



HAL
open science

Evaluation des effets anticancéreux de composés pharmacologiques sur les cellules souches cancéreuses et leurs descendants : caractérisation des mécanismes moléculaires

Sarah Ali-Azouaou

► **To cite this version:**

Sarah Ali-Azouaou. Evaluation des effets anticancéreux de composés pharmacologiques sur les cellules souches cancéreuses et leurs descendants : caractérisation des mécanismes moléculaires. Cancer. Université de Strasbourg, 2015. Français. NNT : 2015STRAJ087 . tel-01394378

HAL Id: tel-01394378

<https://theses.hal.science/tel-01394378>

Submitted on 9 Nov 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé

Laboratoire d'innovation thérapeutique
UMR CNRS 7200 - Faculté de Pharmacie

THÈSE présentée par :

Sarah ALI-AZOUAOU

Soutenue publiquement le **18 décembre 2015**

Pour l'obtention du grade de : **DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE STRASBOURG**

Discipline : Sciences du Vivant – Aspect Moléculaire et Cellulaire de la Biologie

Spécialité : Pharmacologie

*Évaluation des effets anticancéreux de composés pharmacologiques
sur les cellules souches cancéreuses et leurs descendants;
caractérisation des mécanismes moléculaires*

THÈSE dirigée par :

Directeur : Dr Christian MULLER, Université de Strasbourg
Co-directrice : Pr Annelise LOBSTEIN, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Rapporteur externe : Dr Patrice PETIT, Université de Paris
Rapporteur externe : Dr Nadine MARTINET, Université de Nice

AUTRES MEMBRES DU JURY :

Examineur externe : Dr Gérard LIZARD, Université de Bourgogne
Examineur interne : Pr Jean-Marie REIMUND, Université de Strasbourg

Remerciements

Je tiens d'abord à exprimer mes remerciements les plus sincères à mes directeurs de thèse qui, par leur aide et leur disponibilité m'ont permis d'accomplir cette thèse. Je remercie mon directeur de thèse le **Docteur Christian MULLER** de m'avoir donné l'opportunité de rejoindre son laboratoire, pour l'aide compétente qu'il m'a apportée, pour sa patience et ses encouragements. Je remercie également le **Professeur Annelise LOBSTEIN** pour m'avoir conseillée, encouragée et soutenue tout au long de ma thèse avec patience et disponibilité, et pour la confiance qu'elle m'a accordée.

Je remercie très chaleureusement les membres de jury le **Docteur Patrice PETIT**, le **Docteur Nadine MARTINET**, le **Docteur Gérard LIZARD** et le **Professeur Jean-Marie REIMUND** de me faire l'honneur de siéger dans mon jury et d'avoir accepté d'évaluer mon travail. Qu'ils trouvent ici le témoignage de ma profonde reconnaissance.

Je remercie grandement le **Docteur Guy FUHRMANN**, qui a été mon tuteur de Master à mon arrivée au laboratoire. C'est lui qui m'a initiée à la recherche. Je lui dois mes premiers pas dans le monde de la recherche. Tout au long de ces années de thèse, il a orienté mon travail par la pertinence de ses remarques et de ses suggestions. Il m'a toujours apporté son soutien et son appui scientifique. Qu'il retrouve ici le témoignage de ma gratitude.

Je remercie aussi le **Professeur Marcel HIBERT** pour son accueil au sein de l'UMR 7200, son soutien et sa sympathie.

Je remercie particulièrement le **Professeur Valérie SCHINI-KERTH** de l'UMR 7213, pour sa collaboration au cours de ma thèse.

Merci également aux personnels techniques du laboratoire d'innovation thérapeutique et du laboratoire biophotonique et pharmacologie, et plus particulièrement **Evelyne LACOFFRETTE**, pour son aide et sa gentillesse.

Mes remerciements vont aussi à **tous les membres des équipes dirigées par les Pr LOBSTEIN et Pr SCHINI-KERTH**, et plus particulièrement **Fathi EMHEMMED**, pour son aide, sa sympathie et ses encouragements constants.

Je remercie du plus profond de mon cœur **toute ma famille**, et en particulier **mes parents**. Leur appui, leur tendresse, leur amour me portent et me guident tous les jours. Merci pour avoir fait de moi ce que je suis aujourd'hui. Merci pour tout ce que vous avez pu m'offrir, je vous en suis éternellement reconnaissante. Merci. Je vous aime.

Enfin, un grand merci également à mon cher mari **Noureddine**, sans qui cette thèse n'aurait jamais vu le jour. Pour son aide et son soutien, pour avoir partagé avec moi son savoir et son expérience. Merci de me combler de son amour et d'être à mes côtés, particulièrement dans les moments les plus difficiles. Un grand merci. Je t'aime.

Publications

- 1- Sarah Ali Azouaou**, Fathi Emhemmed, Noureddine Idris-Khodja, Annelise Lobstein, Valérie Schini-Kerth, Christian D. Muller, Guy Fuhrmann. Selective ROS-dependent p53-associated anticancer effects of the hypoxoside derivative rooperol on human teratocarcinomal cancer stem-like cells. **Investigational New Drugs**, 2015, 33:64-74.
- 2- Fathi Emhemmed, Sarah Ali Azouaou**, Frédéric Thuaud, Valérie Schini-Kerth, Laurent Désaubry, Christian D. Muller, Guy Fuhrmann. Selective anticancer effects of a synthetic flavagline on human Oct4-expressing cancer stem-like cells via a p38 MAPK-dependent caspase-3-dependent pathway. **Biochemical Pharmacology**, 2014, 89:185-196.
- 3- Sarah Ali Azouaou**, Fathi Emhemmed, Valérie Schini-Kerth, Christian D. Muller, Annelise Lobstein, Guy Fuhrmann. Fak activity regulates Oct4 expression in teratocarcinomal stem-like cells (en préparation).
- 4- Sarah Ali Azouaou**, Olivier Noté, Guy Fuhrmann, Christian D. Muller, Annelise Lobstein. A new acacic acid-type saponin from *Albizia coriaria* induces apoptosis in human malignant melanoma cell lines. (en préparation).
- 5- Fathi Emhemmed, Sarah Ali Azouaou**, Valérie Schini-Kerth, Christian D. Muller, Laurent Désaubry, Guy Fuhrmann. Bad phosphorylation is required for the protection of human normal fibroblast cells against the cytotoxic effects of the anticancer synthetic flavagline FL3 (en préparation).
- 6- Fathi Emhemmed, Sarah Ali Azouaou**, Valérie Schini-Kerth, Christian D. Muller, Laurent Désaubry, Guy Fuhrmann. Pro-differentiating properties of the synthetic flavagline FL3 on teratocarcinomal stem-like cells (en préparation).
- 7- Olivier Noté; Sarah Ali Azouaou**, Line Simo, Cyril Antheaume, Dominique Guillaume, Dieudonné Pegnyemb, Christian Muller, Annelise Lobstein. Phenotype-specific Apoptosis Induced by Triterpenoid Saponins from *Albizia glaberrima* (Schumach. & Thonn.) Benth. **Fitoterapia** (soumis).

Communications orales

Ali Azouaou S, Emhemmed Fathi, Idris-Khodja Nouredine, Lobstein Annelise, Schini-Kerth Valérie, Muller Christian D and Fuhrmann Guy. Potentiel anticancéreux de substances naturelles : exemple du roopérol. Plant Biology Day 2014. Strasbourg, France October 30-10,20014

Ali Azouaou S, Emhemmed Fathi, Idris-Khodja Nouredine, Lobstein Annelise, Schini-Kerth Valérie, Muller Christian D and Fuhrmann Guy. Selective ROS-dependent p53-associated anticancer effects of the hypoxoside derivative rooperol on human teratocarcinomal cancer stem-like cells. Chemical Approaches to Targeting Drug Resistance in Cancer Stem Cells COST Action CM1106. Barcelona, Spain January 19-20, 2015

Fathi Emhemmed, **Sarah Ali Azouaou**, Christian D. Muller, Guy Fuhrmann. Anticarcinogenic effects of flavaglines.13^{ème} journée scientifique de la ligue contre le cancer. 29 November 2012, Illkirch, France.

Communications écrites

Sarah Ali Azouaou, Fathi Emhemmed, Guy Fuhrmann, Jean Pelluso, Serge Dumont, Annelise Lobstein, Christian D. Muller. Role of transcription factor Oct4 in pro-apoptotic selectivity of cancer stem cells. Canceropole Grand Est. 13-14 November 2012, Strasbourg, France.

Sarah Ali Azouaou, Olivier Placide Noté, Line Simo, Cyril Antheaume, Dominique Guillaume, Dieudonné Emmanuel Pegnyemb, Christian D. Muller, and Annelise Lobstein. Three new triterpenoid saponins from *Albizia glaberrima* roots specifically induce apoptosis in human pancreatic adenocarcinoma cells. **PhytoDay. 2015 , Strasbourg , France.**

Abréviation

A

ABC	ATP Binding Cassette
AIF	Apoptosis Inducing Factor
ALDH	Aldéhyde déshydrogénase
Apaf-1	Protease-activating factor-1
APC	Adenomatous polyposis coli
AR	Acide rétinoïque
ATRA	Acide tout-trans-rétinoïque
AXIN	Axis inhibition protein

B

Bad	Bcl-2-associated death promoter
Bax:	Bcl-2-associated X protein
Bid:	BH3 interacting-domain death
Bmi-1:	Polycomb complex protein
BMP	Bone Morphogenetic Protein
Bcl-2	B-cell lymphoma-2
Bcl-xL	B-cell lymphoma-extra large

C

CaMKII γ	Ca ²⁺ /calmoduline-dependent protein kinase II γ
CC	Cellule Cancéreuse
CE	Carcinome Embryonnaire
CN	Cellule Normale
CS	Cellule Souche
CSC	Cellule Souche Cancéreuse
CSE	Cellule Souche Embryonnaire
CSL	CBF1 Suppressor of Hairless Lag-1
CSN	Cellule Souche Normale

CST Cellule Souche T ratocarcinomale

D

DED Death Effector Domain

Dhh Desert Hedgehog

DISC Death-inducing signaling complex

DSH Disheveled

E

EGFR Epidermal Growth Factor Receptor

ESA Epithelial Surface Antigen

F

FAK Focal Focal Adhesion Kinase

FADD Fas-Associated protein with Death Domain

FLIP FLICE-inhibitory protein

FZD Frizzled

G

GCNF Germ Cell Nuclear Factor

GSK3  Glycogen Synthase Kinase 3 

Gli Glioma associated oncogene homolog

H

H₂O₂ Peroxyde d'hydrogène

I

ICM Inner Cell Mass

Ihh Indian Hedgehog

iPSC Induced Pluripotent Stem Cells

J

JAK Janus Kinase

L

LIF	Leukemia Inhibiting Factor
LRH-1	Liver Receptor Homolog-1
LRP	Low-density lipoprotein Receptor- related Protein

M

MAML	Co-factor Mastermind-like
MDR	MultiDrug Resistance
miARN	MicroARN

N

NADPH	Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate
NICD	Notch IntraCellular Domain

O

Oct4	Octamer-binding transcription factor
OMS	Organisation Mondiale de la Santé

P

PKA	Protéine Kinase A
POU	Pituitary-specific Octamer and neural Unc-86 transcription factors
Ptc	Patched
p38 MAPK	p38 mitogen-activated Protein kinase

R

RARs	Retinoic Acid Receptor
ROS	Reactive Oxygen Species

S

SAHA	Suberoylanilide hydroxamic acid
SF-1	Steroidogenic Factor 1
Smac/DIABLO	Second mitochondria-derived activator of caspase
SOD	Superoxyde Dismutase
Sox2	SRY (SEX determining Region Y) –box2
STAT3	Signal Transducer and Activator of Transcription
Shh	Sonic Hedgehog
SMO	Smoothened
SP	Sous Population
SUMO-1	Small Ubiquitin-related Modifier-1
Sufu	Suppressor of fused

T

TCF	T-cell specific transcription factor
TEM	Transition Epithélio-Mésenchymateuse
TNF	Tumor Necrosis Factor
TRAIL	TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand
TCFR1	T-cell specific transcription factor Receptor

W

WWP2	WW domain-containing Protein, 2
------	---------------------------------

Résumé

Ce travail de thèse a pour objectif d'évaluer les propriétés anticancéreuses de différentes substances naturelles, issues de plantes, sur les cellules souches cancéreuses (CSCs) et leurs descendants. Les CSCs se caractérisent par différents marqueurs moléculaires permettant leur identification dans de nombreux tissus cancéreux. Ces cellules sont considérées comme les cellules initiatrices du cancer et sont suspectées d'être responsables de la résurgence du processus cancéreux et de la résistance aux protocoles classiques de chimio- et radio-thérapie. Nous avons centré dans un premier temps nos efforts sur des modèles de CSCs peu différenciées, possédant une forte expression du facteur central de souche, à savoir Oct4. Ce facteur de transcription est connu pour être essentiel au maintien de la pluripotence à spectre large et de l'auto-renouvellement des cellules souches normales (CSNs). Il a cependant été montré qu'Oct4 est exprimé dans de nombreux cancers et qu'il contribue au développement de tumeurs présentant un phénotype peu différencié et très agressif. Une répression de l'expression d'Oct4, suite à l'administration d'agents pharmacologiques potentiellement anticancéreux, laisse donc présager que les cellules concernées rentrent en apoptose ou se différencient.

A cet effet, nous avons examiné l'activité antinéoplasique sélective du **roopérol**. Il s'agit d'une substance rattachée au groupe phytochimique des norlignanes et obtenue après hydrolyse intestinale par une β -glucosidase, de l'hypoxoside, un composé inactif identifié dans une plante médicinale africaine, *Hypoxis hemerocallidea* Fisch. & C.A. Mey (Hypoxidaceae). Notre étude a été menée sur des modèles de cellules pluripotentes tératocarcinomaux humaines exprimant Oct4, ainsi que sur la lignée de cellules fibroblastiques BJ qui représente un modèle de CSNs à

potentialités restreintes de différenciation. Nous avons constaté que le roopérol inhibe sélectivement la prolifération des cellules tératocarcinomales et ceci de manière concentration-dépendante. Fait intéressant, cette molécule n'a aucun effet sur les cellules fibroblastiques. Cette inhibition de la prolifération cellulaire s'accompagne d'une production accrue d'espèces réactives de l'oxygène et d'une altération du potentiel de la membrane mitochondriale. De plus, le roopérol déclenche un processus pro-apoptotique, comme le montrent les tests d'Annexine V-FITC/propidium d'iodure. L'apoptose ainsi induite est associée à une augmentation des niveaux d'expression de p53, de la caspase-3 clivée et de la poly ADP ribose polymérase de type 1 clivée. Ces modifications sont accompagnées par une chute des niveaux d'expression d'Oct4 et de ses deux partenaires impliqués dans le maintien de la pluripotence et l'auto-renouvellement des CSCs, à savoir les facteurs Nanog et Sox2. Un traitement par des piègeurs intracellulaires d'anion superoxyde ($\cdot\text{O}_2^-$) empêche l'apoptose et la régulation positive de l'expression de p53 et de la caspase-3 clivée induite par le roopérol. Ainsi nos résultats indiquent que ce composé a des effets antiprolifératifs sur les CSCs, en déclenchant un stress oxydatif mitochondrial initiateur d'une activation du suppresseur de tumeur p53. Ayant observé que le roopérol n'exerce aucune activité pro-apoptotique sur les CSNs, nous avons cherché à identifier les mécanismes moléculaires qui expliquent sa sélectivité d'action vis-à-vis des CSCs. Des expériences complémentaires ont d'abord permis de confirmer l'absence d'activité délétère du composé sur les fibroblastes. En effet, le roopérol n'y induit aucune perturbation mitochondriale. De façon intéressante, nous avons constaté ensuite que le composé pharmacologique induit dans les cellules fibroblastiques une phosphorylation à la fois de la protéine régulatrice de l'apoptose BAD (au niveau de la sérine 112), et de la protéine de survie Akt (au niveau de la sérine 473), alors que ces protéines restent non phosphorylées dans les CSCs. En fait, le roopérol aurait un effet protecteur sur les cellules

fibroblastiques. En effet, ce composé empêche leur apoptose consécutive à l'augmentation des niveaux d'expression de la p53 induite par le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Ceci indique bien que le roopérol joue un rôle protecteur contre l'effet délétère du stress oxydant dans les cellules normales.

Dans un deuxième temps, nous avons évalué le potentiel anticancéreux de plusieurs hétérosides triterpéniques issus de différentes espèces d'*Albizzia* africaines, appartenant à la famille des Mimosacées. Pour cela, nous avons utilisé un modèle cellulaire de carcinome épidermoïde (A431) et de mélanome métastatique (A375) constitué d'une population hétérogène de CSCs et de cellules cancéreuses. La lignée de cellules non cancéreuses TE 353.SK a servi de contrôle négatif. Dans le but de sélectionner la molécule la plus active puis d'en explorer les mécanismes d'action, nous avons procédé tout d'abord à un criblage de l'activité pro-apoptotique d'une dizaine de composés purifiés. Nos résultats montrent que les dérivés triterpéniques de type avicine (hétérosides tridesmosidiques de l'acide acacique, présents dans certaines Mimosacées) possèdent des effets pro-apoptotiques notables. La détermination de leur EC₅₀ démontre qu'un composé, baptisé coriaroside (carisolé de l'espèce *Albizzia Coriaria* Welw. Ex Oliv. (Mimosaceae) s'avère le plus actif. De manière intéressante, ce composé exerce de façon concentration-dépendante une activité antiproliférative sélective sur les lignées cancéreuses, sans effet notable sur la lignée normale. Cet effet pro-apoptotique est associé à une diminution du potentiel membranaire mitochondrial et est accompagné d'une augmentation de l'activité de la caspase-8. L'inhibition de l'activité de la caspase-8 par un inhibiteur à large spectre a permis de contrecarrer les effets pro-apoptotiques du coriaroside, indiquant que cet hétéroside triterpénique

induit l'apoptose des cellules de mélanome via l'activation de la caspase-8. De plus, nous avons observé que le coriaroside est susceptible d'induire une activation de la voie de signalisation impliquant la MAPK p38 et une diminution de l'expression du facteur de souchitude Oct4. Finalement cette étude a démontré que le coriaroside est un puissant agent anticancéreux capable de supprimer une population hétérogène de cellules issues de carcinome épidermoïde ou de mélanome.

Ce travail de thèse a été complétée par une étude consacrée à l'analyse de l'impact qu'un traitement par l'agent de différenciation **ATRA** (connu sous le nom de *all-trans* retinoic acid, un métabolite de la vitamine A) pourrait avoir sur les mécanismes régulateurs d'Oct4 dans un modèle de cellule souche tératocarcinomale. Comme attendu, le traitement par ATRA réprime l'expression d'Oct4 au niveau transcriptionnel et traductionnel. Cet effet s'accompagne d'une diminution de l'expression de l'E-cadherine et d'une augmentation de l'expression de la N-cadherine, indiquant une différenciation en cellules souches neurales. De façon intéressante, le criblage des niveaux d'expression des protéines qui potentiellement seraient associées à cette différenciation, a permis de montrer une accumulation de la forme phosphorylée de la FAK (au niveau de la tyrosine 861). Partant de ces données, nous avons focalisé notre étude sur les interactions que la FAK et Oct4 pourraient avoir. De façon surprenante, nous avons constaté qu'une répression de l'expression de FAK (obtenue par un traitement avec des ARN interférents spécifiques) interférait avec le processus pro-différenciateur d'ATRA. Cet effet est associé à une chute accélérée de l'expression d'Oct4, tant au niveau transcriptionnel que traductionnel. Ces résultats démontrent donc que l'inhibition de l'activité de la FAK dérégule le processus de différenciation induite par ATRA en ciblant les mécanismes fins de régulation génique d'Oct4.

Cette dérégulation aboutit en effet à l'installation d'un processus pro-apoptotique. Par extrapolation, nous suggérons que l'utilisation des composés agissant spécifiquement sur la FAK serait susceptible de cibler les CSCs exprimant Oct4, en induisant, entre autres, un processus pro-apoptotique qui pourrait accompagner la différenciation.

En conclusion, ces travaux de recherche effectués dans le cadre de ma thèse de doctorat auront permis de mettre en évidence de nouveaux et puissants composés anticancéreux, capables d'induire sélectivement l'apoptose des CSCs et leurs descendants, tout en épargnant les CSNs et leurs descendants. Ces composés, que ce soit le roopérol ou le coriaroside, agissent par leurs effets antiprolifératifs. D'autres molécules (comme les ARN interférents dirigés contre la FAK), en ciblant le processus de différenciation et les mécanismes régulateurs d'Oct4, représentent une alternative prometteuse à la thérapie agressive de destruction cellulaire qui, si elle est instaurée de façon chronique, présente toujours des effets secondaires délétères.

Table des Matières

Remerciements	1
Publications et communications scientifiques	iii
Abréviation	v
Résumé	ix
I. Introduction	1
I.1. Généralités sur le cancer	1
I.2. Biologie de la cellule souche normale (CSN)	2
I.3. Les cellules souches cancéreuses	3
I.3.1. Historique de la cellule souche cancéreuse	3
I.3.2. Hétérogénéité de la population des CSCs	5
I.3.2.1. Modèle stochastique ou modèle de l'évolution clonale	5
I.3.2.2. Modèle hiérarchique	6
I.3.3. Caractéristiques de la cellule souche cancéreuse	7
I.3.3.1. Auto-renouvellement et différenciation	8
I.3.3.1.1. Rôle des voies de signalisation	8
I.3.3.1.1.1. La voie Notch	9
I.3.3.1.1.2. La voie Sonic Hedgehog (Shh)	10
I.3.3.1.1.3. La voie Wnt/β-caténine	12
I.3.3.1.2. Rôle des facteurs de transcription	13
I.3.3.1.2.1. Oct4	13
I.3.3.1.2.2. Nanog	17
I.3.3.1.2.3. Sox2	18
I.3.3.2. Résistance aux traitements anti-tumoraux	20

I.3.3.3. Induction des métastases tumorales	22
I.3.4. La cellule souche cancéreuse tératocarcinomale	24
I.3.4.1. Généralités	24
I.3.4.2. Utilisation comme modèle	25
I.4. Stratégie pour cibler les CSCs	25
I.4.1. Induction de l'apoptose	25
I.4.1.1. La voie intrinsèque	26
I.4.1.1.1. Généralités	26
I.4.1.1.2. Stress oxydant	27
I.4.1.1.3. Le gène suppresseur de tumeurs p53	28
I.4.1.1.4. p38 MAPK	28
I.4.1.2. La voie extrinsèque	29
I.4.2. Blocage de l'auto-renouvellement	31
I.4.2.1. Induction de la différenciation	31
I.4.2.2. Ciblage direct de l'auto-renouvellement	33
I.4.3. Ciblage des marqueurs de surface des CSCs	35
I.5. Le cancer de la peau	36
I.5.1. Généralités	36
I.5.2. Types des cancers cutanés	36
I.5.2.1. Les carcinomes cutanés	36
I.5.2.2. Les mélanomes	37
I.5.3. Les cellules souches cancéreuses dans les cancers cutanés	38
I.6. Produits naturels et thérapies anticancéreuses	39
I.6.1. Roopérol	40
I.6.2. Acide rétinoïque	41

I.6.2. Les dérivés triterpéniques de type avicine	42
II. Objectifs des études expérimentales	45
III. Résultats	47
III.1. Article 1	48
III.2. Article 2	61
III.3. Article 3	85
IV. Discussion générale & perspectives	110
Références bibliographiques	116
Articles annexes	134

Liste des Figures

Figure 1 : Potentiel de différenciation et hiérarchie de la cellule souche.	3
Figure 2 : Modèle de l'hétérogénéité tumorale.	7
Figure 3 : Schéma de la voie de signalisation de Notch.	10
Figure 4 : Schéma de la voie Sonic Hedgehog (Shh).	11
Figure 5 : Schéma de la voie de signalisation Wnt/β-caténine	12
Figure 6 : Différents niveaux d'expression d'Oct4 dans les CSEs <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i>.	15
Figure 7 : Représentation schématique des deux voies pro-apoptotiques.	31
Figure 8 : Les stratégies pharmacologiques permettant de cibler les CSCs.	33
Figure 9 : Les réseaux de régulation d'Oct4.	34
Figure 10 : Structure chimique du roopérol	40
Figure 11 : Structure chimique de l'acide rétinoïque all trans	41
Figure 12 : Structure chimique de dérivés de l'acide acacique (avicines D et G).	43

I. Introduction

I.1. Généralités sur le cancer

Le cancer est une pathologie caractérisée par une prolifération cellulaire anarchique non contrôlée. Cette prolifération est due à l'acquisition de mutations ou à des modifications épigénétiques impliquées dans la progression tumorale. L'ensemble de ces modifications confère à la cellule cancéreuse (CC) des comportements anormaux lui permettant de se diviser de manière illimitée et d'échapper aux signaux antiprolifératifs et apoptotiques (Hanahan and Weinberg, 2011).

Les principaux gènes impliqués dans le développement tumoral sont les oncogènes et les gènes suppresseurs des tumeurs qui régulent la prolifération et la croissance tumorales. Malgré des décennies d'études approfondies, les processus impliqués dans la transformation carcinogénique des cellules normales (CNs) en cellules malignes restent largement mal compris et sujets à controverse. Le concept actuel postule que l'initiation d'un cancer n'est pas le résultat d'une mutation d'un seul gène mais plutôt l'association de plusieurs altérations qui entraînent l'activation des gènes oncogènes et/ou l'inactivation des gènes suppresseurs de tumeurs (Costello and Franklin, 2012).

Il existe plus d'une centaine de cancers, définis en fonction des caractéristiques de la cellule dont ils sont issus. En 2012, L'OMS constate plus de 14 millions de nouveaux cas et 8,2 millions de décès imputés à une pathologie cancéreuse. L'OMS souligne que l'incidence du cancer augmenterait d'environ 70% dans les deux prochaines décennies.

Actuellement, de nouvelles cibles moléculaires de la thérapie anticancéreuse ont été découvertes, suite au développement de nouveaux outils et à différentes améliorations technologiques (Loeb and Harris, 2008). Une meilleure compréhension des mécanismes impliqués lors du processus de la carcinogénèse, de la prolifération métastatique et de la

résistance aux traitements a ainsi permis de développer des approches thérapeutiques innovantes qui visent plus spécifiquement les caractéristiques phénotypiques de la cellule initiatrice du cancer, à savoir la cellule souche cancéreuse (CSC).

I.2. Biologie de la cellule souche normale (CSN)

Les cellules souches (CSs), selon leurs potentialités, peuvent donner naissance à un, plusieurs ou tous les types de cellules de l'organisme. Il est maintenant admis que les CSCs proviennent des cellules souches normales (CSNs) exposées à des mutations ou à des signaux prolifératifs incontrôlés (Bonnet and Dick, 1997). Les CSs ont été identifiées dans de très nombreux tissus de l'organisme, tels que la moelle osseuse, le tube digestif, le cerveau, la peau,...etc. Ces cellules sont caractérisées par deux propriétés essentielles qui sont l'auto-renouvellement et la différenciation. L'auto-renouvellement est un processus qui permet à une CS de se diviser pour donner deux copies de CSs filles. La différenciation est l'habilité d'une CS de générer un ou plusieurs types cellulaires de potentialités de plus en plus restreintes selon leurs origines (Beck and Blanpain, 2013; Morrison and Spradling, 2008).

Malgré la grande variété cellulaire des tissus, toutes les cellules dérivent d'un ovule fécondé qui correspondait à l'origine à une seule CS totipotente. Chez l'homme, quatre jours après la fécondation, les CSs totipotentes filles subissent plusieurs mitoses pour former des cellules identiques ayant perdu leur fort potentiel de prolifération et commençant à se spécialiser en devenant des CSs pluripotentes, qui sont à l'origine des tissus participant à la formation de l'embryon. Ces CSs pluripotentes continuent à se diviser et donnent des CSs multipotentes. Par la suite, ces cellules multipotentes deviennent encore plus spécialisées et donnent naissance à des cellules progénitrices ou CSs unipotentes, qui sont capables de se différencier en un seul type cellulaire (Voir Figure 1) (Slack, 2008).

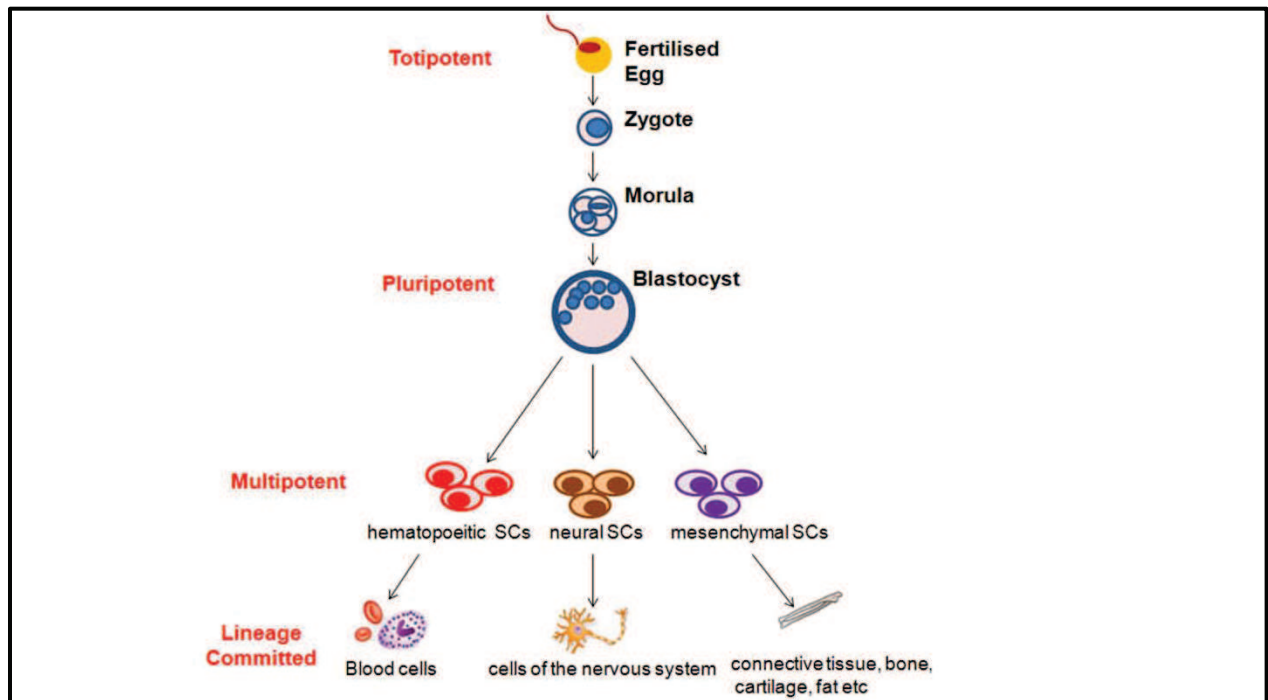


Figure 1 : Potentiel de différenciation et hiérarchie de la cellule souche.

Les cellules embryonnaires pluripotentes possèdent une forte capacité de différenciation et génèrent en bout de course des cellules unipotentes spécialisées (Modifié d'après Hayes et al., 2012)

I.3. Les cellules souches cancéreuses

I.3.1. Historique de la cellule souche cancéreuse

Le premier indice de l'existence des CSCs a été présenté en 1858 par Rudolph Virchow qui soupçonnait qu'un cancer résulte d'une prolifération de cellules de type embryonnaire. Cette hypothèse a été mise en évidence par la ressemblance des caractéristiques d'un tératome et d'un fœtus en développement (Virchow, 1989). Dans les années suivantes, le cancer a été peu étudié en raison de la primauté de plusieurs pandémies infectieuses (comme le typhus, la peste et la grippe). Ce n'est que cinquante ans plus tard que des études sur les tératocarcinomes et les carcinomes hépatocellulaires ont été reprises dans le cadre du développement de nouvelles thérapies anticancéreuses. En 1994, l'équipe de John Dick a suggéré pour la première fois l'existence des CSCs dans les leucémies. Elle a en effet démontré que la transplantation d'une cellule de leucémie myéloïde aiguë humaine est

capable de reformer une leucémie chez des souris immunodéprimées NOD/SCID. L'identification de ces cellules de leucémie chez la souris sur la base des marqueurs de surface cellulaire a démontré qu'elles expriment toute le même phénotype CD34⁺ et CD38⁻ (Lapidot et al., 1994). L'hypothèse qu'une CS leucémique soit capable de reproduire une leucémie a été étendue sur d'autres modèles de tumeurs solides. Les techniques de tri cellulaire ont ainsi permis de mettre en évidence de nouveaux marqueurs de surface cellulaire qui identifient les CSCs dans les tumeurs solides. A titre d'exemple, les CSCs du cancer du sein ont été identifiées sur la base phénotypique CD44⁺/CD24^{low}. Ces cellules sont capables d'induire une tumeur chez des souris immunodéprimées. En revanche, les autres cellules présentes dans le cancer du sein n'en sont pas capables (Al-Hajj et al., 2004; Ginestier et al., 2007). Des CSCs ont également été identifiées par leur expression de CD133 dans plusieurs tumeurs solides, telles que le gliome (Singh et al., 2003), le cancer du côlon (O'Brien et al., 2007) ou le cancer du pancréas (Hermann et al., 2007). Dans une autre étude, une sous-population (SP) de CSCs hautement tumorigènes a été isolée à partir de CCs pancréatiques et exprime les marqueurs de surface CD44, CD24 et ESA (epithelial surface antigen). Cette SP présente une grande capacité de reformer une tumeur suite à une greffe chez une souris immunodéficente (Li et al., 2007). Des CSCs isolées à partir du cancer de la prostate et exprimant le marqueur CD34 sont également capables de reformer la tumeur lorsqu'elles sont transplantées chez des souris immunodéprimées (Collins et al., 2005). Des CSCs ont été également identifiées dans divers types de tumeurs solides, à savoir les cancers du foie (Yang et al., 2008), des poumons (Eramo et al., 2008) et des ovaires (Szotek et al., 2006) ainsi que dans les mélanomes (Schatten et al., 2008). Dans tous les cas, les CS tumorales présentent les mêmes caractéristiques que celles des CS normales, à savoir un phénotype immature, la capacité d'auto-renouvellement et un potentiel de différenciation. A titre d'exemple, des CS

tumorales cérébrales isolées d'un patient peuvent former des sphères ayant à terme la même hétérogénéité phénotypique que celle trouvée dans la tumeur parentale.

I.3.2. Hétérogénéité de la population des CSCs

Depuis longtemps, il a été reconnu que les cellules tumorales ne sont pas toutes identiques et que dans certains cancers tels que le tératocarcinome, une proportion de cellules tumorales est plus différenciée que d'autres. Ce qui a conduit au postulat que les cellules tumorales peuvent être dans un état plus ou moins différencié et que cet état reflète une potentialité de souche plus ou moins large. L'hétérogénéité des CSCs serait en fait apportée par des différences intrinsèques et micro-environnementales (Valent et al., 2012). Les différences intrinsèques proviennent des modifications génétiques ou épigénétiques alors que les interactions cellule-cellule, les divers facteurs chimiotactiques, les concentrations de cytokines et la niche sont considérés comme des différences micro-environnementales (Bomken et al., 2010). Ces variations conduisent à des différences de prolifération, de potentiel de différenciation, de capacité invasive et de réponse aux thérapies (Pietras, 2011). Comme les tumeurs sont formées de cellules présentant des caractéristiques phénotypiques et génotypiques différentes (Visvader, 2011), deux modèles ont été proposés pour expliquer l'hétérogénéité et la croissance tumorale (Voir figure 2).

I.3.2.1. Modèle stochastique ou modèle de l'évolution clonale

Dans ce modèle, l'acquisition successive de mutations génétiques (Gonzalvo and Jones, 1997) ou épigénétiques (Baylin and Jones, 2011) est le fondement de la théorie de l'évolution clonale, dans laquelle les cellules de la population clonale dominante possèdent toutes un potentiel tumorigène semblable, ce qui signifie que la plupart de ces cellules ont la même

capacité de prolifération et de régénération de la tumeur (Nowell, 1976; Visvader and Lindeman, 2012). Cependant une hétérogénéité cellulaire plus grande à l'intérieur d'une tumeur peut également s'installer via des mécanismes extrinsèques micro-environnementales qui confèrent des différences phénotypiques et fonctionnelles aux CCs selon leur localisation dans la tumeur (Bissell and Hines, 2011).

I.3.2.2. Modèle hiérarchique

Le modèle hiérarchique postule une organisation hiérarchique des cellules. Seule une petite SP de CCs présente des propriétés tumorigènes et contribue à la croissance de la tumeur. Ce modèle prend en compte le concept de la CSC définissant la tumeur comme un ensemble hiérarchique où les CSCs, à l'instar des CSNs, représentent une SP capable de s'auto-renouveler (et donc capables à elles seules de régénérer la tumeur) et de se différencier. Ces cellules contribuent donc à l'établissement de l'hétérogénéité cellulaire inhérente à la tumeur d'origine avec des phénotypes différents (Visvader and Lindeman, 2012).

Des observations récentes ont révélé que les deux modèles rendant compte de l'hétérogénéité tumorale sont valides. Le modèle tumoral dépendrait en fait du type de tumeur, mais les deux modèles susmentionnés ne s'excluraient pas nécessairement (Pecqueur et al., 2013). Cependant, la question se pose aussi de l'origine des CSCs dans les tumeurs. En effet, deux phénomènes, pouvant en fait coexister, sont envisagés et encore une fois dépendraient du type tumoral. La CSC pourrait ainsi provenir d'une CSN ayant subi une transformation oncogénique, notamment au niveau des voies moléculaires régulant son auto-renouvellement. Elle pourrait aussi être le descendant d'une cellule différenciée ayant accumulé des lésions oncogéniques lui faisant subir une dédifférenciation vers un stade de souche (Campbell and Polyak, 2007).

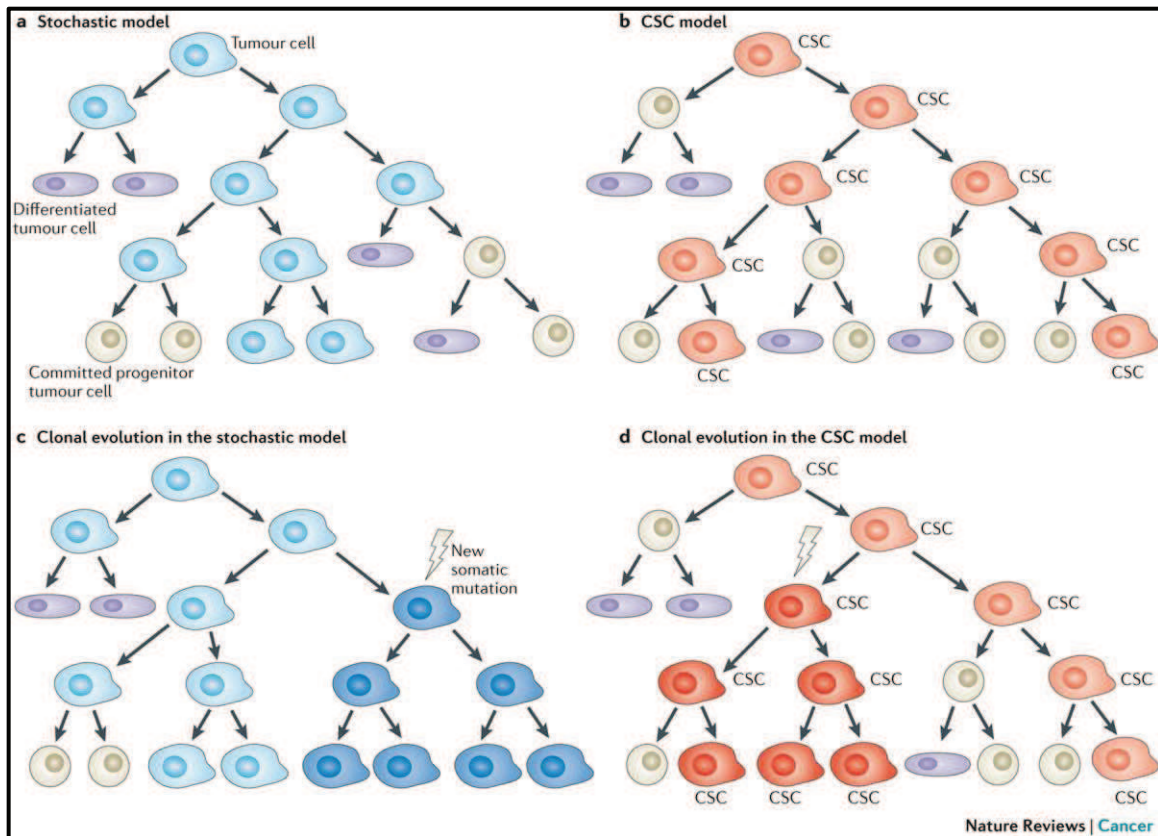


Figure 2 : Modèle de l'hétérogénéité tumorale.

(a) Dans le modèle stochastique de la croissance tumorale, toutes les cellules de la masse tumorale s'auto-renouvellent et se différencient conduisant à la tumorigénicité. (b) Dans le modèle des CSCs de la croissance tumorale, seule une sous-population de cellules tumorales possède la capacité d'auto-renouvellement à long terme. Ces cellules donnent naissance à des progéniteurs à potentiel prolifératif limité avec une éventuelle différenciation. (c) et (d) Dans les deux modèles, des nouvelles mutations somatiques peuvent générer une diversité clonale, ce qui augmente encore l'hétérogénéité tumorale (d'après Beck and Blanpain, 2013).

I.3.3. Caractéristiques de la cellule souche cancéreuse

Les CSCs possèdent des capacités d'auto-renouvellement et de différenciation. La proportion de cette SP de cellules dans une tumeur est variable selon le type et le grade de la tumeur. Ce sont des cellules impliquées dans l'initiation, la croissance et la prolifération métastatique des tumeurs ainsi que dans la résistance aux traitements conventionnels. Ces différentes caractéristiques démontrent le rôle des CSCs dans l'entretien d'une tumeur mais aussi dans la rechute après traitement, d'où l'importance de les identifier afin de développer des traitements anticancéreux appropriés ciblant ces cellules.

I.3.3.1. Auto-renouvellement et différenciation

Comme précisé ci-dessus, la principale caractéristique de la CS est sa capacité de s'auto-renouveler et de se différencier. Ces deux propriétés mettent en jeu un processus particulier de division cellulaire, qui peut être symétrique ou asymétrique. La division symétrique permet de donner deux CSs identiques à la cellule mère, permettant ainsi de croître le stock cellulaire. Dans les conditions physiologiques, les CSs sont soumises à un nombre limité de divisions symétriques ; elles surviennent essentiellement au cours du développement embryonnaire afin de maintenir ultérieurement, après une différenciation plus ou moins soutenue, le pool des différentes lignées souches de l'organisme adulte. Ceci afin de permettre la réparation tissulaire qui se met en place après traumatisme. Au cours du développement, les divisions asymétriques contribuent également à la diversité cellulaire. Elles produisent une cellule fille plus différenciée et une CS fille identique à la cellule mère, permettant ainsi de maintenir l'équilibre cellulaire. A l'âge adulte, ce processus est donc nécessaire pour le maintien de l'homéostasie cellulaire (Tajbakhsh et al., 2009).

L'auto-renouvellement est contrôlé par un réseau de mécanismes extrinsèque et intrinsèque. Il a été montré que leur dérégulation perturbe le processus d'auto-renouvellement et peut conduire à des défauts de développement embryonnaire et être à l'origine du cancer (He et al., 2009).

I.3.3.1.1. Rôle des voies de signalisation

Les voies extrinsèques majeures qui régulent l'auto-renouvellement des CSs sont les voies Wnt/ β -catenin, Notch et Hedgehog.

I.3.3.1.1.1. La voie Notch

La voie de signalisation Notch est impliquée dans la régulation de plusieurs processus cellulaires au cours du développement. Elle régule la prolifération, la différenciation et l'apoptose de divers types cellulaires (Fiuza and Arias, 2007). Notch est un récepteur transmembranaire simple de type I qui fonctionne comme un facteur de transcription activé par un ligand. L'activation de Notch par l'un de ses ligands delta-like (Dll1, Dll2) ou Serrate-like (Jagged1, Jagged2) induit la libération du domaine intracellulaire actif du récepteur "Notch intracellular domain" (NICD) par clivage par la γ secrétase (Gordon et al., 2007). NICD se transloque alors dans le noyau où il forme un complexe activateur en se liant au facteur de transcription de la famille CSL (CBF1 suppressor of Hairless Lag-1) et au cofacteur MAML (co-factor Mastermind-like). Ce complexe actif peut alors recruter des co-activateurs permettant de promouvoir la transcription de gènes impliqués dans la prolifération, la différenciation et l'apoptose cellulaire. En absence de NICD, le facteur de transcription CSL s'associe avec des co-represseurs pour induire la répression des gènes cibles (voir Figure 3) (Kopan and Ilagan, 2009). Des changements dans les niveaux d'expression de Notch ont été observés dans de nombreux cancers tels que le cancer des poumons (Dang et al., 2000), du col de l'utérus (Zagouras et al., 1995) et du foie (Zhu et al., 2015). La répression de l'expression de Notch, Dll ou Jagged par des ARN interférents inhibe la prolifération et induit l'apoptose des lignées cellulaires de gliome (Purow et al., 2005) et des CSCs issus de glioblastomes (Wang et al., 2012).

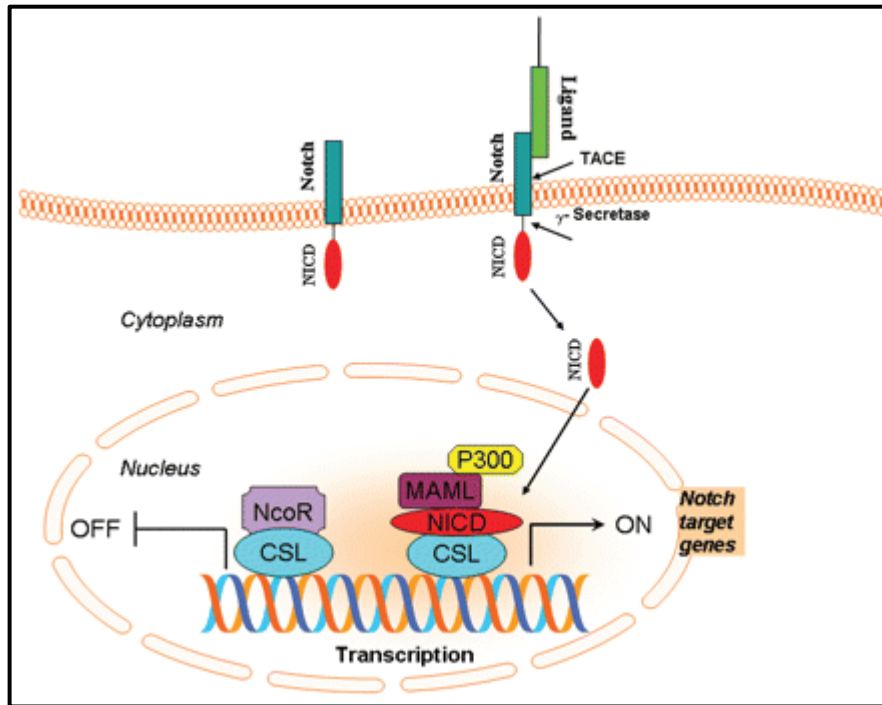


Figure 3 : Schéma de la voie de signalisation de Notch.

