HAL
open science

Etude de la modulation de voies de mort cellulaire programmée par des molécules marines

Thi-Ngoc-Dung Nguyen

To cite this version:

Thi-Ngoc-Dung Nguyen. Etude de la modulation de voies de mort cellulaire programmée par des molécules marines. Biologie cellulaire. Sorbonne Université, 2019. Français. NNT : 2019SORUS280 . tel-03139870

HAL Id: tel-03139870

https://theses.hal.science/tel-03139870v1

Submitted on 12 Feb 2021

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.

Sorbonne Université

ED515 : Complexité du vivant

UMR 8227 CNRS - Sorbonne Université

THESE

POUR L'OBTENTION DU GRADE DE

DOCTEUR DE SORBONNE UNIVERSITE

Mention : Biologie, Santé

Présentée par

Thi-Ngoc-Dung NGUYEN

Sujet de la thèse

Etude de la modulation de voies de mort cellulaire programmée par des molécules marines

Dirigée par Stéphane BACH et co-dirigée par Sandrine RUCHAUD

Présentée et soutenue publiquement le 9/10/2019

Devant un jury composé de :

DIMANCHE-BOITREL Marie-Thérèse / Directrice de recherche INSERM, HDR	Rapportrice
HELLIO Claire / Professeure, HDR, Université de Bretagne Occidentale	Rapportrice
BULINSKI Chloë / Professeure, Columbia University	Examinatrice
CORMIER Patrick / Professeur, HDR, Sorbonne Université	Examinateur
MEHIRI Mohamed / Maître de conférences, HDR, Université Côte d'Azur	Examinateur
BACH Stéphane / Ingénieur de recherche CNRS, HDR	Directeur de thèse
RUCHAUD Sandrine / Chargée de recherche CNRS	Co-directrice de thèse

IFD - Bureau d'accueil des doctorants
15 rue de l'école de médecine – 75006 Paris
Escalier G – 2ème étage

A ma grand-mère

Remerciements

La thèse a été effectuée à la Station Biologique de Roscoff, au sein de l'Unité USR 3151/CNRS-UPMC, nouvellement intégrée à l'Unité UMR 8227/CNRS-SU, en collaboration avec l'Institut de Chimie de Nice, UMR 7272/CNRS- Université Côte d'Azur.

Tout d'abord, je tiens à remercier le Gouvernement Vietnamien, Campus France et Sorbonne Université pour les quatre ans de financement en thèse ainsi que l'Université de Médecine et de Pharmacie de Hochiminh-ville, mon organisation gouvernementale, pour avoir favorisé mon séjour en France.

Ensuite, j'aimerais remercier l'ex-directeur de la Station, Bernard Kloareg, et l'ex-directrice de l'Unité USR3151, Sandrine Ruchaud, pour m'avoir accueillie au sein de la Station, où j'ai eu les bonnes conditions au travail. J'aimerais également remercier la directrice de la Station, Catherine Boyen, le directeur de l'Unité 8227, Stéphane Egée, et la directrice adjointe, Mirjam Czjzek, de m'avoir fourni des conditions favorables pour rédiger mon manuscrit de thèse dans les derniers temps.

Je souhaiterais remercier Marie-Thérèse Dimanche-Boitrel et Claire Hellio, les rapportrices, d'avoir accepté d'évaluer mes travaux de thèse. Vos conseils et critiques constructives m'ont aidée à améliorer la rédaction de ma thèse. Je souhaiterais remercier aussi Chloë Bulinski, Mohamed Mehiri et Patrick Cormier d'avoir accepté de participer à mon jury de soutenance de thèse. Vous m'avez aidé à réviser ma thèse de façon objective et m'avez offert une orientation scientifique pour mon futur projet de recherche.

Je voudrais adresser mes remerciements les plus sincères aux membres de mon comité de thèse : Laurence Meslet-Cladière, Céline Ollivaux, Boutet Agnès et Blandine Baratte, pour leur expertise scientifique, c'est un immanquable dans le déroulement de ma thèse. En particulier, je voudrais remercier Céline et Blandine, qui ont consacré du temps à lire et à corriger, pour l'achèvement de mon manuscrit.