L'activation du récepteur Notch par ses ligands entraîne le clivage et la libération de NICD (domaine intracellulaire du récepteur). NICD se transloque alors dans le noyau où il forme un complexe actif avec CSL et MAML. Ce complexe induit l'activation des gènes cibles. En absence de ligands, NICD reste lié au récepteur et la transcription de gènes cibles de Notch est maintenue dans un état inactif (d'après Wang et al., 2011).

I.3.3.1.1.2. La voie Sonic Hedgehog (Shh)

L'activation de la voie de signalisation Shh est initiée par la liaison de l'un des trois ligands solubles (Sonic Hedgehog Shh, Desert Hedgehog Dhh ou Indian Hedgehog Ihh) au récepteur transmembranaire Patched (Ptc). En absence de ligand, Ptc réprime le récepteur transmembranaire couplé à la protéine G Smoothened (SMO). La liaison du ligand lève l'inhibition de SMO et entraîne la dissociation du complexe suppressor of fused (Su(fu)) - glioma associated oncogene homologs (Glis), ce qui permet la translocation de ces derniers dans le noyau et finalement l'activation de divers gènes (voir Figure 4) (McMillan and Matsui, 2012).

La voie de signalisation Shh est essentielle au développement de l'embryon (Ingham and McMahon, 2001). Une activation anormale de la voie Shh induit une progression tumorale en

affectant les processus de prolifération et de migration (Ruiz i Altaba et al., 2007). La voie Shh maintient les propriétés de souche des cellules normales et tumorales, en régulant l'auto-renouvellement et la différenciation. L'inhibition de la voie Shh réduit le nombre des CSCs et limite le potentiel tumorigène des leucémies myéloïdes chroniques (Zhao et al., 2009) et du cancer du sein (Liu et al., 2006).

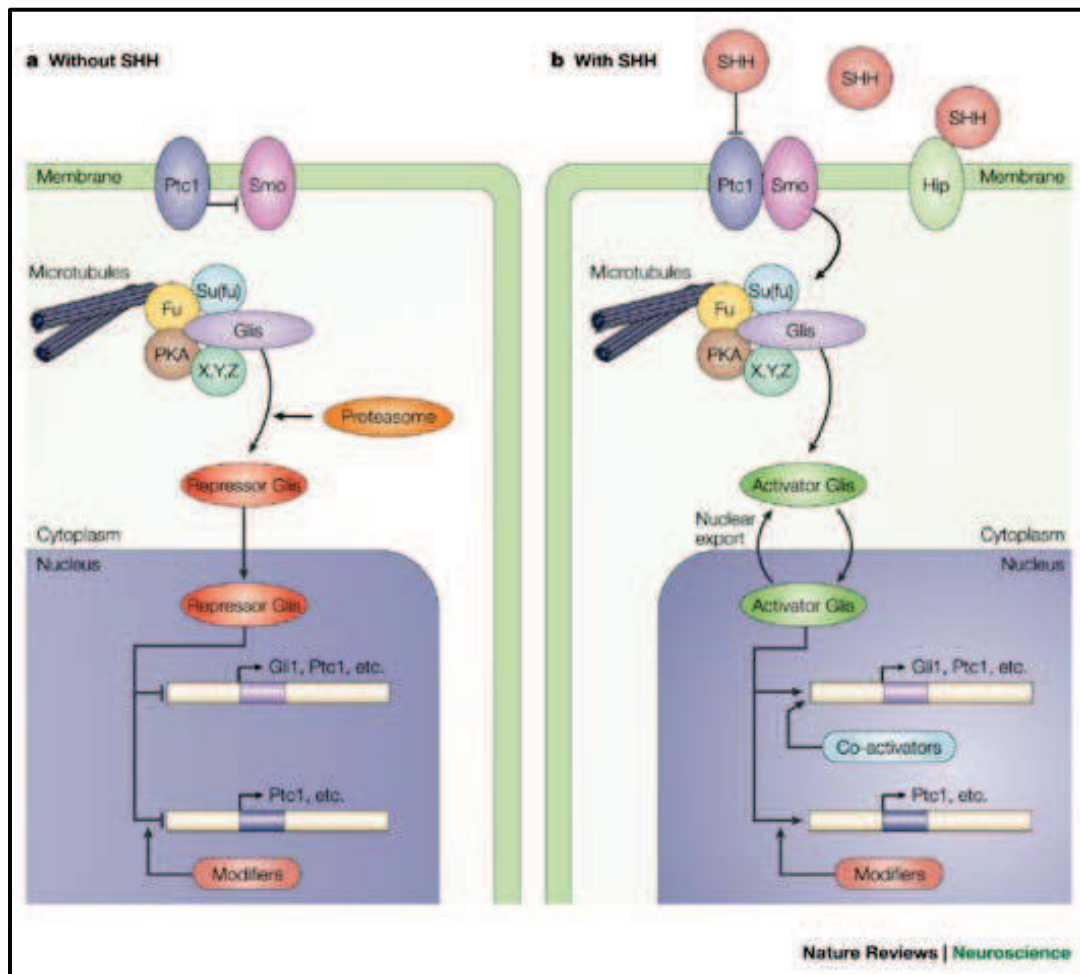


Figure 4 : Schéma de la voie Sonic Hedgehog (Shh).

(a) En absence de Shh, Ptc inhibe SMO. Les protéines Glis sont phosphorylées par la protéine kinase A (PKA) conduisant à leur clivage par le protéasome et à la formation de répresseurs Glis qui transloquent dans le noyau pour réprimer la transcription de gènes cibles. (b) La liaison de Shh à Ptc permet la libération de SMO et la formation d'activateurs Glis inducteurs de la transcription des gènes cibles (d'après Ruiz i Altaba et al., 2002).

I.3.3.1.1.3. La voie Wnt/ β -caténine

En absence de ligand, la β -caténine est associée à un complexe multi-protéique, contenant l'APC (adenomatous polyposis coli), l'AXIN et la GSK3 β (glycogène synthase kinase 3 β), ce qui induit sa phosphorylation, son ubiquitination et sa dégradation par le protéasome. La fixation de Wnt sur son récepteur "Frizzled" (FZD) permet le recrutement du corécepteur LRP 5/6, entraînant l'activation de la phosphoprotéine "disheveled" (DSH). L'activation de DSH induit l'inhibition de la GSK3 β , ce qui réduit la phosphorylation et la dégradation de β -caténine. La β -caténine non phosphorylée s'accumule alors dans le cytoplasme, puis se transloque dans le noyau cellulaire pour se lier au facteur de transcription "T-cell specific transcription factor" (TCF), avec pour conséquence une activation de la transcription des gènes d'intérêt (voir Figure 5) (Blank et al., 2008; Moon et al., 2004).

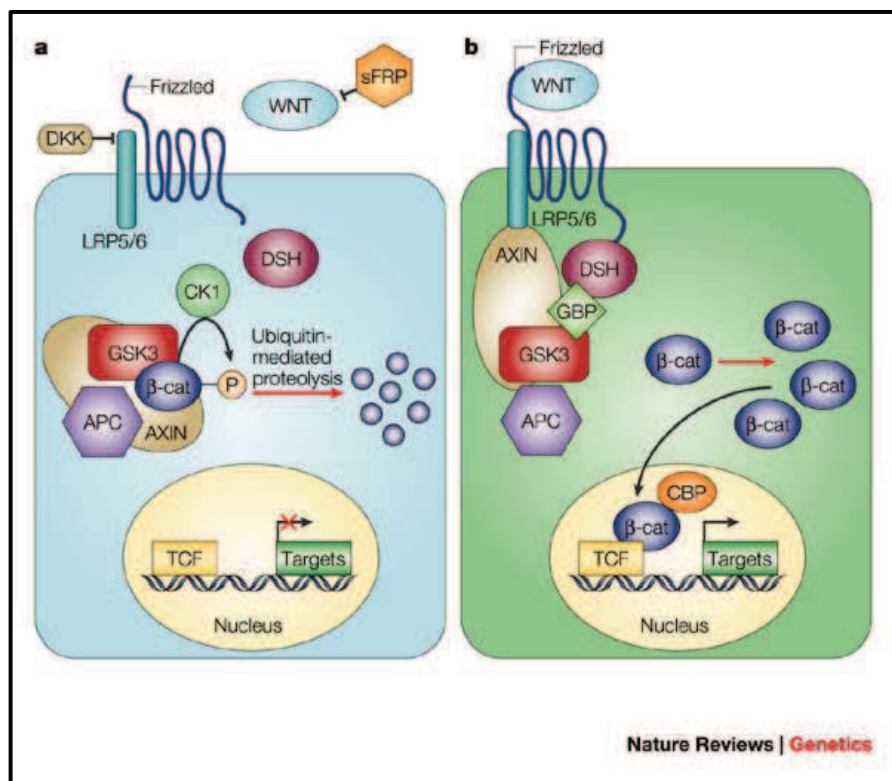


Figure 5 : Schéma de la voie de signalisation Wnt/ β -caténine

a) En absence de Wnt, la β -caténine est dégradée et les gènes cibles potentiels sont dans un état réprimé. b) La liaison de Wnt sur son récepteur Frizzled entraîne l'activation de DSH et l'inhibition de GSK3 β . Ceci réduit la phosphorylation et la dégradation de β -caténine. Comme la β -caténine s'accumule dans le cytoplasme, elle peut ultérieurement transloquer dans le noyau, se lier au TCF et induire la transcription des gènes cibles (d'après Moon et al., 2004).

La voie Wnt/ β -caténine est impliquée dans la prolifération, la différenciation et la motilité cellulaire. L'activation de cette voie et ses conséquences transcriptionnelles est déterminée par l'accumulation nucléaire de β -caténine (van de Wetering et al., 2002). Plusieurs études ont démontré le rôle de la β -caténine dans la régulation de l'auto-renouvellement des CSs et dans le maintien de la pluripotence des cellules souches embryonnaires (CSEs) (Martello et al., 2012; Qiu et al., 2015) et des cellules souches hématopoïétiques (Dolnikov et al., 2014). La surexpression de la β -caténine consécutive à la suppression de GSK3 β maintient les propriétés délétères des CSCs ; ceci a été décrit pour le cancer du côlon (Venugopal et al., 2015), de la prostate (Chen et al., 2004), du sein (Woodward et al., 2007) et des poumons (Qi et al., 2015).

En conclusion, les trois voies de signalisation susmentionnées jouent un rôle majeur dans la régulation de la différenciation et de l'auto-renouvellement des CSs. Une perturbation de ces voies suite à des altérations génétiques ou épigénétiques favorise l'émergence du processus tumoral.

I.3.3.1.2. Rôle des facteurs de transcription

Les facteurs intrinsèques majeurs, en particulier les facteurs Oct4, Nanog et Sox2 sont des modulateurs clés de l'activité des CSNs à spectre large. Leur implication dans le développement de plusieurs types de cancers est maintenant bien établie.

I.3.3.1.2.1. Oct4

Oct4, aussi connu sous le nom de POU5F1, est un facteur de transcription appartenant à la famille des protéines à domaine POU (Pituitary-specific Octamer and neural Unc-86 transcription factors). Il a été initialement isolé dans les CSEs grâce à sa capacité à se lier aux

séquences octamériques ATGCAAAT de l'ADN génomique pour activer ou réprimer les gènes cibles (Herr and Cleary, 1995).

Oct4 joue un rôle important dans le maintien de la pluripotence des CSEs et l'établissement de la lignée de cellules germinales. Ce facteur de transcription est fortement exprimé dans l'ovocyte non fécondé (Scholer et al., 1989). Durant le développement embryonnaire, Oct4 est exprimé initialement dans tout le blastomère jusqu'au stade morula. Après la formation du blastocyste, son expression diminue rapidement dans les cellules du trophoctoderme pour n'être confinée qu'aux cellules de la masse interne du blastocyste (ICM pour inner cell mass). Dans les stades tardifs du développement embryonnaire, l'expression d'Oct4 se restreint aux cellules germinales (Pesce and Scholer, 2000).

Il a été démontré que les souris déficientes en Oct4 ne sont pas en mesure de se développer au-delà du stade de blastocyste. En effet, les cellules dépourvues d'Oct4 sont incapables de former l'ICM et se différencient alors en trophoctoderme. Ceci indique qu'Oct4 est nécessaire pour l'établissement de la pluripotence et le maintien de l'état hautement indifférencié des CSEs (Nichols et al., 1998).

La ré-expression d'Oct4 (entre autre) dans des cellules somatiques différenciées permet leur reprogrammation en CSs (iPSC pour induced pluripotent stem cells) (Takahashi and Yamanaka, 2006; Wernig et al., 2007). *In vitro*, Oct4 est exprimé dans les lignées de CSEs. Après différenciation, ces cellules n'expriment plus le facteur de transcription. Tous ces faits confirment que l'expression d'Oct4 est indispensable à la régulation de l'auto-renouvellement et de l'identité des CSs à spectre large (voir Figure 6).

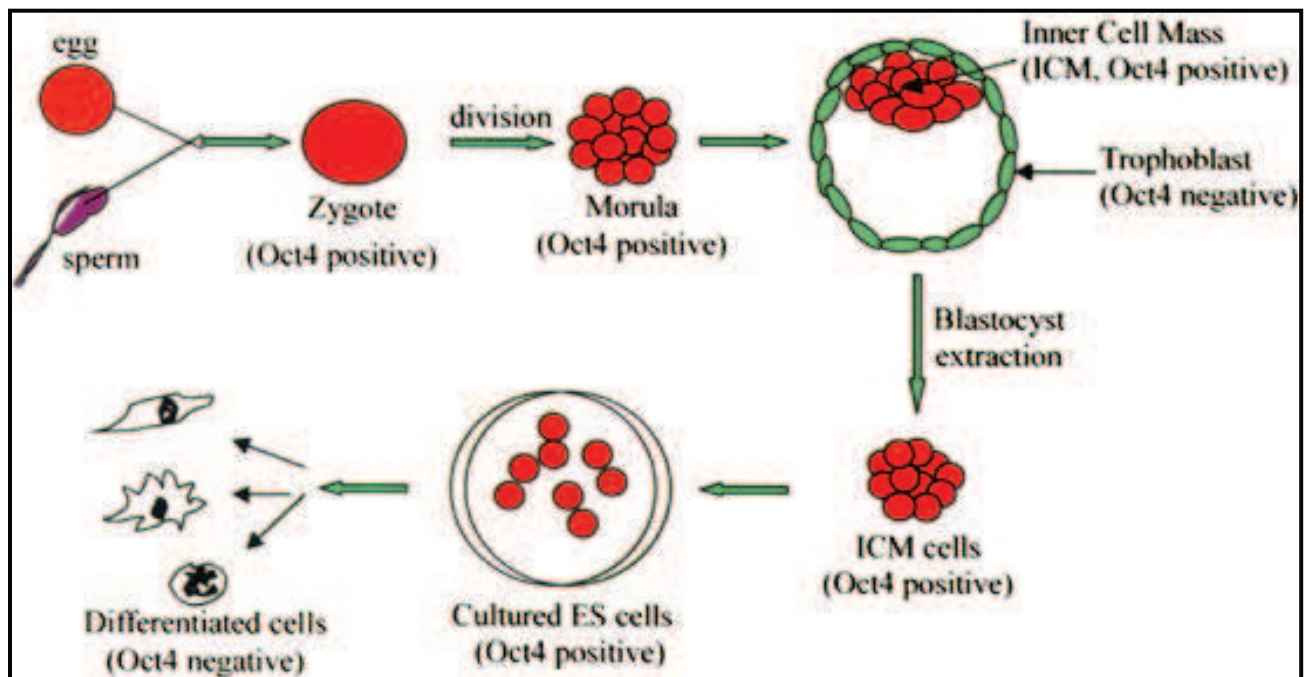


Figure 6 : Différents niveaux d'expression d'Oct4 dans les CSEs *in vivo* et *in vitro*.

Les cellules exprimant Oct4 sont marquées en rouge. Au stade blastocyste, l'ICM contenant les CSEs peut être isolé et mis en culture. Les CSEs peuvent alors se différencier en plusieurs types cellulaires qui n'exprimeront plus Oct4 (d'après Pan et al., 2002).

Des études récentes indiqueraient qu'Oct4 peut être exprimé dans une variété de cellules somatiques. Cependant la plupart de ces études ne tiennent pas compte des possibilités d'artéfacts, de l'existence de pseudogènes et ne distinguent pas les isoformes d'Oct4 (Wang and Dai, 2010). Il a été démontré par des approches rigoureuses, notamment par l'utilisation d'anticorps spécifiques contre la protéine Oct4 ou par RT-PCR, que si le gène et la protéine sont exprimés dans les CSEs, ce n'est pas le cas des cellules filles différenciées, quelque soit l'organe analysé (tel que le sein, le rein, le foie et le pancréas) (Tai et al., 2005).

La régulation de l'expression d'Oct4 implique différents membres de la superfamille des récepteurs nucléaires, y compris SF-1 (Steroidogenic Factor 1), LRH-1 (Liver Receptor Homolog-1) et GCNF (Germ Cell Nuclear Factor) (Kellner and Kikyo, 2010). La liaison de SF-1 et de LRH-1 au promoteur d'Oct4 permet l'activation de son expression et le maintien de l'auto-renouvellement, alors que la liaison de GCNF au même promoteur entraîne la

suppression de son expression, avec pour conséquence l'induction du processus de différenciation (Gu et al., 2006). Les microARN (miARN) sont connus pour leur rôle dans la régulation post-transcriptionnelle de leur cible. Une étude récente a ainsi démontré que le miRNA-145 se lie à l'ARNm d'Oct4 et réprime son expression, contribuant à la commutation d'un état pluripotent à spectre large à un état de pluripotence restreint (Xu et al., 2009b). En outre, la protéine Oct4 est régulée au niveau post-traductionnel par différents mécanismes. L'ubiquitination d'Oct4 par la E3-ligase WWP2 (WW domain-containing Protein, 2) favorise sa dégradation (Xu et al., 2009a), alors que sa sumoylation par SUMO-1 (Small Ubiquitin-related Modifier-1) augmente sa stabilité et son activité (Wei et al., 2007).

Oct4 est un facteur de transcription qui régule l'expression de nombreux gènes cibles impliqués dans l'auto-renouvellement (comme Sox2 ou Nanog) et dans le maintien de la pluripotence à spectre large.

Il est maintenant reconnu que la ré-expression d'Oct4 conduit à la tumorigénicité, la métastase tumorale, et même à la récurrence après chimio et radio-thérapie dans différents types de cancer. Généralement, ce facteur de transcription est surexprimé dans les cancers faiblement différenciés et hautement agressifs (Koo et al., 2015). Les expressions élevées d'Oct4 et de Nanog dans le cancer du pancréas dévoilent un mauvais pronostic pour les patients. Il a été montré par des études *in vivo* et *in vitro* que l'inhibition provoquée d'Oct4 et de Nanog diminuait les capacités prolifératives et invasives des CSCs pancréatiques isolées de patients (Lu et al., 2013). La surexpression d'Oct4 dans les cellules de cancer hépatocellulaire leur permet d'acquérir des propriétés de souche. En revanche, l'inhibition de l'expression d'Oct4 diminue la capacité d'auto-renouvellement et la chimiorésistance des CSCs dérivées des carcinomes hépatocellulaires (Murakami et al., 2015). Une autre étude a par ailleurs démontré que la surexpression d'Oct4 et de Nanog des CSs de carcinomes hépatocellulaires induit une transition épithélio-mésenchymateuse (TEM), via l'activation de la voie Stat3/Snail

(Yin et al., 2015). Les mécanismes de réexpression d'Oct4 ont été élucidés récemment. Ainsi il a été observé que des mutations dans le gène suppresseur de tumeur Rb sont impliquées dans de nombreuses formes de cancer humain. En fait cette inactivation de Rb favorise la reprogrammation des cellules différenciées vers un état de pluripotence et une réactivation de l'expression des facteurs de souchitude tels qu'Oct4 et Sox2 (Kareta et al., 2015). Dans un autre registre, il a été observé que CaMKII γ (Ca²⁺/calmoduline-dependent protein kinase II γ) est fortement exprimée dans les CSCs du cancer de poumon. CaMKII γ induit entre autre une augmentation de l'expression d'Oct4 via l'activation des voies de signalisation d'Akt et de β -caténine (Chai et al., 2015).

I.3.3.1.2.2. Nanog

L'expression de l'ARNm de Nanog est détectée au stade morula dans les cellules qui donneront naissance à l'ICM. Cette expression diminue cependant au cours du développement embryonnaire et devient indétectable dans les cellules somatiques de l'adulte.

Nanog est fortement exprimée dans toutes les lignées de cellules indifférenciées à pluripotence large, à savoir les CSEs et les iPS (Chambers et al., 2003; Mitsui et al., 2003). La surexpression de la protéine Nanog favorise la croissance des CSEs humaines *in vitro* même dans des conditions nutritionnelles très restreintes (Darr et al., 2006). Par contre, la régulation négative de Nanog induit une différenciation des CSEs en cellules simili-tissus extra-embryonnaires (Hough et al., 2006), ce qui démontre le rôle de ce facteur de transcription dans la régulation de l'auto-renouvellement et dans le maintien de la pluripotence des CSEs.

La régulation de Nanog se fait par plusieurs voies de signalisation, y compris celles de Shh, Wnt/ β -caténine et Jak/STAT. Pour ce dernier, il a été montré dans les CSEs que la phosphorylation de STAT3 par le LIF (leukemia inhibiting factor) permettait à cette protéine de se fixer sur les régions régulatrices du gène Nanog et d'entraîner son activation

transcriptionnelle. Fait intéressant, la E-cadhérine favoriserait grandement l'expression de l'ARN et de la protéine Nanog, via la phosphorylation de STAT3 (Hawkins et al., 2012).

Le facteur de transcription p53 est le suppresseur de tumeur le plus important, en raison de sa capacité à induire l'arrêt du cycle cellulaire, l'apoptose ou la sénescence. Une étude a démontré un nouveau rôle de p53 dans la différenciation des CSEs. En effet, p53 se lie directement sur le promoteur de Nanog pour réprimer son expression. De plus, la régulation négative de Nanog au cours de la différenciation est corrélée avec une augmentation de l'activité de la p53 (Lin et al., 2005). Par voie de conséquence, la perte de p53 augmente l'efficacité de reprogrammation cellulaire, conduisant à une augmentation de l'efficacité de générer des iPSs. Deux études ont également montré que la voie de signalisation Shh et p53 régulent directement l'expression de Nanog dans les CSs neurales de tissus sains et de tumeurs cérébrales (Po et al., 2010; Zbinden et al., 2010).

Bien que la protéine Nanog ne soit pas exprimée dans les CNs somatiques, l'expression aberrante de Nanog a été rapportée dans de nombreux types de cancers humains. Les niveaux d'expression de Nanog sont souvent en corrélation positive avec une résistance au traitement et un mauvais pronostic de survie des patients cancéreux (Gong et al., 2015).

I.3.3.1.2.3. Sox2

Sox2 est un membre de la famille des gènes Sox (SRY-related HMG box) qui encodent des facteurs de transcription avec un domaine singulier de liaison à l'ADN appelé HMG-box. Sox2 appartient au sous-groupe dénommé Sox B1, incluant également Sox1 et Sox3 (Kamachi et al., 2000).

L'expression de Sox2 est détectée initialement dans les cellules du stade morula. Dans le blastocyste, Sox2 est exprimé dans le noyau des cellules de l'ICM, mais il se trouve aussi dans le cytoplasme des cellules du trophoctoderme. Durant les derniers stades de

développement embryonnaire, Sox2 est exprimé dans l'épiblaste qui est une monocouche de cellules polyédriques qui recouvre l'embryon. La suppression provoquée de l'expression de Sox2 est létale pour l'embryon, suite à une absence de formation de la couche épiblastique. Par conséquent, Sox2 reste un facteur critique pour un développement embryonnaire harmonieux (Avilion et al., 2003). En accord avec ces données, il a été prouvé que Sox2 joue un rôle primordial dans la reprogrammation des cellules somatique en iPS (Takahashi and Yamanaka, 2006; Zhang and Cui, 2014), ainsi que dans le devenir des CSs pluripotentes à spectre large (Sarkar and Hochedlinger, 2013). En effet, L'expression de Sox2 est importante pour l'entretien des CSs et joue des rôles supplémentaires dans la régénération des tissus adultes, en particulier celui du système nerveux central (Pevny and Placzek, 2005).

Ces dernières années, un nombre croissant de preuves permet d'affirmer que des mutations et des dysfonctionnements de Sox2 peuvent initier une grande variété de cancers. A ce jour, il a ainsi été démontré que Sox2 permet de promouvoir la prolifération cellulaire du cancer du sein (Stolzenburg et al., 2012) et de la prostate (Rybak and Tang, 2013). Sox2 permet aussi d'induire l'invasion puis la prolifération métastatique du cancer colorectal (Han et al., 2012), de l'ovaire (Kellner and Kikyo, 2010) et des mélanomes (Girouard et al., 2012). L'expression aberrante de Sox2 dans le cancer de la prostate est associée à une augmentation de la prolifération cellulaire et à la dédifférenciation des CCs, via une dérégulation des gènes impliqués dans la TEM (Herreros-Villanueva et al., 2013).

L'expression de Sox2 est réglementée notamment par les cascades de signalisation de l'EGFR (epidermal growth factor receptor). L'inhibition de cette voie de signalisation réduit significativement l'expression de Sox2. Ceci entraîne notamment une inhibition du processus d'auto-renouveau des CSs pluripotentes (Bora-Singhal et al., 2015). Une étude récente a

démontré que la surexpression des miRNA-145-5p dans les cellules du cancer de la prostate induisait une diminution de l'expression de Sox2 qui s'accompagne d'une chute des taux de prolifération cellulaire, ainsi qu'une augmentation de l'apoptose (Ozen et al., 2015).

Ainsi les trois facteurs Oct4, Nanog et Sox2, collaborent pour former le réseau moléculaire de régulation qui maintient un état de pluripotence et favorise l'auto-renouvellement des cellules souches normales, comme cancéreuses (Boyer et al., 2005).

I.3.3.2. Résistance aux traitements anti-tumoraux

Les CSCs résistent aux traitements anticancéreux actuels (radiothérapie et chimiothérapie) par différents mécanismes. Cette résistance est due à la surexpression ou à la répression des gènes clés qui permettent aux CSCs d'échapper aux processus de différenciation et d'apoptose. Ainsi les transporteurs d'efflux ABC (ATP binding cassette) se trouvent surexprimés dans les cancers résistants aux traitements actuels. Ces transporteurs actifs utilisent l'ATP pour faire sortir les molécules actives vers le milieu extracellulaire. Plusieurs transporteurs ont été identifiés dans les CSCs, à savoir la glycoprotéine P (P-gp ou ABCB1), la protéine de résistance au cancer du sein (BCRP ou ABCG2) et la protéine liée à la résistance aux médicaments multiples (MRP). D'une façon plus exhaustive, le transporteur ABCB5 se trouve également surexprimé dans les mélanomes humains agressifs résistants à la doxorubicine (Frank et al., 2005). Dans de nombreux cas, les CSs issues de glioblastome ont montré une forte résistance à un traitement anticancéreux à base d'étoposide. Le taux de survie des patients atteints de ce cancer est lié en fait au niveau d'expression de MRP (Jin et al., 2010). La surexpression de BCRP (ABCG2) est associée à une augmentation de l'expression de CD133 et à une dérégulation de la voie AKT dans plusieurs SPs de CSCs résistantes aux médicaments. La même étude démontre que la voie de signalisation Akt est

capable de réguler l'activité d'efflux de la SP des CSCs, via une modification de la localisation subcellulaire du transporteur ABCG2. Par voie de conséquence, l'inhibition de la voie Akt non seulement supprime la prolifération des CCs, mais également améliore la sensibilité des cellules chimio-résistantes (Hu et al., 2008).

Les CSCs possèdent une grande capacité de réparation des dommages causés à l'ADN et échappent alors aux processus apoptotiques. Une étude récente démontre que les CSs de glioblastome qui sont significativement plus résistantes que le reste des CCs de la masse tumorale, réparent plus efficacement les dommages causés à l'ADN par la radiothérapie, grâce notamment à la surexpression d'ATM (ataxia telangiectasia mutated), ATR (ataxia telangiectasia and Rad3 related) et CHK1 (checkpoint kinase 1) (Ahmed et al., 2015).

Dans un autre registre, il a été observé que de nombreux types de CSCs résistent à l'apoptose grâce à leur capacité de surexprimer les protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 (B-cell lymphoma-2) et les inhibiteurs des protéines apoptotiques (He et al., 2014). A titre d'exemple, la surexpression de Bcl-2 inhibe l'apoptose et l'autophagie des CSCs du côlon, contribuant ainsi à la chimiorésistance (Wu et al., 2013).

L'aldéhyde déshydrogénase (ALDH) est une enzyme intracellulaire ubiquitaire qui catalyse l'oxydation des aldéhydes en acide carboxylique dans les processus cellulaires physiologiques et pathologiques. ALDH est surexprimée dans plusieurs types de tumeurs. Elle est utilisée comme marqueur pour isoler les CSCs et pour identifier les patients à haut risque de cancer du poumon et du sein (Moreb, 2008). Récemment, il a été démontré que les CSCs de sarcomes qui développent une grande activité d'ALDH, possèdent de fortes capacités de chimio-résistance et de détoxification (Honoki et al., 2010).

L'épuisement des niveaux d'oxygène dans les tissus (hypoxie) a longtemps été considéré comme une caractéristique majeure du micro-environnement tumoral et un contributeur potentiel à la tumorigénicité accrue des CSCs. Les facteurs de transcription qui répondent à

l'hypoxie sont appelés des facteurs induits par l'hypoxie (HIFs). Ces facteurs empêchent la différenciation cellulaire, favorisent la formation de vaisseaux sanguins et surtout régulent de façon négative le processus pro-apoptotique, en activant des enzymes de réparation de cassures d'ADN et en induisant le développement de cellules tumorales résistantes aux agents thérapeutiques par activation des transporteurs d'efflux ABC (Harada et al., 2007).

I.3.3.3. Induction des métastases tumorales

De nombreuses expériences ont prouvé l'implication des CSCs dans le processus de métastase. L'analyse des métastases localisées dans la moelle osseuse a montré un enrichissement de cellules exprimant le marqueur phénotypique des CSs du cancer du sein $CD44^+/CD24^-$ dont elles sont issues (Balic et al., 2006). Il a été démontré qu'une population de CSCs du pancréas exprimant les marqueurs phénotypiques $CD133^+/CXCR4^+$ est responsable de la croissance et de l'activité métastatique des tumeurs pancréatiques agressives (Hermann et al., 2007). En outre, des cellules tumorales circulatoires, isolées de patients atteints de mélanomes et contenant une sous-population de cellule $ABCB5^+$, sont capables de provoquer des métastases tumorales après leur transplantation à des souris immunodéprimées (Ma et al., 2010).

La TEM est un programme développemental clé souvent activé dans les processus d'invasion cancéreuse et de métastases. Au cours de la TEM, les cellules épithéliales tumorales acquièrent des capacités migratoires et invasives mésenchymateuses afin de faciliter leur circulation. Ainsi, le répertoire moléculaire d'une cellule subit des changements dramatiques entraînant une perte de l'expression de la molécule d'adhérence épithéliale E-cadhérine et l'induction de l'expression de la molécule d'adhérence mésenchymateuse N-cadhérine (Yilmaz and Christofori, 2009). L'induction d'une TEM dans les cellules mammaires épithéliales humaines immortalisées entraîne l'apparition de traits mésenchymateux et

l'expression de marqueurs de souchitude. Les CSs murines ou humaines isolées de glandes mammaires ainsi que celles isolées de carcinomes mammaires expriment également des marqueurs de la TEM. L'ensemble de ces résultats démontre un lien direct entre la TEM et l'acquisition des propriétés de CSs mésenchymateuses (Mani et al., 2008). La diminution du marqueur épithélial E-cadhérine et l'augmentation de la MMP-2 (matrix metalloproteinase-2) pourraient être associées à la capacité de CSCs gastriques à induire des métastases (Yang et al., 2011).

Plusieurs facteurs responsables dans la médiation de la TEM, y compris le facteur de croissance des hépatocytes (Hepatocyte Growth Factor, HGF), le facteur de croissance épidermique (Epidermal Growth Factor, EGF), le facteur de croissance transformant (Transforming Growth Factor β , TGF- β) ainsi que les voies de signalisation Wnt/ β -caténine, Notch et Hedgehog, sont également associés au maintien des propriétés des CSs (Liao et al., 2014). Ainsi la voie de signalisation Notch, connue pour réguler l'auto-renouvellement des CSs, joue également un rôle essentiel dans la migration cellulaire en raison de son implication dans la TEM des CSs du cancer du poumon (Yuan et al., 2014).

D'autre part, plusieurs études ont démontré le rôle des facteurs de pluripotence large dans l'invasion et la migration des CSCs. Nanog entraîne l'augmentation de l'activité du promoteur de FAK (Focal Focal Adhesion Kinase) et peut se lier directement à la protéine FAK pour la phosphoryler. Cette même étude démontre l'effet de régulation mutuelle de FAK et de Nanog sur la croissance, l'invasion et la migration des CSCs dans la carcinogénèse (Ho et al., 2012). De plus, il a été démontré qu'une surexpression de Nanog et d'Oct4 favorisait la métastase des adénocarcinomes pulmonaires via l'induction de la transdifférenciation épithélio-mésenchymateuse (Chiou et al., 2010).

I.3.4. La cellule souche cancéreuse tératocarcinomale

I.3.4.1. Généralités

Les tératomes contiennent un mélange de différents types de cellules dérivant des trois feuillets embryonnaires. Ces tumeurs peuvent être bénignes ou malignes. Dans ce dernier cas, elles sont considérées comme des tératocarcinomes (carcinomes embryonnaires ou CEs). Les tératocarcinomes contiennent des CSCs hautement indifférenciées présentant un grand pouvoir tumorigénique. Ces cellules sont en effet capables de former de nouvelles tumeurs lorsqu'elles sont transplantées chez des souris (Chambers and Smith, 2004). En effet, les cellules des CEs sont très proches des cellules pluripotentes de la masse interne du blastocyste ICM. L'aspect souche des cellules de CEs a été accepté dès 1964, suite à la démonstration qu'une seule cellule souche tératocarcinomale (CST) est capable de former une nouvelle tumeur lorsqu'elle est transplantée dans une souris saine (Kleinsmith and Pierce, 1964). Cette expérience a permis de démontrer le potentiel tumorigène, la pluripotentialité, la capacité d'auto-renouvellement quasi illimité et le potentiel de différenciation en plusieurs types cellulaires des tératocarcinomes. Ces derniers correspondent donc à des tumeurs très agressives qui perdent cependant leur agressivité suite à leur différenciation.

Les lignées cellulaires de CEs sont dérivées des tumeurs de lignées germinales hétérogènes isolées chirurgicalement. La première lignée de cellules germinales établie à partir de tératocarcinome a été appelée NTERA-2 clone D1 (ou NT2/D1). Il s'agit d'un clone dérivé de la lignée parentale NTERA-2, qui fut établie à partir d'une xénotransplantation sur une souris nude de cellules TERA-2, elles-mêmes isolées à l'origine à partir de métastases pulmonaires d'un jeune patient souffrant d'un CE du testicule. Pour ce faire, les cellules de CEs ont été isolées en utilisant des billes magnétiques immunoréactives SSEA-3 (Stage-Specific Embryonic

Antigen 3) puis cultivées dans du milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) contenant de la L-glutamine et du sérum de veau fœtal, jusqu'à la formation d'une monocouche confluente homogène (Andrews et al., 1984). Ces cellules ont alors montré leur capacité à se différencier en différents types cellulaires sous l'effet de l'acide rétinoïque (AR), notamment en neurones. Elles ne requièrent pas l'utilisation d'une couche nourricière pour maintenir leur état indifférencié (Bani-Yaghoub et al., 1999).

I.3.4.2. Utilisation comme modèle

La lignée NT2/D1 est décrite comme une lignée très peu différenciée et hautement agressive, propriété qui s'associe à une forte expression des facteurs de souche Oct4, Nanog et Sox2 (Emhemmed et al., 2014). Les lignées cellulaires de CEes représentent ainsi un modèle approprié pour étudier la biologie des CSCs pour, à terme, développer une thérapie efficace qui pourrait les cibler (Lin et al., 2012).

I.4. Stratégie pour cibler les CSCs

Un traitement anticancéreux efficace devrait en théorie être capable d'éradiquer les CSCs et prévenir la dédifférenciation des cellules tumorales. Nous allons nous concentrer ici sur les voies de régulation critiques des CSCs qui pourraient être ciblées par des agents pharmacologiques anticancéreux.

I.4.1. Induction de l'apoptose

L'apoptose ou mort cellulaire programmée est un moyen d'éliminer une cellule d'un organisme sans provoquer une inflammation de l'hôte et/ou une réponse immunitaire. L'apoptose est régulée par deux voies différentes à savoir, la voie intrinsèque qui est contrôlée par la perméabilisation des membranes mitochondriales et la voie extrinsèque dans laquelle les récepteurs de mort cellulaire déclenchent la cascade de l'apoptose. Les acteurs centraux en

aval des deux voies d'initiation sont les caspases. Ces dernières correspondent à une famille de protéases à cystéine, qui sont normalement exprimées dans le cytoplasme sous forme inactive (zymogène) et qui sont activées par clivage protéolytique (voir Figure7) (Iannolo et al., 2008). L'apoptose joue un rôle primordial dans l'homéostasie tissulaire et dans la suppression tumorale. La résistance acquise à l'apoptose est la caractéristique essentielle de tous les types de cancer et plus spécifiquement des CSCs.

I.4.1.1. La voie intrinsèque

I.4.1.1.1. Généralités

La voie intrinsèque, également connue comme la voie mitochondriale, est induite par une variété de signaux de stress tels que les rayonnements ionisants, les agents cytotoxiques et la privation des facteurs de croissance qui provoquent des dommages à l'ADN. Ces signaux de stress conduisent à la perméabilisation de la membrane mitochondriale. Celle-ci est en fait médiée par des protéines de la famille Bcl-2. La perméabilité mitochondriale permet ainsi la libération de protéines pro-apoptotiques, tels que le cytochrome C, AIF (Apoptosis Inducing Factor) et Smac/DIABLO (second mitochondria-derived activator of caspase) à partir de l'espace inter-membranaire de la mitochondrie vers le cytosol. Le cytochrome C se lie à la protéine Apaf-1 (protease-activating factor-1) pour former l'apoptosome. L'apoptosome se lie à la pro-caspase 9 pour la cliver, qui à son tour permet l'activation des caspases effectrices de l'apoptose à savoir, les caspases 3, 6 et 7, conduisant à la fragmentation de l'ADN et à la mort cellulaire (He et al., 2014). Les protéines de la famille Bcl-2 sont classées en deux sous-familles: les protéines Bcl-2 pro-apoptotiques (Bad, Bax, Bid) et les protéines Bcl-2 anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-xL, p-Bad).

I.4.1.1.2. Stress oxydant

Le stress oxydant résulte d'une production anormale des espèces réactives d'oxygène (ROS), tel que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), les anions superoxydes ($\bullet O_2^-$) et les radicaux hydroxyles ($\bullet OH^-$).

Dans les conditions physiologiques, l'homéostasie des ROS est très importante dans le maintien des fonctions physiologiques normales. Dans les cellules ou les tissus normaux, une augmentation des niveaux de production des ROS entraîne des dommages irréversibles au niveau de l'ADN, conduisant à une instabilité chromosomique, à l'apparition de mutations génétiques et éventuellement à la cancérogénèse (Bao et al., 2014). Au contraire, dans les cellules tumorales, la surproduction des ROS entraîne une toxicité cellulaire qui déclenche l'apoptose. Cependant les CCs possèdent une grande capacité anti-oxydante, leur permettant de contrecarrer et de piéger les ROS. Cette capacité d'adaptation au stress oxydant, intrinsèque dans les CCs, permet ainsi de leur conférer une résistance aux médicaments anticancéreux (Trachootham et al., 2009). De même, les niveaux faibles des ROS dans les CSCs comparés aux CSNs sont associés à une expression accrue des piègeurs des radicaux libres. La déplétion pharmacologique des piègeurs des ROS dans les CSCs diminue considérablement leur clonogénicité et entraîne une sensibilité à la radiothérapie (Diehn et al., 2009). L'induction des ROS par le H_2O_2 induit l'activation de la signalisation p38 MAPK. La p38 activée entraîne la dégradation de la protéine Bmi1 et l'activation de FOXO3, contribuant ainsi à la perte des capacités d'auto-renouvellement et favorisant la différenciation des cellules initiatrices de gliome (Sato et al., 2014). En outre, les ROS sont également produites suite à l'activation de la voie intrinsèque de l'apoptose. Le traitement des CSCs avec des médicaments anticancéreux qui agissent comme des pro-oxydants entraînent donc des lésions de l'ADN, conduisant à la formation de ROS par l'intermédiaire de l'activation de la PARP (Poly ADP-ribose polymerase) ou de la NADPH oxydase (nicotinamide-adenine-dinucleotide

phosphate-oxydase). Ces dommages d'ADN non réparables induisent l'activation des gènes suppresseurs des tumeurs tels que la p53 et la p73, responsables du processus apoptotique (Mizutani, 2007).

I.4.1.1.3. Le gène suppresseur de tumeurs p53

La p53 joue un rôle primordial dans la réparation de l'ADN, l'arrêt du cycle cellulaire et l'induction de l'apoptose en réponse aux dommages causés à l'ADN, comme en témoigne le fait que les thymocytes de souris p53^{-/-} ne subissent pas d'apoptose en réponse aux dommages de l'ADN induits par des rayonnements (Lowe et al., 1993). De plus, il a été démontré que l'inactivation du suppresseur de tumeur p53 dans les CSCs favorise la division symétrique et contribue ainsi à la croissance des tumeurs (Cicalese et al., 2009). La p53 peut induire directement la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale en formant des complexes avec les protéines protectrices BclXL et Bcl2, ce qui entraîne la libération du cytochrome C (Mihara et al., 2003). La phosphorylation de la p53 sur différents résidus sérine/thréonine est une étape clé dans la régulation de sa fonction, en réponse à une grande variété de stimuli. Parmi les différentes kinases capables de phosphoryler la p53, on peut citer la p38 MAPK. Par exemple, la cisplatine entraîne la mort cellulaire des CCs via l'activation de la cascade ROS/p38 MAPK/p53. L'activation de la p38 MAPK par la cisplatine est également associée à une augmentation des niveaux d'expression de la p53, contribuant finalement à une induction optimale de l'apoptose (Bragado et al., 2007).

I.4.1.1.4. p38 MAPK

De nombreuses études soutiennent le rôle pro-apoptotique de la p38 MAPK. L'importance de cette protéine dans l'induction de l'apoptose a été démontrée dans des études de réponses de différentes cellules déficientes en p38, comme les cardiomyocytes primaires immortalisées ou les fibroblastes. Ces cellules sont de fait plus résistantes à l'apoptose initiée par des divers

stimuli (Porras et al., 2004). La p38 contribue à une réponse pro-apoptotique accrue par différents mécanismes. Par exemple, la p38 activée induit la phosphorylation et la translocation des protéines pro-apoptotiques (Bax), ce qui permet la libération de cytochrome C des mitochondries (Park et al., 2003). De plus, comme mentionné ci-dessus, la p38 coopère avec la p53 pour induire l'apoptose en réponse à des agents anticancéreux (Papoutsaki et al., 2005). La formation de ROS en est l'initiateur. Ainsi l'acide bétulinique entraîne l'apoptose des mélanomes humains par activation de la voie p38 MAPK via la production de ROS (Tan et al., 2003). Plusieurs études ont également démontré le rôle de la p38 MAPK dans la biologie de la CSN et de la CSC. L'inhibition de cette kinase protège par exemple les CSs hématopoïétiques contre la perte de la capacité d'auto-renouvellement et empêche leur différenciation (Ito et al., 2006). Une autre étude a démontré que la phosphorylation de la p38 entraînait la différenciation des cellules initiatrices des gliomes (Sato et al., 2014). Finalement, la p38 MAPK pourrait représenter une cible thérapeutique prometteuse pour cibler la CSC.

I.4.1.2. La voie extrinsèque

La voie extrinsèque ou voie du récepteur de mort est activée par l'intermédiaire des récepteurs de la famille TNF (Tumor Necrosis Factor) et joue un rôle fondamental dans le maintien de l'homéostasie tissulaire. Il existe plusieurs récepteurs de la famille TNF qui sont exprimés différemment en fonction des populations cellulaires, à savoir TNFR1 (Tumor Necrosis Factor Receptor), CD95 (également connu sous le nom Apo1 ou Fas), TRAIL-R1 (DR4) et TRAIL-R2(DR5). Cette voie est activée lorsque le ligand de mort se lie aux domaines extracellulaires des récepteurs de mort et conduit directement à la formation du DISC (death-inducing signaling complex) via le recrutement du domaine de la protéine adaptatrice FADD (Fas-Associated protein with Death Domain). La protéine adaptatrice porte un domaine de mort DED (Death Effector Domain) qui permet de recruter la pro-caspase 8 dans le DISC

pour l'activer. La caspase 8 activée clive et active diverses caspases effectrices, comme la caspase 3. De plus, la voie extrinsèque et la voie mitochondriale sont étroitement liées. Par exemple, la caspase 8 activée clive la protéine pro-apoptotique de la famille Bcl2 (Bid) qui se transloque dans la membrane mitochondriale et se lie avec Bad et BAK pour les activer. Cette activation entraîne la translocation de Bax vers la membrane externe mitochondriale, provoquant ainsi l'oligomérisation de Bax et BAK avec le cytochrome C et leur libération de la mitochondrie (Iannolo et al., 2008).

L'inhibition de la voie extrinsèque est induite par FLIP (FLICE-inhibitory protein), via l'interaction de ses isoformes avec le DISC. Ceci empêche le recrutement de la pro-caspase 8 par le récepteur de mort activé et donc le clivage de cette dernière par le DISC. FLIP est surexprimé dans les cellules CD133⁺ des glioblastomes, du cancer du sein et de la leucémie aiguë (Zobalova et al., 2008a). L'inhibition de FLIP par des siRNAs spécifiques restaure la sensibilité des cellules aux stimuli de mort (Zobalova et al., 2008b). Cette diminution imposée de l'expression de FLIP inhibe également l'auto-renouvellement des CSCs et l'apparition de métastases tumorales (Piggott et al., 2011). Il a été rapporté que l'expression insuffisante des récepteurs de mort et la surexpression de FLIP pouvaient rendre compte de la résistance des CSCs à l'activation du ligand de mort TRAIL (tumor-necrosis-factor related apoptosis inducing ligand) (Ding et al., 2011).

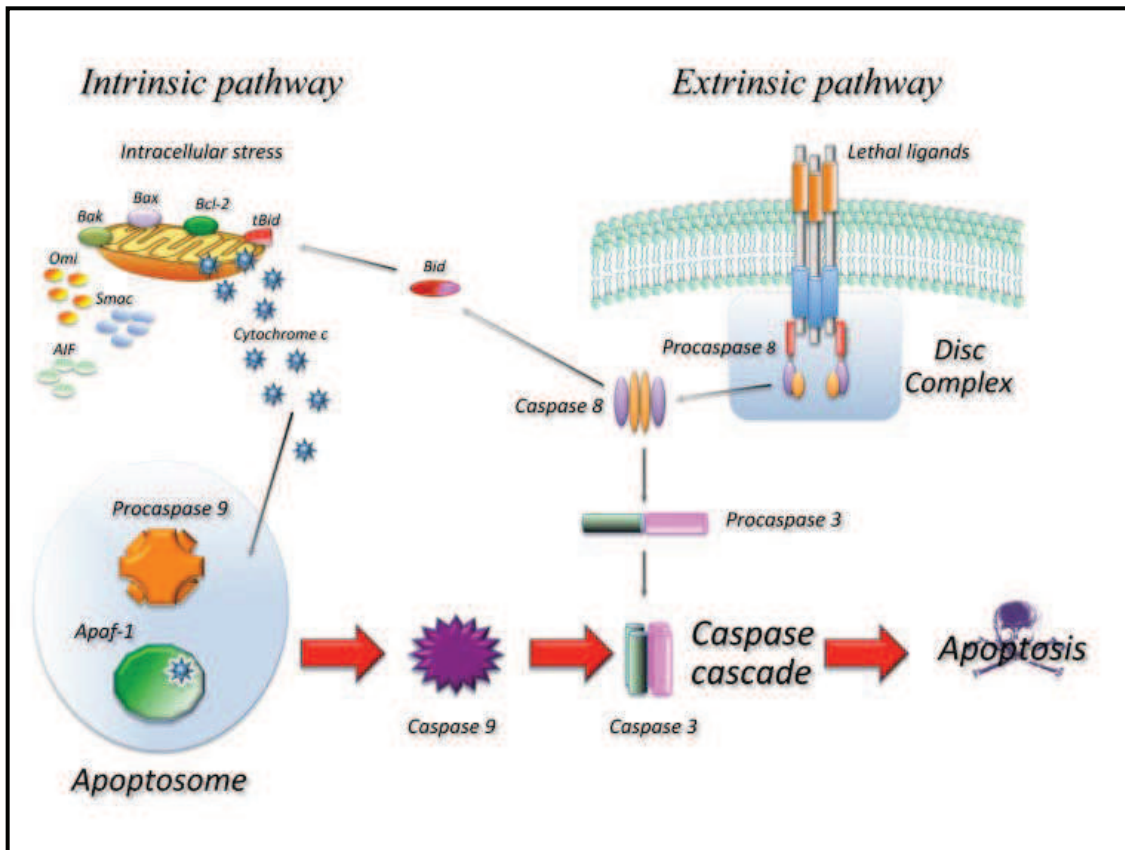


Figure 7 : Représentation schématique des deux voies pro-apoptotiques.

Dans la voie extrinsèque, la liaison du ligand à des récepteurs spécifiques entraîne la formation du complexe DISC et l'activation de la caspase 8. Dans la voie intrinsèque, la libération du cytochrome C de la mitochondrie entraîne la formation de l'apoptosome et l'activation de la caspase 9. Ainsi, les caspases 8 et 9 activent les caspases effectrices telles que la caspase 3, induisant la mort cellulaire. Les deux voies sont inter-connectées via la protéine Bid (d'après Favaloro et al., 2012).

I.4.2. Blocage de l'auto-renouvellement

I.4.2.1. Induction de la différenciation

Il a été démontré que les traitements conventionnels étaient efficaces sur les CCs différenciées. En revanche, la SP des CSCs dédifférenciées résiste à ces traitements. La thérapie de différenciation consiste donc à forcer les CSCs à se différencier et à perdre leur propriété d'auto-renouvellement. Donc, l'appauvrissement du pool des CSCs par l'utilisation

des médicaments pro-différenciateurs pourrait avoir des implications thérapeutiques prometteuses en diminuant la tumorigénicité des cellules (Massard et al., 2006).

Parmi la grande panoplie d'agents anticancéreux étudiés, seulement quelques-uns affectent la différenciation des CSCs à savoir, l'AR, la BMP (Bone Morphogenetic Protein) et les agents ciblant l'épigénétique tumorale. Le seul agent de différenciation utilisé dans la pratique clinique est en fait l'AR. Ce composé est connu en tant que modulateur puissant de la différenciation et de la prolifération cellulaire en se liant à son récepteur (RAR). L'acide rétinoïque s'est ainsi avéré être un agent anti-tumoral puissant dans le traitement de certains cancers. A titre d'exemple, la leucémie myéloïde aiguë est devenue une maladie curable grâce à l'utilisation d'ATRA (all-trans-retinoic-acid) en association avec la chimiothérapie conventionnelle (Ohno et al., 2003).

Alternativement, l'inhibiteur de l'histone déacétylase HDAC, SAHA (Suberoylanilide Hydroxamic Acid) est connu pour entraîner la différenciation de plusieurs lignées de CSCs. Par ailleurs, il a été décrit qu'*in vitro*, l'AR peut induire une différenciation dans plusieurs types de cellules telles que les cellules embryonnaires, les tératocarcinomes ou les mélanomes. Cependant, l'effet pro-différenciateur de l'ATRA est limité dans certaines tumeurs solides, probablement en raison de la répression épigénétique du $RAR\alpha$. Ainsi, l'augmentation de $RAR\beta$ et l'activation des gènes situés en aval de celui-ci peut aider à optimiser l'utilisation de l'acide rétinoïque dans le traitement des tumeurs solides (Connolly et al., 2013). Ces stratégies fournissent donc des approches nouvelles et prometteuses pour cibler les CSCs dans le traitement du cancer. La combinaison de plusieurs thérapies devrait à terme permettre de forcer les CSCs à se différencier, à perdre leur capacité d'auto-renouvellement. Cette multi-thérapie pourrait finalement avoir les avantages d'une efficacité accrue et d'une action rapide sur les tumeurs solides très agressives (Xu et al., 2014).

I.4.2.2. Ciblage direct de l'auto-renouvellement

Les voies de signalisation de régulation de l'auto-renouvellement, de la prolifération et de la différenciation sont essentielles pour les CSNs. Cependant, l'activation aberrante ou le dérèglement de ces voies clés peuvent conduire à la formation de CSCs. Les voies extrinsèques de l'auto-renouvellement les plus importantes sont les voies Hedgehog, Notch et Wnt/ β -catenin (cf. § 1.3.3.1.1). Par conséquent, ces voies de signalisation constituent une nouvelle cible stratégique pour le traitement du cancer (Voir figure 8, Maugeri-Sacca et al., 2011)

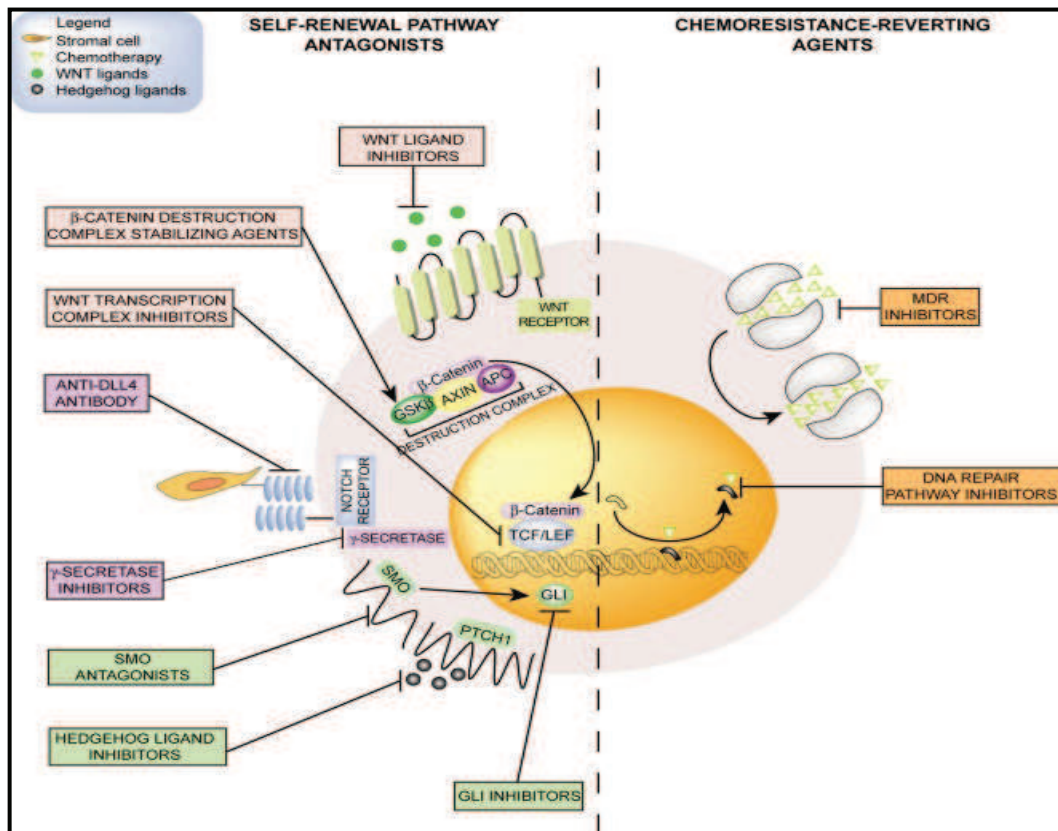


Figure 8 : Les stratégies pharmacologiques permettant de cibler les CSCs.

Les signaux d'auto-renouvellement comme Hedgehog, Notch et Wnt/ β -caténine peuvent être contrecarrés par des agents moléculaires, à savoir les molécules de liaison au ligand, les antagonistes de récepteurs ou les inhibiteurs des effecteurs intracellulaires (d'après Maugeri-Sacca et al., 2011).

De plus, plusieurs facteurs intrinsèques régulent l'auto-renouvellement et la différenciation des CSs pour maintenir leur pluripotence, en particulier les facteurs Oct4, Nanog et Sox2. La dérégulation de ces facteurs entraîne la tumorigénicité (cf. § 1.3.3.1.2.). La surexpression de ces facteurs de pluripotence, et en particulier le facteur Oct4, a été impliquée dans la croissance, la formation de métastases et la pharmaco-résistance aux traitements conventionnels dans de nombreux cancers. Les agents pharmacologiques anticancéreux permettant de cibler l'activité d'Oct4 constitue donc une approche thérapeutique prometteuse dans le traitement des tumeurs agressives, d'autant plus qu'Oct4 joue un rôle primordial dans la dédifférenciation des cellules somatiques et la réactivité des CSCs (voir figure 9).

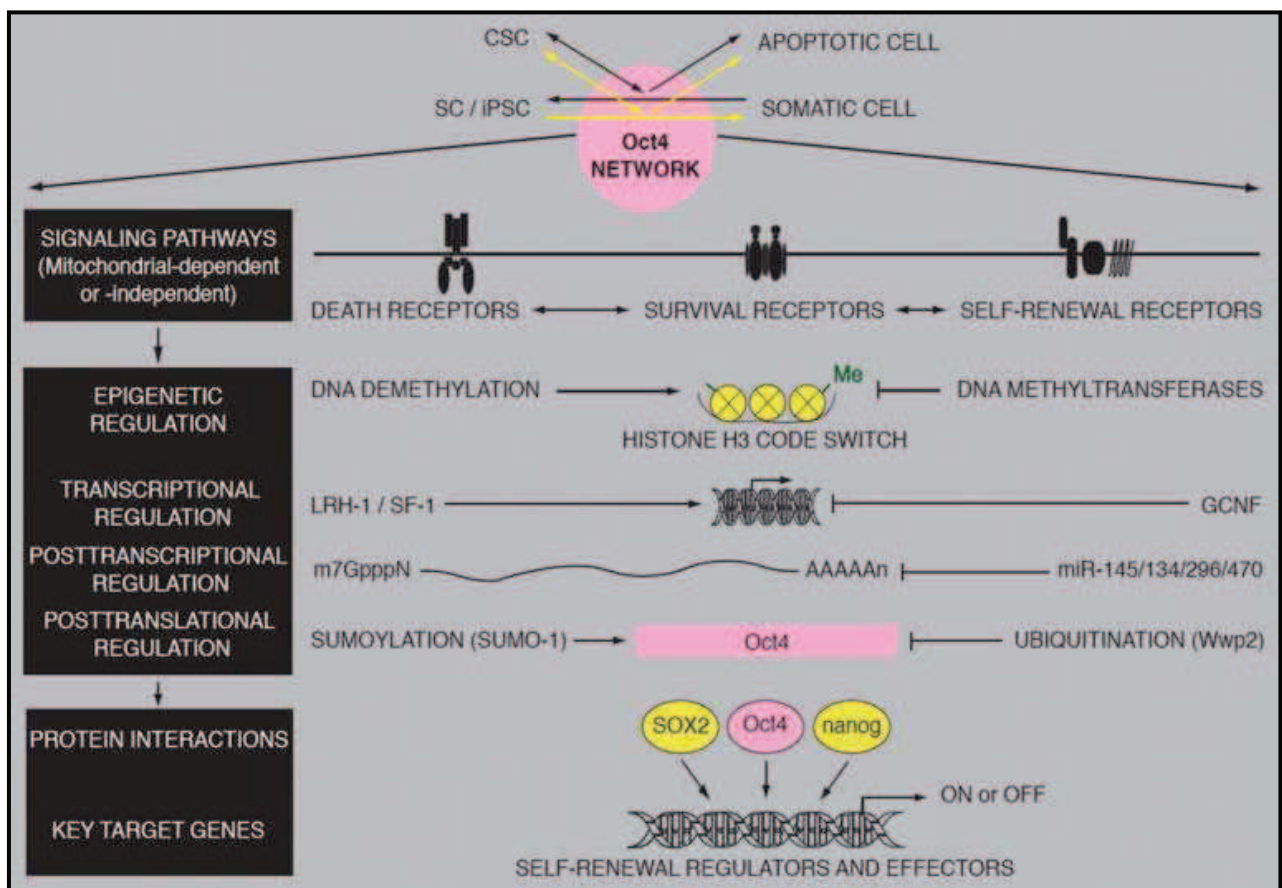


Figure 9 : Les réseaux de régulation d'Oct4.

Les voies de régulation de l'expression d'Oct4 constituent des cibles potentielles pour les composés pharmacologiques. Voir le détail des mécanismes de régulation d'Oct4 au § 1.3.3.1.2.1. La méthylation du promoteur d'Oct4 et les modifications spécifiques dans l'histone H3 peuvent également conduire à la répression d'Oct4 (d'après Sharif Tanveer, 2011)

I.4.3. Ciblage des marqueurs de surface des CSCs

Les marqueurs utilisés pour isoler les CSCs sont des cibles potentielles pour des thérapies anticancéreuses. De nombreuses tumeurs expriment fortement le marqueur de surface CD133. Son expression est notamment associée à une forte résistance aux traitements de chimio-radiothérapie. Il a été démontré que la suppression de l'expression de CD133 par des shRNA dans les mélanomes métastatiques entraînait une réduction de la croissance, de la motilité, et donc de la capacité à former des sphères et des métastases. L'utilisation des anticorps anti-CD133 pour traiter les mélanomes humains a ainsi montré un effet cytotoxique dose-dépendant. De ce fait, le CD133 représente non seulement un marqueur de CSCs, mais également une cible thérapeutique importante pour plusieurs types de cancers agressifs exprimant le marqueur de surface CD133, notamment les mélanomes (Rappa et al., 2008).

L'ALDH constitue un marqueur d'identification des CSNs et CSCs. Il peut agir comme une enzyme de détoxification des principes actifs médicamenteux. Son expression est associée à une forte résistance aux traitements anticancéreux. Il a ainsi été montré que la SP de CSCs $ALDH^{high}CD44^{+}$ du cancer du sein est plus résistante aux traitements anticancéreux standards. L'inhibition de l'activité de l'ALDH par ATRA ou DEAB (diethylaminobenzaldehyde), qui est un inhibiteur spécifique de l'ALDH, sensibilise les CSs du cancer du sein aux traitements (Crocker and Allan, 2012).

De plus, les transporteurs d'efflux ABC sont surexprimés dans les CSNs afin de les protéger des agents toxiques. Cette surexpression est également retrouvée dans les CSCs et explique leur résistance aux thérapies anticancéreuses. Il a été démontré que l'utilisation des inhibiteurs pharmacologiques de ces transporteurs permettait d'augmenter l'efficacité des protocoles de chimiothérapie et permettait de réduire, par exemple, la tumorigénicité du cancer du poumon, en affectant les CSCs (Xia et al., 2010).

I.5. Le cancer de la peau

I.5.1. Généralités

L'incidence des cancers cutanés a augmenté au cours des dernières décennies. Actuellement, environ 2 et 3 millions de cancers cutanés non mélanocytaires et 132000 mélanomes sont enregistrés chaque année dans le monde. En France, 50000 cas de carcinomes et 7000 nouveaux cas de mélanomes sont diagnostiqués par an. Dans les pays où la population est majoritairement blanche, l'incidence du cancer de la peau a doublé entre 2000 et 2015 selon l'OMS. On pense également que 50% des personnes âgées de plus de 65 ans auront au moins un cancer de la peau au cours de leur vie. En 2012, 167231 décès en France étaient imputables à un mélanome et 9780 nouveaux cas ont été diagnostiqués. En France, les femmes ayant un mélanome cutané représentent 52% des cas dépistés soit 5 086 patientes, ce qui classe ce type de cancer au 11ème rang des cancers les plus fréquents (Les cancers en France Edition 2014)

I.5.2. Types des cancers cutanés

Les cancers cutanés sont nommés en fonction de la cellule à partir de laquelle ils se développent. Les trois types de cancer cutané les plus courants sont les carcinomes basocellulaires, les carcinomes épidermoïdes (tous deux également appelés cancers cutanés non mélanocytaires) et les mélanomes malins cutanés. Les carcinomes représentent 90% des cancers de la peau alors que les mélanomes 10%.

I.5.2.1. Les carcinomes cutanés

L'incidence des cancers de la peau non mélanocytaires est beaucoup plus importante que celles des mélanomes, mais la plupart sont beaucoup plus faciles à traiter et ont un meilleur pronostic à long terme. Les deux formes principales, les carcinomes basocellulaires et les carcinomes épidermoïdes, sont tous deux dérivés de kératinocytes épidermiques. Ils sont

moins mortels que les mélanomes principalement en raison de leur tendance à rester confinés dans leur site primaire, ce qui rend leur traitement plus simple.

Les carcinomes cutanés touchent souvent des sujets de phototype clair et apparaissent après l'âge de 40 ans, voire plus tôt. Chez des sujets prédisposés, plusieurs facteurs d'environnement sont impliqués dans la formation de ces carcinomes : expositions solaires aiguës, intermittentes et surtout répétées, mais aussi radiations ionisantes, exposition à l'arsenic et plaies chroniques. En l'absence de traitement adapté, les carcinomes peuvent s'étendre localement puis métastaser (Dar et al., 2008; Simoes et al., 2015).

I.5.2.2. Les mélanomes

Les mélanomes cutanés sont plus rares que les carcinomes mais représentent la forme la plus mortelle des cancers de la peau. Ils se développent à partir de mélanocytes épidermiques. Les mélanomes sont souvent des tumeurs malignes fortement métastatiques et résistantes aux traitements anticancéreux (Simoes et al., 2015). Ces derniers sont à la fois chirurgicaux (exérèse), radiologiques et/ou chimiothérapiques et adaptés en fonction du tableau clinique (type, taille et localisation de la tumeur), de l'analyse anatomopathologique réalisée après biopsie (type et grade) et du patient lui-même (âge, contexte professionnel et caractère immunocompétent). Afin de traiter des mélanomes d'une certaine épaisseur et pour lesquels le taux de réponse à des traitements de chimiothérapie est insuffisant, les oncologues peuvent faire aussi appel à l'immunothérapie qui permet l'activation des lymphocytes T du système immunitaire pour attaquer les cellules tumorales. Ainsi, plus le cancer est localisé et traité rapidement, meilleur sera le pronostic.

I.5.3. Les cellules souches cancéreuses dans les cancers cutanés

La peau est un tissu très complexe composé de multiples types de cellules et d'une matrice extracellulaire formé de nombreux composants. Plusieurs populations de CSs distinctes ont été identifiées dans différents compartiments de la peau: les CSs épidermiques, les CSs du follicule pileux et les CSs de mélanocytes. Un parfait équilibre entre prolifération et différenciation de ces CSs est nécessaire pour maintenir l'homéostasie tissulaire. Différentes voies de signalisation comme la voie Wnt/ β -caténine, Hedgehog et Notch sont impliquées dans le maintien de cet équilibre. Plusieurs études récentes révèlent le rôle crucial des CSs et de leurs voies de régulation dans le développement des cancers cutanés (Singh et al., 2014). En effet, il a été démontré qu'une SP de CSCs est responsable du maintien des carcinomes épidermoïdes et des mélanomes. Malanch et ses collaborateurs ont identifié une population de cellules CD34⁺ dans les tumeurs épidermiques ayant des similitudes phénotypiques et fonctionnelles avec les CSs de la peau. La transplantation de ces cellules CD34⁺ préserve l'organisation hiérarchique de la tumeur primaire et conduit à l'élaboration de tumeurs secondaires (Malanchi et al., 2008). Dans une autre étude, les différentes populations de CCs provenant des carcinomes épidermoïdes ont été isolées par cytométrie de flux pour tester le pouvoir tumorigène de ces populations dans un modèle de souris immunodéficientes. Cette étude a démontré qu'une population minoritaire des CCs CD44⁺ représentant moins de 10% des cellules présentes dans la tumeur, suffisait pour former de nouvelles tumeurs *in vivo*. Une telle aptitude n'a pas été observée avec les CCs CD44⁻. En outre, les CCs CD44⁺ ont une morphologie cellulaire primitive et expriment les marqueurs des cellules basales, tandis que les cellules cancéreuses CD44⁻ ressemblent aux épithéliums différenciés et expriment le marqueur de différenciation involucrine. Ceci suggère que les cellules initiatrices de tumeurs sont situées dans la couche basale indifférenciée. Ces deux études suggèrent donc la présence de cellules initiatrices de tumeurs dans les carcinomes épidermoïdes qui ont les propriétés de

CSs (Prince et al., 2007). Des petites SPs de CSCs ont été identifiées et isolées à partir des mélanomes primaires et secondaires chez les patients (Magnoni et al., 2014). Ces CSs de mélanome expriment plusieurs marqueurs comme CD133, CD44, la nestine et les transporteurs ABC (tels que MDR-1, ABCG2 et ABCB5) (Keshet et al., 2008). Un grand nombre de ces marqueurs est associé aux CSs classiques. Les cellules CD133⁺/ABCG2⁺ isolées des mélanomes métastatiques induisent des mélanomes chez des souris immunodéficientes (Monzani et al., 2007). Les CSs exprimant la nestine et isolées à partir des mélanomes primaires, sont capables de donner naissance à plusieurs foyers tumoraux lorsqu'elles sont injectées chez des souris immunodéprimées (Singh et al., 2014). L'ensemble de ces observations suggère donc que la dysfonction des CSs peut contribuer de manière majeure à l'oncogenèse cutanée. Une des stratégies thérapeutiques envisageables est alors de cibler les CSs cutanées, notamment dans le cas de mélanomes pour lesquels les traitements efficaces font actuellement cruellement défaut.

I.6. Produits naturels et thérapies anticancéreuses

L'utilisation des plantes comme sources de remèdes naturels permettant de guérir diverses pathologies humaines ou animales, est très ancienne puisqu'elle remonte à plus de 5 000 ans. De nombreux travaux scientifiques ont permis de valider, en partie, certains usages traditionnels. Le recours à des ressources végétales comme source de nouveaux actifs médicamenteux, notamment anticancéreux, a progressé grâce à l'évolution des techniques d'isolement et d'identification structurales des molécules bioactives, ainsi que l'évolution des techniques couplées à des modèles biologiques adaptés aux criblages anticancéreux. Grâce à la chimie thérapeutique, des substances naturelles ont pu être modifiées dans le but d'obtenir des composés plus actifs, plus sélectifs ou encore mieux tolérés parce que moins toxiques. (Zulkipli et al., 2015).

I.6.1. Roopérol

Le roopérol (1,5-Bis (3',4'-dihydroxyphenyl) pent-4-en-1-yne) correspond à l'aglycone de l'hypoxoside (voir Figure 10), un polyphénol majoritaire isolé des parties souterraines d'une espèce médicinale africaine *Hypoxis hemerocallidea*.

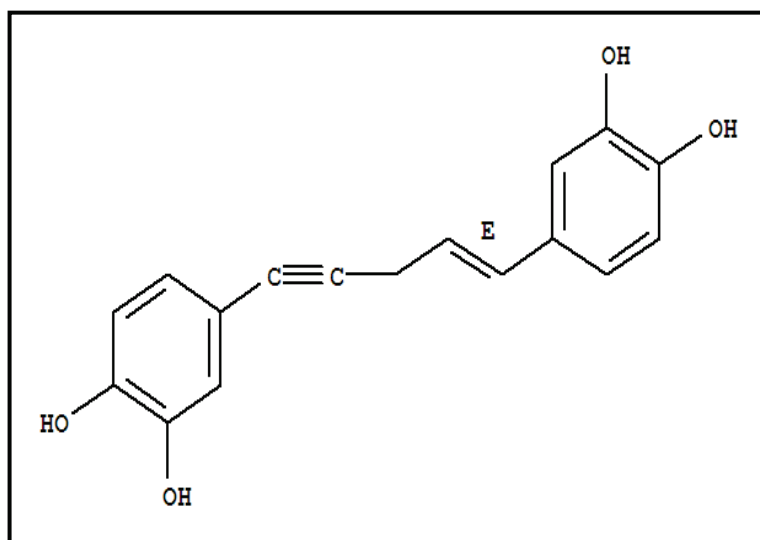


Figure 10 : Structure chimique du roopérol

Plusieurs travaux antérieurs ont mis en évidence les activités anti-oxydantes et anti-inflammatoires du roopérol. Par contre, ses effets anticancéreux ont été peu étudiés (Hanna et al., 1991). Le rooperol induit notamment une diminution de la prolifération cellulaire des cellules murines de mélanomes BL6 (Albrecht et al., 1995). Il entraîne également, dans les lignées cancéreuses HeLa, HT-29 et MCF-7, un arrêt du cycle cellulaire en phase G1, via l'augmentation de l'expression de la p21, et induit l'apoptose par activation des caspases 3 et 7 (Boukes et al., 2010).

I.6.2. Acide rétinoïque

La vitamine A (rétinol) se trouve dans les aliments d'origine animale (viandes et produits laitiers), alors que les végétaux contiennent essentiellement les carotènes qui sont des précurseurs du rétinol. Une fois dans l'organisme, le rétinol est converti en AR et ses isoformes, appelés rétinoïdes. Tous les rétinoïdes, y compris l'AR, sont composés de trois unités: une région hydrophobe volumineuse (a), une région de liaison (b) et une région polaire C-terminal (c). En raison de l'efficacité des rétinoïdes naturels dans le traitement de plusieurs cancers (notamment le cancer sein et du poumon), plusieurs rétinoïdes synthétiques ont été générés et étudiés, comme l'ATRA (voit Figure 11) (Alizadeh et al., 2014).

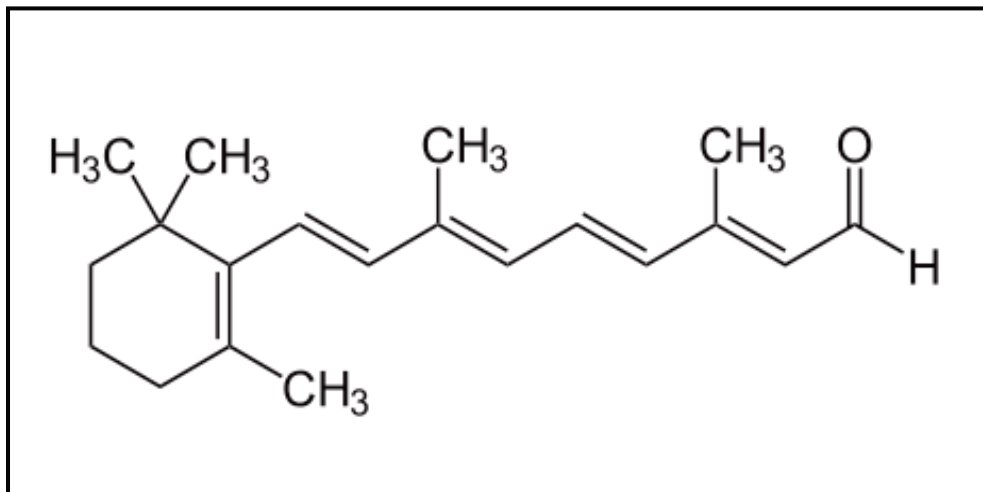


Figure 11 : Structure chimique de l'acide rétinoïque all trans (ATRA)

Les propriétés anticancéreuses de l'acide rétinoïque ont été étudiées sur de nombreux modèles. Au début des années 1980, il a été montré qu'il entraînait *in vitro* la différenciation des cellules embryonniques de tératocarcinome P19 en cellules neurales (Jones-Villeneuve et al., 1982). Plus précisément, il a été montré que les cellules tératocarcinomiques F9 pouvaient pleinement se différencier en neurones en réponse à un traitement avec l'acide rétinoïque (Kuff and Fowell, 1980). Ce dernier, en fait, inhibe les marqueurs de la prolifération cellulaire tels que la cycline D1, la télomérase, et les récepteurs et ligands des facteurs de croissance (par exemple, le récepteur de l'EGF et le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire,

VEGF). L'AR régule également la perméabilité mitochondriale et la formation de ROS (Chen et al., 2014). Ses effets sont induits via l'activation de la transcription de gènes cibles en se liant à deux familles de récepteurs nucléaires, à savoir les récepteurs d'acide rétinoïque (RAR) et les récepteurs X des rétinoïdes (RXR). La liaison de l'acide rétinoïque à son récepteur conduit à la libération du co-répresseur transcriptionnel et permet le recrutement du co-activateur de transcription. L'activation de la voie décrite ci-dessus conduit ainsi à la différenciation cellulaire, et éventuellement à l'induction de l'apoptose (Tang and Gudas, 2011). L'AR régule également la différenciation de CSCs de tumeurs solides autres que les tératocarcinomes. Ying *et al.* ont rapporté sa capacité à induire l'expression de marqueurs de différenciation spécifiques (Tuj1 et GFAP) et à réduire l'expression de marqueurs de CSNs (CD133, Msi-1, nestine et Sox2) (Ying et al., 2011). Actuellement, l'AR est utilisé en clinique dans le traitement de la leucémie promyélocytaire aiguë (APL), du cancer de la prostate et des neuroblastomes. Cependant, l'utilisation des rétinoïdes en clinique est limitée en raison du développement de résistances intrinsèques lors de la carcinogénèse dans les tumeurs solides et des résistances acquises dans le cas du traitement de l'APL (Morrison, 1972).

I.6.2. Les dérivés triterpéniques de type avicine

Les dérivés triterpéniques de type avicine correspondent à des hétérosides tridesmosidiques de l'acide acacique, peu répandus dans la nature, mais biosynthétisés dans certaines familles botaniques, comme celles des Mimosacées. Les hétérosides triterpéniques de type avicine ont au départ été identifiés dans une espèce endémique d'Australie: *Acacia victoriae*. Un criblage phytochimique a été réalisé par la suite sur différentes mimosacées africaines (espèces camerounaises et sénégalaises), ce qui a permis de sélectionner le genre *Albizzia* en raison de la présence des composés recherchés. L'optimisation des protocoles d'extraction décrits dans la littérature a permis de purifier des dérivés d'acide acacique, même présents à l'état de

traces, à partir d'une quantité de matériel végétal assez réduite (100 g d'écorces, contre plusieurs kg dans les publications antérieures). Une quinzaine de dérivés d'acide acacique ont ainsi été purifiés et de nouvelles structures ont été identifiées. Les métabolites secondaires représentent une classe d'hétérosides très complexes possédant un même aglycone (à savoir l'acide acacique) qui porte divers groupements oligosaccharidiques en C-3 et C-28 et un groupe acyl en C-21 (voir Figure 12).

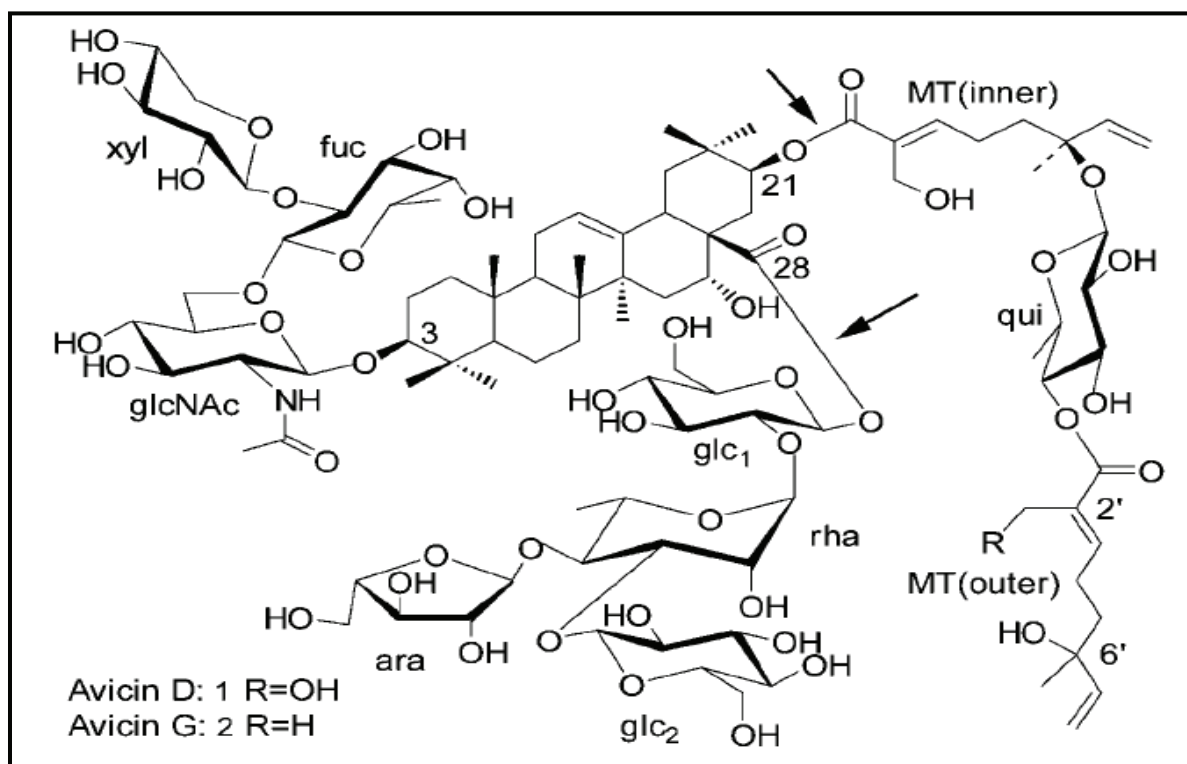


Figure 12 : Structure chimique de dérivés de l'acide acacique (avicines D et G).

Isolés des écorces de racines d'*Acacia victoriae*

Les saponosides triterpéniques isolés d'*Acacia victoriae* sont capables d'induire l'apoptose des cellules Jurkat (lignée de cellules T- leucémiques), ou de diminuer la prolifération des cellules MDA-MB-435 (lignée de cellules issues du cancer du sein) en bloquant le cycle cellulaire en phase G1 (Mujoo et al., 2001). Ils induisent en fait l'apoptose en provoquant des perturbations mitochondriales et en entraînant la libération intracellulaire de cytochrome C.

Ils sont également capables d'induire l'autophagie de cellules de lignées cancéreuses résistantes à l'apoptose (comme la lignée CTCL de cellules de lymphome cutané primitif à cellules T) (Haridas et al., 2001). En utilisant un modèle expérimental de carcinogénèse murin, l'application topique d'un mélange d'avicines D et G a permis la régression de tumeurs cutanées chez la souris (Hanausek et al., 2001).

II. Objectifs des études expérimentales

Nous avons vu, à travers ce travail bibliographique, l'implication des CSCs dans l'initiation, la métastase et la résurgence du cancer. La pathogénicité de la CSC est due à la dérégulation des voies de signalisation impliquées dans l'auto-renouvellement et la différenciation. Des études antérieures ont corrélé la présence des CSCs dans une tumeur à son degré d'agressivité. Ce dernier est en fait associé à une expression plus ou moins soutenue de la protéine Oct4. Ce facteur de transcription est connu pour être essentiel au maintien de la pluripotente à spectre large et de l'auto-renouvellement de cellules souches peu différenciées. Il est maintenant reconnu que l'expression d'Oct4 est notamment observée dans des SPs de lignées de CCs. Le travail de thèse a ainsi visé à analyser les effets des produits phytochimiques sur les CSCs exprimant Oct4. Plus spécifiquement ce travail, comportant trois parties, avait pour objectifs :

- 1) de caractériser les effets anti-carcinogéniques du roopérol sur un modèle de CSC pluripotente à spectre large (cellules souches tératocarcinomales) et d'en déterminer les mécanismes moléculaires sous-jacents. Ce travail a été complété par une évaluation de l'effet protecteur du roopérol sur les CSNs.
- 2) de cribler des composés photochimiques dérivés d'avicines sur un modèle de carcinome épidermoïde et de mélanome métastatique, afin de sélectionner de nouveaux composés potentiellement actifs sur les cancers cutanés exprimant Oct4. Ce travail a été complété par une caractérisation des mécanismes moléculaires mis en jeu lors de l'activation du processus pro-apoptotique déclenché par le composé le plus actif.

3) d'évaluer un des mécanismes de répression génique d'Oct4 accompagnant les modifications phénotypiques qui se mettent en place lors de la différenciation des CSCs. Plus précisément, nous nous sommes intéressés à l'étude de l'effet de l'activation de la FAK dans la chute de l'expression d'Oct4 dans les cellules tératocarcinomales traitées par l'inducteur de différenciation ATRA.

III. Résultats

Article 1 : Selective ROS-dependent p53-associated anticancer effects of the hypoxoside derivative rooperol on human teratocarcinomal cancer stem-like cells

Article 2 : A new acacic acid-type saponin from *Albizia coriaria* induces apoptosis in human malignant melanoma cell lines

Article 3 : FAK activity regulates Oct4 expression in teratocarcinomal stem-like cells

**Selective ROS-dependent p53-associated anticancer effects of the
hypoxoside derivative rooperol on human teratocarcinomal cancer stem-
like cells**

“Investigational New Drugs”

Selective ROS-dependent p53-associated anticancer effects of the hypoxoside derivative rooperol on human teratocarcinomal cancer stem-like cells

Sarah Ali Azouaou · Fathi Emhemmed ·
Noureddine Idris-Khodja · Annelise Lobstein ·
Valérie Schini-Kerth · Christian D. Muller · Guy Fuhrmann

Received: 17 July 2014 / Accepted: 29 October 2014 / Published online: 19 November 2014
© Springer Science+Business Media New York 2014

Abstract Cancer stem cells (CSCs) are potential targets for innovative anticancer therapies that involve natural products with potential chemopreventive effects. We therefore analyzed the antineoplastic activity of rooperol, the aglycone of the plant-derived compound hypoxoside, on a model of Oct4-expressing cancer stem-like cell, i.e. the human embryonal carcinoma (EC) cell NT2/D1.

Rooperol selectively inhibited the proliferation of NT2/D1 cells in a concentration-dependent manner and had no effect on either normal embryonic fibroblasts which are more restrictive pluripotent stem cells or on NCCIT p53-mutant EC cells. Accordingly, rooperol only eliminates colon carcinoma cells expressing p53.

Rooperol treatment triggered cell death on NT2/D1 cells through the alteration of mitochondrial membrane potential

and production of reactive oxygen species (ROS). Rooperol-induced apoptosis was associated with activation of p53 and concentration-dependent changes of the expression levels of both caspase 3 and poly ADP ribose polymerase type 1 cleaved subunits. These modifications were accompanied by a downregulation of Oct4 and its two partners involved in the maintenance of cell pluripotency and self-renewal, Nanog and Sox2.

Treatment with intracellular membrane permeant O₂⁻ scavengers prevented rooperol-induced apoptosis and upregulation of the expression of p53 and active caspase-3. Our findings indicate that rooperol mediates its growth inhibitory effects on CSCs via a mitochondrial redox-sensitive mechanism. We propose that abrogating the expression of the stemness regulators is a prerequisite for rooperol to fully exert its pro-apoptotic properties on wild-type p53-bearing CSCs.

S. Ali Azouaou · F. Emhemmed · N. Idris-Khodja ·
V. Schini-Kerth · G. Fuhrmann (✉)
UMR 7213 CNRS, Laboratoire de Biophotonique et Pharmacologie,
Faculté de Pharmacie, Université de Strasbourg, 74 route du Rhin,
67401 Illkirch, France
e-mail: guy.fuhrmann@unistra.fr

A. Lobstein · C. D. Muller
UMR 7200 CNRS, Laboratoire d'Innovation Thérapeutique, Faculté
de Pharmacie, Université de Strasbourg, 74 route du Rhin,
67401 Illkirch, France

Present Address:

S. Ali Azouaou · F. Emhemmed
UMR 7200 CNRS, Laboratoire d'Innovation Thérapeutique, Faculté
de Pharmacie, Université de Strasbourg, 74 route du Rhin,
67401 Illkirch, France

Present Address:

N. Idris-Khodja
Lady Davis Institute for Medical Research, Sir Mortimer B. Davis-Jewish
General Hospital, McGill University, 3755 Côte-Ste-Catherine Rd.,
Montreal, QC H3T 1E2, Canada

Keywords Cancer stem-like cells · Rooperol · Apoptosis ·
Reactive oxygen species · p53 · Oct4

Introduction

The cancer stem cell (CSC) is believed to be the initiator of tumor development and metastatic outgrow, as well as the causal factor of cancer resistance to radiotherapy and numerous natural and synthetic anticancer chemical compounds [1, 2]. It is now accepted that CSCs arise from normal stem cells (NSCs) exposed to repetitive mutation-inducing stress injuries [2, 3]; actually CSCs share many characteristics with NSCs and can be defined by their ability to undergo self-renewal and to differentiate into more restricted cell types (from pluripotency to monopotency). The capacity to self-renew allows the expansion of NSC or CSC pool in response to

controlled or uncontrolled local signals respectively [2]. Moreover the existence of a hierarchical and dynamical relationship between CSC and cancer cell implies that anticancer treatments should not only target the descendant cancer cells, but also their progenitors [2, 4].

On the basis of epidemiological data, it has been reported that diet rich in fruits and vegetables has cancer-protective properties [5]; this suggests that some plant-derived compounds may be able to restrict the expansion of CSCs and to kill them. The chemotherapeutic benefits of different phytochemical agents on cancer cells are well documented [2, 6, 7]; for instance they target various cell processes, including induction of apoptosis as well as inhibition of cell survival. However their effects on CSCs have only been explored recently with the development of reliable cell models [2]. Indeed, a combination of specific markers is now recommended for a prospective isolation of CSCs and consequently the derivation of *bona fide* CSC lines. This combination includes, amongst others, different cell surface antigens, whose identity determines the specific molecular signature of a given type of CSC [2]. Alternatively, we and others, previously argued that the malignant counterparts of embryonic stem cell lines, like the embryonal carcinoma stem cell lines, are suitable models of CSCs [1, 8, 9]. These cell lines are poorly differentiated pluripotent germinal stem cells which express different stemness markers and have a high aggressive malignant phenotype; they can therefore be used as experimental tools for carcinogenicity studies and the evaluation of potential anticancer chemopreventive agents [1, 10].

Rooperol (1,5-Bis(3',4'-dihydroxyphenyl)pent-4-en-1-yne; CAS 83,644-00-2) is the aglycone of hypoxoside, the major phenolic constituent of the African potato, *Hypoxis hemerocallidea* Fish. & C.A. Mey. (Hypoxidaceae). Previous studies have shown that rooperol has strong antioxidant and anti-inflammatory activities [11, 12]. More recently, it has been observed that the hypoxoside derivative exhibits pro-apoptotic properties on various cancer cell lines [13]. Rooperol-induced cell death involves cell cycle arrest and increasing expression levels of p21^{Waf1/Cip1} and active caspase-3 [13].

In the framework of our screening program of drug leads, we have first evaluated the *in vitro* anticancer properties of rooperol on human embryonal teratocarcinoma stem cells NT2/D1 (also known as NTERA-2 cl. D1). This highly pluripotent undifferentiated cell line harbors a strong expression of the stemness factor Oct4. This transcription factor is known to be essential for pluripotency maintenance and self-renewal. Oct4 binds at the promoters and regulatory regions of target genes which are involved in proliferation or differentiation processes [14, 15]. Increased specificity of Oct4 activity is reached when the stemness factor interacts with either one of the two transcriptional regulators, namely the homeobox protein Nanog or the SRY-related HMG-box protein Sox2 [16].

Actually Oct4, like its two partners, are expressed in several CSC types [17] and their presence is clearly associated with a poorly differentiated and highly aggressive cancer phenotype [18].