Je remercie particulièrement mon directeur de thèse, Stéphane Bach, pour son encadrement pendant quatre ans de thèse. Il m'a non seulement donné l'opportunité d'accéder à de nouveaux horizons scientifiques, mais également il m'a aidé à progresser et à dépasser

mes limites dans la recherche et dans la vie humaine. Ce sont des expériences précieuses et inoubliables.

Je remercie également ma directrice de thèse, Sandrine Ruchaud, qui m'a encadrée et m'a accompagnée tout au long de ma thèse avec sa connaissance scientifique et son humanité. Avec tous ses conseils et ses soutiens précieux, je n'ai pas été perdu.

Je n'oublie pas d'adresser un remerciement spécial à Mohamed Mehiri et à Vo Thi Bach Hue pour vos aides et vos échanges afin de pouvoir démarrer ma thèse, cela a ouvert mon destin à Roscoff.

Je remercie chaleureusement Sophie Paris-Labrousse pour son aide précieuse au niveau administratif ainsi que Nathalie Desban pour ses formations et ses expériences en culture cellulaire. Merci à Béatrice Josselin et Amandine Bescond, qui ont partagé avec moi le bureau pendant quatre ans et des conversations intéressantes. Merci Thomas Robert pour sa gentillesse et son enthousiasme, dans le travail et dans la vie. Merci Pierre Colas pour sa disponibilité en discussion scientifique. Merci Claire Delehouzé pour sa collaboration dans certains projets de recherche. Je tiens à remercier encore mes anciens collègues : Luc Reininger, Benoît Serîve, Mohamed Souab, Ilann Sarfati et Julien Caloch pour les bons moments qu'on a passés ensemble au laboratoire. Merci à mon ami proche, Omid Feizbakhsh, qui m'a accompagnée volontairement dans tous les chemins. Tu m'as offert une belle amitié, que je garderai toujours.

Je n'oublie pas de remercier tous les membres de l'Unité 8227 qui nous ont bien accueillis au moment de l'intégration de notre équipe.

Je voudrais remercier sincèrement toutes les équipes de services et scientifiques de la Station, avec la présence de Dominique, Estelle, Brigitte, Christine, Franck, Barbara, Pascale, Evelyne, Martine, André, Damien… J'apprécie beaucoup leurs aides et leur gentillesse pendant mon temps à la Station Biologique de Roscoff.

Je remercie grandement Geneviève et Loulou de m'avoir accueillie et de m'avoir aidée à m'adapter à la culture bretonne-française, depuis mon arrivée à Roscoff il y a quatre ans. Mais je n'ai pas oublié ma culture d'origine grâce à la présence de la famille de mon cousin et la famille de Mme. Pham. Malgré toutes les différences entre les deux cultures, je trouve que

nous mettons toujours les valeurs familiales et humaines en premier et les conserverons. Cela m'a permis de m'adapter très bien à la vie en France.

Un grand merci à mes amis du Club de Badminton (Lucile, David, Stéphane), de l'association Ar Boutou Nevez (Jean, Catie, Akira), de l'association pour la Sauvegarde des sites de Roscoff et la Mise en valeur de son Patrimoine, et à la mairie de Roscoff pour mes quatre années pleines d'activités sportives et culturelles. Ils m'ont accompagnée dans les tournois, les balades, les soirées crêpes, les Fest-Noz ou encore les festivals historiques. Ce seront mes souvenirs inoubliables.

Merci mes autres amis à Roscoff : Hajar, Harold, Wei-Ting, Aurélie, An, Arnaud, Anaïs, Sofia, Marilyne, Amandine, Hetty, Miriam, Margot, Ilann, Hervé et Simon. Vous m'avez accompagnée partout, de la maison à la Station ou du marché à la plage, et m'avez offert des moments inoubliables.