The second aim of the present study was to evidence the selective effect of rooperol on CSCs, with a potential lack of activity on normal stem-like cells. For that purpose, we took the most appropriate non-cancerous cell line counterpart, i.e. the fibroblastic BJ cell line. The latter was originally established from primary human newborn foreskin and was spontaneously immortalized with stable growth rate, without oncogenic transformation; the BJ cell line is currently used for the generation of induced pluripotent stem cells [19], but has limited differentiation capacity by itself [8].

Here we show that rooperol selectively kills pluripotent cancer stem-like cells but not normal stem-like cells. This chemopreventive effect implicates a p53-dependent caspase-3-dependent pro-apoptotic pathway, leading to the downregulation of the main regulators of a highly pluripotent cell state. This effect involves ROS formation that initiates a pro-apoptotic mitochondrial response. Our study therefore highlights the mechanisms controlling cell reactivity after exposure to pharmacological agents (e.g. rooperol) with chemotherapeutic and chemopreventive properties on p53-expressing cancer cells and CSCs respectively.

Material and methods

Cell lines and culture conditions

NT2/D1 (CRL-1973), NCCIT (CRL-2073), BJ (CRL-2,522), HCT116 (CCL-247), HT29 (HTB-38) and SW480 (CCL-228) cell lines, all purchased from ATCC (LGC Standards, Molsheim, France), were cultivated in DMEM-based media (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France), supplemented with 10 % (*v/v*) fetal bovine serum (BioWhittaker, Verviers, Belgium), 2 mM ultraglutamine, 50 μ M non essential amino acids, 50 U/ml penicillin and 50 μ g/ml streptomycin (Sigma-Aldrich). Cells, grown in humidified atmosphere with 5 % CO₂ at 37 °C, were treated when they reached semi-confluence.

Cell treatment

Rooperol, a gift of Dr. A.C. Allison (Belmont, CA, USA) was diluted to 10 mM in dimethyl sulfoxide (DMSO). Cells were treated at different times with the appropriate working concentrations of rooperol mixed with the cell culture medium. In some experiments, cells were incubated 30 min prior rooperol treatment with different antioxidants including SOD (superoxide dismutase), MnTMPyP (manganese [III] tetrakis [1-methyl-4-pyridyl] porphyrin, a membrane-permeant SOD

mimetic), Cat (catalase) or PEG-Cat (polyethylene glycol-catalase, a membrane-permeant Cat) (Sigma-Aldrich).

MTS assay

Cells seeded in triplicate on 96-multiwell plates at a density of 5×10^3 cells/well, were grown for 24 h and exposed to either vehicle or rooperol at different concentrations for an additional 24 h. Cell proliferation rate was then determined by colorimetry using the CellTiter 96 AQueous One® Solution Cell Proliferation Assay (MTS), following the manufacturer's recommendations (Promega, Charbonnières-les-Bains, France). Absorbance was measured at 490 nm on a multiwell ELISA plate reader (Multiskan Ascent 96/384 Plate Reader, MTX Lab Systems, Vienna, Virginia, USA). The percentage of living cell was estimated as a ratio of the OD value of each rooperol-treated cell sample to the OD value of the corresponding control untreated cell sample.

Apoptosis rate analysis by annexin V assay

Apoptosis was determined by evaluating the externalization rate of phosphatidylserine related to annexin V binding and nucleus labeling intensity of propidium iodide (PI). Cells were cultured, treated with rooperol and collected. Apoptosis rates were then assessed by capillary cytometry (Guava EasyCyte Plus, EMD Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) using annexin V-FITC (Immunotools, Friesoythe, Germany) and PI (Miltenyi Biotec, Paris, France), according to the manufacturer's recommendations. At least 10,000 events were recorded to assess the percentage of apoptotic cells.

Mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) measurement

Cells seeded at a density of 2×10^5 cells/well in 6-well plates, were treated with vehicle or increasing concentrations of rooperol during 24 h. The $\Delta\Psi_m$ changes were then determined by incubating the cells for 15 min at 37 °C in PBS supplemented with 40 nM of [3,3' - Dihexyloxycarbocyanine iodide] -DiOC6-, prior to capillary cytometry examination (Guava EasyCyte Plus). At least 5,000 cells were analyzed for each sample.

Determination of reactive oxygen species (ROS) formation

The levels of cellular ROS production were determined as previously described [20]. Briefly, cells seeded at an initial density of 2×10^6 cells/well in 6-well plates, were exposed for 2 h to either vehicle or increasing concentrations of rooperol and then stained for 15 min at room temperature with a 1 μ M dihydroethidine (DHE) solution; DHE is a redox-sensitive

fluorescent probe which is rapidly oxidized by superoxide anions, resulting in red fluorescent ethidium which accumulates in the nucleus by intercalating into DNA. After staining with DHE, cells were subjected to flow cytometric examination (FACSCalibur, BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Data were acquired and analyzed using the FlowJo software (FlowJo, Ashland, OR, USA). At least 10,000 events were recorded per experiment.

Western blot analysis

Exponentially growing cells were treated with either vehicle or increasing concentrations of rooperol and incubated for different times. Cells were harvested and centrifuged at 20,000 g for 10 min at room temperature. The pellets were then resuspended in RIPA buffer (25 mM Tris pH 7.6, 150 mM NaCl, 1 % NP-40, 1 % sodium deoxycholate, 0.1 % SDS) containing protease inhibitors (Sigma-Aldrich). Proteins from cell lysates were extracted, separated on 10–15 % SDS-polyacrylamide gels and transferred to membranes as previously described [21, 22]. Immunoblotting was performed, using either a mouse monoclonal anti-p53 antibody or a rabbit polyclonal anti-p21 antibody (Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA, USA), or a rabbit polyclonal anti-cleaved caspase-3 antibody (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), or a rabbit monoclonal anti-poly ADP ribose polymerase type 1 (Cleaved p25) antibody (Abcam, Paris, France), or a rabbit polyclonal anti-Oct4 antibody (Active Motif, La Hulpe, Belgium), or a rabbit polyclonal anti-Nanog or Sox2 antibody (GeneTex, Irvine, CA, USA), according to the manufacturer's instructions. After incubation with the appropriate horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody, the immunoreactive bands were detected on the membranes using ECL chemiluminescence substrate solution (GE Healthcare Europe GmbH, Saclay, France). Membranes were stripped subsequently and re probed with a mouse polyclonal anti-beta tubulin antibody or a rabbit polyclonal anti-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) antibody (Abcam, Paris, France) for normalization purposes. Autoradiographic signals were captured on a GeneGenius Bio Imaging System (Syngene, Cambridge, UK) using the GeneSnap software and analyzed on NIH's Image J software.

Statistical analysis

Data, presented as bar graphs, were expressed as means \pm S.E.M. of at least three independent experiments. Statistical evaluation was performed with the one-way ANOVA test followed by the post-hoc Bonferroni test using GraphPad Prism software (Prism version 5.04 for Windows, GraphPad

Software, CA, USA); a p -value less than 0.05 was considered as significant.

Results

Rooperol selectively inhibited cell growth of p53-expressing cancer stem-like cells and cancer cells

The cytotoxic effects of rooperol were first assessed by measuring the growth parameters of different cell lines after short-term treatment. Cell proliferation following 24 h of rooperol treatment was decreased in a concentration-dependent manner (from 1 μ M to 50 μ M) in the teratocarcinomal stem-like cell lines NT2/D1 and the colon carcinoma cell line HCT 116 (Fig. 1). In our experimental conditions, extrapolated calculated concentrations of rooperol-induced half-maximal effects on cell proliferation were respectively of 15.4 ± 0.2 μ M and 61.9 ± 2.4 μ M for NT2/D1 and HCT116 cells. These results indicate that CSCs and cancer cells optimally respond to rooperol within 24 h and at a micromolar concentration. In contrast, proliferation of the fibroblast cell line BJ was not affected by rooperol, even when treated with high concentrations (up to 50 μ M) (Fig. 1). Interestingly p53 mutant cell lines, like the teratocarcinomal stem-like cell line NCCIT or colon carcinoma cell lines HT29 and SW480, were insensitive to rooperol at the micromolar concentrations (Fig. 1). These findings show that p53 is a major regulator of cell death induced by rooperol treatment.

Rooperol selectively induced apoptosis and reduction of Ψ m in p53-expressing teratocarcinomal cancer stem-like cells

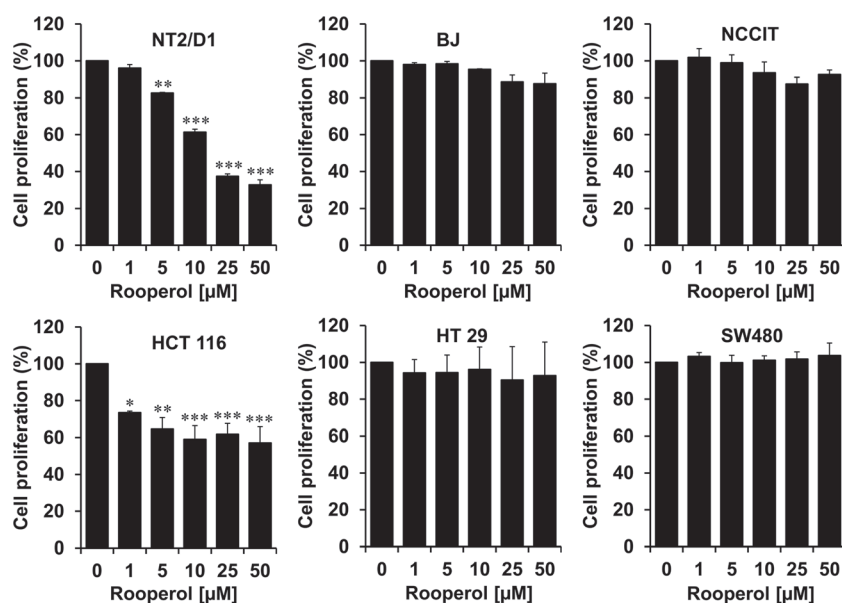
We next investigated whether rooperol could selectively induce apoptosis in NT2/D1 cells. As shown in Fig. 2a and b, increasing concentrations of rooperol (from 1 to 50 μ M) are associated with increasing number of apoptotic cells. Rooperol triggered apoptosis starting at 25 μ M, while at 50 μ M, a major proportion of cells were apoptotic. As expected, the calculated half-maximal effect of rooperol on cell apoptosis was 29.1 ± 1.0 μ M. On the contrary, no significant change was observed in BJ fibroblasts.

In parallel, effects of rooperol on the mitochondrial membrane potential status in NT2/D1 and BJ cells were investigated by monitoring the uptake rate of DiOC6, a mitochondrial specific and voltage-dependent fluorescent dye. The number of teratocarcinomal cells, emitting high fluorescence levels, were decreased when cells were treated with 25 or 50 μ M of rooperol (Fig. 2c and d), indicating a dramatic drop of $\Delta\Psi$ m. At the opposite, no significant change was observed in the normal stem-like cells (Fig. 2c and d). These results demonstrate the occurrence of a selective apoptosis, associated with a loss of mitochondrial membrane potential, in the p53-wild type cancer stem-like cells, when exposed to rooperol; by contrast, the drug has no obvious effect on the normal stem-like cells.

Rooperol selectively induced the production of ROS in p53-expressing teratocarcinomal cancer stem-like cells

We hypothesized that rooperol, like many phenolic compounds, can trigger apoptosis by generating ROS [23], that in turn induces mitochondrial membrane disruption. We

Fig. 1 Concentration-dependent effects of rooperol on the proliferation rate of different cell lines. Cells were exposed to rooperol at the indicated concentrations and incubated for 24 h. The proliferation rate of NT2/D1, BJ, NCCIT, HCT 116, HT 29 and SW480 cells was then assessed by colorimetry using the MTS assay. The absolute value obtained for each rooperol-treated sample was expressed in a second step as percent relative to the corresponding absolute value obtained from the untreated sample and set at 100. Values are means \pm S.E.M. of three independent experiments; statistically significant: *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$



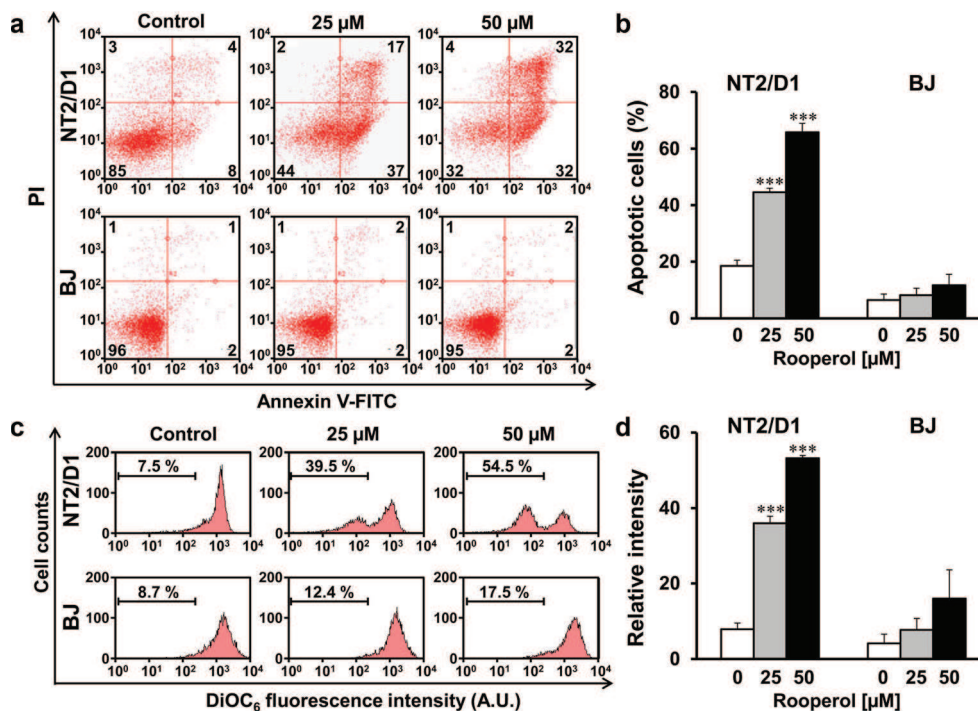


Fig. 2 Selective concentration-dependent effects of rooperol on the apoptosis rate and $\Delta\Psi_m$ disruption degree. Cells were exposed to rooperol at the indicated concentrations and incubated for 24 h. **(a, b)** Cell apoptosis rate was assessed by flow cytometry using the Annexin V-FITC/PI staining assay. **a** shows representative cell sorting results for NT2/D1 and BJ cells; each of the four quadrants corresponds to a specific cell event: viable cells, cells in a early stage of apoptosis, cells in a late stage of apoptosis and necrotic cells are respectively represented in the lower left, lower right, upper right and upper left quadrants. **b** recapitulates in a bar graph form the percentage of NT2/D1 or BJ cells in

apoptosis. The number of apoptotic cells is expressed as percent relative to the total cell number. **(c, d)** $\Delta\Psi_m$ alteration was assessed by flow cytometry using the DiOC6 staining assay. **c** shows representative histogram of the percentage of damaged NT2/D1 or BJ cells with depolarized mitochondrial membranes. **d** recapitulates in a bar graph form the percentage of NT2/D1 and BJ cells with depolarized mitochondrial membranes, expressed as percent relative to the total cell number. Values are means \pm S.E.M. of three independent experiments; statistically significant: ***, $p < 0.001$

therefore determined by cytometry the levels of the DNA intercalating fluorescent marker ethidium produced after intracellular oxidation of DHE. As shown in Fig. 3a and b, the fluorescence signal was markedly increased in NT2/D1 cells treated with 25 and 50 μM of rooperol, whereas at lower concentrations no significant changes were observed. On the other hand, no significant variations were observed in the normal stem-like cells, when treated by increasing concentrations of the drug (Fig. 3c and d). These results suggest therefore that rooperol selectively induces apoptosis and breakdown of $\Delta\Psi_m$ by producing ROS metabolites in the p53-wild type teratocarcinoma cells. At the opposite, the fibroblastic cells are not affected by the drug, even when administered at high concentrations.

Rooperol down-regulated the expression of stemness factors in cancer stem-like cells

Oct4 plays a critical role for the maintenance of cell pluripotency and self-renewal [14, 15]. Oct4 activity is enhanced when it interacts with two additional transcription factors, Nanog and Sox2 [16]. There are several lines of

evidences that induction of apoptosis in pluripotent normal or potential cancer stem-like cells is accompanied by a down-regulation of Oct4 [2, 8–10]. We therefore analyzed the expression levels of Oct4, Nanog and Sox2 during rooperol-induced apoptosis of teratocarcinoma stem-like cells. As shown in Fig. 4, NT2/D1 cells treated with 5 μM of rooperol exhibited decreased Oct4 and Nanog levels, whereas at higher concentrations, only faint bands could be visualized. However at least 10 μM of the drug were necessary to observe a mild, but significant, down-regulation of Sox2 expression. Taken together, these results indicate that rooperol kills teratocarcinoma cells by a pro-apoptotic process which is associated with a selective down-regulation of core regulators (i.e. Oct4, Nanog and Sox2) involved in maintaining a stemness state.

Rooperol induced a p53-associated caspase-3-associated apoptosis in cancer stem-like cells

We supposed that rooperol could trigger apoptosis in teratocarcinoma cells by a caspase-3-dependent pathway which selectively leads to the proteolytic degradation of

Fig. 3 Selective concentration-dependent ROS production induced by rooperol. Cells were exposed to rooperol at the indicated concentrations and incubated for 2 h. ROS accumulation was assessed by flow cytometry after DHE incubation. **a** and **c**, respectively, show representative histograms of the overlapping fluorescence curves obtained for untreated and rooperol-treated NT2/D1 and BJ cells. **b** and **d**, respectively, recapitulate in a bar graph from the percentage of fluorescence intensity obtained for each rooperol-treated NT2/D1 and BJ cell sample and expressed in a second step as percent relative to the corresponding absolute value obtained for the untreated cell sample and set at 100. Values are means \pm S.E.M. of six independent experiments; statistically significant: *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$

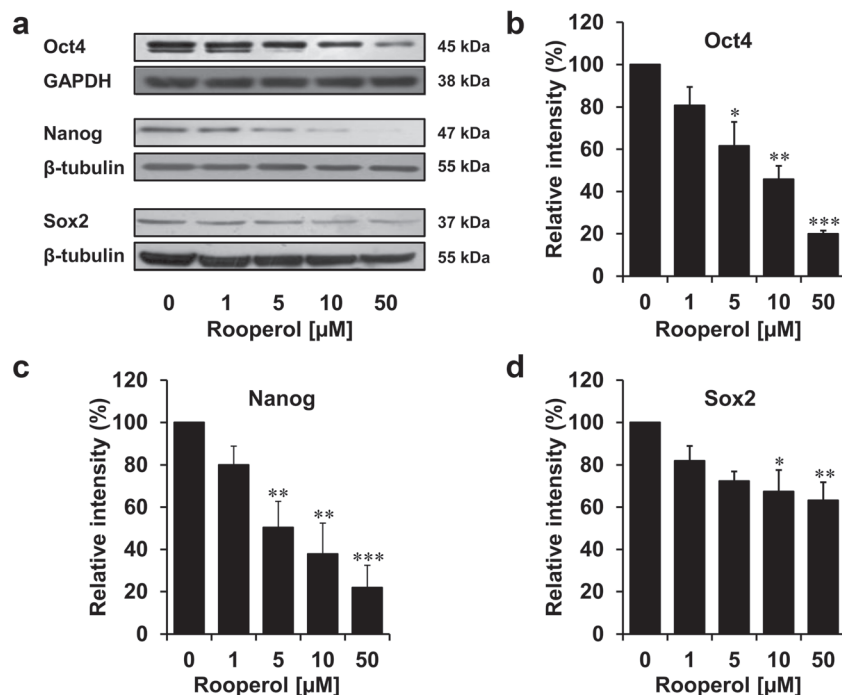
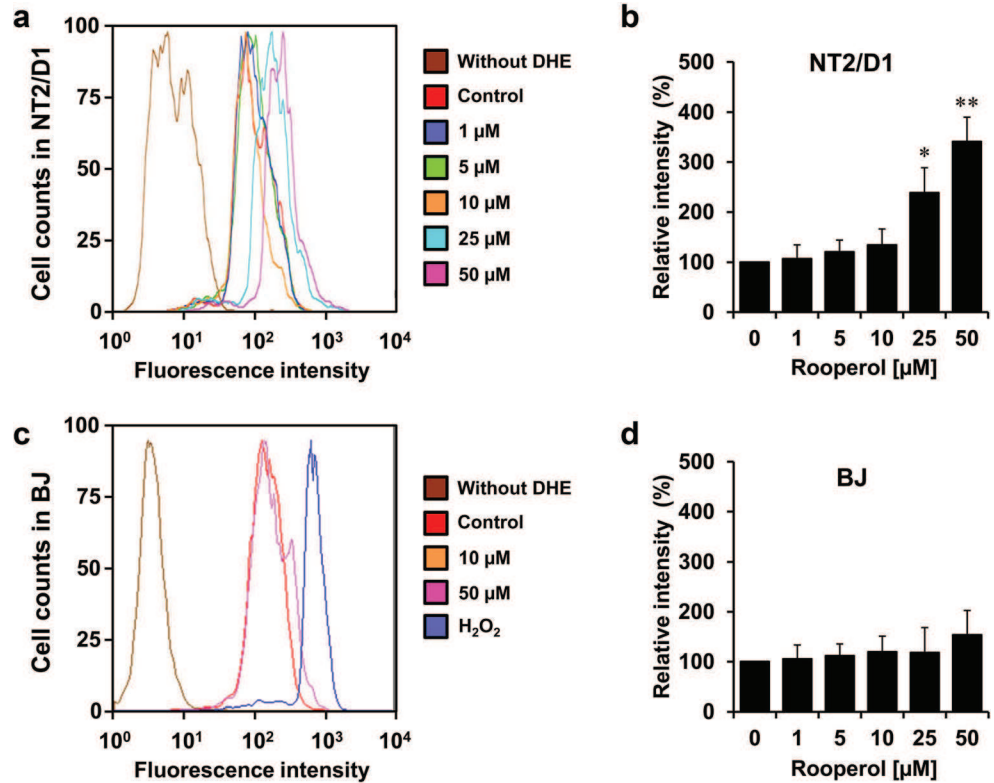


Fig. 4 Concentration-dependent effects of rooperol on the expression levels of the main stemness factors in NT2/D1 cells. Cells were exposed to rooperol at the indicated concentrations and incubated for 24 h. Immunoblotting analysis was performed as described in “Material and methods” with the corresponding antibodies. Specific bands were detected with their expected apparent molecular weight. **a** shows representative

immunoblotting results. **b**, **c**, **d** respectively show densitometry results of Oct4, Nanog and Sox2 expression normalized to either GAPDH or β -tubulin expression and given as ratios relative to the value obtained for the untreated sample and set at 100. Values are means \pm S.E.M. of three independent experiments; statistically significant: *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$

Oct4 and Nanog. Accordingly we detected accumulating expression rates of p53, p21^{CIP1/WAF1} (a regulator of cell cycle progression controlled by p53 [24]), as well as caspase-3 cleaved subunits in NT2/D1 cells when treated for 24 h with increasing concentrations (from 1 to 50 μM) of the drug (Fig. 5). Interestingly, time-course analysis showed that significant levels of apoptosis can be observed as early as 6 h of treatment (Fig. 6). Moreover, significant expression levels of p53, active caspase-3 and cleaved poly ADP ribose polymerase type 1 (PARP1) were observed after 6 h of cell treatment, when compared with untreated cells. Oct4 downregulation was only obtained after 12 h of rooperol treatment (Fig. 7). In view of these chronological expression pattern modifications, it could be suggested that the drug induces a p53-dependent caspase-3-dependent pro-apoptotic process in Oct4-expressing teratocarcinoma cells.

Rooperol induced a ROS-dependent, p53- and caspase-3-associated apoptosis in cancer stem-like cells

Recent findings indicated that phenolic compounds can induce ROS-dependent apoptosis in cancer cells [20, 22] by producing either superoxide anions or hydrogen peroxide. To determine whether a ROS-signaling pathway could be involved in rooperol-induced apoptosis and additionally to determine the implicated sources of ROS, we examined the effects of various antioxidants on rooperol-treated NT2/D1 teratocarcinoma stem-like cells. For that purpose, different ROS scavengers were used, i.e. SOD, MnTMPyP (a

membrane-permeant SOD mimetic), catalase and PEG-catalase (a membrane-permeant catalase). A marked reduction of ROS formation was observed when rooperol-treated cells were concomitantly exposed to the antioxidant compounds (Fig. 8a). Moreover as shown in Fig. 8b, the presence of MnTMPyP was able to partially countervail apoptosis triggered by rooperol at 25 μM , whereas native SOD, catalase or PEG-catalase were inactive, indicating a key role of intracellular superoxide anions (O_2^-). In addition, MnTMPyP prevented rooperol-induced upregulation of p53, active caspase-3 and cleaved PARP1 (Fig. 8c, d and e). Actually these events did not induce a reinitiation of Oct4 expression (data not shown). Our results finally suggest that rooperol activation of the p53-associated caspase-associated pathway in cancer stem-like cells triggers apoptosis through a ROS-dependent mechanism (Fig. 9).

Discussion

Cytometry studies have previously indicated that the cytotoxic effect of rooperol on cancer cells is associated with an activation of the pro-apoptotic effector caspase-3 [13]. In CSCs however, the molecular mechanisms involved in rooperol-induced reactivity were not yet documented.

The present study demonstrates that rooperol triggers apoptosis in teratocarcinoma cancer stem-like cells (and additionally in cancer cells) through the activation of the tumor suppressor p53. Indeed, only p53-expressing cell lines were

Fig. 5 Concentration-dependent effects of rooperol on the expression levels of the tumor suppressor p53 and its effectors in NT2/D1 cells. Cells were exposed to rooperol at the indicated concentrations and incubated for 24 h. Immunoblotting analysis was performed as explained in the legend of Fig. 4. **a** shows representative immunoblotting results and **b**, **c**, **d** show normalized densitometry results for p53, p21 and cleaved caspase-3 (C. Casp-3) respectively. Values are means \pm S.E.M. of three independent experiments; statistically significant: *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$

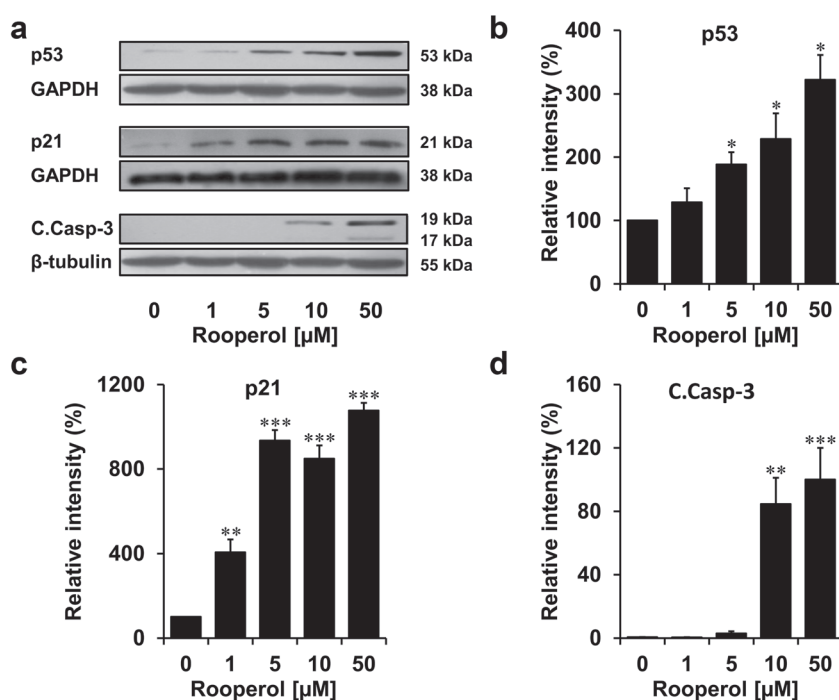
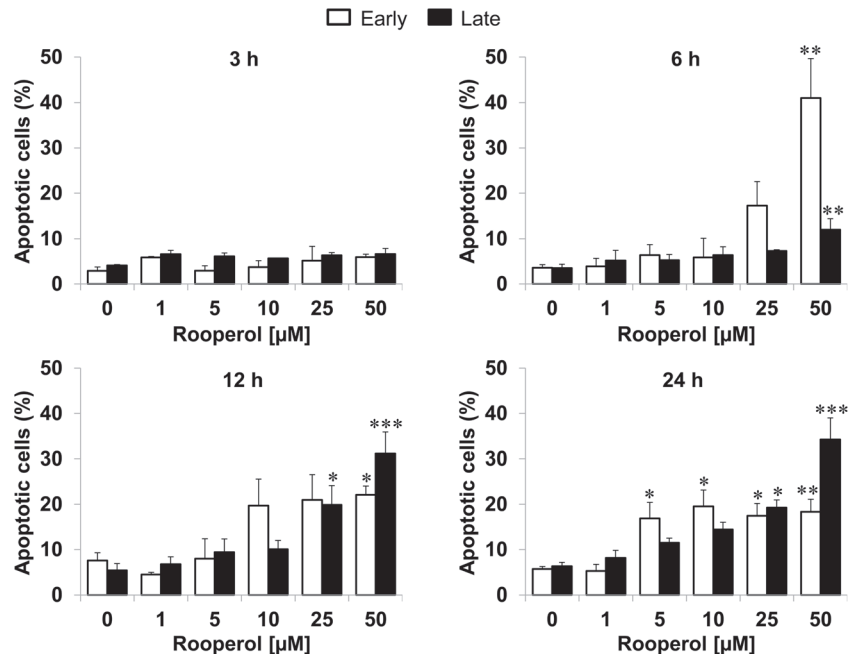


Fig. 6 Time-course of the effects of rooperol on the apoptosis rate in NT2/D1 cells. Cells were exposed to rooperol at the indicated concentrations and incubated for the indicated times. The number of cells in early and late apoptosis is expressed as percent relative to the total cell number. Values are means \pm S.E.M. of three independent experiments; statistically significant: *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$

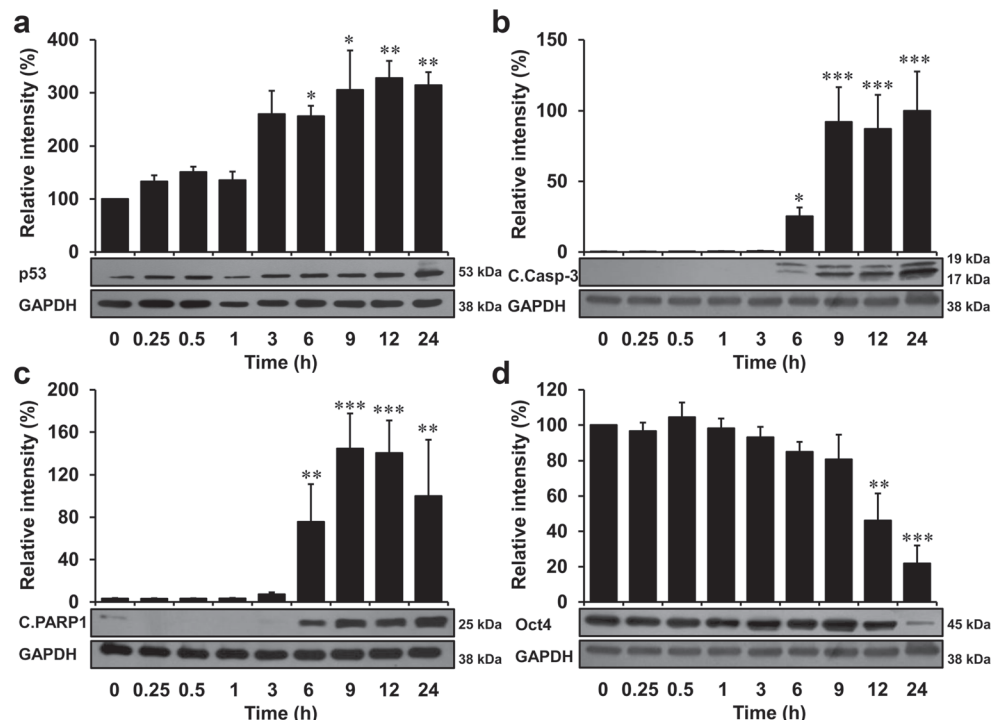


sensitive to rooperol at the micromolar concentrations, suggesting that the drug induces a p53-dependent pro-apoptotic process. Accordingly immunoblotting analysis demonstrates that increased expression levels of p53 could be detected in CSCs when treated with the pharmacological agent. DNA damage-induced activation of a precise pro-apoptotic pathway is known to be cell type- and genotoxin-specific, depending amongst others on the p53/p73 status in the case of a mitochondrial reaction [25]. It is therefore not surprising that

cancer cells and CSCs respond in a similar manner (e.g. caspase involvement) to a specific pharmacophore (for instance rooperol) since they share common molecular determinants for their mitochondrial reactivity.

Selective toxicity of a pharmacological agent against CSCs and cancer cells, but not on normal SCs and normal cells, should provide a propitious possibility for an efficient chemotherapy with limited side effects. As rooperol has a strong cytotoxic effect on CSCs, its discriminatory activity should be

Fig. 7 Time-course of the effects of rooperol on the expression levels of p53, active caspase-3, active PARP1 and Oct4 in NT2/D1 cells. Cells were exposed to 25 μ M of rooperol and incubated for the indicated times. Immunoblotting analysis was performed as explained in the legend of Fig. 4. Normalized densitometry and representative immunoblotting results are shown for p53 **a**, cleaved caspase-3 (C. Casp-3) **b**, cleaved PARP1 (C. PARP1) **c** and Oct4 **d** respectively. Values are means \pm S.E.M. of three independent experiments; statistically significant: *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$



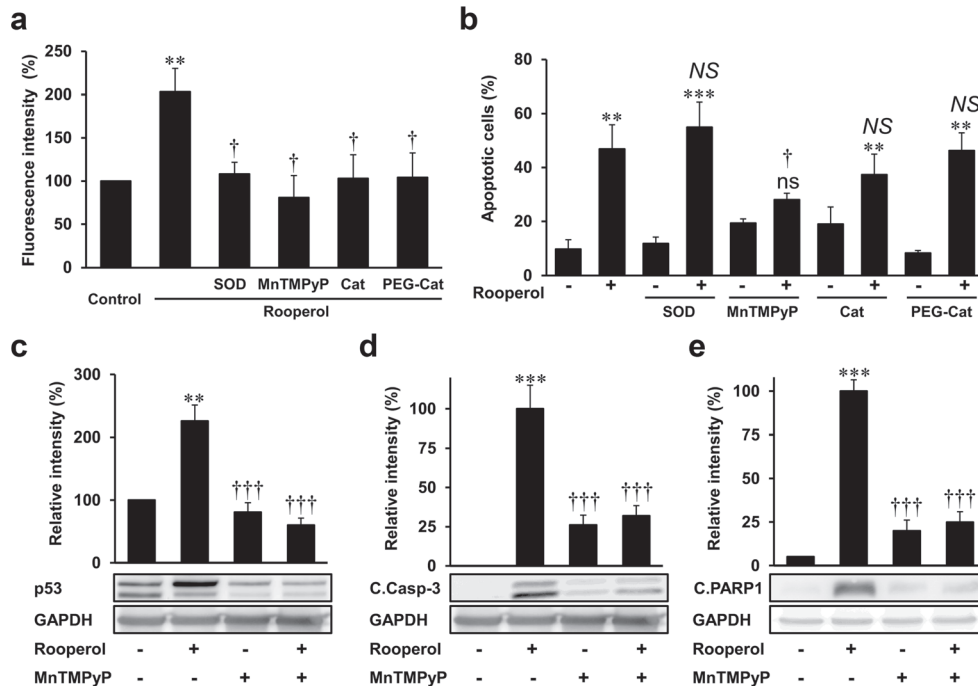


Fig. 8 Rescue effects of a treatment with different ROS scavengers on rooperol-induced apoptosis of NT2/D1 cells. Cells were treated or not with 100 μ M of either SOD, MnTMPyP, Cat or PEG-Cat for 30 min and then grown for either 1 h (A) or 24 h (B, C, D and E) in the presence or absence of 25 μ M of rooperol. **a** recapitulates in a bar graph form, as explained in the legend of Fig. 3, the percentage of ethidium fluorescence intensity obtained for each rooperol-treated sample and expressed in a second step as percent relative to the corresponding absolute value obtained for the untreated sample and set at 100. **b** recapitulates in a bar graph form, as explained in the legend of Fig. 2, the percentage of

apoptotic cells obtained for each sample and expressed as percent relative to the total cell number. **c**, **d** and **e** respectively show normalized densitometry and representative immunoblotting results, obtained after the different treatments, for p53, cleaved caspase-3 (C. Casp-3) and cleaved PARP1 (C. PARP1), as explained in legend of Fig. 4. Values are means \pm S.E.M. of four independent experiments. Statistical significance for “rooperol” variable (treated versus untreated): **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; ns, not significant. Statistical significance for “antioxidant” variable (treated versus untreated and rooperol-exposed): †, $p < 0.05$; †††, $p < 0.001$; NS, not significant

explored. To address this point, we therefore studied the effects of the hypoxoside derivative on a fibroblast cell line which is known to have a restricted developmental potential and enhanced reprogramming capacity [8, 19]; as hypothesized, the results showed that high concentrations of rooperol which were able to strongly decrease the proliferation rate of

cancer cells (HCT116) and cancer stem-like cells (NT2/D1), had no observable toxic effect on these normal stem-like cells. Indeed annexin V assay, as well as other indirect indicators of apoptosis, confirmed that the drug, even at high concentrations, had no effect on BJ fibroblasts. Consequently, it is expected that rooperol is also ineffective on other non-pathological proliferative cells. It should however be noted that there are some remaining unresolved issues with respect to rooperol selectivity. For instance, it is unclear to what extent the fibroblast could be used as a general model of negative control for anticancer drug screening, although this is widely accepted. We previously showed that the normalized pluripotent CSC, i.e. the retinoic acid-treated teratocarcinoma cell, like the fibroblast, is not affected by a treatment known to kill the undifferentiated parental cell. We concluded that the differentiation therapy has led to a loss of the tumorigenic properties [9]. In this point of view, it would be worth investigating whether rooperol has no effect on retinoic acid-treated NT2/D1 cells which are more closely related to their cancerous counterparts than fibroblasts. Additional studies need therefore to be carried out to confirm the likely lack of response of the drug on these normalized cells before drawing further generalization about cell susceptibility to rooperol.

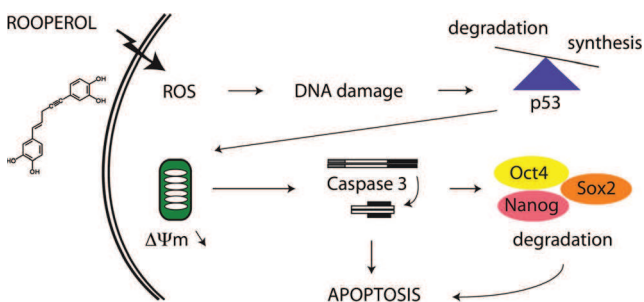


Fig. 9 Hypothetical model of ROS-dependent p53-associated caspase-3-associated pro-apoptotic activity of rooperol in cancer stem-like cells. After its translocation in the cytoplasm, rooperol triggers the production of ROS and consecutively induces an upregulation of the tumor suppressor p53 in teratocarcinoma cells, leading to an activation of a caspase-3-dependent proteolytic process which targets the stemness factors Oct4, Nanog and Sox2. As a consequence, cells undergo an irreversible programmed cell death

The reason for the targeted response of rooperol on CSCs and cancer cells, but not on normal SCs (and normal cells), still remains unexplained. In agreement with Warburg's concept, this could be linked to the particular properties of the metabolic activity of cells which exhibit an oncogenic phenotype [26]. Indeed in contrast to their normal counterparts, these cells are known to have enhanced glycolysis rate at the expense of the oxidative phosphorylation [27]. These specificities could be related to the selective cytotoxic effect of rooperol on CSCs and cancer cells; however further investigations are necessary in order to decipher the precise molecular mechanisms which underly rooperol-associated cell reactivity.

One of the major findings of the present study is that rooperol exerts its anticancer activity by generating ROS. By using a redox-sensitive fluorescent probe, we evidenced that rooperol causes a sustained formation of intracellular ROS in NT2/D1 cells. Indeed membrane-permeable superoxide dismutase mimetics prevented rooperol-induced ROS production and apoptosis whereas native superoxide dismutase, unable to cross membranes, was inefficient. Moreover intracellular radical scavengers abolished rooperol-triggered up-regulation of p53 and active caspase-3, as well as active PARP1. These results show therefore that rooperol is acting as a powerful intracellular ROS producer which exerts its anticancer effects by inhibiting cell growth and inducing subsequently a p53-dependent caspase-dependent apoptosis of teratocarcinoma cells.

Cancer cells efficiently respond to pro-oxidant pharmacological compounds like polyphenols. For example, curcumin is known to induce growth inhibition on various cancer cell types through a pro-oxidant response involving an intracellular formation of ROS [2]. It has been shown that these free radicals predominantly originate from the mitochondrial respiration chain and reduce oxidative defense subsequently to a down-regulation of mitochondrial SOD [28, 29]. Accordingly, we assumed that the initial mediator of rooperol-induced prooxidant response is the mitochondrial machinery. This hypothesis is supported by our results showing a concentration-dependent $\Delta\Psi_m$ disruption after exposure of teratocarcinoma NT2/D1 cells to the hypoxoside derivative.

Our findings show that rooperol exerts its cytotoxic activity on Oct4-expressing cancer stem-like cells. Indeed, rooperol treatment of teratocarcinoma cells led to a dramatic increase of the expression of cleaved caspase-3, the main executor of stress-induced apoptosis. This upregulation was associated with a strong downregulation of Oct4, suggesting that such kind of drug could target the stemness factor via a caspase-3-dependent process as we observed previously [10].

Pluripotency and self-renewal are the main properties of normal SCs, as well as of CSCs. These characteristics are controlled by different proteins. For instance, Oct4, as a marker of the stemness and unrestricted pluripotency [14], plays a

central role in the survival of poorly differentiated and highly aggressive CSCs [18]. It has been suggested that Oct4 acts as a multi-functional protein during cancer development [30] and is able to potentiate tumor growth and to work as an oncogene by regulating transcriptionally pro- and anti-apoptotic genes [31]. Our results show that rooperol treatment of EC cells markedly decreased the expression of Oct4 and Nanog whereas Sox2 expression is only mildly affected; this suggests divergent regulatory pathways of the expression of the three stemness factors in response to pharmacophore treatment. Anyhow, modifications in the expression of these key proteins should induce a loss of cell pluripotency and promote cell death. It is worth noting that membrane-permeable superoxide dismutase mimetics could not prevent rooperol-induced Oct4 downregulation. It is known that the induction or repression of the protein is heavily regulated in order to avoid any deleterious effect of a transient dysfunction [2]. It is therefore possible that the finely tuned and complex regulatory mechanisms of Oct4 have such sensitivity that the two overlapping stimuli, namely rooperol and ROS scavenger administrations, cannot correctly neutralize each other in our experimental conditions. Additional studies are therefore required with serial treatments of both pharmacological agents in order to specify the molecular mechanisms leading to Oct4 retro-regulation. Moreover since rooperol is able to kill highly undifferentiated pluripotent CSCs, e.g. teratocarcinoma cells, it is likely that the drug could also have some deleterious effects on CSCs with more restricted differentiation potential, like glioblastoma or melanoma CSCs. Further studies will therefore be needed to demonstrate conclusively that.

Finally our findings clearly show that rooperol is able to target Oct4-expressing cancer stem-like cells and, by extrapolation, could be a strong anticarcinogenic drug which kills CSCs of various origins, with no significant effects on their normal counterparts.

Acknowledgments This work is dedicated to the memory of Dr. A.C. Allison. This study has been supported by grants from the CCIR-GE of the "Ligue contre le Cancer" (Comité du Grand Est, France). Fathi Emhemmed is supported by a fellowship from the Higher Education Commission of Libya.

Conflict of interest The authors declare no conflict of interest.

References

1. Sell S (2004) Stem cell origin of cancer and differentiation therapy. *Crit Rev Oncol Hematol* 51:1–28
2. Sharif T, Emhemmed F, Fuhrmann G (2011) Towards new anticancer strategies by targeting cancer stem cells with phytochemical compounds. In: Shostak S (ed) *Cancer Stem Cells - The Cutting Edge*. Rijeka, Croatia, Intech, pp 431–456
3. Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, Hoang T, Caceres-Cortes J, Minden M, Paterson B, Caligiuri MA, Dick JE (1994) A

- cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature* 367:645–648
4. Visvader JE (2011) Cells of origin in cancer. *Nature* 469:314–322
 5. Surh YJ (2003) Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nat Rev Cancer* 3:768–780
 6. Chabner BA, Roberts TG Jr (2005) Timeline: Chemotherapy and the war on cancer. *Nat Rev Cancer* 5:65–72
 7. Shu L, Cheung KL, Khor TO, Chen C, Kong AN (2010) Phytochemicals: cancer chemoprevention and suppression of tumor onset and metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 29:483–502
 8. Sharif T, Auger C, Bronner C, Alhosin M, Klein T, Etienne-Selloum N, Schini-Kerth VB, Fuhrmann G (2011) Selective proapoptotic activity of polyphenols from red wine on teratocarcinoma cell, a model of cancer stem-like cell. *Invest New Drugs* 29:239–247
 9. Sharif T, Stambouli M, Burrus B, Emhemmed F, Dandache I, Auger C, Etienne-Selloum N, Schini-Kerth VB, Fuhrmann G (2013) The polyphenolic-rich *Aronia melanocarpa* juice kills teratocarcinoma cancer stem-like cells, but not their differentiated counterparts. *J Funct Foods* 5:1244–1252
 10. Emhemmed F, Ali Azouaou S, Thuau F, Schini-Kerth V, Désaubry L, Muller CD, Fuhrmann G (2014) Selective anticancer effects of a synthetic flavagline on human Oct4-expressing cancer stem-like cells via a p38 MAPK-dependent caspase-3-dependent pathway. *Biochem Pharmacol* 89:185–196
 11. Guzdek A, Turyna B, Allison AC, Sladek K, Koj A (1997) Rooperol, an inhibitor of cytokine synthesis, decreases the respiratory burst in human and rat leukocytes and macrophages. *Mediators Inflamm* 6: 53–57
 12. Boukes GJ, van de Venter M (2012) Rooperol as an antioxidant and its role in the innate immune system: an in vitro study. *J Ethnopharmacol* 144:692–699
 13. Boukes GJ, Daniels BB, Albrecht CF, van de Venter M (2010) Cell survival or apoptosis: rooperol's role as anticancer agent. *Oncol Res* 18:365–376
 14. Pesce M, Schöler HR (2001) Oct-4: gatekeeper in the beginnings of mammalian development. *Stem Cells* 19:271–278
 15. Jung M, Peterson H, Chavez L, Kahlem P, Lehrach H, Vilo J, Adjaye J (2010) A data integration approach to mapping OCT4 gene regulatory networks operative in embryonic stem cells and embryonal carcinoma cells. *PLoS One* 5:e10709
 16. Boyer LA, Lee TI, Cole MF, Johnstone SE, Levine SS, Zucker JP, Guenther MG, Kumar RM, Murray HL, Jenner RG, Gifford DK, Melton DA, Jaenisch R, Young RA (2005) Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell* 122:947–956
 17. Kang J, Shakya A, Tantin D (2009) Stem cells, stress, metabolism and cancer: a drama in two Octs. *Trends Biochem Sci* 34:491–499
 18. Ben-Porath I, Thomson MW, Carey VJ, Ge R, Bell GW, Regev A, Weinberg RA (2008) An embryonic stem cell-like gene expression signature in poorly differentiated aggressive human tumors. *Nat Genet* 40:499–507
 19. Robinton DA, Daley GQ (2012) The promise of induced pluripotent stem cells in research and therapy. *Nature* 481:295–305
 20. Sharif T, Alhosin M, Auger C, Minker C, Kim JH, Etienne-Selloum N, Bories P, Gronemeyer H, Lobstein A, Bronner C, Fuhrmann G, Schini-Kerth VB (2012) *Aronia melanocarpa* juice induces a redox-sensitive p73-related caspase 3-dependent apoptosis in human leukemia cells. *PLoS One* 7:e32526
 21. Fuhrmann G, Sylvester I, Schöler HR (1999) Repression of Oct-4 during embryonic cell differentiation correlates with the appearance of TRIF, a transiently induced DNA-binding factor. *Cell Mol Biol* 45: 717–724
 22. Sharif T, Auger C, Alhosin M, Ebel C, Achour M, Etienne-Selloum N, Fuhrmann G, Bronner C, Schini-Kerth VB (2010) Red wine polyphenols cause growth inhibition and apoptosis in acute lymphoblastic leukaemia cells by inducing a redox-sensitive up-regulation of p73 and down-regulation of UHRF1. *Eur J Cancer* 46:983–994
 23. Sánchez-Duffhues G, Calzado MA, de Vinuesa AG, Appendino G, Fiebich BL, Look U et al (2009) Denbinobin inhibits nuclear factor-kappaB and induces apoptosis via reactive oxygen species generation in human leukemic cells. *Biochem Pharmacol* 77:1401–1409
 24. Rodriguez R, Meuth M (2006) Chk1 and p21 cooperate to prevent apoptosis during DNA replication fork stress. *Mol Biol Cell* 17:402–412
 25. Roos WP, Kaina B (2006) DNA damage-induced cell death by apoptosis. *Trends Mol Med* 12:440–450
 26. Warburg O (1925) Über den Stoffwechsel der Carcinomzelle. *Klin Wochenschr Berl* 4:534–536
 27. Zheng J (2012) Energy metabolism of cancer: Glycolysis versus oxidative phosphorylation. *Oncol Lett* 4:1151–1157
 28. Poyton RO, Ball KA, Castello PR (2009) Mitochondrial generation of free radicals and hypoxic signaling. *Trends Endocrinol Metab* 20: 332–340
 29. Buettner GR (2011) Superoxide dismutase in redox biology: the roles of superoxide and hydrogen peroxide. *Anticancer Agents Med Chem* 11:341–346
 30. Hochedlinger K, Yamada Y, Beard C, Jaenisch R (2005) Ectopic expression of Oct-4 blocks progenitor-cell differentiation and causes dysplasia in epithelial tissues. *Cell* 121:465–477
 31. Wang YD, Cai N, Wu XL, Cao HZ, Xie LL, Zheng PS (2013) OCT4 promotes tumorigenesis and inhibits apoptosis of cervical cancer cells by miR-125b/BAK1 pathway. *Cell Death Dis* 4:e760

Annexe Article 1

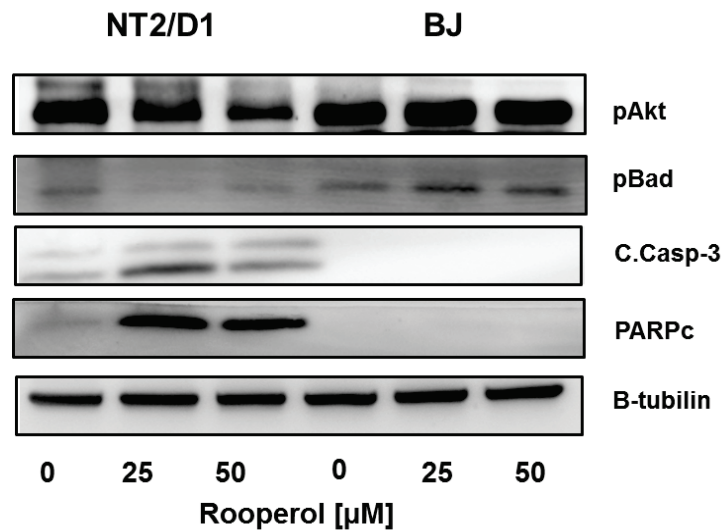


Figure supplémentaire 1 : Effets sélectifs du rooperol sur l'expression des protéines pro-apoptotiques et sur la pAKT. Les cellules souche tératocarcinomales NT2/D1 et les fibroblastes BJ ont été traitées ou pas avec 25μM ou 50 μM de rooperol pendant 24h. Des analyses par Western-Blot ont été réalisées avec les anticorps correspondants.

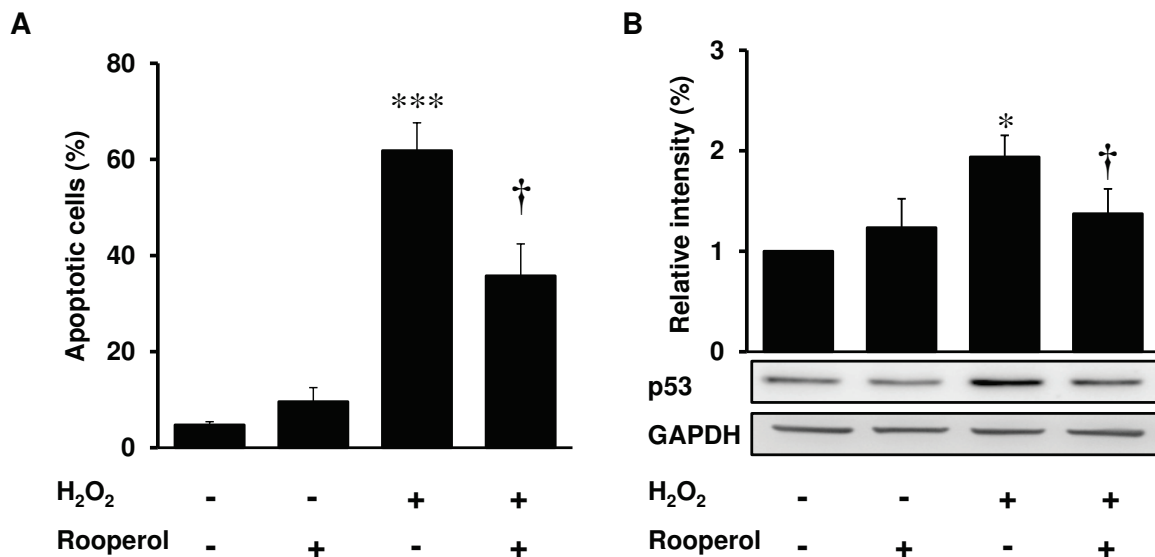


Figure supplémentaire 2 : Le rooperol inhibe l'apoptose et la surexpression de la p53 induites par le H₂O₂ dans les CSNs. Les cellules de fibroblaste BJ étaient d'abord traitées ou non avec 25μM de rooperol pendant 1h. Puis, elles ont été exposées ou non à 200μM de H₂O₂ suivi d'une incubation de 24h. (A) représente le pourcentage de cellules en apoptose, exprimé en pourcentage par rapport au nombre total des cellules, était évalué par cytométrie en flux grâce au marquage par l'Annexine V-FITC/Iodure de propidium. (B) représente les résultats normalisés de *western blots* relatifs à la p53, et obtenus après les différents traitements. Les valeurs sont des moyennes ± S.E.M. de trois expériences indépendantes. **P* < 0,05 et ****P* < 0,001 indiquent une différence significative versus cellules non traitées (contrôles). † *P* < 0,05 indique une différence significative versus cellules traitées au H₂O₂.

A new acacic acid-type saponin from *Albizia coriaria* induces apoptosis in human malignant melanoma cell lines

A New Acacic Acid-Type Saponin from *Albizia coriaria* Induces Apoptosis in Human Malignant Melanoma Cell Lines

Sarah Ali Azouaou¹, Olivier Noté^{1,2}, Guy Fuhrmann³, Dieudonné Emmanuel Pegnyemb²,
Christian D. Muller¹, Annelise Lobstein¹

1 UMR 7200 CNRS, Laboratoire d'Innovation Thérapeutique, Université de Strasbourg, Faculté de Pharmacie, 74 route du Rhin, 67401 Illkirch, France,

2 Laboratoire de Pharmacochimie des Substances Naturelles, Département de Chimie Organique, Faculté de Sciences, Université de Yaoundé, BP 812, Yaoundé, Cameroun,

3 UMR 7213 CNRS, Laboratoire de Biophotonique et Pharmacologie, Université de Strasbourg, Faculté de Pharmacie, 74 route du Rhin, 67401 Illkirch, France

Corresponding author: Annelise Lobstein

Abstract

Skin malignant melanoma remains a highly aggressive tumor that frequently resists chemotherapy. We here describe a biological screening of eleven acacic acid-type saponins purified from *Albizia coriaria* and *Albizia adianthifolia* roots, to compare their anticancer potential on a human epidermoid carcinoma cell line A431. Our results indicated that all isolated saponins induced apoptosis at various levels. The more active, named compound C3, has also a elective pro-apoptotic activity on the malignant melanoma A375 cell line. Interestingly its effect is selective since it is unable to kill normal skin cells from the cell line TE 353.Sk. C3 treatment triggered apoptosis on A375 cells through the alteration of mitochondrial membrane potential. C3-induced apoptosis was associated with the phosphorylation of p38 MAPK and the activation of caspase 8 and caspase 9. These modifications were accompanied by a downregulation of Oct4 involved in the maintenance of cell pluripotency and self-renewal of the side population of melanoma cells which is expected to be a population of cancer stem cells. Treatment with intracellular inhibitor of caspase 8 prevented C3-induced apoptosis. Such event was not observed with an intracellular inhibitor of caspase 9 treatment. Our findings indicate that C3 mediates its growth inhibitory effects on malignant melanoma cells via the activation of caspase 8. Since C3 has a selective pro-apoptotic activity, it might be a new leads to putative anticancer therapy.

Key Words: Pro-apoptotic activity, caspase activation, mitochondrial membrane potential, human malignant melanoma cell lines, *Albizia coriaria*, *Albizia adianthifolia*, acacic acid-type saponins

Introduction

The need to develop more effective and less toxic anticancer drugs has prompted researchers to explore new sources of pharmacologically active compounds (Abdullah et al., 2010). Naturally occurring potent compounds isolated from medicinal plants often show moderate side effects as compared to chemically synthesized ones. So far, cancer chemotherapy has employed various classes of natural products including flavonoids, flavones, isoterpenoids, alkaloids, which show promising effects both in *in vitro* and *in vivo* studies. A truly highly aggressive tumor that frequently resists chemotherapy is the attribute of any malignant melanoma. Thus, the search for new agents for its treatment remains of great importance.

The genus *Albizia* comprises about 150 species widely distributed in the tropics, with the greatest diversity in Africa and South America (Abdel-Kader et al., 2001). Triterpenoid saponins are commonly described in this genus. Adianthifoliosides, grandibracteosides, gummiferaosides, julibrosides, coriariosides, albizosides, and lebbeckosides are complex triterpenoid saponins isolated from the *Albizia* genus (Note et al., 2015). These saponins represent a class of very complex glycosides possessing a common aglycon unit, acacic acid, having various oligosaccharide moieties at C-3 and C-28 and an acyl group at C-21. These acacic acid-type saponins (AATS) have been reported to inhibit the growth of tumor cells, and thus appear as a new potential class of anticancer natural triterpenoid saponins, which are of prime importance to improve cancer control and therapy. *Albiziacoriararia* Welw.exOliv. (Mimosaceae) is a tree widely distributed in Cameroon and Uganda, where it is harvested for timber or herbal medicine. The bark or root is used as a general tonic and for the treatment of syphilis, skin diseases, jaundice, eye diseases, cough, and sore throat. It is also used to concentrate breast milk in humans. Two AATS, named coriariosides A and B, were already isolated from the roots of *A. coriaria* and were tested for cytotoxicity against two human

colorectal cancer cells (Note et al., 2009). *Albizia adianthifolia* (Schum.) W.F. Wight is an umbrella-like crown tree of about 25 m high, common in tropical Africa, from South Africa to Ethiopia and Senegal. The roots are used as a fish poison and in the treatment of skin diseases, inflammatory conditions of eye and for snake bite. Six AATS were isolated from the roots and named adianthifoliosides A-F (Haddad et al., 2003).

Adianthifoliosides A and B were tested in an *in vitro* lymphocyte proliferation assay by measuring the ³H-thymidine incorporation into the DNA of Jurkat cells. Adianthifolioside B showed a dose-dependent immunomodulatory effect. The induction of apoptosis on Jurkat cells was observed with adianthifoliosides A and D after 24 h of treatment in a dose-dependent manner (Haddad et al., 2004). However, the effects of these AATS on human malignant melanoma cell lines and the mechanisms underlying the process are yet to be delineated.

Apoptosis is the cell's intrinsic program to death and plays a central role in physiological growth control and regulation of tissue homeostasis. Failure to undergo apoptosis in response to anticancer therapy may result in cancer resistance (Strasser et al., 2011).

Apoptosis triggered by various stimuli, is characterized by a series of distinct biochemical and morphological changes, including increase in reactive oxygen species (ROS) level, activation of caspases and chromatin condensation. One of the most significant events in apoptosis is mitochondrial dysfunction that leads to the release of the cytochrome C (Halder et al., 2008)

In the present study, we describe a biological screening of eleven AATS purified from *A. coriaria* and *A. adianthifolia* roots, and compare first their proapoptotic activity in the epidermoid carcinoma cell line A-431, which has been considered since decades as a model

of human epidermoid carcinoma, whose frequency has increased significantly over the last century (Smina et al., 2015)

The second aim of the present study was to evidence the selective effect of the most active AATS on human malignant melanoma cell line A375, with a potential lack of activity on normal skin cells. For that purpose, we took the most appropriate non-cancerous cell line counterpart, i.e. the TE 353.SK cell line.

Our data showed that one of AATS, named saponin C3 and isolated from *A. coriaria*, induced apoptosis in several models of skin cancer. We further investigate the detailed mechanisms underlying this process. Our results indicate that the compound C3 acts on the mechanisms regulating apoptosis in order to avoid cancer cells to evade cell death. It may therefore provide novel opportunities to develop an effective drug for the melanoma treatment.

Material and Methods

Plant Material, Extraction and Isolation of AATS

The roots of *Albizia coriaria* and of *Albizia adianthifolia* were harvested in October 2011 at Nkolbisson and Eloundem, respectively, corresponding to two Yaoundé peripheral quarters in Cameroon. Their botanical authentication was done under the guidance of Mr. Victor Nana, botanist of the National Herbarium of Cameroon (NHC), where voucher specimens (41198/HNC and 64235/HNC, respectively) were deposited.

The air-dried, powdered roots of *A. coriaria* (300 g) were extracted with 70% EtOH in soxhlet apparatus. The resulting hydroalcoholic solution was then evaporated to dryness

under reduce pressure to yield brown residue (8.73 g). This residue was suspended in 200 mL of H₂O and partitioned with n-BuOH sat. H₂O (3 x 300 mL). The n-BuOH soluble phase was evaporated to dryness affording 5.11 g of brown gum residue which was taken in a minimum of water (10 mL) and then submitted to vacuum-liquid chromatography (VLC) using RP-18 silica gel 60 (25–40 mm) eluted with a gradient of MeOH–H₂O (100% H₂O–100%MeOH). The 70–85% MeOH fraction (650.8 mg) was subjected to VLC using silica gel 60 (15–40 mm) eluted with CHCl₃–MeOH–H₂O (80:20:2, 70:30:5, 60:33:7 and 60:40:10) to give three main subfractions (AC1–AC3). Subfraction AC3 (200.3 mg) was purified by semipreparative HPLC using gradient system of CH₃CN–H₂O (20 mL/min) to yield compounds C1 (5.7 mg, *t_R* 20.33 min), C2 (25.8 mg, *t_R* 22.48 min), C3 (7.9 mg, *t_R* 24.44 min), C4 (3.0 mg, *t_R* 14.43 min), and C5 (7.1 mg, *t_R* 21.19 min).

In the same way, air-dried and powdered roots of *A. adianthifolia* (300 g) were extracted with EtOH 70% in a soxhlet apparatus. The hydroalcoholic solution was then evaporated to dryness under reduce pressure to yield a brown residue (6.83 g). This residue was suspended in 200 mL of water and partitioned between H₂O and saturated n-BuOH (3x300 mL). The n-BuOH-soluble part (4.64 g) was dissolved in a minimum of water (10 mL) and then submitted to VLC using RP-18 (25–40 μm) silica gel and eluting with a gradient of MeOH–H₂O (100% H₂O–100% MeOH) to yield 3 main fractions (AD1–AD3). The 70–85% MeOH fraction (AD3) (700.25 mg) was subjected to VLC on silica gel 60 (15–40μm), eluted with CHCl₃–MeOH–H₂O (80:20:2, 70:30:5, 60:33:7, and 60:40:10) to give 6 main subfractions (AD31– AD36) based on TLC behaviors. Subfraction AD 33 (300 mg) was purified by Semipreparative HPLC using a gradient system of CH₃CN–H₂O (20 ml/min) to yield compounds A1 (6.4 mg, *t_R* 21.19 min), A2 (4.2 mg, *t_R* 23.61 min), A3 (5.6 mg, *t_R* 24.14 min), A4 (10.8 mg, *t_R* 20.59 min), A5 (33.0 mg, *t_R* 21.35 min) and A6 (9.8 mg, *t_R* 23.64 min). Structures of these AATS were established on the basis of extensive 1D and 2D NMR (¹H,

¹³C NMR, DEPT, COSY, TOCSY, ROESY, HSQC, and HMBC) and HRESIMS studies, by chemical evidence, and confirmed by comparison with those reported in literature [9-21].

Cell Lines and Culture Conditions

A375 (ATCC[®] CRL-1619TM), A431 (ATCC[®] CRL-1555TM) and TE 353.SK (ATCC[®] CRL-7761) cell lines, all purchased from ATCC (LGC Standards, Molsheim, France), were cultivated in DMEM-based media (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum (BioWhittaker, Verviers, Belgium), 2 mM ultra-glutamine, 50 μM non-essential amino acids, 50 U/ml penicillin and 50 μg/ml streptomycin (Sigma-Aldrich). Cells were cultured in humidified atmosphere with 5% CO₂ at 37 °C and tested when in exponential growth rate.

Cell Treatment

The A431 cells were treated for 24 hours in presence of increasing concentration of different compounds purified from *Albizia adianthifolia* (A1 to A6) and *Albizia coriaria* (C1 to C5). The compound C3, established as the most active, was used in the subsequent experiments. Cultured A375 cells were treated with 5 μM of compound C3 for 3, 6, 9, 12 and 24 hours. In some experiments, inhibitors of caspase 8 (Ac-LEHD-CHO) or caspase 9 (Ac-IETD-CHO) were added to the culture media 30 min prior treatment with the C3 compound.

Apoptosis Evaluation

Apoptosis was determined by evaluating the externalization rate of phosphatidylserine related to annexin V binding and propidium iodide (PI) nucleus labeling intensities. For that purpose, cultured cells were treated with increasing concentration (1 to 15 μ M) of tested compounds derived from *Albizia adianthifolia* (A1-A6) and *Albizia coriaria* (C1-C5) then collected for apoptosis quantification. Apoptosis rates were assessed by capillary cytometry (Guava EasyCyte Plus, Merck Millipore, Darmstadt, Germany) based on annexin V-FITC (Immunotools, Friesoythe, Germany) and PI (Miltenyi Biotec, Paris, France) labeling according to the manufacturer's recommendations. At least 10,000 events were optimally recorded to assess the apoptotic rate.

Mitochondrial Membrane Potential ($\Delta\Psi_m$) Measurement

Cells seeded at a density of 3×10^5 cells/well in 6-well plates, were treated with vehicle, 3 μ M or 5 μ M of C3 for 12 and 24 h. The $\Delta\Psi_m$ changes were then determined by incubating the cells for 15 min at 37°C in PBS supplemented with 40 nM of [3,3' - Dihexyloxacarbocyanine iodide] –DiOC6, prior to capillary cytometry examination (Guava EasyCyte Plus). At least 5,000 cells were analyzed for each sample.

Western Blot Analysis

Exponentially growing cells were treated with either vehicle or 5 μ M of C3 and incubated for increasing time periods. Cells were harvested and centrifuged at 20,000 g for 10 min at room temperature. The pellets were then resuspended in RIPA buffer (25 mM Tris pH 7.6, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS) containing protease

inhibitors (Sigma-Aldrich). Proteins from cell lysates were extracted, separated on 10-15% SDS-polyacrylamide gels and transferred to membranes. Immunoblotting was performed, using a mouse monoclonal anti-p53 antibody (Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA, USA), a rabbit polyclonal anti-Oct4 antibody (Active Motif, La Hulpe, Belgium) or a rabbit monoclonal phospho-p38 MAPK antibody (Cell Signaling Technology) according to the manufacturer's instructions. After incubation with the appropriate horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody, the immunoreactive bands were detected on the membranes using ECL chemiluminescence substrate solution (GE Healthcare Europe GmbH, Saclay, France). Membranes were stripped subsequently and probed with a mouse monoclonal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) antibody (Abcam, Paris, France) for normalization purposes. Autoradiography signals were captured on a Gene Genius Bio Imaging System (Syngene, Cambridge, UK) using Gene Snap software and analyzed on NIH's Image J freeware.

Detection of caspase 8 and 9 enzymatic activities

A375 cells were cultured at a density of 3×10^5 cells/well in 6-well plates, grown for 24 h and treated with either vehicle or C3 at 3 μ M and 5 μ M for an additional 12h or 24h. After trypsinization, the cells were collected by centrifugation and resuspended in 500 μ l of cell lysis buffer and incubated on ice for 10 min. After centrifugation for 5 min at 10,000 g, supernatant was transferred to a 96-multiwell plate. Caspase 8 and 9 activity was determined by capillary cytometry (Guava EasyCyte Plus, EMD Millipore Corporation, Billerica, MA, USA), according to the manufacturer's recommendations.

Statistical analysis

Data, presented as bar graphs, were expressed as means \pm S.E.M. of at least three independent experiments. Statistical evaluation was performed with the one-way ANOVA test followed by the post-hoc Bonferroni test using GraphPad software (Prism version 5.04 GraphPad, CA, USA); a *p*-value less than 0.05 is considered as significant.

Results & Discussion

Cytotoxic effects monitoring

The cytotoxic effects of different compounds extracted from *Albizia adianthifolia* (A1 to A6) and *Albizia coriaria* (C1 to C5) were assessed on human epidermoid carcinoma cell line (A431) by flow cytometry using the Annexin V-FITC/PI staining assay. The percentage of apoptotic cells following 24h of treatment with compounds A1 to A6 and C1 to C5 was found increased and this in a concentration-dependent manner (0.5 μ M to 15 μ M, Fig. S1 and S2)

In our experimental conditions, extrapolated calculated concentrations of half-maximal effects on cell apoptosis of different compounds are given in table 1. Based on these data, we selected the most active compound, namely C3, to investigate the molecular mechanism of its cytotoxic effects. Apoptotic effects of increasing concentration of C3 on A431 cells upon treatment for 24 hours (Fig. 1A) were as well observed on A375 malignant melanoma cells. Interestingly, 24 hours treatment with C3 did not induced apoptosis in non-cancerous skin cells (TE 353.Sk), even when treated with higher concentrations (up to 15 μ M) (Fig. 1C). Next, we assessed the time course effect of C3 on A375 cells. A375 cells treated with either

vehicle or 5 μM of C3 during 3, 6, 9, 12 and 24 hours showed that C3 induced a time-dependent increase in the apoptosis rate (Fig 1D).

C3 induced a reduction of mitochondrial potential status in malignant melanoma cells

We next investigated effects of C3 on the mitochondrial membrane potential status ($\Delta\Psi\text{m}$) in A375 cells by monitoring the uptake rate of DiOC6, a mitochondrial specific and voltage-dependent fluorescent dye. The number of malignant melanoma cells, emitting high fluorescence levels, was decreased when cells were treated with 3 or 5 μM of C3 during either 12h or 24h (Fig. 2). These results demonstrate the occurrence of a drop of $\Delta\Psi\text{m}$ in A375 cells upon treatment with C3.

C3 treatment increased the activities of caspase 8 and 9

Caspases are normally present in healthy cells as inactive precursor enzymes (zymogens) with little or no protease activity (Taylor et al., 2008) To date, two main routes to apoptosis associated caspase activation have been firmly established in mammals. Caspase activation is induced by two different ways. The extrinsic pathway involves the binding of extracellular death ligands (such as FasL or tumour necrosis factor- α (TNF α) to transmembrane death receptors. Engagement of death receptors with their cognate ligands provokes the recruitment of adaptor proteins, such as the Fas-associated death domain protein (FADD), which in turn recruits and aggregates several molecules of caspase 8, thereby promoting its auto-processing and activation (Iannolo et al., 2008). The intrinsic pathway is provoked by diverse stimuli or damage that induced cell stress leading to mitochondrial membrane permeabilisation with the release of cytochrome C from mitochondria. Active caspase 9 then propagates a proteolytic cascade of further caspase activation events. Irrespective of the actual route to caspase activation, all pathways lead to the activation of the major effector caspases, caspase 3 and

caspase 7, and these enzymes carry out the proteolysis during the demolition phase of apoptosis (He et al., 2014). We assessed here the activities of caspase 8 and 9 in C3-treated A375 cells using a cytometric assay. The treatment of A375 with either 3 or 5 μM of C3 during 12 hours induced an increase in the activity of both caspase 8 and 9 (Fig 3A and B). C3-induced increased activities of caspase 8 and 9 were more pronounced upon treatment of cells during 24h in comparison with 12h of treatment. In order to determine the role of caspase 8 and 9 in C3-induced apoptosis of malignant melanoma cells, A375 cells were treated with either an inhibitor of caspase 8 or 9 before the exposure to 5 μM of C3 during 24h. C3-induced apoptosis of A375 cells was partially but significantly reduced following the inhibition of caspase 8 activity (Fig 3C). Such inhibitory effect was not observed after the treatment of cells with the inhibitor of caspase 9 activity (Fig 3C). The extrinsic pathway seems to be, at least partially, the route used by C3 to induce apoptosis. The anticancer properties of AATS like avicines isolated from *Acacia victoriae* was described earlier. Avicin D-mediated cell death was associated with the activation of the death receptor caspase 8 pathway even if avicin D was able to induce caspase 8 activation in the presence of a neutralizing Fas antibody that blocks ligand binding. These results demonstrated that the activation of caspase 8 was independent on the linkage of extracellular Fas ligands. One of the most important pathways of cell survival is the PI3K (phosphatidylinositol-3-kinase)/ Akt /mTOR pathway. The phosphorylated form of these proteins is involved in the inhibition of apoptosis (caspases and modulation of the expression of anti-apoptotic protein Bcl-2) and various pro-proliferative factors. Inhibition of this pathway triggers apoptosis by attenuating the expression of anti-apoptotic protein Mcl-1 and reducing phosphorylation of Bim (Bender et al., 2011). PI3K kinase is linked to the intracellular portion of receptor tyrosine kinases (RTKs) and G protein-coupled receptors (GPCRs). After bindings of various growth factors on these receptors, it activates PI3K/Akt cascade, which itself triggers the activation of

mTOR (mammalian target of rapamycin). Moreover, mTOR has been found to induce the activation of the transcription factor STAT3. This transcription factor has been considered as oncogene. Its activity leads to the regulation of the expression of different survival factors such as Bcl-xl, c-Myc and cycline D1 (Martelli et al., 2007; Schroeder et al., 2014). The PI3K/Akt/mTOR signaling pathway plays an important role in the maintenance of liver, glioblastoma and leukemia cancer stem cells (CSC) and its inhibition abolishes the CSC phenotype. Furthermore, the PI3K/Akt/mTOR pathway appears to mediate the radio and chemo-resistance in many CSC types by increasing the expression of drug resistance transporters such as ABCG2. These effects are abolished by the presence of inhibitors this pathway (Martelli et al., 2007)

Interestingly, CSCs displayed preferential sensitivity to pathway inhibition when compared to healthy stem cells. To further elucidate the activation mechanism induced by saponin C3 we analyzed the time-course expression of p53, pP38 and Oct4 (a marker of CSC) upon treatment of A375 cells with 5 μ M of C3 during 3, 6, 9, 12 and 24h. As shown in Fig. 4B, C3 treatment did not affect the expression of p53 in A375 cells. The pP38 level was already significantly increased after 3h of treatment with compound C3 (Fig 4C) and decreased Oct4 level was observed after 12h of treatment.

Conclusion

One of the AATS isolated from *Albizia coriaria*, the compound C3, induces a reduction of mitochondrial potential status in malignant melanoma cells; moreover the extrinsic pathway seems to be, at least preferentially, the route used by compound C3 to induce apoptosis. We furthermore provided additional evidence for the absence of cytotoxic effect of compound C3 on non-cancerous skin cells by using annexin V assays. It is believed that the subpopulations of CSCs (expressing Oct4), which reside within the bulk tumor, are responsible for tumor

development and malignancy due to the deregulation of their self-renewal process (Koo et al., 2015). As a consequence, it is expected that pharmacological agents able to differentiate these cells will lead to a loss of their self-renewal capacities and aggressiveness. We therefore aimed here to evaluate whether compound C3 could be able to trigger cell differentiation of cancer stem-like cells. Our results indicated that compound C3 down regulates in melanoma cells the expression of the stemness factor Oct4 starting at 12 hours of treatment. Interestingly, the decreased expression level of Oct4 was correlated with the appearance of caspase 8 activity. This suggests that the degradation and gene repression of Oct4 could involve interconnected yet unidentified mechanisms. Taken as a whole, C3 is a powerful anti-skin cancer compound, since it acts as a selective proapoptotic agent, without toxic effects on a normal skin cell line.

References

- Abdel-Kader, M., Hoch, J., Berger, J.M., Evans, R., Miller, J.S., Wisse, J.H., Mamber, S.W., Dalton, J.M., and Kingston, D.G. (2001). Two bioactive saponins from *Albizia subdimidiata* from the Suriname rainforest. *Journal of natural products* *64*, 536-539.
- Abdullah, H., Pihie, A.H., Hohmann, J., and Molnar, J. (2010). A natural compound from *Hydnophytum formicarium* induces apoptosis of MCF-7 cells via up-regulation of Bax. *Cancer cell international* *10*, 14.
- Bender, A., Opel, D., Naumann, I., Kappler, R., Friedman, L., von Schweinitz, D., Debatin, K.M., and Fulda, S. (2011). PI3K inhibitors prime neuroblastoma cells for chemotherapy by shifting the balance towards pro-apoptotic Bcl-2 proteins and enhanced mitochondrial apoptosis. *Oncogene* *30*, 494-503.
- Haddad, M., Laurens, V., and Lacaille-Dubois, M.A. (2004). Induction of apoptosis in a leukemia cell line by triterpene saponins from *Albizia adianthifolia*. *Bioorganic & medicinal chemistry* *12*, 4725-4734.
- Haddad, M., Miyamoto, T., Laurens, V., and Lacaille-Dubois, M.A. (2003). Two new biologically active triterpenoidal saponins acylated with salicylic acid from *Albizia adianthifolia*. *Journal of natural products* *66*, 372-377.
- Halder, B., Bhattacharya, U., Mukhopadhyay, S., and Giri, A.K. (2008). Molecular mechanism of black tea polyphenols induced apoptosis in human skin cancer cells: involvement of Bax translocation and mitochondria mediated death cascade. *Carcinogenesis* *29*, 129-138.
- He, Y.C., Zhou, F.L., Shen, Y., Liao, D.F., and Cao, D. (2014). Apoptotic death of cancer stem cells for cancer therapy. *International journal of molecular sciences* *15*, 8335-8351.
- Iannolo, G., Conticello, C., Memeo, L., and De Maria, R. (2008). Apoptosis in normal and cancer stem cells. *Critical reviews in oncology/hematology* *66*, 42-51.
- Koo, B.S., Lee, S.H., Kim, J.M., Huang, S., Kim, S.H., Rho, Y.S., Bae, W.J., Kang, H.J., Kim, Y.S., Moon, J.H., *et al.* (2015). Oct4 is a critical regulator of stemness in head and neck squamous carcinoma cells. *Oncogene* *34*, 2317-2324.
- Martelli, A.M., Evangelist, C., Billi, A.M., Manzoli, L., Papa, V., and Cocco, L. (2007). Intranuclear 3'-phosphoinositide metabolism and apoptosis protection in PC12 cells. *Acta Biomed* *78 Suppl 1*, 113-119.
- Note, O.P., Jihu, D., Antheaume, C., Zeniou, M., Pegnyemb, D.E., Guillaume, D., Chneiweiss, H., Kilhoffer, M.C., and Lobstein, A. (2015). Triterpenoid saponins from *Albizia*

lebbeck (L.) Benth and their inhibitory effect on the survival of high grade human brain tumor cells. *Carbohydrate research* 404, 26-33.

Note, O.P., Mitaine-Offer, A.C., Miyamoto, T., Paululat, T., Mirjolet, J.F., Duchamp, O., Pegnyemb, D.E., and Lacaille-Dubois, M.A. (2009). Cytotoxic acacic acid glycosides from the roots of *Albizia coriaria*. *Journal of natural products* 72, 1725-1730.

Schroeder, A., Herrmann, A., Cherryholmes, G., Kowolik, C., Buettner, R., Pal, S., Yu, H., Muller-Newen, G., and Jove, R. (2014). Loss of androgen receptor expression promotes a stem-like cell phenotype in prostate cancer through STAT3 signaling. *Cancer Res* 74, 1227-1237.

Smina, T.P., Mohan, A., Ayyappa, K.A., Sethuraman, S., and Krishnan, U.M. (2015). Hesperetin exerts apoptotic effect on A431 skin carcinoma cells by regulating mitogen activated protein kinases and cyclins. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 61, 92-99.

Strasser, A., Cory, S., and Adams, J.M. (2011). Deciphering the rules of programmed cell death to improve therapy of cancer and other diseases. *EMBO J* 30, 3667-3683.

Taylor, R.C., Cullen, S.P., and Martin, S.J. (2008). Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 231-241.

Figure captions

Compounds	EC ₅₀ (μM)
C1	249
C2	16
C3	8
C4	59
C5	8
A1	251
A2	48
A3	13
A4	9
A5	28
A6	158

Table 1. EC₅₀ of compounds

A431 cells were incubated in increasing concentration of different molecules derived from *Albizia Adianthifolia* (A1 to A6) and *Albizia coriaria* (C1 to C5) for 24h. Cell apoptosis rate was assessed by flow cytometry using Annexin V-FITC/PI staining. EC₅₀ of each compound was computed using Prism Pad software.

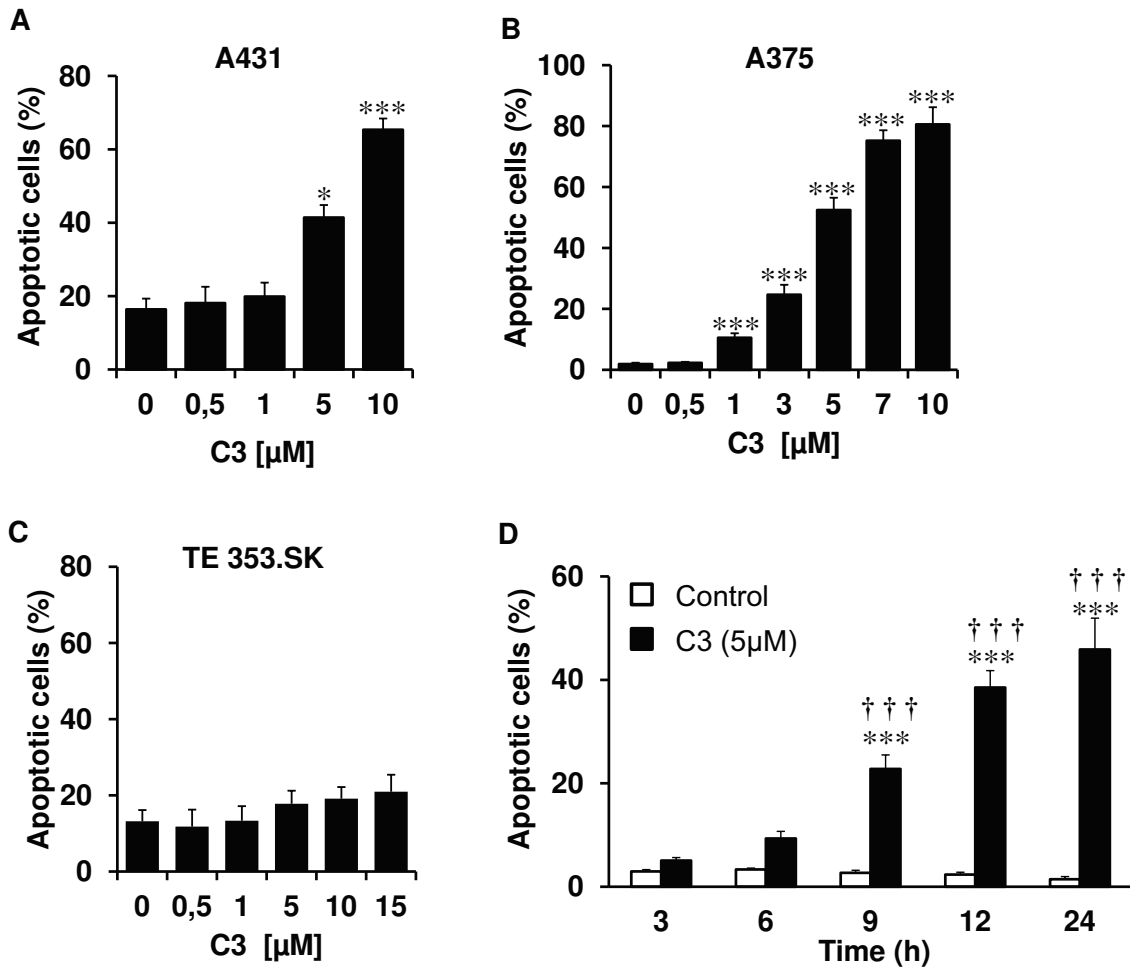


Fig. 1 Effects of C3 on the apoptosis rate.

Cells were exposed to C3 at the indicated concentrations and incubated for 24h (A, B, C). Cell apoptosis rate was assessed by flow cytometry using the Annexin V-FITC/PI staining assay. (A) recapitulates in a bar graph form the percentage of A431 cells in apoptosis. (B) recapitulates in a bar graph form the percentage of A375 cells in apoptosis. (C) recapitulates in a bar graph form the percentage of TE353.SK cells in apoptosis. The number of apoptotic cells is expressed as percent relative to the total cell number. Values are means \pm S.E.M. of four independent experiments. * $P < 0.05$ and *** $P < 0.001$ vs. vehicle-treated cells (C3 = 0 μ M). (D) Cells were exposed to either vehicle or 5 μ M of C3 during 3, 6, 9 12 or 24 h. The number of cells in early and late apoptosis is expressed as percent relative to the total cell number. Values are means \pm S.E.M. of four independent experiments. *** $P < 0.001$ vs. vehicle-treated cells.

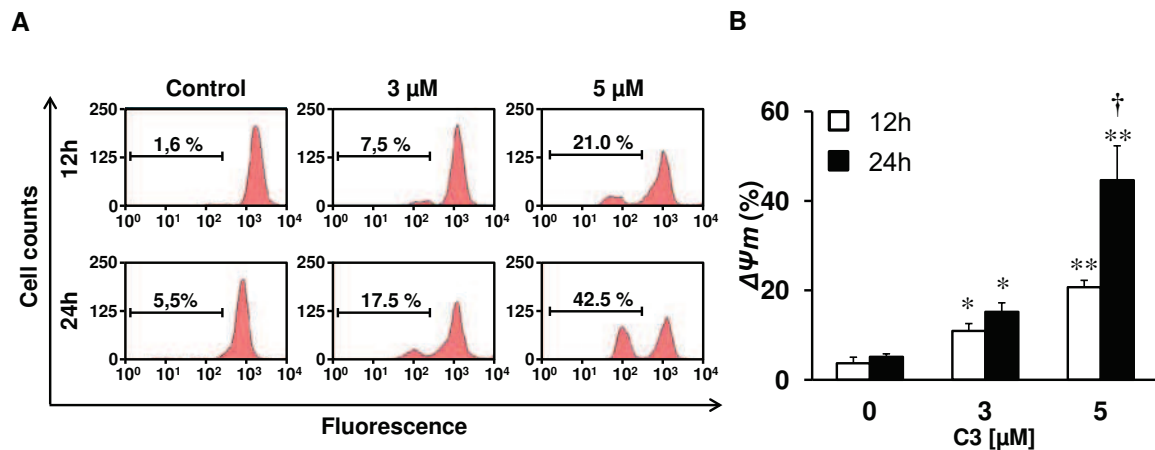


Fig. 2 $\Delta\Psi_m$ disruption degree. A375 cells were exposed to C3 at the indicated concentrations for 12 or 24h. (A, B), $\Delta\Psi_m$ alteration was assessed by flow cytometry using the DiOC6 staining assay. (A) shows representative histogram of the percentage of damaged A375 cells with depolarized mitochondrial membranes. (B) recapitulates in a bar graph form the percentage of A375 cells with mitochondrial dysfunction, expressed as percent relative to the total cell number. Values are means \pm S.E.M. of three independent experiments. * $P < 0.01$ and ** $P < 0.001$ vs. ctrl (C3 = 0 μM). † $P < 0.001$ vs. 12h.