Merci à toi, Maria, mon âme-sœur, ta présence est déjà un cadeau. Notre rencontre nous a fait évoluer énormément, je l'apprécie beaucoup. Continuons notre chemin et croyons que l'on se voit encore.

Merci mes amis qui m'ont accompagnée dans les moments difficiles bien qu'ils ne soient pas en France (au Vietnam, au Japon, à Taiwan, en Autriche, en Australie ou encore aux États-Unis). Je ne vous cite pas ici mais vous êtes toujours dans mon cœur. Je vais aller vous voir dans mes prochains voyages, promis !

Enfin, j'aimerais remercier ma famille qui m'a toujours soutenue et encouragée. La nostalgie et le manque de la famille ne m'ont pas empêchée, au contraire, ça m'a renforcée pour finir ma thèse dans le délai requis.

Quatre ans pour une thèse, quatre ans pour une vie, ce n'est pas long mais ça m'a suffi pour développer énormément mes connaissances scientifiques ainsi que mes compétences professionnelles. J'ai eu l'occasion de découvrir la beauté d'une nouvelle langue et d'une nouvelle culture ainsi que d'explorer mes passions et mes potentiels illimités sur différents domaines de la vie. Je n'oublierai jamais cette page de ma vie qui était bien remplie et enrichissante de l'amitié et de l'humanité. Merci à vous tous.

" In this life, place all your trust in someone, even when bad things happen, be brave enough to accept it, because if you lose your faith, you will not be able to reach the goal."

Phan Anh

"Men never plan to be failures; they simply fail to plan to be successful. "

William Arthur Ward

"Four steps to achievement: Plan purposefully. Prepare prayerfully. Proceed positively. Pursue persistently. "

William Arthur Ward

Sommaire

Remerciements iii
Sommaire vii
Introduction 1
Avant-propos 3
1. La mort cellulaire programmée 5
1.1. Généralités 5
1.1.1 L'apoptose 11
1.1.2 L'autophagie 13
1.1.3 La nécroptose 14
1.1.4 La ferroptose 17
1.1.5 La catastrophe mitotique 18
1.2. Rôle physiologique de la mort cellulaire programmée et mécanismes de dérégulation 21
1.3. Mort cellulaire programmée dans les pathologies humaines 24
1.3.1 Exemple dans le cancer 24
1.3.2 Exemple dans les troubles neurodégénératifs 29
1.3.3 Modulation chimique des voies de mort cellulaire programmée comme nouvelles approches thérapeutiques 33
2. Les protéines kinases 44
2.1. Généralités 44
2.2. Les protéines kinases en tant que cibles thérapeutiques 49
2.3. Inhibiteurs de protéines kinases 53
3. Intérêt et potentiel des molécules marines 58
3.1. Diversité des molécules marines 58
3.2. Application des molécules marines en thérapie humaine 60
3.3. Inhibiteurs de protéines kinases d'origine marine 63
3.4. Inhibiteurs de la mort cellulaire programmée d'origine marine 65
Objectifs de la thèse 69
Résultats 73
1. Etude du mécanisme d'induction de la mort cellulaire par des molécules marines de *Crambe tailliezi* et *Crambe crambe* sur certaines lignées de cellules cancéreuses 75

1.1. Caractérisation du composé P3 isolé de l'éponge de Méditerranée *Crambe tailliezi* 76
Contexte et résumé de l'article 1 76
Article 1 (soumis) 77
Discussion sur l'article 1 107
Résultats supplémentaires 108
Complément matériels et méthodes 111
1.2. Caractérisation de nouveaux métabolites secondaires de l'éponge de l'Atlantique *Crambe crambe* 114
Contexte et résumé de l'article 2 114
Article 2 (en préparation) 115
Discussion sur l'article 2 129
2. Etude du mécanisme de protection de la mort cellulaire neuronale par un panel de pigments d'origine marine 130
Contexte 130
Introduction 130
Résultats 133
Matériels et méthodes 140
Discussion sur la 3ème partie des résultats 141
Discussion générale, perspectives et conclusion 143
Bibliographie 153
Liste des tableaux 177
Liste des figures 178
Liste des abréviations 180
Résumé x