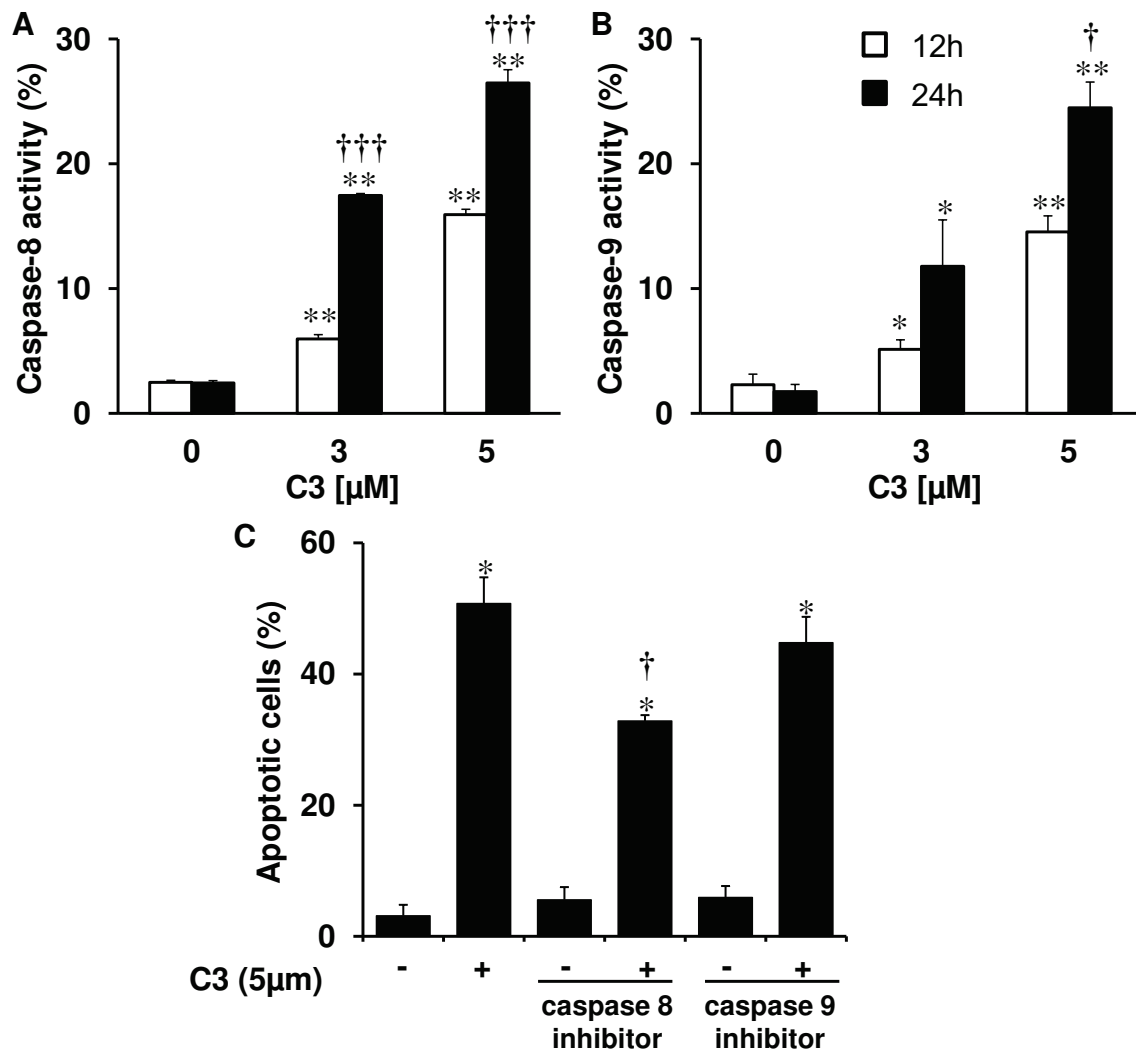


Fig. 3 Effects of the inhibition of caspase-8 and -9 activity on C3-induced A375 cell apoptosis. A375 cells were exposed to the indicated concentration of C3 incubated for 12h or 24h. The activities of caspase 8 or 9 were detected by colorimetry using an *in vitro* fluorescent-based assays for caspase 8 and 9. (A) The panel shows in a bar graph the caspase-9 activation, expressed as percent relative to the value obtained for the untreated sample. (B) The panel shows in a bar graph the caspase 8 activation, expressed as percent relative to the value obtained for the untreated sample. * $P < 0.01$ and ** $P < 0.001$ vs. ctrl (C3 = 0 μM) † $P < 0.01$ and †† $P < 0.001$ vs. 12h. A375 cells were treated or not with either caspase 8 inhibitor or caspase 9 inhibitor for 1h and then grown for 24 h in the presence or absence of 5 μM of C3. Cell apoptosis rate was determined as described in Section 1. (C) recapitulates in a bar graph form the percentage of cells undergoing apoptosis after the different treatments. * $P < 0.001$ vs. corresponding vehicle-treated cells, † $P < 0.01$ vs. 5 μM C3 treated cells

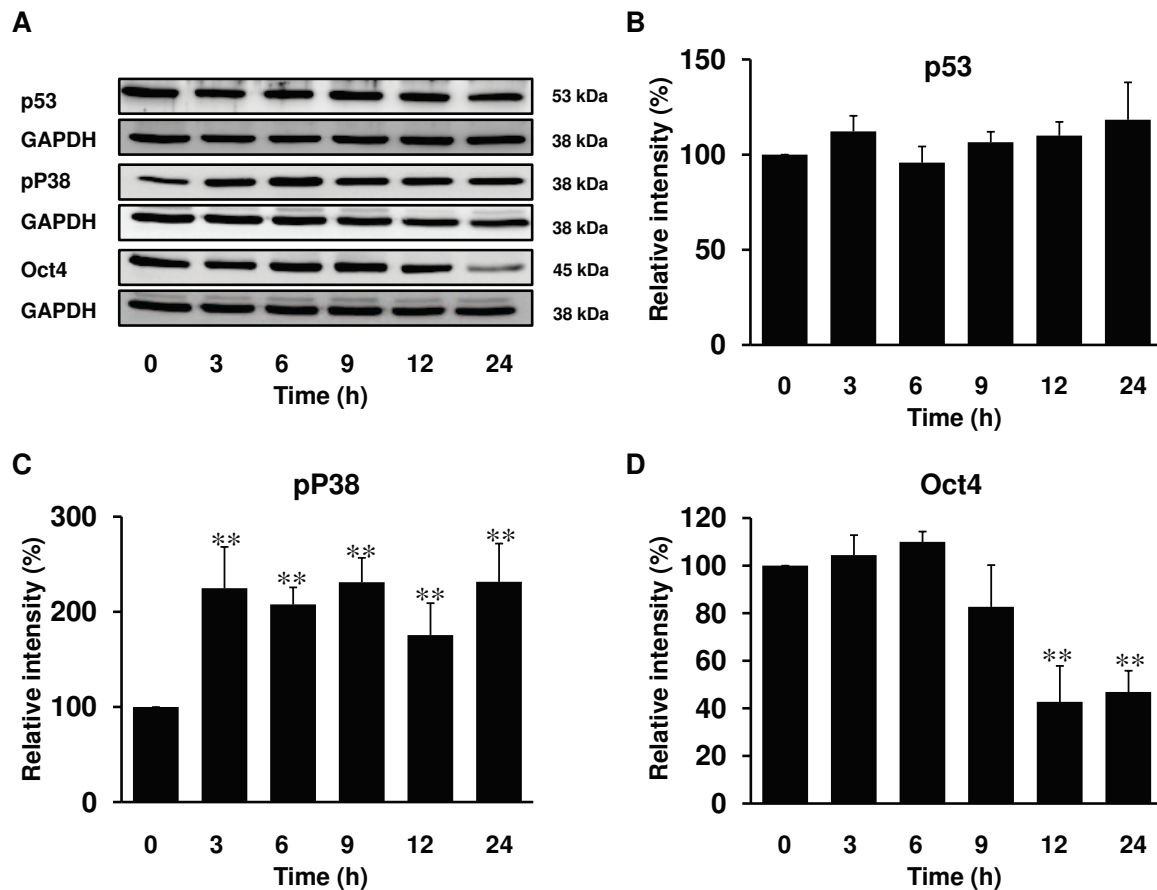
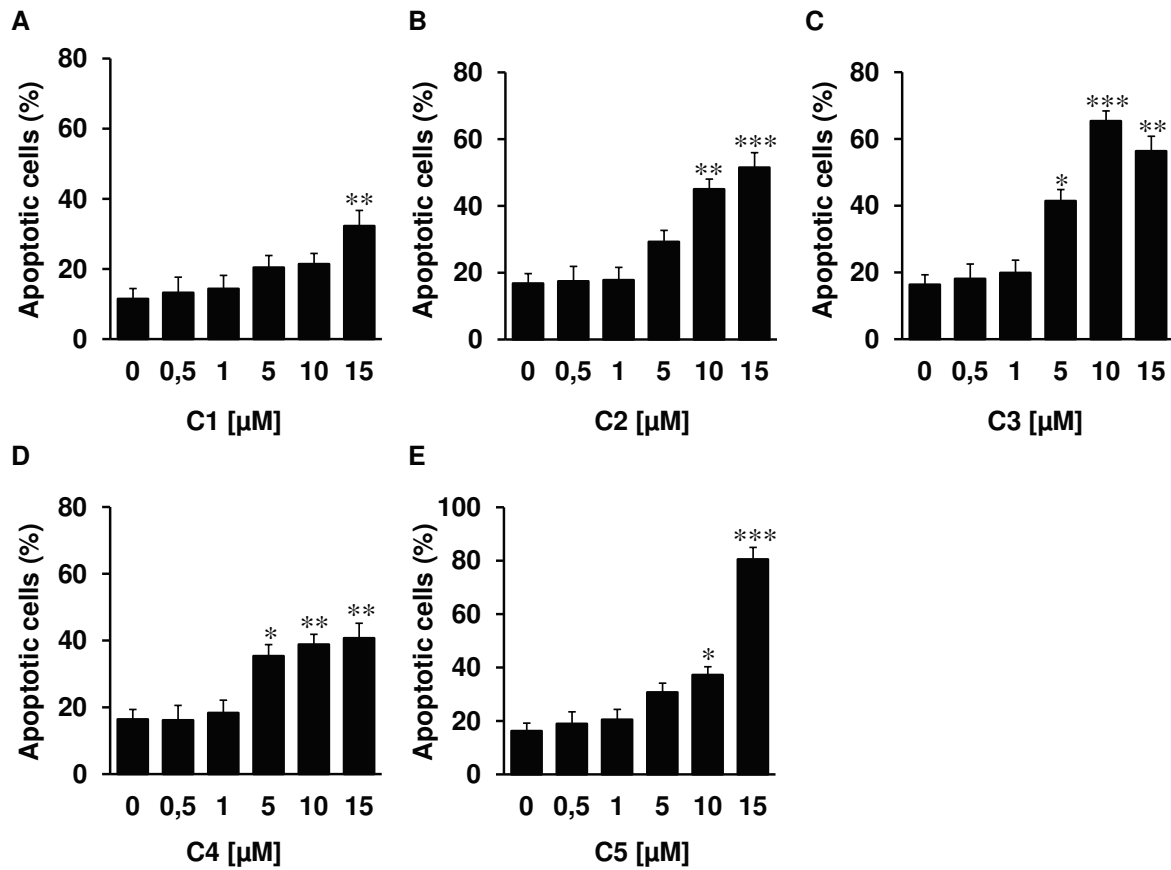
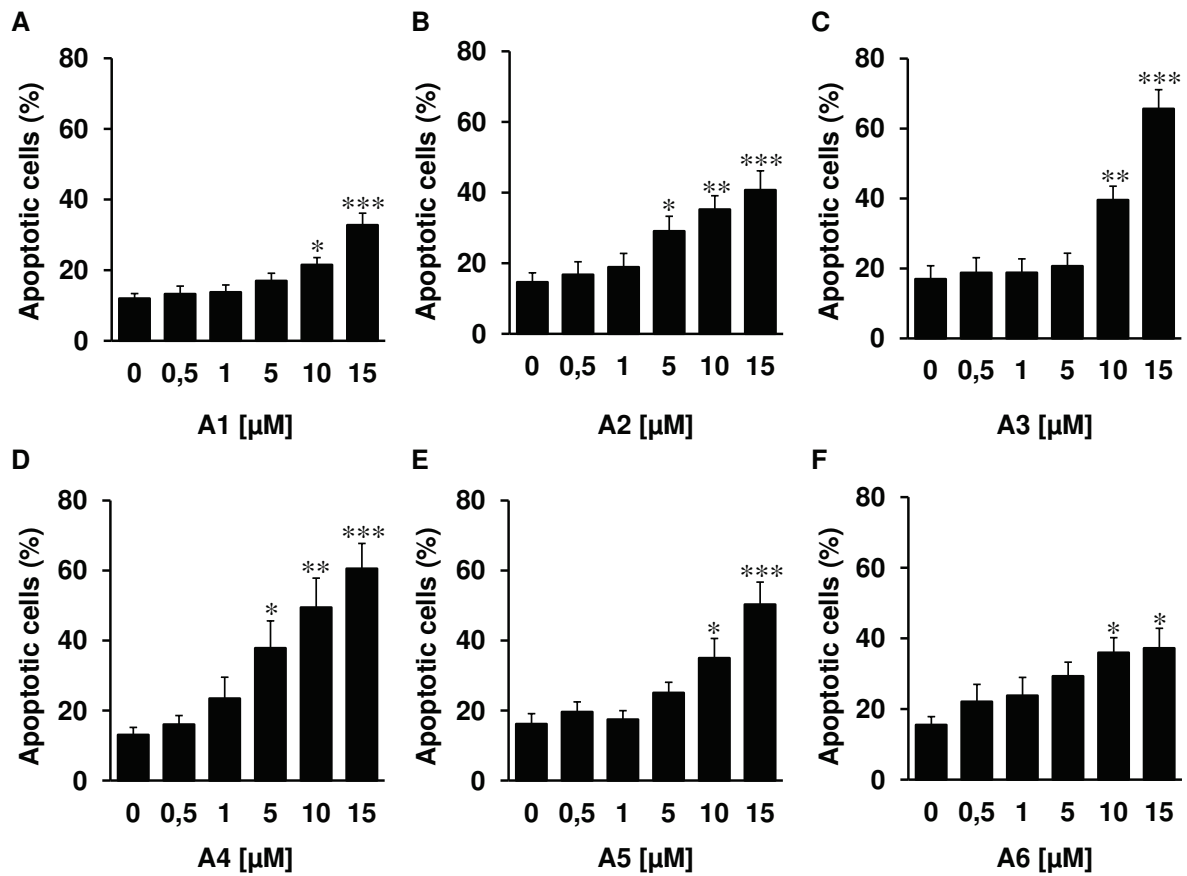


Fig. 4 Time-dependent effects of C3 on the expression of the tumor suppressor p53, pP38 and the main stemnes factors Oct4 in A375 cells. Cells were exposed to 5 μ M of C3 during 3, 6, 9 12 or 24 h. Immunoblotting analysis was performed as described in “Material and methods” with the corresponding antibodies. Specific bands were detected with their expected apparent molecular weight. Figure (A) shows representative immunoblotting results. Figures (B, C, D) show respectively densitometry of p53, pP38 and Oct4 expression normalized to GAPDH and given as ratios relative to the value obtained for the untreated sample set at 100 %. Values are means \pm S.E.M. of three independent experiments. ** P <0.01 vs. untreated cells



Supplemental figure 1. Effects of AATS derived from *A. coriaria* on the apoptosis rate. Cells were exposed to compounds (C1 to C5) at the indicated concentrations and incubated for 24h. Cell apoptosis rate was assessed by flow cytometry using the Annexin V-FITC/PI staining assay. * $P < 0.05$ and *** $P < 0.001$ vs. vehicle-treated cells.



Supplemental figure 2. Effects of AATS derived from *A. Albiziaadanthifolia* on the apoptosis rate. Cells were exposed to compounds (A1 to A6) at the indicated concentrations and incubated for 24h. Cell apoptosis rate was assessed by flow cytometry using the Annexin V-FITC/PI staining assay. * $P < 0.05$ and *** $P < 0.001$ vs. vehicle-treated cells.

**FAK activity regulates Oct4 expression in teratocarcinomal stem-
like cells**

FAK activity regulates Oct4 expression in teratocarcinomal stem-like cells

Sarah Ali Azouaou ², Fathi Emhemmed ², Valérie Schini-Kerth ¹, Christian D. Muller ²,
Annelise Lobstein ² and Guy Fuhrmann ^{1*}

¹ UMR 7213 CNRS, Laboratoire de Biophotonique et Pharmacologie, Université de Strasbourg, Faculté de Pharmacie, 74 route du Rhin, 67401 Illkirch, France

² UMR 7200 CNRS, Laboratoire d'Innovation Thérapeutique, Université de Strasbourg, Faculté de Pharmacie, 74 route du Rhin, 67401 Illkirch, France

* Corresponding author: Guy Fuhrmann, PhD

UMR 7213 CNRS

Laboratoire de Biophotonique et Pharmacologie

Faculté de Pharmacie

74 route du Rhin, B.P. 60024, 67401 Illkirch

France

Tel: (33) 3 68 85 42 17

Fax: (33) 3 68 85 43 13

E-mail: guy.fuhrmann@unistra.fr

Abstract

Several publications have highlighted the role of force-dependent cell signaling events in stem cell differentiation. These biophysical signals involve proteins which interact with the extracellular environment and are able to initiate mechanotransduction forces directing stem cell differentiation and determining the cell fate. For instance, the cytoplasmic focal adhesion kinase (FAK), in association with other adhesion molecules, is a central actor of the mechanotransduction machinery which creates biophysical constraints and can lead to phenotypic cell modifications. However the precise impact of FAK in the differentiation of stem cells remains unclear. We therefore investigated the role of FAK during the specification of the poorly differentiated pluripotent teratocarcinomal cell which is a model of Oct4-expressing embryonal cell. We observed that Oct4 downregulation during *all trans* retinoic acid-inducing differentiation is accompanied by an increase in the phosphorylation of FAK at tyrosine 397 and 861. Moreover, a transient knock-down of the FAK protein accelerates Oct4 gene repression, concomitantly with an increase in the apoptosis rate. These results suggest that counteracting FAK activity during cell differentiation triggers an upheaval of the finely tuned regulation of Oct4 gene expression which finally leads to programmed cell death.

Keywords: teratocarcinomal stem-like cells; differentiation; FAK; Oct4

1. Introduction

The signaling pathways involved in the regulation of stem cell differentiation can be initiated by several processes, including cytokines, growth factors, or even extracellular mechanical activity [Sun et al., 2012]. For example, focal adhesion kinase (FAK) is a signaling mechanosensing protein at the cell-matrix adhesion sites, which is able to form a complex with Src kinase and to promote cell proliferation, migration and differentiation [Wozniak et al., 2004]. Actually upon growth factor stimulation or cell-matrix interaction, FAK/Src complexes activate MAPK, which induces cell's fate decision [Liao et al., 2013]. However, many details at the initiation of the differentiation process, especially the crosstalk among the different signaling pathways leading to transcription responses, remain largely unclear. For instance, the mechanisms how the differentiation induction factors co-regulate FAK and Src, and how those signals initiate stem cell differentiation have not been fully understood. In embryonic stem cells (ESCs), adhesion signals through FAK/Src are believed to regulate their differentiation to cardiomyocytes [Hakuno et al., 2005]. Meanwhile, FAK is considered a key protein during neurite differentiation and outgrowth in mesenchymal stem cells [Liao et al., 2013]. Interestingly, the inhibition of FAK-induced phosphorylation has been shown to prevent the neurite outgrowth in mesenchymal stem cells [Liao et al., 2013]. Moreover it has been observed that retinoic acid (RA)-inducing differentiation of ESCs is accompanied by an activation of Src and FAK; however their depletion does not interfere with the differentiation process, but preferentially promotes an endocrine specification to the detriment of a neural cell fate determination [Afrikanova et al., 2011].

Prosurvival and self-renewal signaling pathways in stem cells share several common molecular components, pointing out the finely tuned balance which controls cell proliferation and differentiation [Konopleva and Jordan, 2011]. As a consequence, it is not surprising that

some factors could target specific nodal points of the self-renewal and differentiation machineries [Sarkar et al., 2009]. In highly pluripotent stem cells, *i.e.* ESCs, it has been observed that induction of differentiation correlates with an arrest of proliferation and a significant increased level of apoptosis. Actually, the process involves huge modifications in the regulation of the expression of the stemness factor Oct4. This transcription factor is known to be essential for pluripotency maintenance and self-renewal. Indeed, Oct4 binds at the promoters and/or regulatory regions of numerous target genes which are associated with proliferation and differentiation processes (Pesce and Schöler, 2001; Jung et al., 2010). To achieve a higher specificity, Oct4 may form protein complexes with other transcriptional regulators, including the homeobox protein Nanog and the SRY-related HMG-box protein Sox2 (Boyer et al., 2005). Finely tuned functional Oct4 levels are crucial for phenotype stability and it is believed that the induction or repression of Oct4 is heavily regulated in order to avoid any deleterious effect of a transient dysfunction. It has been shown that the regulation of Oct4 expression involves different members of the nuclear receptor superfamily, including SF-1 (Steroidogenic Factor 1), LRH-1 (Liver Receptor Homolog-1) and GCNF (Germ Cell Nuclear Factor) [Kellner & Kikyo, 2010]. By means of genetic, molecular, and pharmacological studies, a recent report has demonstrated that a catenin-dependent LRH-1 regulation is required for maintaining steady-state levels of Oct4 [Wagner et al., 2010]. This means that the balance between proliferation and differentiation of pluripotent SCs involves, at least in part, a Wnt/beta-catenin control which can specifically target the upstream regulators of the stemness factor Oct4. Moreover it has been argued that GCNF is able to recruit different MBD (Methylated CpG Binding Domain) proteins to the Oct4 promoter, suggesting a link between Oct4 gene repression and its epigenetic locking [Gu et al., 2011]. A cascade of events from the binding of extracellular signaling molecules to Oct4 gene silencing can therefore be outlined. However it was believed that unknown mechanisms of regulation

might also emerge. Recently, it has been postulated that nanotopography affects focal adhesion formation in hESCs, which in turn affects cell–matrix tension, focal adhesion kinase signaling and integrin–growth factor receptor crosstalk, which eventually modulates Oct4 expression in hESCs (Kong et al., 2013). The aim of our work was therefore to evaluate the role of FAK during the differentiation of the human embryonal teratocarcinoma stem cells NT2/D1 (also known as NTERA-2 cl.D1). This cell line, as the pathological counterpart of ESC, is described as a highly pluripotent undifferentiated cell line, a property associated to a strong expression of the stemness regulator Oct4 (Emhemmed et al., 2014; Ali Azouaou et al., 2015). Here we show the FAK activity during cell differentiation can act on the fine-tuned regulation of Oct4 gene expression which finally leads to cell decision, either to programmed cell death or to differentiation. Finally our results suggest that FAK signaling plays an important role in regulating *all trans* retinoic acid (ATRA)-induced neural differentiation of embryonal stem cells.

Material and methods

Cell lines and culture conditions

NT2/D1 (CRL-1973) cell line, purchased from ATCC (LGC Standards, Molsheim, France) was cultivated in DMEM-based media (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France), supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum (BioWhittaker, Verviers, Belgium), 2 mM glutamine, 50 U/ml penicillin and 50 µg/ml streptomycin (Sigma-Aldrich). Cells were grown in Petri dishes to 30% confluency prior to treatment. All plates were incubated in humidified atmosphere with 5% CO₂ at 37 °C.

Cell Treatment

For our purpose, cells were treated with 1 μ M ATRA mixed with the cell culture medium. Treatment was carried out till 8 days and ATRA-supplemented media was changed every two days.

siRNA transient transfection

Cells at density of 2×10^5 cells/well were seeded in 6-well plates, cultured with free antibiotic Opti-MEM reduced serum (Gibco-Life Technologies) and then transfected with 50 nM of FAK siRNA (Cell Signaling Technology) in presence of INTERFERin (Polyplus-transfection, Illkirch, France), as described by the manufacturers. Efficient knockdown was achieved after 48h incubation.

Apoptosis assay

Cells at density of 4×10^3 cells/ml were seeded in 96-well-plates, incubated overnight and then treated. After treatment, cells were trypsinized, resuspended in medium and stained with annexin V-FITC and propidium iodide -PI- (Immunotools, Friesoythe, Germany) for 10 min at 37C. Cells then analyzed by using flow cytometry (Guava EasyCyte Plus, EMD Millipore, Billerica, MA, USA).

Western blot analysis

Exponentially growing cells were treated with the vehicle or ATRA and incubated at different times. Cells were harvested, centrifuged at 200 g for 10 min at room temperature and the pellets were resuspended in RIPA buffer (25 mM Tris pH 7.6, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.1% SDS, 1% sodium deoxycholate) containing protease inhibitors (Sigma-Aldrich). Proteins of cell lysates were then extracted, separated on 8-15% SDS-polyacrylamide gels and transferred to membranes. Immunoblotting was performed as previously described [Sharif et

al., 2011a; Sharif et al., 2013], by using either a rabbit polyclonal anti-Oct4 or anti-Nanog antibody (GeneTex, Irvine, CA, USA), a rabbit polyclonal anti-FAK or anti p-Y397 FAK) or anti-p-Y861 FAK antibody (Life Technologies, Saint Aubin, France), a rabbit polyclonal anti-E-cadherin or anti-N-cadherin antibody (Genetex), or a rabbit polyclonal GCNF antibody (Abcam, Paris, France). Membranes were subsequently reprobbed with a mouse polyclonal anti-beta tubulin antibody (Abcam), or a rabbit polyclonal anti-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) antibody (Abcam).

Immunocytochemistry analysis

Treated cells were trypsinized and seeded at a density of 4×10^4 in imaging μ -Dishes (Ibidi, Martinsried, Germany) and incubated for 24 h. Cells were then fixed with 4% paraformaldehyde for 15 min, permeabilized with 0,3% Triton X-100 in PBS (Phosphate-Buffered Saline) for 15 min and blocked in 2% normal goat serum for 30 min at room temperature. After rinsing, cells were incubated with either a rabbit polyclonal anti-Oct4 (GeneTex) or a rabbit polyclonal anti-FAK or anti-p-Y861 FAK antibody (Life technologies). All the primary antibodies were diluted at 1:200-1:400 in 2% normal goat serum. After 2 h of incubation at room temperature, cells were washed with PBS and exposed for an additional half hour to either a mouse or a rabbit Alexa fluor 488-conjugated secondary antibody (Life Technologies), diluted at 1:2000 in 2% normal goat serum. After rinsing, cells were stained with Hoechst 33342 (Life Technologies) diluted at 1:10000 for 5 min. Images were captured using a Leica TCS SP2 laser scanning confocal microscope (Leica Microsystems, Nanterre, France).

Quantitative Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT/PCR) analysis

Total RNA from untreated and treated cells was extracted using the EZ-10 DNAaway RNA Mini-prep kit (BioBasic Inc., Toronto, Canada) following the manufacturer's instructions. PCR reaction was then carried out with 10 ng RNA and 200 nM of specific primers (QuantiTect Primer Assays, Qiagen, Courtaboeuf, France), using the KAPA SYBR Fast 1-step qRT-PCR kit (Kapa Biosystems Ltd., London, UK), according to the manufacturer's specifications. Amplification was performed on an iCycler MyiQ system (Bio-rad, Marnes-la-Coquette, France).

Statistical analysis

Data are presented in a bar graph form and expressed as means \pm S.E.M. of at least three independent experiments. Statistical evaluation was performed with the one-way ANOVA test followed by Student–Newman–Keuls *post-hoc* test using Sigmaplot software; a p value less than 0.05 was considered as significant.

3. Results

ATRA treatment induces a gradual downregulation of the stemness factors in embryonal stem cells

ATRA is known as a differentiation factor of embryonic and embryonal stem cells. In a first step, the expression levels of the stemness factor Oct4 and its interactive partner Nanog were monitored during the 8 days of treatment with 1 μ M of ATRA. As shown in Fig. 1, the expression of Oct4 was totally blunted after 4 days of treatment. Additionally, a progressive, but significant decrease of the expression levels of Nanog was observed during the 8 days of treatment, with a significant reduction starting at 2 days of treatment. At day 8 of treatment, only faint bands of Nanog expression were visualized by immunoblotting, suggesting that the

embryonal cells have definitively lost their highly pluripotent state. Furthermore, a significant increase of the expression rates of the main repressor of Oct4 gene expression, namely GCNF, was observed after 2 days of ATRA treatment with a maximum effect after 4 days of treatment.

Long lasting treatment with ATRA induces a gradual upregulation of phosphorylated Y-397 and Y-861 FAK in embryonal stem cells

The expression levels of FAK and its phosphorylated forms Y-397 and Y-861, were monitored during the 8 days of treatment with 1 μ M of ATRA. As shown in Fig. 2, a progressive downregulation of the expression rates of total FAK is observed. Concomittantly, a significant increase in the expression levels of the phosphorylated forms Y-397 and Y-861 of FAK was observed after the day 4 of ATRA treatment. Indeed, strong bands were visualized by immunoblotting for both FAK p-Y397 and FAK p-Y861, suggesting that the embryonal cells have definitively switched from a highly undifferentiated state to a differentiated phenotype.

Embryonal stem cells display a strong labelling of p-Y861 FAK at the plasma membrane after ATRA treatment

Differentiation involves a steady reduction and finally the disappearance of the stemness factors in poorly differentiated stem cells. Accordingly, teratocarcinomal cells treated for 8 days with 1 μ M of ATRA show blunted Oct4 expression with increased FAK p-Y861 labelling at the plasmic membranes, in comparison with untreated cells which exhibit strong nuclear labelling of Oct4 and faint staining of FAK p-Y861 (Fig. 3). These results therefore suggest that ATRA is able to repress the expression of the stemness marker, concomittantly with phenotypic modifications associated with membrane remodelling linked to FAK activity.

Long lasting treatment with ATRA induces a neural differentiation in embryonal stem cells

The expression of E-cadherin and N-cadherin were monitored during the 8 days of treatment with 1 μ M of ATRA. As shown in Fig. 4, a progressive, but significant decrease of the expression rates of E-cadherin, concomittantly with an increase of the expression rates of N-cadherin was observed. These results suggest that ATRA treatment of human embryonal NT2/D1 cells induces a switch from a highly undifferentiated state to a neural phenotype, as described previously for other cell models, *i.e.* mouse teratocarcinomal P19 cells (Gao et al., 2001).

Knockdown of FAK induces a downregulation of the stemness factors in embryonal stem cells

NT2/D1 cells were transfected or not with 50 nM of FAK siRNA for 48h and grown for further 2 or 4 days in the presence or absence of 1 μ M of ATRA. As shown in Fig. 5, FAK knockdown induces a significant decrease in the expression levels of the stemness factors Oct4 and Nanog in untreated embryonal stem cells. Accordingly, FAK depletion speeds up the downregulation of these factors in ATRA-treated cells. Moreover FAK knockdown potentiates the upregulation of GCNF, induced by an ATRA treatment. All these results suggest that the expression of the stemness factors can be controlled by a mecanotransduction process involving FAK apart of the ATRA response mechanism.

Knockdown of FAK induces a downregulation of the transcript levels of stemness factors in embryonal stem cells

As shown in Fig. 6, FAK depletion affects the expression levels of *POU5F1* (gene of Oct4) and *NANOG* mRNAs in embryonal stem cells. FAK knockdown induces a significant

decrease of the transcript levels of the stemness factors in ATRA-treated embryonal stem cells. Intriguingly, only mild modifications can be observed in untreated embryonal stem cells. These results suggest that the expression of the stemness factors, at the transcription level, can only be controlled by a mecanotransduction process involving FAK in ATRA sensibilized cells.

Knockdown of FAK promotes apoptosis in embryonal stem cells, independently of ATRA activity.

As shown in Fig. 7, knockdown of FAK by specific siRNA, either in presence or absence of ATRA, induces a significant increase in the number of apoptotic cells. Such effect was not observed in cells, treated or not with ATRA, and transfected with a scramble siRNA. These results suggest therefore that modifications in FAK levels can affect the survival offset of embryonal stem cells, either when they are in a highly undifferentiated state or during neural specification.

4. Discussion

Differentiation involves a steady reduction and finally the disappearance of the stemness factors Oct4 and Nanog in poorly differentiated stem cells. Accordingly, embryonal stem cells treated with ATRA show a progressive decrease in the expression rates of these factors, at both the transcriptional and translational levels. These modifications are accompanied by a switch of the expression of E-cadherin to that of N-cadherin which demonstrates that ATRA-treated teratocarcinomal cells shift from a highly pluripotent state to a neural phenotype [Gao et al., 2001]. Interestingly, the differentiation process involves extensive changes of the range of FAK phosphorylated forms, namely those linked to FAK Y-397 and Y-861. Accordingly, previous report has shown that FAK was markedly induced during RA treatment of Colo 201

colon cancer cells and the increase in FAK levels results in elevation of tyrosin-phosphorylated FAK. This suggests a role for FAK in the activation of cell adhesion during growth inhibition and differentiation induction [Nakagawa et al., 1998]. Actually, differentiation inducers such as RA are known to increase the differentiated phenotype of several cell lines by modulating the expression of cell adhesion molecules, including integrins [Dahl and Grabel, 1989; Gaetano et al., 1994]. FAK is considered to be a key element in the integrin signalling pathway [Schaller et al., 1995]. However how this protein mediates changes in the differentiation rate by acting as transducer of integrin signals is still unknown. Previous reports have shown that cytoskeletal tension can affect the activity of signalling pathway components, including ERK [Aplin and Juliano, 2001] and Akt [Sawada and Sheetz, 2002], known to promote the differentiation of embryonic stem cells [Ying et al., 2008]. This suggests therefore that the phenotypic switch which accompanies ATRA-induced differentiation process of stem cells could be reinforced by an activation of downstream partners of FAK activity.

We hypothesized in the present work that FAK could indirectly act as positive regulator of the gene activity of the stemness factors in embryonic and embryonal stem cells, by targeting several signalling pathways molecules. Indeed, it has been shown that Nanog is directly linked to FAK survival signalling [Ho et al., 2012]. These data are also consistent with a recent report that showed that Oct4 overexpressing glioblastoma cells exhibit increased invasion, which was associated with an upregulation of FAK expression [Kobayashi et al., 2012]. All these results demonstrate a close relationship between both FAK and Oct4/Nanog activities.

By means of RNA interference experiments, we observed that FAK depletion accelerates ATRA-induced downregulation of Oct4 and Nanog expressions, at both protein and RNA levels. These results suggest that the progressive decrease of expression of the stemness

factors is directly controlled through ATRA-induced repression mechanisms, such as gene silencing by specific nuclear repressors, *i.e.* GCNF [Fuhrmann et al., 2001; Kellner & Kikyo, 2010]. However additional regulatory mechanisms should be activated to allow a smooth Oct4 and Nanog downregulations during stem cell differentiation. Indeed, a finely tuned regulation of these stemness factors is necessary, since they control numerous genes which are implicated in the harmonious completion of the self-renewal process in highly pluripotent cells [Sharif et al., 2011b]. For instance, it is known that a critical amount of Oct4 is required to sustain self-renewal of embryonic stem cells, and modifications of the concentration of the transcription factor induce divergent cell commitments [Niwa et al., 2000]. There should be a highly sensitive sensor mechanism that is able to detect Oct4 levels and to send adequate signals for a smooth downregulation through precise feedback loops [Kellner and Kikyo, 2010]. We expect that one of the critical elements of this mechanism is specifically activated during the adhesion remodelling of the differentiating embryonal cells, in order to avoid pathological deviations. Supposedly, FAK activation could be one of these secured firewalls. Its disturbance fatally leads to cell failure which induces the initiation of a pro-apoptotic programme. Accordingly, we observed that FAK knock-down accelerates the downregulation of Oct4 and Nanog, with the consequence that a significant number of differentiating embryonal stem cells undergo apoptosis. However the precise mechanism by which the recruitment of active forms of FAK protects the differentiating cells, which are in the process to downregulate their expression of Oct4 and Nanog, is still unknown and needs further investigation.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Authorship Contributions

Participated in research design: FE, GF, SAA

Conducted experiments: FE, SAA

Contributed new reagents or analytic tools: AL, CDM, VSK

Performed data analysis: GF, SAA

Wrote or contributed to the writing of the manuscript: GF, SAA

Acknowledgements

This study has been supported by grants from the CCIR-GE of the “Ligue contre le Cancer” (Comité du Grand Est, France). Fathi Emhemmed has been supported by a fellowship from the Higher Education Commission of Libya.

References

- Afrikanova I, Yebra M, Simpkinson M, Xu Y, Hayek A and Montgomery A (2011) Inhibitors of Src and focal adhesion kinase promote endocrine specification: impact on the derivation of β -cells from human pluripotent stem cells. *J Biol Chem* **286**:36042-36052.
- Ali Azouaou S, Emhemmed F, Idris-Khodja N, Lobstein A, Schini-Kerth V, Muller CD and Fuhrmann G (2015) Selective ROS-dependent p53-associated anticancer effects of the hypoxoside derivative rooperol on human teratocarcinoma cancer stem-like cells. *Invest New Drugs* **33**:64-74.
- Aplin AE and Juliano RL (2001) Regulation of nucleocytoplasmic trafficking by cell adhesion receptors and the cytoskeleton. *J Cell Biol* **155**:187-191.
- Boyer LA, Lee TI, Cole MF, Johnstone SE, Levine SS, Zucker JP, Guenther MG, Kumar RM, Murray HL, Jenner RG, Gifford DK, Melton DA, Jaenisch R and Young RA (2005) Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell* **122**:947-956.
- Dahl SC and Grabel LB (1989) Integrin phosphorylation is modulated during the differentiation of F-9 teratocarcinoma stem cells. *J Cell Biol* **108**:183-190.
- Emhemmed F, Ali Azouaou S, Thuaud F, Schini-Kerth V, Désaubry L, Muller CD and Fuhrmann G (2014) Selective anticancer effects of a synthetic flavagline on human Oct4-expressing cancer stem-like cells via a p38 MAPK-dependent caspase-3-dependent pathway. *Biochem Pharmacol* **89**:185-196.
- Fuhrmann G, Chung AC, Jackson KJ, Hummelke G, Baniahmad A, Sutter J, Sylvester I, Schöler HR and Cooney AJ (2001) Mouse germline restriction of Oct4 expression by germ cell nuclear factor. *Dev Cell* **1**:377-387.
- Gaetano C, Melchiorri A, Albini A, Benelli R, Falcioni R, Modesti A, Modica A, Scarra S and Sacchi A (1994) Retinoic acid negatively regulates β 4 integrin expression and suppresses the malignant phenotype in a Lewis lung carcinoma cell line. *Clin Exp Metastasis* **12**:63-72.
- Gao X, Bian W, Yang J, Tang K, Kitani H, Atsumi T and Jing N (2001) A role of N-cadherin in neuronal differentiation of embryonic carcinoma P19 cells. *Biochem Biophys Res Commun* **284**:1098-1103.
- Gu P, Xu X, Le Menuet D, Chung AC and Cooney AJ (2011) Differential recruitment of methyl CpG-binding domain factors and DNAmethyltransferases by the orphan receptor germ cell nuclear factor initiates the repression and silencing of Oct4. *Stem Cells* **29**:1041-

1051.

- Hakuno D1, Takahashi T, Lammerding J and Lee RT (2005) Focal adhesion kinase signaling regulates cardiogenesis of embryonic stem cells. *J Biol Chem* **280**:39534-3944.
- Ho B, Olson G, Figel S, Gelman I, Cance WG and Golubovskaya VM (2012) Nanog increases focal adhesion kinase (FAK) promoter activity and expression and directly binds to FAK protein to be phosphorylated. *J Biol Chem* **287**:18656-18673.
- Jung M, Peterson H, Chavez L, Kahlem P, Lehrach H, Vilo J, and Adjaye J (2010) A data integration approach to mapping OCT4 gene regulatory networks operative in embryonic stem cells and embryonal carcinoma cells. *PLoS One* **5**:e10709.
- Kellner S and Kikyo N (2010) Transcriptional regulation of the Oct4 gene, a master gene for pluripotency. *Histol Histopathol* **25**:405-412.
- Kobayashi K, Takahashi H, Inoue A, Harada H, Toshimori S, Kobayashi Y, Goto K, Sugimoto K, Yano H, Ohnishi T and Tanaka J (2012). Oct-3/4 promotes migration and invasion of glioblastoma cells. *J Cell Biochem* **113**:508–517.
- Kong YP, Tu CH, Donovan PJ and Yee AF (2013) Expression of Oct4 in human embryonic stem cells is dependent on nanotopographical configuration. *Acta Biomater* **9**:6369-6380.
- Konopleva MY and Jordan CT (2011) Leukemia stem cells and microenvironment: biology and therapeutic targeting. *J Clin Oncol* **29**:591-599.
- Liao X, Lu S, Wu Y, Xu W, Zhuo Y, Peng Q, Li B, Zhang L and Wang Y (2013) The effect of differentiation induction on FAK and Src activity in live HMSCs visualized by FRET. *PLoS One* **8**:e72233.
- Nakagawa K, Sogo S, Hioki K, Tokunaga R and Taketani S (1998) Acquisition of cell adhesion and induction of focal adhesion kinase of human colon cancer Colo 201 cells by retinoic acid-induced differentiation. *Differentiation* **62**:249-257.
- Niwa H, Miyazaki J and Smith AG (2000) Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet* **24**:372–376.
- Pesce M and Schöler HR (2001) Oct-4: gatekeeper in the beginnings of mammalian development. *Stem Cells* **19**:271-278.
- Sarkar FH, Li Y, Wang Z and Kong D (2009) Cellular signaling perturbation by natural products. *Cell Signal* **21**:1541-1547.
- Sawada Y and Sheetz MP (2002) Force transduction by Triton cytoskeletons. *J Cell Biol* **156**:609–615.
- Schaller MD, Otey CA, Hilderbrand JD and Parsons JT (1995) Focal adhesion kinase and

- paxillin bind to peptides mimicking β -integrin cytoplasmic domains. *J Cell Biol* **130**:1181–1187.
- Sharif T, Auger C, Bronner C, Alhosin M, Klein T, Etienne-Selloum N, Schini-Kerth V and Fuhrmann G (2011a) Selective proapoptotic activity of polyphenols from red wine on teratocarcinoma cell, a model of cancer stem-like cell. *Invest New Drugs* **29**:239-247.
- Sharif T, Emhemmed F and Fuhrmann G (2011b). Towards new anticancer strategies by targeting cancer stem cells with phytochemical compounds. In Intech (Rijeka, Croatia), Shostak S, editor. *Cancer Stem Cells - The Cutting Edge* pp 431-456.
- Sharif T, Stambouli M, Burrus B, Emhemmed F, Dandache I, Auger C, Etienne-Selloum N, Schini-Kerth V and Fuhrmann G (2013) The polyphenolic-rich aronia melanocarpa juice kills teratocarcinoma cancer stem-like cells, but not their differentiated counterparts. *J Funct Foods* **5**:1244-1252.
- Sun Y, Chen CS and Ful Jianping Fu1 (2012) Forcing Stem Cells to Behave: A Biophysical Perspective of the Cellular Microenvironment. *Annu Rev Biophys* **41**:519–542.
- Wagner RT, Xu X, Yi F, Merrill BJ, Cooney AJ (2010) Canonical Wnt/ β -catenin regulation of liver receptor homolog-1 mediates pluripotency gene expression. *Stem Cells* **28**:1794-1804.
- Wozniak MA, Modzelewska K, Kwong L and Keely PJ (2004) Focal adhesion regulation of cell behavior. *Biochim Biophys Acta* **1692**:103-19.
- Ying Q-L, Wray J, Nichols J, Battle-Morera L, Doble B, Woodgett J, Cohen P and Smith A (2008) The ground state of embryonic stem cell self-renewal. *Nature* **453**:519-523.

Figure captions

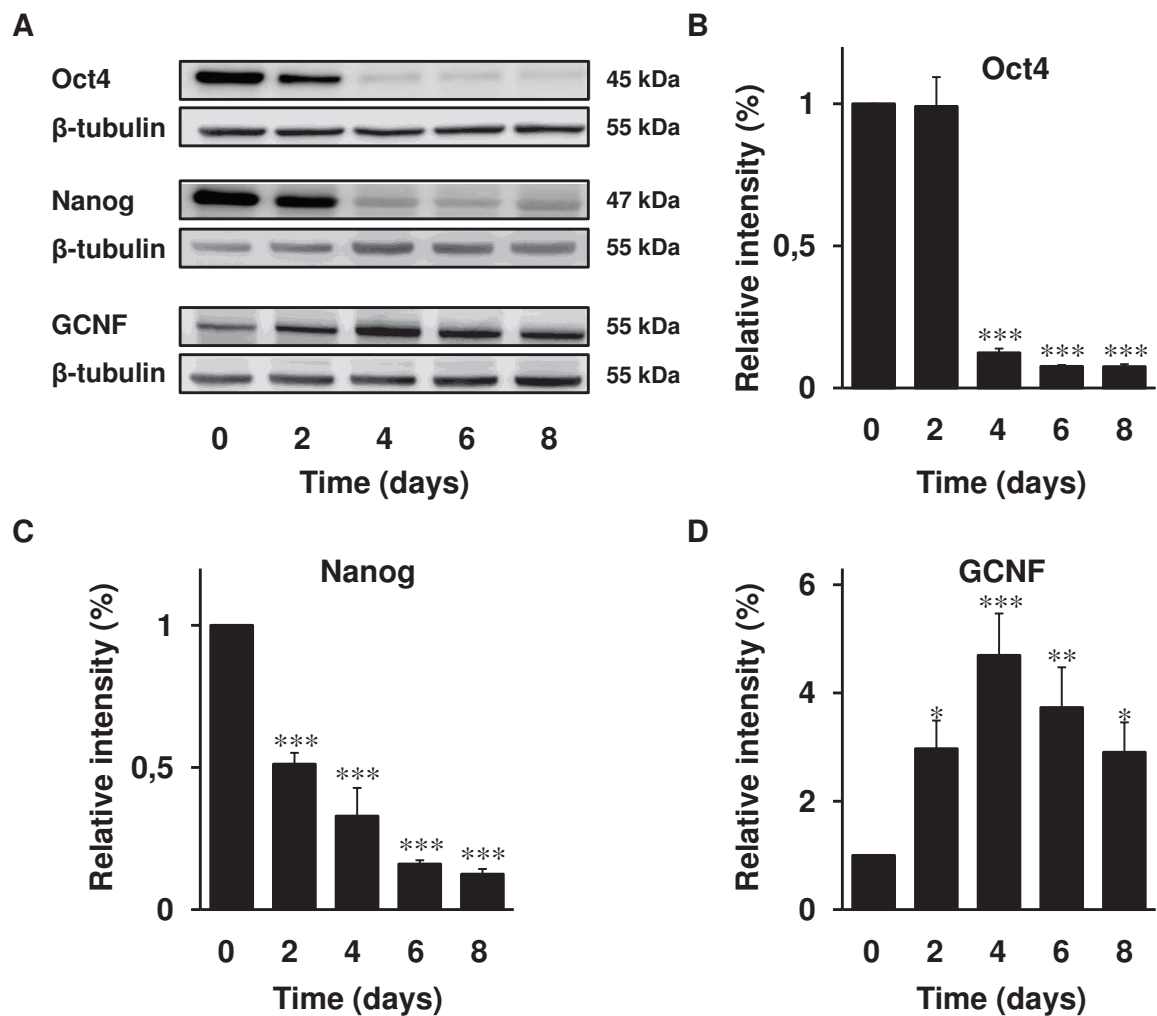


Fig. 1. Time-dependent effects of ATRA on the expression levels of the main stemness factors and Oct4 gene repressor in embryonal stem cells. NT2/D1 cells were exposed to 1 μ M ATRA during 2, 4, 6, 8 days and compared with untreated cells. Immunoblotting analysis was performed as described in “Material and methods” with the corresponding antibodies. Specific bands were detected with their expected apparent molecular weight. (A) shows representative immunoblotting results. (B, C, D) respectively show densitometry results of Oct4, Nanog and GCNF expression normalized to β -tubulin expression and given as ratios relative to the value obtained for the untreated sample and set at 100. Values are means \pm S.E.M. of 4-6 independent experiments. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ vs. untreated cells.

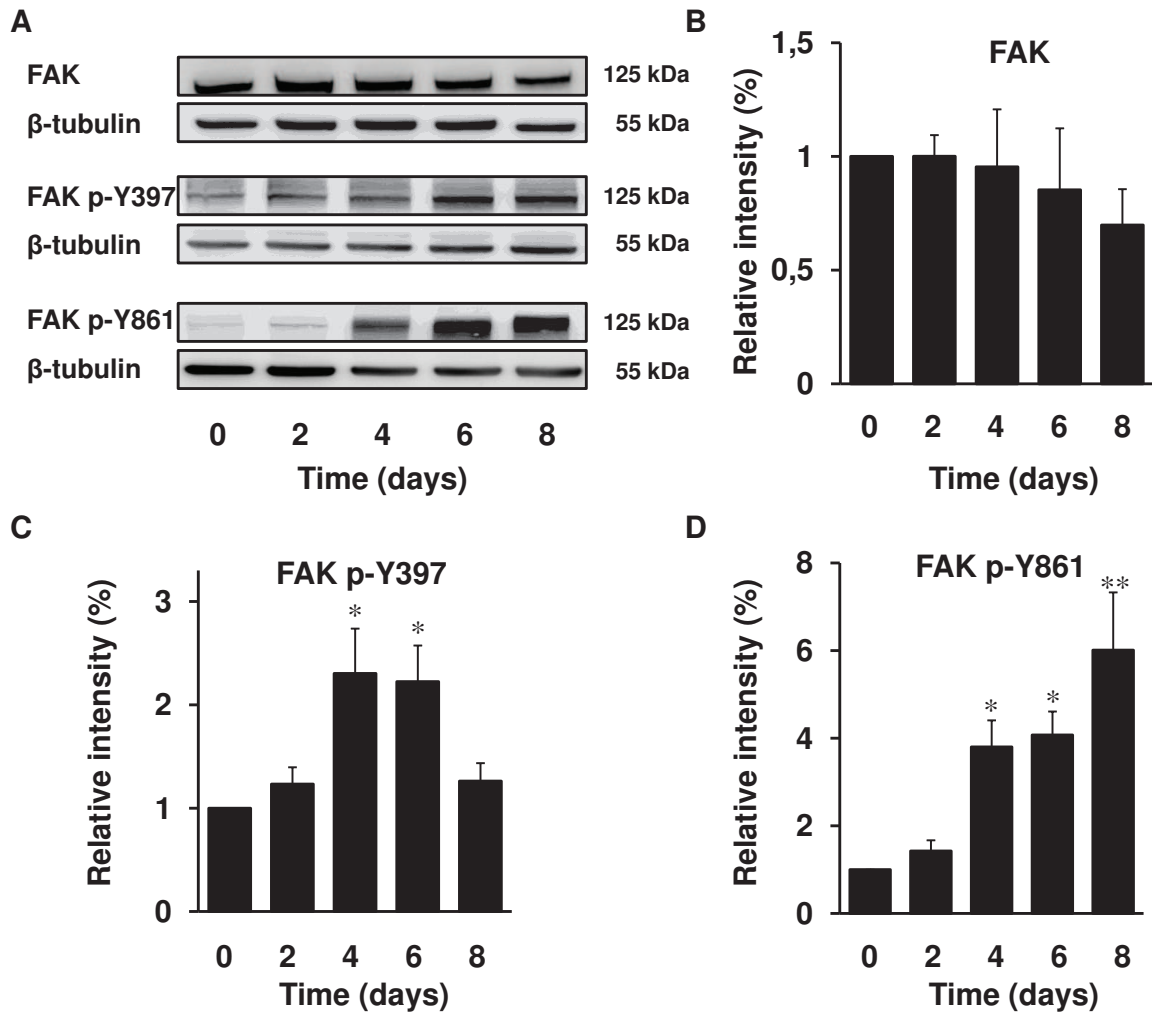


Fig. 2. Time-dependent effects of ATRA on the expression of FAK and its phosphorylated forms Y-397 and Y-861 in embryonal stem cells. NT2/D1 cells were exposed to 1 μ M ATRA during 2, 4, 6, 8 days and compared with untreated cells. Immunoblotting analyses were performed as described in “Material and methods” with the corresponding antibodies. Specific bands were detected with their expected apparent molecular weight. (A) shows representative immunoblotting results. (B, C, D) respectively show densitometry results of FAK, FAK p-Y861 and FAK p-Y397 expression normalized to β -tubulin expression and given as ratios relative to the value obtained for the untreated sample and set at 100. Values are means \pm S.E.M. of 5 independent experiments. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ vs. untreated cells.

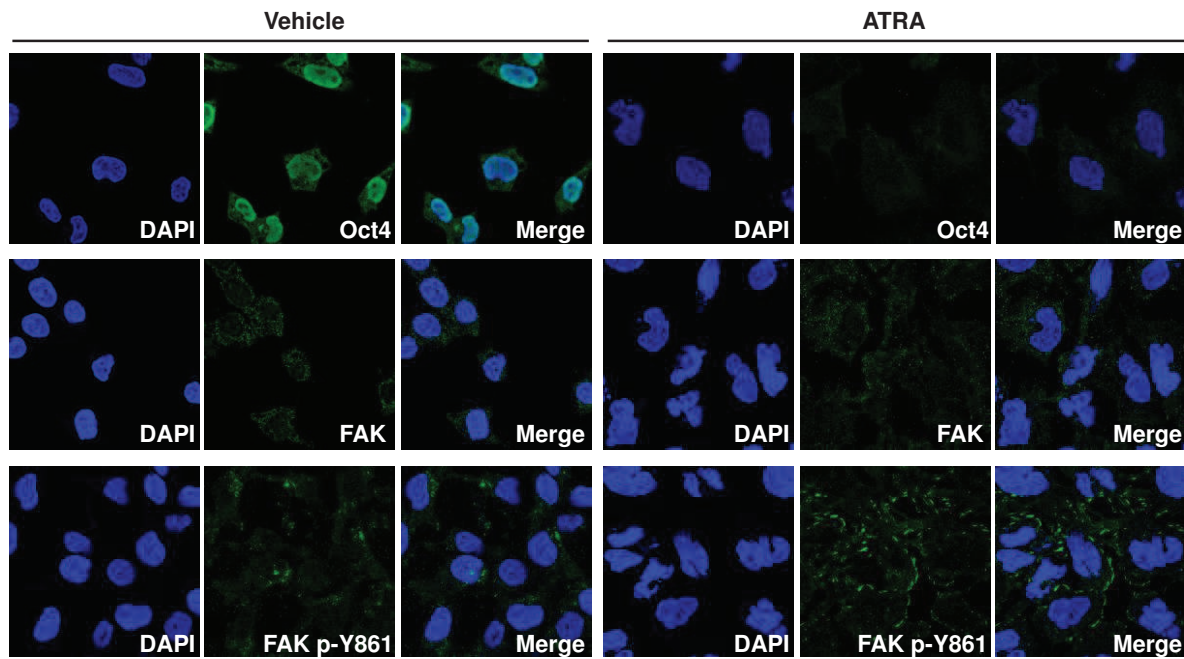


Fig. 3. ATRA treatment induces the disappearance of the nuclear staining of Oct4 and the appearance of a cytoplasmic staining of the phosphorylated form of FAK Y-861 in embryonal stem cells. NT2/D1 cells were exposed to either vehicle (left panel) or 1 μ M ATRA (right panel) during 8 days and stained with an anti-Oct4, anti-FAK or anti-FAK p-Y861 antibodies. Representative Oct4, FAK and FAK p-Y861 fluorescence images (green fluorescence) of vehicle- and ATRA-treated NT2/D1 cells are shown. Nuclei were stained with DAPI (blue fluorescence) and merged images were obtained using image J software. Scale bar 40 μ m.

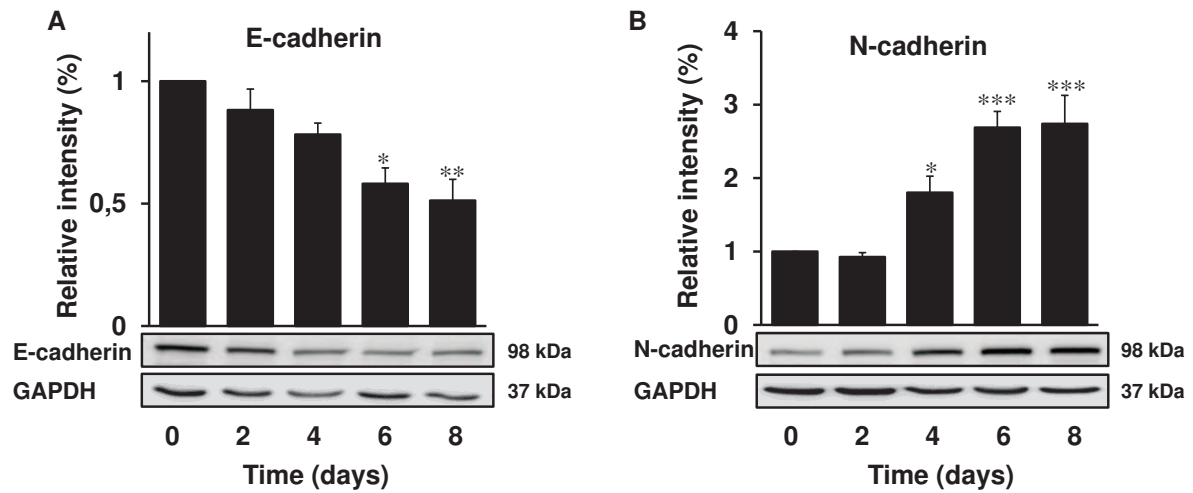


Fig. 4. Time-dependent effects of ATAR on the expression of EMT markers in embryonal stem cells. NT2/D1 cells were exposed to 1 μ M ATRA during 2, 4, 6, 8 days and compared with untreated cells. Immunoblotting analyses were performed as described in “Material and methods” with the corresponding antibodies. Specific bands were detected with their expected apparent molecular weight. The lower panel shows representative immunoblotting results. The upper panels show densitometry results of E-cadherin and N-cadherin normalized to GAPDH expression and given as ratios relative to the value obtained for the untreated sample. Values are means \pm S.E.M. of four independent experiments. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ vs. untreated cells.

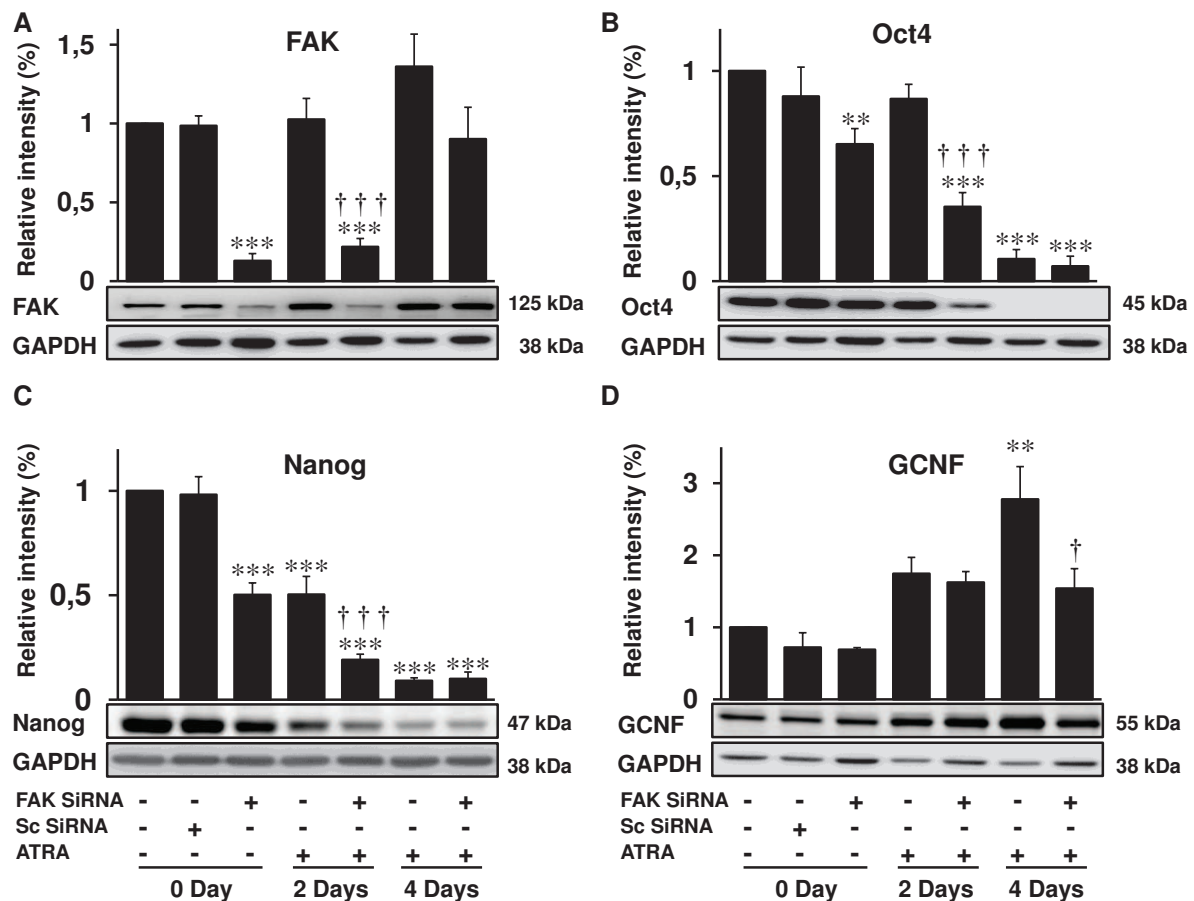


Fig. 5. Potentialisation effects of FAK post-transcriptional gene silencing on ATRA-induced expression variations of the main stemness factors and Oct4 repressor in embryonal stem cells. NT2/D1 cells were transfected or not with 50 nM of FAK siRNA for 48 h and grown for further 2 or 4 days in the presence or absence of 1 μ M ATRA. Expression of proteins was determined as described in “Material and methods”. The lower panels show representative immunoblotting for FAK, Oct4, Nanog and GCNF. The upper panels show densitometry results of FAK, Oct4, Nanog and GCNF normalized to GAPDH expression and given as ratios relative to the value obtained for the untreated sample. Values are means \pm S.E.M. of four independent experiments. $**P < 0.01$ and $***P < 0.001$ vs. untreated cells. $\dagger P < 0.05$ and $\dagger\dagger\dagger P < 0.001$ vs. corresponding untransfected cells.

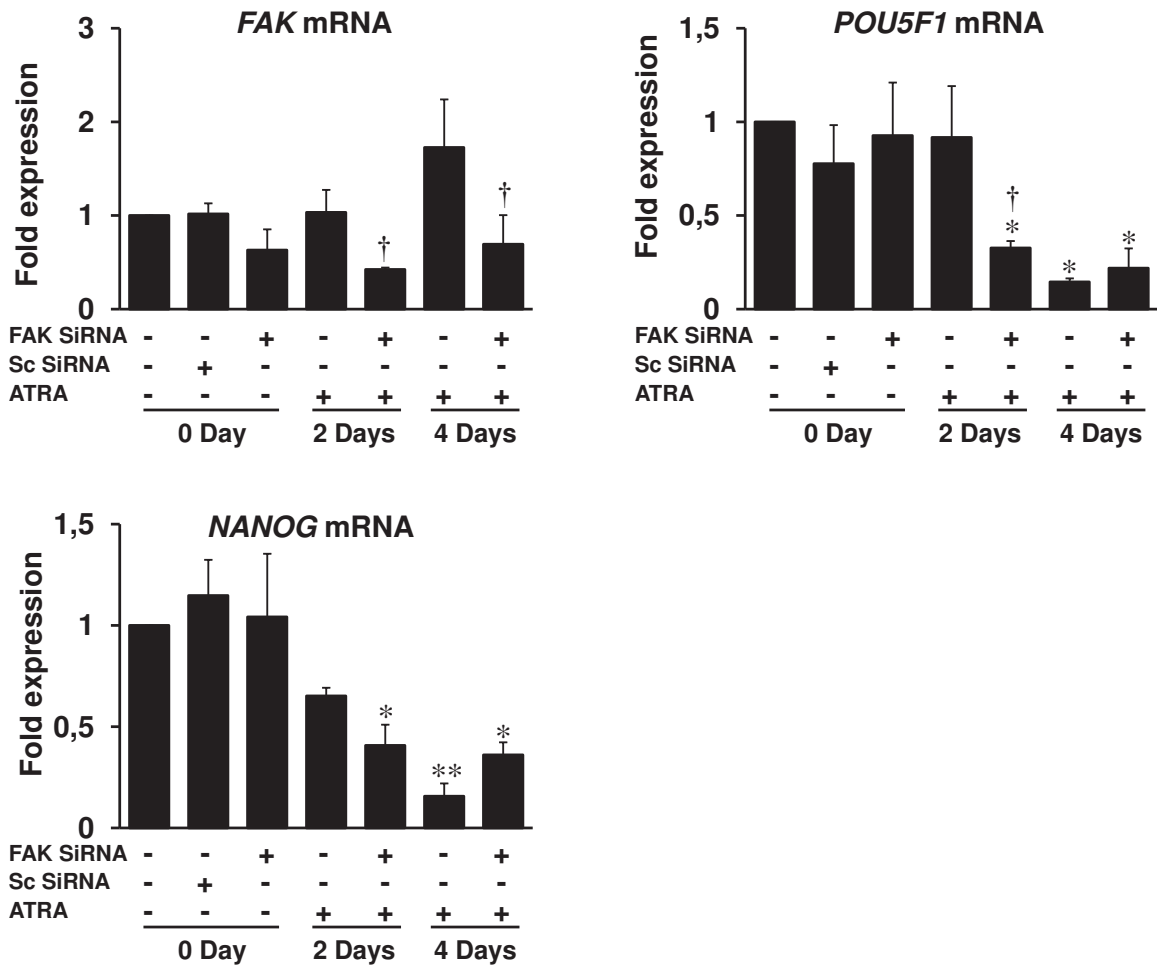


Fig. 6. Effects of FAK post-transcriptional gene silencing on time-dependent response of ATRA on the mRNA levels of the main stemness factors in embryonic stem cells. NT2/D1 cells were transfected or not with 50 nM of FAK siRNA for 48 h and grown for further 2 or 4 days in the presence or absence of 1 μ M ATRA. RT/PCR was performed as described in “Material and methods”. The three panels show the results obtained for the expression levels of *FAK*, *POU5F1* and *NANOG* transcripts, normalized to the expression levels of *GAPDH* mRNA and given as ratios relative to the value obtained for the untreated sample. Values are means \pm S.E.M. of three independent experiments. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ vs. untreated cells. † $P < 0.05$ vs. corresponding untransfected cells.

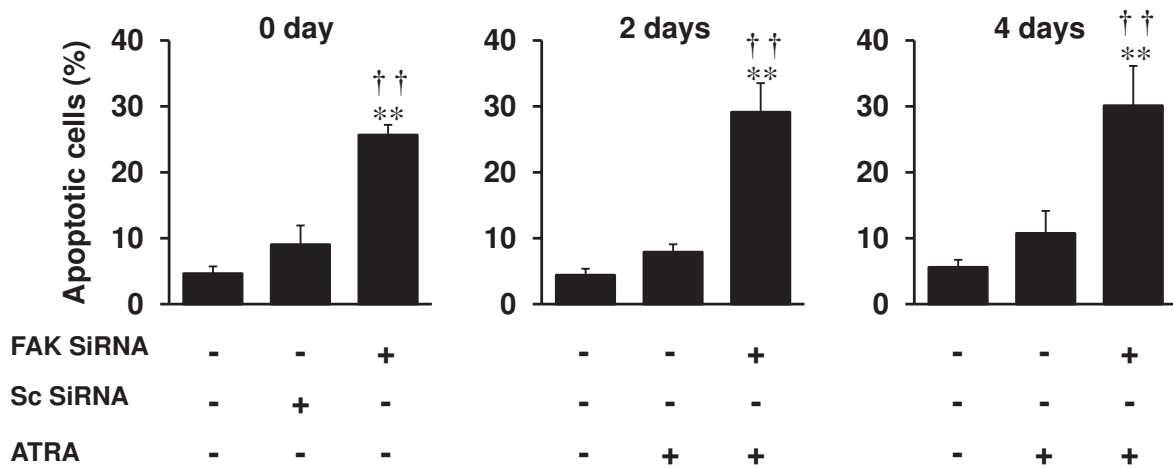


Fig. 7. Potentialisation effects of FAK post-transcriptional gene silencing on ATRA-induced apoptosis rate of embryonal stem cells. Cells were transfected or not with 50 nM of FAK siRNA for 48 h and grown for further 2 or 4 days in the presence or absence of 1 μ M ATRA. Cell apoptosis rate was then assessed by flow cytometry using the Annexin V-FITC/PI staining assay. Panels recapitulate in a bar graph form the percentage of cells undergoing apoptosis. Values are means \pm S.E.M. of three independent experiments. ** $P < 0.01$ vs. untreated cells. †† $P < 0.01$ vs. corresponding untransfected cells.

IV. Discussion générale & perspectives

Le concept de la cellule souche cancéreuse (CSC) a attiré beaucoup d'attention ces dernières années, suite aux travaux de l'équipe de Dick (Lapidot et al., 1994) qui a démontré pour la première fois l'existence des CSCs dans la leucémie. Ces cellules ont des capacités d'auto-renouvellement illimité et de différenciation. Depuis cette découverte, de nombreuses études ont également signalé la présence d'une petite SP de CSCs dans les tumeurs solides. Actuellement, il est admis que ces CSCs sont les cellules initiatrices du cancer, responsables du développement de la récurrence, et des propriétés métastatiques du processus cancéreux. De plus, leur rôle dans la résistance aux protocoles classiques de chimio et radiothérapie semble maintenant bien établi (Tan et al., 2006). Comme conséquence directe, les traitements anticancéreux se doivent de tenir compte dans le futur de la présence de cette SP cellulaire. Cependant, les recherches précliniques de thérapies médicamenteuses ciblant les CSCs restent insuffisantes. Différentes molécules ont été proposées, telles que la salinomycine, le dérivé des rétinoïdes (ATRA) ou l'inhibiteur de HDAC (SAHA). Ces composés induisent l'apoptose et/ou la différenciation des CSCs. En revanche, l'administration répétée de certains de ces composés pendant une longue période entraîne des effets cytotoxiques même sur les CSNs (Bhat-Nakshatri et al., 2013; Campos et al., 2010; Ding et al., 2015; Xu et al., 2014).

De nombreux constituants présents dans les plantes, certaines alimentaires, jouent un rôle important dans la prévention et la thérapie anticancéreuses (Gusman et al., 2001; Surh, 2003). De nombreuses études épidémiologiques mettent ainsi en évidence le rôle important des fruits riches en polyphénols et la consommation des légumes dans la protection de notre organisme vis-à-vis du développement de certains cancers (Kwan et al., 2004). L'objectif global de ma thèse a été d'évaluer les propriétés anticancéreuses de différents composés naturels sur les CSCs et leurs descendants. Ainsi, mes travaux de thèse se sont déclinés trois principales parties : 1) l'effet pro-apoptotique sélectif du roopérol sur les CST ; 2) l'effet pro-apoptotique sélectif des hétérosides triterpéniques issus de Mimosacées dans un modèle de mélanome métastatique ; 3) l'étude de l'effet de l'activité de FAK sur la régulation de l'expression génique d'Oct4 dans les CSTs au cours de la différenciation induite par ATRA.

Nos résultats montrent un effet anticancéreux sélectif du roopérol sur les CSTs. Cet effet est dépendant de l'activation de p53 via la formation intracellulaire de ROS (Ali Azouaou et al., 2015). En effet, l'activité pro-apoptotique du roopérol dans les CSCs et leurs descendants est

déclenchée via l'activation du gène suppresseur de tumeur p53. L'activation d'une voie pro-apoptotique précède suite aux dommages causés à l'ADN est en fait fonction du type cellulaire, des génotoxines spécifiques, de la capacité de réparation de l'ADN et, entre autres, du statut p53/p73 (Roos and Kaina, 2006). Il n'est donc pas surprenant que les CCs et leurs progéniteurs réagissent d'une manière similaire en réponse à un pharmacophore spécifique (comme le roopérol), car elles partagent les mêmes déterminants moléculaires qui sont impliqués dans l'induction de l'apoptose et l'inhibition de la prolifération.

Des études antérieures ont indiqué que plusieurs produits naturels tels que le resvératrol (Gusman et al., 2001), l'épigallocatechine-3 gallate (Azam et al., 2004) et la curcumine (Duvoix et al., 2005) entraînent l'inhibition de la prolifération de divers types de CCs, par le biais d'une réponse pro-oxydante impliquant la formation intracellulaire de ROS. D'une manière identique, le roopérol exerce son activité anticancéreuse sur les CSTs via une production de ROS, induisant ainsi une surexpression de p53 et l'activation de la caspase-3 qui mènent les cellules vers l'apoptose. En effet, le traitement préalable des CSTs par un analogue perméant de la superoxyde dismutase (SOD) empêche la formation intracellulaire de ROS induite par le roopérol et bloque donc les effets pro-apoptotiques de ce dernier. Un tel effet n'est cependant pas observé avec la SOD native. Comme cette dernière est incapable de traverser les membranes, nous pouvons conclure que le roopérol agit comme un puissant producteur de ROS intracellulaires, qui en retour exercent leurs effets anti-cancéreux pro-apoptotiques via un mécanisme p53-dépendant. En fait, il a été démontré que ces radicaux libres proviennent essentiellement d'un dysfonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale ou plus exactement d'une diminution de l'activité antioxydante de la SOD mitochondriale (Buettner, 2011; Roos and Kaina, 2006). Nous supposons alors que le stress oxydant mitochondrial est le médiateur de la réponse initiale pro-oxydante induite par le roopérol. Le bien fondé de notre hypothèse est étayé par nos résultats qui démontrent une perturbation du potentiel de la membrane mitochondriale $\Delta\Psi_m$, perturbation qui est sélective des CSCs après être exposées au dérivé de l'hypoxoside.

L'effet cytotoxique sélectif du roopérol sur les CSCs peut également être consécutif à la chute significative de l'expression du facteur de souche Oct4. Une telle modification est en effet connue pour induire une perte de la pluripotence et promouvoir la mort des CSCs, ce qui est en parfait accord avec nos observations.

La nocivité sélective des agents pharmacologiques contre les CSCs et les CCs, mais non sur les CSNs et les CNs, devrait ouvrir de nouvelles voies d'exploration pour une chimiothérapie plus efficace avec des effets secondaires limités. Cependant, les mécanismes de résistance des CNs et des CSNs aux effets cytotoxiques de ces molécules restent à préciser. Afin d'analyser ce point crucial, nous avons examiné les processus qui pourraient rendre compte de l'absence d'effet toxique du roopérol. A cette fin, nous avons utilisé comme matériel biologique la cellule fibroblastique qui peut être considérée comme un modèle de CSN, mais avec un potentiel de différenciation limitée (Robinton and Daley, 2012). Comme attendu, nos résultats démontrent que des concentrations croissantes de roopérol induisent sélectivement une inhibition de la prolifération des CCs et des CSCs, sans aucun effet toxique sur les fibroblastes BJ. En effet, le test de mesure de l'apoptose par suivi de l'externalisation de la phosphatidylsérine, ainsi que d'autres indicateurs indirects de l'apoptose, ont confirmé que le roopérol, même à des concentrations très élevées (jusqu'à 50 μ M), n'a aucun effet sur les fibroblastes BJ. Nous avons constaté que, contrairement à ses effets sur les CSCs, le roopérol est incapable d'altérer l'intégrité de la membrane mitochondriale des CSNs et d'y provoquer une formation de ROS. A ce jour, il reste à déterminer les mécanismes moléculaires précis qui font défaut dans les CSNs et qui empêchent la formation de ROS, suite à leur exposition à un agent pro-oxydant comme le roopérol. La phosphorylation sélective de la protéine régulatrice de l'apoptose BAD (au niveau de la sérine 112) et de la protéine de survie Akt (au niveau de la sérine 473) dans les CSNs, mais non dans les CSCs, apparaît comme un événement clé de la protection des fibroblastes BJ contre l'agent anticancéreux roopérol (Voir figure supplémentaire1 de l'article1). Cependant, le mécanisme impliqué dans l'activation d'Akt dans les CSNs traitées par le roopérol nécessite d'être précisé. Plusieurs protéines kinases, y compris la protéine kinase Akt, ont été impliquées dans l'inactivation de la protéine pro-apoptotique BAD, via sa phosphorylation (Gross et al., 1999). En effet, le roopérol n'entraîne une augmentation de l'expression de la p53 que dans les CSCs. Paradoxalement, il empêche l'apoptose des CSNs consécutive à l'augmentation des niveaux d'expression de la p53 induite par le peroxyde d'hydrogène H₂O₂. Nos résultats indiquent donc que le roopérol joue en fait dans les CSNs un rôle protecteur contre l'effet délétère d'un stress oxydant induit. Ces travaux nécessitent donc d'être approfondis ultérieurement et élargis à d'autres modèles de CSNs. En effet, il n'est pas clair à quel point les fibroblastes BJ peuvent être utilisés comme un modèle de contrôle négatif pour élucider les mécanismes de sélectivité de futurs agents anticancéreux, bien que ce modèle soit largement accepté dans la littérature.

Dans une dernière partie de mon travail, le potentiel anticancéreux sélectif de plusieurs hétérosides triterpéniques issus de différentes espèces d'*Albizzia* africaines appartenant à la famille des Mimosacées a été évalué. Les différentes molécules pures ont été testées pour leur efficacité anti-cancéreuse sur la lignée A431, des cellules dérivées d'un carcinome épidermoïde agressif. Cette lignée est largement utilisée pour l'identification des molécules à potentiel anticancéreux et dans l'élucidation des mécanismes d'induction d'apoptose des carcinomes cutanés (Bhujade et al., 2013; Smina et al., 2015). L'analyse de l'apoptose par FITC/PI test d'AnnexineV a démontré que la majorité des composés testés exercent une activité anti-apoptotique. La comparaison de leurs EC₅₀ nous a permis de sélectionner la molécule la plus active puis d'en explorer le mécanisme d'action.

Chez les patients atteints de mélanome métastatique, les traitements systémiques sont malheureusement très peu efficaces, en raison de la résistance élevée des CCs à diverses thérapies anticancéreuses. Le composé sélectionné, suite à notre criblage et présentant la plus grande activité apoptotique sur notre modèle de carcinome cutané, est le composé C3. Ce dernier entraîne une augmentation de l'apoptose dans la lignée de mélanome métastatique A375, sans aucune modification significative dans la lignée de cellules normales de peau TE353.SK. Ces résultats notamment ceux concernant la sélectivité sont en concordance avec nos données précédentes obtenus sur un autre modèle de CSC (en l'occurrence la CST) et avec une autre molécule bioactive (en l'occurrence le roopérol ou la flavagline (Ali Azouaou et al., 2015; Emhemmed et al., 2014)).

De plus, le traitement avec le composé C3 est associé à une augmentation du nombre des cellules A375 présentant une chute de potentiel de la membrane mitochondriale $\Delta\Psi_m$, synonyme d'une altération du fonctionnement de la mitochondrie. Celle-ci joue en effet un rôle primordial dans l'induction de l'apoptose par activation de la voie intrinsèque, suite à la libération de protéines pro-apoptotiques (telle le cytochrome C) de la mitochondrie vers le cytosol (Green and Kroemer, 2004; Kaufmann and Earnshaw, 2000). Nous avons cependant constaté que le composé C3 entraîne une augmentation de l'activité des caspases 8 et 9 dans les cellules de mélanome A375. L'inhibition pharmacologique de l'activité de la caspase 8 a permis de contrecarrer les effets pro-apoptotiques du composé C3, indiquant l'implication de la voie extrinsèque dans ses effets pro-apoptotiques sur les mélanomes A375. Cependant l'inhibition de l'activité de la caspase 9 n'a aucun effet sur l'apoptose induite par le composé C3. Nos résultats suggèrent donc que le composé C3 induit l'apoptose des cellules A375 via une activation préférentielle de la caspase 8. L'augmentation de l'activité de la caspase 9,

suite au traitement avec le composé C3, peut être due à une interaction des deux voies pro-apoptotiques. En effet, il a été démontré que l'activation de la caspase 8 peut entraîner des perturbations des fonctions mitochondriales qui conduisent à l'activation de la caspase 9, qui par la suite cible les caspases effectrices (caspase 3 et 7), déclenchant le processus de dégradation cellulaire pro-apoptotique (Ge et al., 2002). La cible initiale conduisant à l'activation de la caspase 8 en réponse au traitement par C3 reste cependant à ce jour inconnue.

Une SP de cellules minoritaires se trouve dans de nombreux types de cancer et est généralement plus tumorigène et résistante aux traitements. Il a été démontré qu'une SP des cellules de mélanome affiche une capacité tumorigène supérieure au reste de la population cellulaire en termes de taille de la tumeur après xénogreffe et de l'activité clonogénique. De plus, cette SP semble être en mesure de rétablir l'hétérogénéité de la lignée cellulaire de mélanome A375. En outre, les gènes liés à l'invasion et à la migration cellulaires qui sont connus d'être surexprimés dans la SP de mélanome des patients sont retrouvés dans la SP de la lignée cellulaire A375 (Wouters et al., 2013). De plus, dans la mesure où Oct4 est un marqueur de pluripotence et d'agressivité tumorale, sa détection au sein de la SP de mélanome de patient ou dans la lignée cellulaire A375 démontre que l'on a affaire à du matériel biologique enrichi en CSCs. Nous avons ainsi constaté que C3 entraîne une réduction du niveau d'expression du facteur de souche Oct4 dans les cellules de mélanome A375, permettant ainsi de réduire leur pluripotentialité et leur capacité d'autorenouvellement, et finalement de promouvoir la mort cellulaire, via l'activation de la voie P38 MAPK (Emhemmed et al., 2014). Ceci démontre que C3 est susceptible de cibler à la fois les CCs et les CSCs.

En conclusion, les travaux de recherche effectués dans le cadre de ma thèse de doctorat ont permis de mettre en évidence de nouveaux et puissants composés anticancéreux, capables d'induire sélectivement *in vitro* l'apoptose des CSCs et leurs descendants, tout en épargnant les CSNs et leurs descendants. Cette étude se doit d'être étendue à d'autres modèles de CSCs résistants aux traitements chimio-thérapeutiques. Le défi est de déchiffrer tous les aspects *in vitro* et *in vivo* de l'activité biologique de ces composés bioactifs, en termes de cibles cellulaires et moléculaires, avant d'envisager les essais cliniques.

Ce travail de thèse a été complété, dans une étude annexe, par une analyse de l'effet de l'activité de FAK sur la régulation de l'expression d'Oct4; le modèle d'étude choisi a été la

CST au cours de la différenciation. Il en ressort que les mécanismes de répression de l'expression d'Oct4 sont complexes et interconnectés. En effet, la chute de l'expression d'Oct4, que ce soit sous l'effet d'ATRA, du roopérol ou de C3, peut prendre différents visages qui peuvent mener à deux processus distincts, soit la différenciation, soit l'apoptose. Il faut supposer qu'à faible dose, cette chute est progressive et permettrait d'induire la différenciation, comme cela a été vu pour ATRA et plus récemment pour la flavagline (manuscrit en préparation). A dose plus forte, cette chute est brutale et permettrait d'induire l'apoptose. En jouant sur des mécanismes régulateurs de cette chute, comme ceux engendrés par l'activité FAK, nous pouvons présupposer que tout agent pharmacologique est susceptible d'entraîner une apoptose ou une différenciation. Afin de vérifier cette hypothèse, nous chercherons à vérifier dans l'avenir que le roopérol ou le coriaroside C3 a une activité pro-différenciatrice sur les CSCs et que cette activité peut être contrecarrée en induisant des dysfonctionnements des mécanismes régulateurs fins de l'expression génique d'Oct4 (comme l'activité FAK). Dans ce cas précis, un processus pro-apoptotique serait alors favorisé au détriment du processus pro-différenciateur. En dernier recours, toute substance pharmacologique possédant l'une ou l'autre activité, pourrait donc présenter des potentiels thérapeutiques, dans la mesure où elle est susceptible de cibler toute CSC exprimant le facteur de souche Oct4.

Références bibliographiques

(Edition 2014). Les cancers en France (ETKFRANCE15).

Ahmed, S.U., Carruthers, R., Gilmour, L., Yildirim, S., Watts, C., and Chalmers, A.J. (2015). Selective inhibition of parallel DNA damage response pathways optimizes radiosensitization of glioblastoma stem-like cells. *Cancer research*.

Al-Hajj, M., Becker, M.W., Wicha, M., Weissman, I., and Clarke, M.F. (2004). Therapeutic implications of cancer stem cells. *Current opinion in genetics & development* *14*, 43-47.

Albrecht, C.F., Theron, E.J., and Kruger, P.B. (1995). Morphological characterisation of the cell-growth inhibitory activity of rooperol and pharmacokinetic aspects of hypoxoside as an oral prodrug for cancer therapy. *South African medical journal = Suid-Afrikaanse tydskrif vir geneeskunde* *85*, 853-860.

Ali Azouaou, S., Emhemmed, F., Idris-Khodja, N., Lobstein, A., Schini-Kerth, V., Muller, C.D., and Fuhrmann, G. (2015). Selective ROS-dependent p53-associated anticancer effects of the hypoxoside derivative rooperol on human teratocarcinoma cancer stem-like cells. *Investigational new drugs* *33*, 64-74.

Alizadeh, F., Bolhassani, A., Khavari, A., Bathaie, S.Z., Naji, T., and Bidgoli, S.A. (2014). Retinoids and their biological effects against cancer. *International immunopharmacology* *18*, 43-49.

Andrews, P.W., Damjanov, I., Simon, D., Banting, G.S., Carlin, C., Dracopoli, N.C., and Fogh, J. (1984). Pluripotent embryonal carcinoma clones derived from the human teratocarcinoma cell line Tera-2. Differentiation in vivo and in vitro. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* *50*, 147-162.

Avilion, A.A., Nicolis, S.K., Pevny, L.H., Perez, L., Vivian, N., and Lovell-Badge, R. (2003). Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes & development* *17*, 126-140.

Azam, S., Hadi, N., Khan, N.U., and Hadi, S.M. (2004). Prooxidant property of green tea polyphenols epicatechin and epigallocatechin-3-gallate: implications for anticancer properties. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* *18*, 555-561.

Balic, M., Lin, H., Young, L., Hawes, D., Giuliano, A., McNamara, G., Datar, R.H., and Cote, R.J. (2006). Most early disseminated cancer cells detected in bone marrow of breast cancer

patients have a putative breast cancer stem cell phenotype. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* *12*, 5615-5621.

Bani-Yaghub, M., Felker, J.M., and Naus, C.C. (1999). Human NT2/D1 cells differentiate into functional astrocytes. *Neuroreport* *10*, 3843-3846.

Bao, B., Azmi, A.S., Li, Y., Ahmad, A., Ali, S., Banerjee, S., Kong, D., and Sarkar, F.H. (2014). Targeting CSCs in tumor microenvironment: the potential role of ROS-associated miRNAs in tumor aggressiveness. *Current stem cell research & therapy* *9*, 22-35.

Baylin, S.B., and Jones, P.A. (2011). A decade of exploring the cancer epigenome - biological and translational implications. *Nature reviews Cancer* *11*, 726-734.

Beck, B., and Blanpain, C. (2013). Unravelling cancer stem cell potential. *Nature reviews Cancer* *13*, 727-738.

Bhat-Nakshatri, P., Goswami, C.P., Badve, S., Sledge, G.W., Jr., and Nakshatri, H. (2013). Identification of FDA-approved drugs targeting breast cancer stem cells along with biomarkers of sensitivity. *Scientific reports* *3*, 2530.

Bhujade, A., Gupta, G., Talmale, S., Das, S.K., and Patil, M.B. (2013). Induction of apoptosis in A431 skin cancer cells by *Cissus quadrangularis* Linn stem extract by altering Bax-Bcl-2 ratio, release of cytochrome c from mitochondria and PARP cleavage. *Food & function* *4*, 338-346.

Bissell, M.J., and Hines, W.C. (2011). Why don't we get more cancer? A proposed role of the microenvironment in restraining cancer progression. *Nature medicine* *17*, 320-329.

Blank, U., Karlsson, G., and Karlsson, S. (2008). Signaling pathways governing stem-cell fate. *Blood* *111*, 492-503.

Bomken, S., Fiser, K., Heidenreich, O., and Vormoor, J. (2010). Understanding the cancer stem cell. *British journal of cancer* *103*, 439-445.

Bonnet, D., and Dick, J.E. (1997). Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nature medicine* *3*, 730-737.

Bora-Singhal, N., Perumal, D., Nguyen, J., and Chellappan, S. (2015). Gli1-Mediated Regulation of Sox2 Facilitates Self-Renewal of Stem-Like Cells and Confers Resistance to EGFR Inhibitors in Non-Small Cell Lung Cancer. *Neoplasia* *17*, 538-551.

Boukes, G.J., Daniels, B.B., Albrecht, C.F., and van de Venter, M. (2010). Cell survival or apoptosis: rooperol's role as anticancer agent. *Oncology research* *18*, 365-376.

Boyer, L.A., Lee, T.I., Cole, M.F., Johnstone, S.E., Levine, S.S., Zucker, J.P., Guenther, M.G., Kumar, R.M., Murray, H.L., Jenner, R.G., *et al.* (2005). Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell* *122*, 947-956.

Bragado, P., Armesilla, A., Silva, A., and Porras, A. (2007). Apoptosis by cisplatin requires p53 mediated p38alpha MAPK activation through ROS generation. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* 12, 1733-1742.

Campbell, L.L., and Polyak, K. (2007). Breast tumor heterogeneity: cancer stem cells or clonal evolution? *Cell cycle* 6, 2332-2338.

Campos, B., Wan, F., Farhadi, M., Ernst, A., Zeppernick, F., Tagscherer, K.E., Ahmadi, R., Lohr, J., Dictus, C., Gdynia, G., *et al.* (2010). Differentiation therapy exerts antitumor effects on stem-like glioma cells. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 16, 2715-2728.

Chai, S., Xu, X., Wang, Y., Zhou, Y., Zhang, C., Yang, Y., Yang, Y., Xu, H., Xu, R., and Wang, K. (2015). Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase IIgamma enhances stem-like traits and tumorigenicity of lung cancer cells. *Oncotarget* 6, 16069-16083.

Chambers, I., Colby, D., Robertson, M., Nichols, J., Lee, S., Tweedie, S., and Smith, A. (2003). Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell* 113, 643-655.

Chambers, I., and Smith, A. (2004). Self-renewal of teratocarcinoma and embryonic stem cells. *Oncogene* 23, 7150-7160.

Chen, G., Shukeir, N., Potti, A., Sircar, K., Aprikian, A., Goltzman, D., and Rabbani, S.A. (2004). Up-regulation of Wnt-1 and beta-catenin production in patients with advanced metastatic prostate carcinoma: potential pathogenetic and prognostic implications. *Cancer* 101, 1345-1356.

Chen, M.C., Hsu, S.L., Lin, H., and Yang, T.Y. (2014). Retinoic acid and cancer treatment. *BioMedicine* 4, 22.

Chiou, S.H., Wang, M.L., Chou, Y.T., Chen, C.J., Hong, C.F., Hsieh, W.J., Chang, H.T., Chen, Y.S., Lin, T.W., Hsu, H.S., *et al.* (2010). Coexpression of Oct4 and Nanog enhances malignancy in lung adenocarcinoma by inducing cancer stem cell-like properties and epithelial-mesenchymal transdifferentiation. *Cancer research* 70, 10433-10444.

Cicalese, A., Bonizzi, G., Pasi, C.E., Faretta, M., Ronzoni, S., Giulini, B., Brisken, C., Minucci, S., Di Fiore, P.P., and Pelicci, P.G. (2009). The tumor suppressor p53 regulates polarity of self-renewing divisions in mammary stem cells. *Cell* 138, 1083-1095.

Collins, A.T., Berry, P.A., Hyde, C., Stower, M.J., and Maitland, N.J. (2005). Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer research* 65, 10946-10951.

Connolly, R.M., Nguyen, N.K., and Sukumar, S. (2013). Molecular pathways: current role and future directions of the retinoic acid pathway in cancer prevention and treatment. *Clinical*

cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research *19*, 1651-1659.

Costello, L.C., and Franklin, R.B. (2012). The genetic/metabolic transformation concept of carcinogenesis. *Cancer metastasis reviews* *31*, 123-130.

Crocker, A.K., and Allan, A.L. (2012). Inhibition of aldehyde dehydrogenase (ALDH) activity reduces chemotherapy and radiation resistance of stem-like ALDHhiCD44(+) human breast cancer cells. *Breast cancer research and treatment* *133*, 75-87.

Dang, T.P., Gazdar, A.F., Virmani, A.K., Sepetavec, T., Hande, K.R., Minna, J.D., Roberts, J.R., and Carbone, D.P. (2000). Chromosome 19 translocation, overexpression of Notch3, and human lung cancer. *Journal of the National Cancer Institute* *92*, 1355-1357.

Dar, Z.A., Tanveer, S., Yattoo, G.N., Sofi, B.A., Dar, P.A., and Wani, S.A. (2008). Presence of anti-Toxocara antibodies in children population of district Anantnag and Pulwama of Kashmir valley. *Indian journal of medical microbiology* *26*, 400-402.

Darr, H., Mayshar, Y., and Benvenisty, N. (2006). Overexpression of NANOG in human ES cells enables feeder-free growth while inducing primitive ectoderm features. *Development* *133*, 1193-1201.

Diehn, M., Cho, R.W., Lobo, N.A., Kalisky, T., Dorie, M.J., Kulp, A.N., Qian, D., Lam, J.S., Ailles, L.E., Wong, M., *et al.* (2009). Association of reactive oxygen species levels and radioresistance in cancer stem cells. *Nature* *458*, 780-783.

Ding, L., Yuan, C., Wei, F., Wang, G., Zhang, J., Bellail, A.C., Zhang, Z., Olson, J.J., and Hao, C. (2011). Cisplatin restores TRAIL apoptotic pathway in glioblastoma-derived stem cells through up-regulation of DR5 and down-regulation of c-FLIP. *Cancer investigation* *29*, 511-520.

Ding, L., Zhang, Z., Liang, G., Yao, Z., Wu, H., Wang, B., Zhang, J., Tariq, M., Ying, M., and Yang, B. (2015). SAHA triggered MET activation contributes to SAHA tolerance in solid cancer cells. *Cancer letters* *356*, 828-836.

Dolnikov, A., Xu, N., Shen, S., Song, E., Holmes, T., Klamer, G., and O'Brien, T.A. (2014). GSK-3beta inhibition promotes early engraftment of ex vivo-expanded haematopoietic stem cells. *Cell proliferation* *47*, 113-123.

Duvoix, A., Blasius, R., Delhalle, S., Schnekenburger, M., Morceau, F., Henry, E., Dicato, M., and Diederich, M. (2005). Chemopreventive and therapeutic effects of curcumin. *Cancer letters* *223*, 181-190.

Emhemmed, F., Ali Azouaou, S., Thuaud, F., Schini-Kerth, V., Desaubry, L., Muller, C.D., and Fuhrmann, G. (2014). Selective anticancer effects of a synthetic flavagline on human

Oct4-expressing cancer stem-like cells via a p38 MAPK-dependent caspase-3-dependent pathway. *Biochemical pharmacology* 89, 185-196.

Eramo, A., Lotti, F., Sette, G., Piloizzi, E., Biffoni, M., Di Virgilio, A., Conticello, C., Ruco, L., Peschle, C., and De Maria, R. (2008). Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population. *Cell death and differentiation* 15, 504-514.

Favaloro, B., Allocati, N., Graziano, V., Di Ilio, C., and De Laurenzi, V. (2012). Role of apoptosis in disease. *Aging* 4, 330-349.

Fiuza, U.M., and Arias, A.M. (2007). Cell and molecular biology of Notch. *The Journal of endocrinology* 194, 459-474.

Frank, N.Y., Margaryan, A., Huang, Y., Schatton, T., Waaga-Gasser, A.M., Gasser, M., Sayegh, M.H., Sadee, W., and Frank, M.H. (2005). ABCB5-mediated doxorubicin transport and chemoresistance in human malignant melanoma. *Cancer research* 65, 4320-4333.

Ge, X., Fu, Y.M., Li, Y.Q., and Meadows, G.G. (2002). Activation of caspases and cleavage of Bid are required for tyrosine and phenylalanine deficiency-induced apoptosis of human A375 melanoma cells. *Archives of biochemistry and biophysics* 403, 50-58.

Ginestier, C., Hur, M.H., Charafe-Jauffret, E., Monville, F., Dutcher, J., Brown, M., Jacquemier, J., Viens, P., Kleer, C.G., Liu, S., *et al.* (2007). ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell stem cell* 1, 555-567.

Girouard, S.D., Laga, A.C., Mihm, M.C., Scolyer, R.A., Thompson, J.F., Zhan, Q., Widlund, H.R., Lee, C.W., and Murphy, G.F. (2012). SOX2 contributes to melanoma cell invasion. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 92, 362-370.

Gong, S., Li, Q., Jeter, C.R., Fan, Q., Tang, D.G., and Liu, B. (2015). Regulation of NANOG in cancer cells. *Molecular carcinogenesis* 54, 679-687.

Gonzalvo, M.L., and Jones, P.A. (1997). Mutagenic and epigenetic effects of DNA methylation. *Mutation research* 386, 107-118.

Gordon, W.R., Vardar-Ulu, D., Histen, G., Sanchez-Irizarry, C., Aster, J.C., and Blacklow, S.C. (2007). Structural basis for autoinhibition of Notch. *Nature structural & molecular biology* 14, 295-300.

Green, D.R., and Kroemer, G. (2004). The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science* 305, 626-629.

Gross, A., McDonnell, J.M., and Korsmeyer, S.J. (1999). BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes & development* 13, 1899-1911.

Gu, P., Le Menuet, D., Chung, A.C., and Cooney, A.J. (2006). Differential recruitment of methylated CpG binding domains by the orphan receptor GCNF initiates the repression and silencing of Oct4 expression. *Molecular and cellular biology* 26, 9471-9483.

Gusman, J., Malonne, H., and Atassi, G. (2001). A reappraisal of the potential chemopreventive and chemotherapeutic properties of resveratrol. *Carcinogenesis* 22, 1111-1117.

Han, X., Fang, X., Lou, X., Hua, D., Ding, W., Foltz, G., Hood, L., Yuan, Y., and Lin, B. (2012). Silencing SOX2 induced mesenchymal-epithelial transition and its expression predicts liver and lymph node metastasis of CRC patients. *PloS one* 7, e41335.

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646-674.

Hanausek, M., Ganesh, P., Walaszek, Z., Arntzen, C.J., Slaga, T.J., and Gutterman, J.U. (2001). Avicins, a family of triterpenoid saponins from *Acacia victoriae* (Benth), suppress H-ras mutations and aneuploidy in a murine skin carcinogenesis model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 11551-11556.

Hanna, J.D., Foreman, J.W., and Chan, J.C. (1991). Chronic renal insufficiency in infants and children. *Clinical pediatrics* 30, 365-384.

Harada, H., Kizaka-Kondoh, S., Li, G., Itasaka, S., Shibuya, K., Inoue, M., and Hiraoka, M. (2007). Significance of HIF-1-active cells in angiogenesis and radioresistance. *Oncogene* 26, 7508-7516.

Haridas, V., Higuchi, M., Jayatilake, G.S., Bailey, D., Mujoo, K., Blake, M.E., Arntzen, C.J., and Gutterman, J.U. (2001). Avicins: triterpenoid saponins from *Acacia victoriae* (Benth) induce apoptosis by mitochondrial perturbation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 5821-5826.

Hawkins, K., Mohamet, L., Ritson, S., Merry, C.L., and Ward, C.M. (2012). E-cadherin and, in its absence, N-cadherin promotes Nanog expression in mouse embryonic stem cells via STAT3 phosphorylation. *Stem cells* 30, 1842-1851.

Hayes, M., Curley, G., Ansari, B., and Laffey, J.G. (2012). Clinical review: Stem cell therapies for acute lung injury/acute respiratory distress syndrome - hope or hype? *Crit Care* 16, 205.

He, S., Nakada, D., and Morrison, S.J. (2009). Mechanisms of stem cell self-renewal. *Annual review of cell and developmental biology* 25, 377-406.

He, Y.C., Zhou, F.L., Shen, Y., Liao, D.F., and Cao, D. (2014). Apoptotic death of cancer stem cells for cancer therapy. *International journal of molecular sciences* 15, 8335-8351.

Hermann, P.C., Huber, S.L., Herrler, T., Aicher, A., Ellwart, J.W., Guba, M., Bruns, C.J., and Heeschen, C. (2007). Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer. *Cell stem cell* 1, 313-323.

Herr, W., and Cleary, M.A. (1995). The POU domain: versatility in transcriptional regulation by a flexible two-in-one DNA-binding domain. *Genes & development* 9, 1679-1693.

Herreros-Villanueva, M., Zhang, J.S., Koenig, A., Abel, E.V., Smyrk, T.C., Bamlet, W.R., de Narvajás, A.A., Gomez, T.S., Simeone, D.M., Bujanda, L., *et al.* (2013). SOX2 promotes dedifferentiation and imparts stem cell-like features to pancreatic cancer cells. *Oncogenesis* 2, e61.

Ho, B., Olson, G., Figel, S., Gelman, I., Cance, W.G., and Golubovskaya, V.M. (2012). Nanog increases focal adhesion kinase (FAK) promoter activity and expression and directly binds to FAK protein to be phosphorylated. *The Journal of biological chemistry* 287, 18656-18673.

Honoki, K., Fujii, H., Kubo, A., Kido, A., Mori, T., Tanaka, Y., and Tsujiuchi, T. (2010). Possible involvement of stem-like populations with elevated ALDH1 in sarcomas for chemotherapeutic drug resistance. *Oncology reports* 24, 501-505.

Hough, S.R., Clements, I., Welch, P.J., and Wiederholt, K.A. (2006). Differentiation of mouse embryonic stem cells after RNA interference-mediated silencing of OCT4 and Nanog. *Stem cells* 24, 1467-1475.

Hu, C., Li, H., Li, J., Zhu, Z., Yin, S., Hao, X., Yao, M., Zheng, S., and Gu, J. (2008). Analysis of ABCG2 expression and side population identifies intrinsic drug efflux in the HCC cell line MHCC-97L and its modulation by Akt signaling. *Carcinogenesis* 29, 2289-2297.

Iannolo, G., Conticello, C., Memeo, L., and De Maria, R. (2008). Apoptosis in normal and cancer stem cells. *Critical reviews in oncology/hematology* 66, 42-51.

Ingham, P.W., and McMahon, A.P. (2001). Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes & development* 15, 3059-3087.

Ito, K., Hirao, A., Arai, F., Takubo, K., Matsuoka, S., Miyamoto, K., Ohmura, M., Naka, K., Hosokawa, K., Ikeda, Y., *et al.* (2006). Reactive oxygen species act through p38 MAPK to limit the lifespan of hematopoietic stem cells. *Nature medicine* 12, 446-451.

Jin, F., Zhao, L., Guo, Y.J., Zhao, W.J., Zhang, H., Wang, H.T., Shao, T., Zhang, S.L., Wei, Y.J., Feng, J., *et al.* (2010). Influence of Etoposide on anti-apoptotic and multidrug resistance-associated protein genes in CD133 positive U251 glioblastoma stem-like cells. *Brain research* 1336, 103-111.

Jones-Villeneuve, E.M., McBurney, M.W., Rogers, K.A., and Kalnins, V.I. (1982). Retinoic acid induces embryonal carcinoma cells to differentiate into neurons and glial cells. *The Journal of cell biology* 94, 253-262.

Kamachi, Y., Uchikawa, M., and Kondoh, H. (2000). Pairing SOX off: with partners in the regulation of embryonic development. *Trends in genetics : TIG* 16, 182-187.

Kareta, M.S., Gorges, L.L., Hafeez, S., Benayoun, B.A., Marro, S., Zmoos, A.F., Cecchini, M.J., Spacek, D., Batista, L.F., O'Brien, M., *et al.* (2015). Inhibition of pluripotency networks by the Rb tumor suppressor restricts reprogramming and tumorigenesis. *Cell stem cell* 16, 39-50.

Kaufmann, S.H., and Earnshaw, W.C. (2000). Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. *Experimental cell research* 256, 42-49.

Kellner, S., and Kikyo, N. (2010). Transcriptional regulation of the Oct4 gene, a master gene for pluripotency. *Histology and histopathology* 25, 405-412.

Keshet, G.I., Goldstein, I., Itzhaki, O., Cesarkas, K., Shenhav, L., Yakirevitch, A., Treves, A.J., Schachter, J., Amariglio, N., and Rechavi, G. (2008). MDR1 expression identifies human melanoma stem cells. *Biochemical and biophysical research communications* 368, 930-936.

Kleinsmith, L.J., and Pierce, G.B., Jr. (1964). Multipotentiality of Single Embryonal Carcinoma Cells. *Cancer research* 24, 1544-1551.

Koo, B.S., Lee, S.H., Kim, J.M., Huang, S., Kim, S.H., Rho, Y.S., Bae, W.J., Kang, H.J., Kim, Y.S., Moon, J.H., *et al.* (2015). Oct4 is a critical regulator of stemness in head and neck squamous carcinoma cells. *Oncogene* 34, 2317-2324.

Kopan, R., and Ilagan, M.X. (2009). The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism. *Cell* 137, 216-233.

Kuff, E.L., and Fewell, J.W. (1980). Induction of neural-like cells and acetylcholinesterase activity in cultures of F9 teratocarcinoma treated with retinoic acid and dibutylryl cyclic adenosine monophosphate. *Developmental biology* 77, 103-115.

Kwan, M.L., Block, G., Selvin, S., Month, S., and Buffler, P.A. (2004). Food consumption by children and the risk of childhood acute leukemia. *American journal of epidemiology* 160, 1098-1107.

Lapidot, T., Sirard, C., Vormoor, J., Murdoch, B., Hoang, T., Caceres-Cortes, J., Minden, M., Paterson, B., Caligiuri, M.A., and Dick, J.E. (1994). A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature* 367, 645-648.

Li, C., Heidt, D.G., Dalerba, P., Burant, C.F., Zhang, L., Adsay, V., Wicha, M., Clarke, M.F., and Simeone, D.M. (2007). Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer research* 67, 1030-1037.

Liao, W.T., Ye, Y.P., Deng, Y.J., Bian, X.W., and Ding, Y.Q. (2014). Metastatic cancer stem cells: from the concept to therapeutics. *American journal of stem cells* 3, 46-62.

Lin, T., Chao, C., Saito, S., Mazur, S.J., Murphy, M.E., Appella, E., and Xu, Y. (2005). p53 induces differentiation of mouse embryonic stem cells by suppressing Nanog expression. *Nature cell biology* 7, 165-171.

Lin, Y., Yang, Y., Li, W., Chen, Q., Li, J., Pan, X., Zhou, L., Liu, C., Chen, C., He, J., *et al.* (2012). Reciprocal regulation of Akt and Oct4 promotes the self-renewal and survival of embryonal carcinoma cells. *Molecular cell* 48, 627-640.

Liu, S., Dontu, G., Mantle, I.D., Patel, S., Ahn, N.S., Jackson, K.W., Suri, P., and Wicha, M.S. (2006). Hedgehog signaling and Bmi-1 regulate self-renewal of normal and malignant human mammary stem cells. *Cancer research* 66, 6063-6071.

Loeb, L.A., and Harris, C.C. (2008). Advances in chemical carcinogenesis: a historical review and prospective. *Cancer research* 68, 6863-6872.

Lowe, S.W., Schmitt, E.M., Smith, S.W., Osborne, B.A., and Jacks, T. (1993). p53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes. *Nature* 362, 847-849.

Lu, Y., Zhu, H., Shan, H., Lu, J., Chang, X., Li, X., Lu, J., Fan, X., Zhu, S., Wang, Y., *et al.* (2013). Knockdown of Oct4 and Nanog expression inhibits the stemness of pancreatic cancer cells. *Cancer letters* 340, 113-123.

Ma, J., Lin, J.Y., Alloo, A., Wilson, B.J., Schatton, T., Zhan, Q., Murphy, G.F., Waaga-Gasser, A.M., Gasser, M., Stephen Hodi, F., *et al.* (2010). Isolation of tumorigenic circulating melanoma cells. *Biochemical and biophysical research communications* 402, 711-717.

Magnoni, C., Giudice, S., Pellacani, G., Bertazzoni, G., Longo, C., Veratti, E., Morini, D., Benassi, L., Vaschieri, C., Azzoni, P., *et al.* (2014). Stem cell properties in cell cultures from different stage of melanoma progression. *Applied immunohistochemistry & molecular morphology : AIMM / official publication of the Society for Applied Immunohistochemistry* 22, 171-181.

Malanchi, I., Peinado, H., Kassen, D., Hussenet, T., Metzger, D., Chambon, P., Huber, M., Hohl, D., Cano, A., Birchmeier, W., *et al.* (2008). Cutaneous cancer stem cell maintenance is dependent on beta-catenin signalling. *Nature* 452, 650-653.

Mani, S.A., Guo, W., Liao, M.J., Eaton, E.N., Ayyanan, A., Zhou, A.Y., Brooks, M., Reinhard, F., Zhang, C.C., Shipitsin, M., *et al.* (2008). The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* *133*, 704-715.

Martello, G., Sugimoto, T., Diamanti, E., Joshi, A., Hannah, R., Ohtsuka, S., Gottgens, B., Niwa, H., and Smith, A. (2012). Esrrb is a pivotal target of the Gsk3/Tcf3 axis regulating embryonic stem cell self-renewal. *Cell stem cell* *11*, 491-504.

Massard, C., Deutsch, E., and Soria, J.C. (2006). Tumour stem cell-targeted treatment: elimination or differentiation. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* *17*, 1620-1624.

Maugeri-Sacca, M., Zeuner, A., and De Maria, R. (2011). Therapeutic targeting of cancer stem cells. *Frontiers in oncology* *1*, 10.

McMillan, R., and Matsui, W. (2012). Molecular pathways: the hedgehog signaling pathway in cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* *18*, 4883-4888.

Mihara, M., Erster, S., Zaika, A., Petrenko, O., Chittenden, T., Pancoska, P., and Moll, U.M. (2003). p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. *Molecular cell* *11*, 577-590.

Mitsui, K., Tokuzawa, Y., Itoh, H., Segawa, K., Murakami, M., Takahashi, K., Maruyama, M., Maeda, M., and Yamanaka, S. (2003). The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell* *113*, 631-642.

Mizutani, H. (2007). [Mechanism of DNA damage and apoptosis induced by anticancer drugs through generation of reactive oxygen species]. *Yakugaku zasshi : Journal of the Pharmaceutical Society of Japan* *127*, 1837-1842.

Monzani, E., Facchetti, F., Galmozzi, E., Corsini, E., Benetti, A., Cavazzin, C., Gritti, A., Piccinini, A., Porro, D., Santinami, M., *et al.* (2007). Melanoma contains CD133 and ABCG2 positive cells with enhanced tumorigenic potential. *European journal of cancer* *43*, 935-946.

Moon, R.T., Kohn, A.D., De Ferrari, G.V., and Kaykas, A. (2004). WNT and beta-catenin signalling: diseases and therapies. *Nature reviews Genetics* *5*, 691-701.

Moreb, J.S. (2008). Aldehyde dehydrogenase as a marker for stem cells. *Current stem cell research & therapy* *3*, 237-246.

Morrison, S.J., and Spradling, A.C. (2008). Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life. *Cell* *132*, 598-611.

Morrison, W.H. (1972). Charles Marion Swab, MD. *Transactions of the American Ophthalmological Society* *70*, 10-11.

Mujoo, K., Haridas, V., Hoffmann, J.J., Wachter, G.A., Hutter, L.K., Lu, Y., Blake, M.E., Jayatilake, G.S., Bailey, D., Mills, G.B., *et al.* (2001). Triterpenoid saponins from *Acacia victoriae* (Benth) decrease tumor cell proliferation and induce apoptosis. *Cancer research* 61, 5486-5490.

Murakami, S., Ninomiya, W., Sakamoto, E., Shibata, T., Akiyama, H., and Tashiro, F. (2015). SRY and OCT4 Are Required for the Acquisition of Cancer Stem Cell-Like Properties and Are Potential Differentiation Therapy Targets. *Stem cells* 33, 2652-2663.

Nichols, J., Zevnik, B., Anastassiadis, K., Niwa, H., Klewe-Nebenius, D., Chambers, I., Scholer, H., and Smith, A. (1998). Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell* 95, 379-391.

Nowell, P.C. (1976). The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 194, 23-28.

O'Brien, C.A., Pollett, A., Gallinger, S., and Dick, J.E. (2007). A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature* 445, 106-110.

Ohno, R., Asou, N., and Ohnishi, K. (2003). Treatment of acute promyelocytic leukemia: strategy toward further increase of cure rate. *Leukemia* 17, 1454-1463.

Ozen, M., Karatas, O.F., Gulluoglu, S., Bayrak, O.F., Sevli, S., Guzel, E., Ekici, I.D., Caskurlu, T., Solak, M., Creighton, C.J., *et al.* (2015). Overexpression of miR-145-5p inhibits proliferation of prostate cancer cells and reduces SOX2 expression. *Cancer investigation* 33, 251-258.

Pan, G.J., Chang, Z.Y., Scholer, H.R., and Pei, D. (2002). Stem cell pluripotency and transcription factor Oct4. *Cell research* 12, 321-329.

Papoutsaki, M., Moretti, F., Lanza, M., Marinari, B., Sartorelli, V., Guerrini, L., Chimenti, S., Levvero, M., and Costanzo, A. (2005). A p38-dependent pathway regulates DeltaNp63 DNA binding to p53-dependent promoters in UV-induced apoptosis of keratinocytes. *Oncogene* 24, 6970-6975.

Park, M.T., Choi, J.A., Kim, M.J., Um, H.D., Bae, S., Kang, C.M., Cho, C.K., Kang, S., Chung, H.Y., Lee, Y.S., *et al.* (2003). Suppression of extracellular signal-related kinase and activation of p38 MAPK are two critical events leading to caspase-8- and mitochondria-mediated cell death in phytosphingosine-treated human cancer cells. *The Journal of biological chemistry* 278, 50624-50634.

Pecqueur, C., Oliver, L., Oizel, K., Lalier, L., and Vallette, F.M. (2013). Targeting metabolism to induce cell death in cancer cells and cancer stem cells. *International journal of cell biology* 2013, 805975.

Pesce, M., and Scholer, H.R. (2000). Oct-4: control of totipotency and germline determination. *Molecular reproduction and development* 55, 452-457.

Pevny, L., and Placzek, M. (2005). SOX genes and neural progenitor identity. *Current opinion in neurobiology* 15, 7-13.

Pietras, A. (2011). Cancer stem cells in tumor heterogeneity. *Advances in cancer research* 112, 255-281.

Piggott, L., Omidvar, N., Marti Perez, S., French, R., Eberl, M., and Clarkson, R.W. (2011). Suppression of apoptosis inhibitor c-FLIP selectively eliminates breast cancer stem cell activity in response to the anti-cancer agent, TRAIL. *Breast cancer research : BCR* 13, R88.

Po, A., Ferretti, E., Miele, E., De Smaele, E., Paganelli, A., Canettieri, G., Coni, S., Di Marcotullio, L., Biffoni, M., Massimi, L., *et al.* (2010). Hedgehog controls neural stem cells through p53-independent regulation of Nanog. *The EMBO journal* 29, 2646-2658.

Porras, A., Zuluaga, S., Black, E., Valladares, A., Alvarez, A.M., Ambrosino, C., Benito, M., and Nebreda, A.R. (2004). P38 alpha mitogen-activated protein kinase sensitizes cells to apoptosis induced by different stimuli. *Molecular biology of the cell* 15, 922-933.

Prince, M.E., Sivanandan, R., Kaczorowski, A., Wolf, G.T., Kaplan, M.J., Dalerba, P., Weissman, I.L., Clarke, M.F., and Ailles, L.E. (2007). Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 973-978.

Purow, B.W., Haque, R.M., Noel, M.W., Su, Q., Burdick, M.J., Lee, J., Sundaresan, T., Pastorino, S., Park, J.K., Mikolaenko, I., *et al.* (2005). Expression of Notch-1 and its ligands, Delta-like-1 and Jagged-1, is critical for glioma cell survival and proliferation. *Cancer research* 65, 2353-2363.

Qi, W., Chen, J., Cheng, X., Huang, J., Xiang, T., Li, Q., Long, H., and Zhu, B. (2015). Targeting the Wnt-regulatory protein CTNNBIP1 by microRNA-214 enhances the stemness and self-renewal of cancer stem-like cells in lung adenocarcinomas. *Stem cells*.

Qiu, D., Ye, S., Ruiz, B., Zhou, X., Liu, D., Zhang, Q., and Ying, Q.L. (2015). Klf2 and Tfcp2l1, Two Wnt/beta-Catenin Targets, Act Synergistically to Induce and Maintain Naive Pluripotency. *Stem cell reports* 5, 314-322.

Rappa, G., Fodstad, O., and Lorico, A. (2008). The stem cell-associated antigen CD133 (Prominin-1) is a molecular therapeutic target for metastatic melanoma. *Stem cells* 26, 3008-3017.

Robinton, D.A., and Daley, G.Q. (2012). The promise of induced pluripotent stem cells in research and therapy. *Nature* 481, 295-305.

Roos, W.P., and Kaina, B. (2006). DNA damage-induced cell death by apoptosis. *Trends in molecular medicine* 12, 440-450.

Ruiz i Altaba, A., Mas, C., and Stecca, B. (2007). The Gli code: an information nexus regulating cell fate, stemness and cancer. *Trends in cell biology* 17, 438-447.

Ruiz i Altaba, A., Palma, V., and Dahmane, N. (2002). Hedgehog-Gli signalling and the growth of the brain. *Nature reviews Neuroscience* 3, 24-33.

Rybak, A.P., and Tang, D. (2013). SOX2 plays a critical role in EGFR-mediated self-renewal of human prostate cancer stem-like cells. *Cellular signalling* 25, 2734-2742.

Sarkar, A., and Hochedlinger, K. (2013). The sox family of transcription factors: versatile regulators of stem and progenitor cell fate. *Cell stem cell* 12, 15-30.

Sato, A., Okada, M., Shibuya, K., Watanabe, E., Seino, S., Narita, Y., Shibui, S., Kayama, T., and Kitanaka, C. (2014). Pivotal role for ROS activation of p38 MAPK in the control of differentiation and tumor-initiating capacity of glioma-initiating cells. *Stem cell research* 12, 119-131.

Schatton, T., Murphy, G.F., Frank, N.Y., Yamaura, K., Waaga-Gasser, A.M., Gasser, M., Zhan, Q., Jordan, S., Duncan, L.M., Weishaupt, C., *et al.* (2008). Identification of cells initiating human melanomas. *Nature* 451, 345-349.

Scholer, H.R., Hatzopoulos, A.K., Balling, R., Suzuki, N., and Gruss, P. (1989). A family of octamer-specific proteins present during mouse embryogenesis: evidence for germline-specific expression of an Oct factor. *The EMBO journal* 8, 2543-2550.

Sharif Tanveer, E.F.a.F.G. (2011). Towards New Anticancer Strategies by Targeting Cancer Stem Cells with Phytochemical Compounds. In *Cancer Stem Cells - The Cutting Edge*, P.S. Shostak, ed. (ISBN: 978-953-307-580-8, InTech).

Simoes, M.C., Sousa, J.J., and Pais, A.A. (2015). Skin cancer and new treatment perspectives: a review. *Cancer letters* 357, 8-42.

Singh, R., Chen, C., Phelps, R.G., and Elston, D.M. (2014). Stem cells in the skin and their role in oncogenesis. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV* 28, 542-549.

Singh, S.K., Clarke, I.D., Terasaki, M., Bonn, V.E., Hawkins, C., Squire, J., and Dirks, P.B. (2003). Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer research* 63, 5821-5828.

Slack, J.M. (2008). Origin of stem cells in organogenesis. *Science* 322, 1498-1501.

Smina, T.P., Mohan, A., Ayyappa, K.A., Sethuraman, S., and Krishnan, U.M. (2015). Hesperetin exerts apoptotic effect on A431 skin carcinoma cells by regulating mitogen activated protein kinases and cyclins. *Cellular and molecular biology* 61, 92-99.

Stolzenburg, S., Rots, M.G., Beltran, A.S., Rivenbark, A.G., Yuan, X., Qian, H., Strahl, B.D., and Blancafort, P. (2012). Targeted silencing of the oncogenic transcription factor SOX2 in breast cancer. *Nucleic acids research* 40, 6725-6740.

Surh, Y.J. (2003). Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nature reviews Cancer* 3, 768-780.

Szotek, P.P., Pieretti-Vanmarcke, R., Masiakos, P.T., Dinulescu, D.M., Connolly, D., Foster, R., Dombkowski, D., Preffer, F., Maclaughlin, D.T., and Donahoe, P.K. (2006). Ovarian cancer side population defines cells with stem cell-like characteristics and Mullerian Inhibiting Substance responsiveness. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 11154-11159.

Tai, M.H., Chang, C.C., Kiupel, M., Webster, J.D., Olson, L.K., and Trosko, J.E. (2005). Oct4 expression in adult human stem cells: evidence in support of the stem cell theory of carcinogenesis. *Carcinogenesis* 26, 495-502.

Tajbakhsh, S., Rocheteau, P., and Le Roux, I. (2009). Asymmetric cell divisions and asymmetric cell fates. *Annual review of cell and developmental biology* 25, 671-699.

Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126, 663-676.

Tan, Y., Yu, R., and Pezzuto, J.M. (2003). Betulinic acid-induced programmed cell death in human melanoma cells involves mitogen-activated protein kinase activation. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 9, 2866-2875.

Tang, X.H., and Gudas, L.J. (2011). Retinoids, retinoic acid receptors, and cancer. *Annual review of pathology* 6, 345-364.

Trachootham, D., Alexandre, J., and Huang, P. (2009). Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? *Nature reviews Drug discovery* 8, 579-591.

Valent, P., Bonnet, D., De Maria, R., Lapidot, T., Copland, M., Melo, J.V., Chomienne, C., Ishikawa, F., Schuringa, J.J., Stassi, G., *et al.* (2012). Cancer stem cell definitions and terminology: the devil is in the details. *Nature reviews Cancer* 12, 767-775.

van de Wetering, M., Sancho, E., Verweij, C., de Lau, W., Oving, I., Hurlstone, A., van der Horn, K., Battle, E., Coudreuse, D., Haramis, A.P., *et al.* (2002). The beta-catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells. *Cell* 111, 241-250.

Venugopal, A., Subramaniam, D., Balmaceda, J., Roy, B., Dixon, D.A., Umar, S., Weir, S.J., and Anant, S. (2015). RNA binding protein RBM3 increases beta-catenin signaling to increase stem cell characteristics in colorectal cancer cells. *Molecular carcinogenesis*.

Virchow, R. (1858). Cellular pathology. As based upon physiological and pathological histology. Lecture XVI--Atheromatous affection of arteries. 1858. *Nutrition reviews* 47, 23-25.

Visvader, J.E. (2011). Cells of origin in cancer. *Nature* 469, 314-322.

Visvader, J.E., and Lindeman, G.J. (2012). Cancer stem cells: current status and evolving complexities. *Cell stem cell* 10, 717-728.

Wang, J., Wang, C., Meng, Q., Li, S., Sun, X., Bo, Y., and Yao, W. (2012). siRNA targeting Notch-1 decreases glioma stem cell proliferation and tumor growth. *Molecular biology reports* 39, 2497-2503.

Wang, X., and Dai, J. (2010). Concise review: isoforms of OCT4 contribute to the confusing diversity in stem cell biology. *Stem cells* 28, 885-893.

Wang, Z., Ahmad, A., Li, Y., Azmi, A.S., Miele, L., and Sarkar, F.H. (2011). Targeting notch to eradicate pancreatic cancer stem cells for cancer therapy. *Anticancer research* 31, 1105-1113.

Wei, F., Scholer, H.R., and Atchison, M.L. (2007). Sumoylation of Oct4 enhances its stability, DNA binding, and transactivation. *The Journal of biological chemistry* 282, 21551-21560.

Wernig, M., Meissner, A., Foreman, R., Brambrink, T., Ku, M., Hochedlinger, K., Bernstein, B.E., and Jaenisch, R. (2007). In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature* 448, 318-324.

Woodward, W.A., Chen, M.S., Behbod, F., Alfaro, M.P., Buchholz, T.A., and Rosen, J.M. (2007). WNT/beta-catenin mediates radiation resistance of mouse mammary progenitor cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 618-623.

Wouters, J., Stas, M., Gremeaux, L., Govaere, O., Van den Broeck, A., Maes, H., Agostinis, P., Roskams, T., van den Oord, J.J., and Vankelecom, H. (2013). The human melanoma side population displays molecular and functional characteristics of enriched chemoresistance and tumorigenesis. *PloS one* 8, e76550.

Wu, S., Wang, X., Chen, J., and Chen, Y. (2013). Autophagy of cancer stem cells is involved with chemoresistance of colon cancer cells. *Biochemical and biophysical research communications* 434, 898-903.

Xia, X., Yang, J., Li, F., Li, Y., Zhou, X., Dai, Y., and Wong, S.T. (2010). Image-based chemical screening identifies drug efflux inhibitors in lung cancer cells. *Cancer research* 70, 7723-7733.

Xu, H., Wang, W., Li, C., Yu, H., Yang, A., Wang, B., and Jin, Y. (2009a). WWP2 promotes degradation of transcription factor OCT4 in human embryonic stem cells. *Cell research* 19, 561-573.

Xu, N., Papagiannakopoulos, T., Pan, G., Thomson, J.A., and Kosik, K.S. (2009b). MicroRNA-145 regulates OCT4, SOX2, and KLF4 and represses pluripotency in human embryonic stem cells. *Cell* 137, 647-658.

Xu, W.P., Zhang, X., and Xie, W.F. (2014). Differentiation therapy for solid tumors. *Journal of digestive diseases* 15, 159-165.

Yang, L., Ping, Y.F., Yu, X., Qian, F., Guo, Z.J., Qian, C., Cui, Y.H., and Bian, X.W. (2011). Gastric cancer stem-like cells possess higher capability of invasion and metastasis in association with a mesenchymal transition phenotype. *Cancer letters* 310, 46-52.

Yang, Z.F., Ho, D.W., Ng, M.N., Lau, C.K., Yu, W.C., Ngai, P., Chu, P.W., Lam, C.T., Poon, R.T., and Fan, S.T. (2008). Significance of CD90+ cancer stem cells in human liver cancer. *Cancer cell* 13, 153-166.

Yilmaz, M., and Christofori, G. (2009). EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion. *Cancer metastasis reviews* 28, 15-33.

Yin, X., Zhang, B.H., Zheng, S.S., Gao, D.M., Qiu, S.J., Wu, W.Z., and Ren, Z.G. (2015). Coexpression of gene Oct4 and Nanog initiates stem cell characteristics in hepatocellular carcinoma and promotes epithelial-mesenchymal transition through activation of Stat3/Snail signaling. *Journal of hematology & oncology* 8, 23.

Ying, M., Wang, S., Sang, Y., Sun, P., Lal, B., Goodwin, C.R., Guerrero-Cazares, H., Quinones-Hinojosa, A., Lathera, J., and Xia, S. (2011). Regulation of glioblastoma stem cells by retinoic acid: role for Notch pathway inhibition. *Oncogene* 30, 3454-3467.

Yuan, X., Wu, H., Han, N., Xu, H., Chu, Q., Yu, S., Chen, Y., and Wu, K. (2014). Notch signaling and EMT in non-small cell lung cancer: biological significance and therapeutic application. *Journal of hematology & oncology* 7, 87.

Zagouras, P., Stifani, S., Blaumueller, C.M., Carcangiu, M.L., and Artavanis-Tsakonas, S. (1995). Alterations in Notch signaling in neoplastic lesions of the human cervix. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 6414-6418.

- Zbinden, M., Duquet, A., Lorente-Trigos, A., Ngwabyt, S.N., Borges, I., and Ruiz i Altaba, A. (2010). NANOG regulates glioma stem cells and is essential in vivo acting in a cross-functional network with GLI1 and p53. *The EMBO journal* 29, 2659-2674.
- Zhang, S., and Cui, W. (2014). Sox2, a key factor in the regulation of pluripotency and neural differentiation. *World journal of stem cells* 6, 305-311.
- Zhao, C., Chen, A., Jamieson, C.H., Fereshteh, M., Abrahamsson, A., Blum, J., Kwon, H.Y., Kim, J., Chute, J.P., Rizzieri, D., *et al.* (2009). Hedgehog signalling is essential for maintenance of cancer stem cells in myeloid leukaemia. *Nature* 458, 776-779.
- Zhu, P., Wang, Y., Du, Y., He, L., Huang, G., Zhang, G., Yan, X., and Fan, Z. (2015). C8orf4 negatively regulates self-renewal of liver cancer stem cells via suppression of NOTCH2 signalling. *Nature communications* 6, 7122.
- Zobalova, R., McDermott, L., Stantic, M., Prokopova, K., Dong, L.F., and Neuzil, J. (2008a). CD133-positive cells are resistant to TRAIL due to up-regulation of FLIP. *Biochemical and biophysical research communications* 373, 567-571.
- Zobalova, R., Stantic, M., Prokopova, K., Dong, L.F., and Neuzil, J. (2008b). Cancer cells with high expression of CD133 exert FLIP upregulation and resistance to TRAIL-induced apoptosis. *BioFactors* 34, 231-235.
- Zulkipli, I.N., David, S.R., Rajabalaya, R., and Idris, A. (2015). Medicinal Plants: A Potential Source of Compounds for Targeting Cell Division. *Drug target insights* 9, 9-19.

Articles annexes



Contents lists available at ScienceDirect

Biochemical Pharmacology

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



Selective anticancer effects of a synthetic flavagline on human Oct4-expressing cancer stem-like cells via a p38 MAPK-dependent caspase-3-dependent pathway

Fathi Emhemmed^{a,1}, Sarah Ali Azouaou^{a,1}, Frédéric Thuaud^b, Valérie Schini-Kerth^a, Laurent Désaubry^b, Christian D. Muller^b, Guy Fuhrmann^{a,*}

^a UMR 7213 CNRS, Laboratoire de Biophotonique et Pharmacologie, Université de Strasbourg, Faculté de Pharmacie, 74 route du Rhin, 67401 Illkirch, France

^b UMR 7200 CNRS, Laboratoire d'Innovation Thérapeutique, Université de Strasbourg, Faculté de Pharmacie, 74 route du Rhin, 67401 Illkirch, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 December 2013

Accepted 19 February 2014

Available online xxx

Keywords:

Cancer stem cells

Teratocarcinoma

Flavagline

Apoptosis

Oct4

ABSTRACT

Cancer stem cells (CSCs) are considered as the initiators of the carcinogenic process and are therefore emerging targets for innovative anticancer therapies. In order to evaluate the anticancer chemopreventive activity of flavagline derivatives, we used the pluripotent teratocarcinoma cell as a model of Oct4-expressing cancer stem-like cell and determined the underlying cellular and molecular mechanisms induced by a synthetic flavagline. We precisely investigated the effects of the flavagline derivative FL3 on the human embryonal carcinoma (EC) cell line NT2/D1 and compared the responses to those of a normal more restrictive pluripotent stem cell line (i.e. BJ fibroblast cell line). FL3 selectively inhibited the proliferation of NT2/D1 cells by inducing G₁ phase cell cycle arrest in a dose-dependent manner. Moreover, FL3 treatment specifically triggered apoptosis in association with an induction of the phosphorylation of p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) and caspase-3 activation followed by a drastic downregulation of the master regulator of stemness Oct4. Forced inhibition of p38 MAPK activity by the specific pharmacological inhibitor SB203580 or by p38 MAPK gene knockdown using small-interfering RNA (siRNA) counteracted the effects of FL3, demonstrating that its chemopreventive action is related to growth inhibition and a p38-dependent caspase-3-dependent induction of apoptosis in Oct4-expressing CSCs. This study also shows that FL3 selectively kills poorly differentiated and highly aggressive carcinomal cells, but has little effect on normal stem-like cells. Thus FL3 offers great promise for cancer treatment since it is able to target the carcinogenic process without affecting normal cells.

© 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Cancer stem cells (CSCs) are considered to be responsible for tumor initiation and development, metastatic spreading, and resistance to radio- and chemo-therapies [1]. A large body of observations supports the 100 year old hypothesis which predicted a clonal genetic background of the heterogeneous cell population found in a tumor outgrowth [2]. Growing evidence suggests now that CSCs arise from embryonic, fetal or adult stem cells (SCs) exposed to repetitive mutation-inducing stress injuries [3]. CSCs could also arise, after additional oncogenic hits, from closely

related dedifferentiated descendants which possess de facto higher lineage-specific competencies [4,5]. Such a hierarchical and dynamical relationship between these two cell type populations thus indicates that future anticancer treatments should not only target cancer cells, but also CSCs.

The chemotherapeutic properties of various pharmacological agents on different cancer cell types have been extensively studied over the past few decades [6,7]. By modulating specific signaling pathways, the anticancer compounds target different cell processes, including those leading to apoptotic or nonapoptotic cell death. However their effects on CSCs have only recently been accessible to experimentation with the development of new cell models. Accordingly, it is now accepted that serial xenotransplantation and tissue cultivation allows to recapture the malignant phenotype and to isolate CSCs from any tumor tissue [8]. In this point of view, we and others have suggested that the malignant counterparts of the embryonic stem cell lines, namely the embryonal

* Corresponding author.

E-mail address: guy.fuhrmann@unistra.fr (G. Fuhrmann).

¹ Present address: UMR 7200 CNRS, Laboratoire d'Innovation Thérapeutique, Université de Strasbourg, Faculté de Pharmacie, 74 route du Rhin, 67401 Illkirch, France.

Bad phosphorylation is required for the protection of normal stem-like cells against the cytotoxic effects of the synthetic flavagline FL3

Fathi Emhemmed¹, Sarah Ali Azouaou¹, Valérie Schini-Kerth², Laurent Désaubry¹,
Christian D. Muller¹ and Guy Fuhrmann^{2*}

¹ UMR 7200 CNRS, Laboratoire d'Innovation Thérapeutique, Université de Strasbourg, Faculté de Pharmacie, 74 route du Rhin, 67401 Illkirch, France

² UMR 7213 CNRS, Laboratoire de Biophotonique et Pharmacologie, Université de Strasbourg, Faculté de Pharmacie, 74 route du Rhin, 67401 Illkirch, France

* Corresponding author: Guy Fuhrmann, PhD
UMR 7213 CNRS
Laboratoire de Biophotonique et Pharmacologie
Faculté de Pharmacie
74 route du Rhin, B.P. 60024, 67401 Illkirch
France
Tel: (33) 3 68 85 42 17
Fax: (33) 3 68 85 43 13
E-mail: guy.fuhrmann@unistra.fr

ABSTRACT

The molecular pathways by which flavagline derivatives exert their anticancer activity against various cancer cell lines are well documented, while the mechanisms that prevent their cytotoxic effects on normal cells remain to be clarified. We previously showed that the synthetic flavagline FL3 selectively induces apoptosis in Oct4-expressing cancer stem-like cell (*e.g.* NT2/D1 cell) through a p38MAPK/Caspase3- dependent pathway, without having any effect on the normal more restrictive pluripotent stem-like cell (*e.g.* BJ fibroblast). Here we provide the underlying mechanism by which normal cells remain unaffected after exposure to FL3. We first show that FL3 fails to trigger apoptosis in fibroblasts. Accordingly, FL3 is unable to induce depolarization of their mitochondrial membrane and the release of cytochrome C in the cytoplasm. Most importantly, FL3 selectively phosphorylates Akt at Ser473 and Bcl-2-associated death promoter protein (Bad) at Ser112 and Ser136 in normal stem-like cells but not in cancer stem-like cells. The fact that the active form of Akt promotes cell survival and that the phosphorylated form of Bad serves as antiapoptotic protein, could explain the resistance of fibroblasts to FL3. Indeed, forced inhibition of the phosphorylation of the upstream regulator Akt by the specific inhibitor LY-294002 or gene knockdown of Bad by siRNA sensitize normal stem-like cells to FL3, by undergoing a caspase-3 dependent proapoptotic process, as measured by annexin V-FITC and western blot assays. These findings, therefore, provide new insights into the signaling pathway that could underly the resistance of normal stem-like cells against the potent anticancer agent FL3.

Key words: normal stem-like cell; cytotoxicity; resistance; flavagline; Bad protein

Pro-differentiating effects of a synthetic flavagline on human Oct4-expressing cancer stem-like cells

Fathi Emhemmed², Sarah Ali Azouaou², Valérie Schini-Kerth¹, Christian D. Muller²,
Laurent Désaubry² and Guy Fuhrmann^{1*}

¹ UMR 7213 CNRS, Laboratoire de Biophotonique et Pharmacologie, Université de Strasbourg, Faculté de Pharmacie, 74 route du Rhin, 67401 Illkirch, France

² UMR 7200 CNRS, Laboratoire d'Innovation Thérapeutique, Université de Strasbourg, Faculté de Pharmacie, 74 route du Rhin, 67401 Illkirch, France

* Corresponding author: Guy Fuhrmann, PhD

UMR 7213 CNRS

Laboratoire de Biophotonique et Pharmacologie

Faculté de Pharmacie

74 route du Rhin, B.P. 60024, 67401 Illkirch

France

Tel: (33) 3 68 85 42 17

Fax: (33) 3 68 85 43 13

E-mail: guy.fuhrmann@unistra.fr

Abstract

As initiators of the carcinogenic process, cancer stem cells (CSCs) are considered as emerging targets for innovative anticancer therapies. However these cells are hidden in the cancer bulk and remain insensitive to chemotherapy which precisely targets only their proliferative capacities. Alternatively, growing evidences have pointed out that a differentiation therapy could adversely affect these cells which consequently should lose their self-renewal properties and become less aggressive.

In order to evaluate the differentiation potential of flavaglines, we used the poorly differentiated pluripotent teratocarcinoma cell as a model of Oct4-expressing cancer stem-like cell and determined the molecular mechanisms induced by the synthetic compound FL3. The drug, administered at sub-lethal doses and for long period, was able to significantly downregulate the expression levels of the stemness factor Oct4 at both the transcriptional and translational level, concomitantly with a decrease of clonogenicity. The appearance of specific neural markers further demonstrates the differentiation properties of FL3. Interestingly, the drug treatment first induced the appearance of caspase-3 cleaved fragments followed by significant increase of the expression levels of the germ cell nuclear factor; this suggests that the extinction of Oct4 expression necessary for the induction of differentiation involves overlapping mechanisms of protein degradation and gene repression. Finally this study shows that FL3, like all-trans retinoic acid (ATRA), is acting as a novel differentiation inducer of CSCs. Thus FL3 could offer an alternative possibility for cancer treatment since it is able to target the carcinogenic process by inducing differentiation in ATRA-resistant cancers.

Keywords: cancer stem cells; teratocarcinoma; flavagline; differentiation; Oct4

Évaluation des effets anticancéreux de composés pharmacologiques sur les cellules souches cancéreuses et leurs descendants; caractérisation des mécanismes moléculaires mis en jeu

Résumé en français:

Les cellules souches cancéreuses (CSCs) représentent une petite sous-population de cellules dans la tumeur qui sont capables de s'autorenouveler. Ce sont des cellules impliquées dans l'initiation et la croissance métastatique des tumeurs, ainsi que dans la résistance aux traitements conventionnels. Ces CSCs expriment les facteurs de pluripotence Oct4, Nanog et Sox2, lorsqu'elles sont fortement indifférenciées. Mon travail de thèse a consisté à analyser les effets anticancéreux de produits phytochimiques sur des CSCs. Nous avons ainsi étudié l'activité anti-carcinogénique sélective du roopérol sur un modèle de CSC tératocarcinomale. Le roopérol entraîne un processus pro-apoptotique et induit l'activation de la p53 et de la caspase 3, via la formation intracellulaire d'espèces réactives d'oxygène (ERO), ce qui conduit à une chute de l'expression d'Oct4 et Nanog. Un tel effet n'est pas observé dans les cellules souches normales (CSNs). Nous avons donc étudié le mécanisme impliqué dans la résistance des CSNs au traitement par le roopérol. Ce dernier n'y provoque aucune formation de ERO, mais active sélectivement les protéines de pro-survie Akt et Bad. Dans une 2^{ème} étude, nous avons examiné le potentiel anticancéreux sélectif de plusieurs dérivés triterpéniques de type avicine, issus de différentes espèces d'*Albizzia* africaines, sur un modèle de carcinome épidermoïde. Après criblage, nous avons choisi d'étudier plus en profondeur les mécanismes moléculaires mis en jeu par le composé qui présentait la plus grande activité pro-apoptotique. Cette analyse a été effectuée dans un modèle de mélanome métastatique agressif connu pour exprimer Oct4. Nous démontrons que l'agent pharmacologique entraîne une apoptose sélective des cellules de mélanome, via une activation de la p38 MAPK et de la caspase 3, suivie d'une diminution de l'expression d'Oct4. Un tel effet apoptotique n'a pas été observé dans les cellules normales. Ces résultats permettent ainsi de mettre en évidence de nouveaux et puissants composés anticancéreux, capables d'induire sélectivement et *in vitro* l'apoptose des CSCs et leurs descendants, tout en épargnant les CSNs et leurs descendants.

Mots-clés: Cellule souche cancéreuse, apoptose, oct4, roopérol, dérivés triterpéniques de type avicine

Résumé en anglais:

Cancer stem cells (CSCs) are a small subpopulation of cells in the tumor which are able to self-renew. These cells are involved in the initiation and the metastatic growth of tumors, as well as in the resistance to conventional treatments. In their highly undifferentiated state, CSCs are known to express the stemness factors Oct4 and Nanog. The aim of this work was therefore to analyze the effects of phytochemicals on Oct-4 expressing teratocarcinomal stem-like cells. In a first study, we investigated the selective anti-carcinogenic activity of rooperol, the aglycone of the plant-derived compound hypoxoside. We observed that the rooperol-induced apoptosis in CSCs was associated with an oxidative stress, dependent of the activation of p53 and cleaved caspase 3 expression. These modifications were accompanied by reduced expression of the stemness factors. Such effect was however not observed in normal stem cells (NSCs). We investigated therefore the mechanism involved in the resistance of NSCs to the drug. In contrast to CSCs, rooperol does not cause ROS (reactive oxygen species) formation in NSCs and selectively activates the pro-survival proteins Akt and Bad. In a second study, we examined the selective anti-cancer potential of several acacic acid-type saponins, from different species of African *Albizzia*, on epidermoid carcinoma cells; in a next step, we investigated the molecular targets of the anti-cancer compound which showed the greatest proapoptotic activity. The study was performed on a model of aggressive metastatic melanoma cell known to express Oct4. We observed that the pharmacological agent had a selective pro-apoptotic effect, via the activation of p38 MAPK and caspase 3, followed by a decrease on the expression of Oct4. Such effect could not be detected in normal cells. These results highlight new and powerful anticancer compounds able to induce selectively apoptosis of CSCs and their descendants, while sparing NSCs and their descendants.

Key words: cancer stem cells, apoptosis, Oct4, rooperol, acacic acid-type saponins