Introduction

Avant-propos

La **mort cellulaire programmée** (ou *programmed cell death*, PCD) est un processus intracellulaire décrit dans la littérature au milieu des années 60s (Lockshin, 1969; Lockshin and Williams, 1964). Ce processus physiologique permet, par exemple, l'élimination de cellules indésirables dont les cellules cancéreuses. Elle est déclenchée par des signaux intra- ou extracellulaires. L'apoptose est la première PCD morphologiquement décrite (Kerr et al., 1972) et la plus étudiée jusqu'à maintenant. Depuis cette découverte, d'autres phénotypes de PCD ont également été caractérisés, tels que la nécroptose, la ferroptose et la catastrophe mitotique (Galluzzi et al., 2018). Ces voies de mort cellulaire jouent des rôles très importants dans les conditions physiologiques et pathologiques (Fuchs and Steller, 2011). Ainsi, l'apoptose est essentielle dans le maintien de l'homéostasie tissulaire et dans la différenciation cellulaire. Par ailleurs, la nécroptose est fortement liée à l'inflammation et la ferroptose apparaît comme un élément central dans la physiopathologie de certaines maladies neurodégénératives. La caractérisation des mécanismes de la PCD est donc essentielle afin de permettre la mise en place de stratégies thérapeutiques innovantes. On peut ainsi distinguer deux approches thérapeutiques distinctes impliquant la modulation de la mort cellulaire : l'induction de la mort cellulaire dans les thérapies anticancéreuses et l'inhibition de la mort cellulaire principalement dans le cadre des maladies inflammatoires et neurodégénératives.

Le contrôle de la mort cellulaire implique entre-autres l'action de **protéines kinases**. Ce sont des enzymes qui catalysent la phosphorylation d'autres protéines. Cette phosphorylation va modifier l'activité de ces protéines et ainsi réguler les processus intracellulaires dans lesquels elles sont impliquées. Ainsi, le dysfonctionnement de l'expression ou de la fonction de protéines kinases peut contribuer à la perturbation de l'activité de la cellule mais également à la formation des cellules tumorales. Depuis ces deux dernières décennies, les kinases sont donc devenues des cibles thérapeutiques primordiales, particulièrement dans les traitements anticancéreux, concentrant 20-30% du budget de recherches actuelles de nouveaux principes actifs médicamenteux par les sociétés pharmaceutiques. Ainsi, à ce jour, 50 inhibiteurs de protéines kinases ont été approuvés par la FDA (US *Food and Drug Administration*) et commercialisés (Roskoski, 2019).

La mise sur le marché de deux nucléosides (la spongothymidine et la spongouridine) provenant de l'éponge des Caraïbes *Cryptotethia crypta* a mis au jour un grand potentiel de

l'utilisation de molécules naturelles issues de ressources marines pour la thérapie humaine (Bergmann and Burke, 1955). Ces produits marins « pionniers » présentent des caractéristiques structurales associées à une forte efficacité thérapeutique, en particulier dans le traitement anticancéreux. A ce jour, dix composés naturels marins ou dérivés ont été approuvés au niveau mondial pour des traitements anticancéreux, antiviraux, anti-triglycérides et antidouleurs, http://marinepharmacology.midwestern.edu/clinical_pipeline.html, https://www.fda.gov et (Kim, 2017). Malgré sa biodiversité et sa chimio-diversité, les ressources marines sont encore sous-explorées en comparaison de ce qui a été fait au niveau terrestre (Blunt et al., 2018; Shang et al., 2018). Les difficultés dans la collecte et l'identification structurale de produits actifs peuvent expliquer en partie ce « retard » : environ 30 000 molécules marines ont été identifiées (http://pubs.rsc.org/marinlit et « Dictionary of Marine Natural Products 2018 »), en comparaison de 150 000 molécules terrestres identifiées (« Dictionary of Natural Products 28.1). Par conséquent, la recherche de molécules marines constitue un domaine prometteur pour le développement de médicaments.

Le médicament approuvé, la midostaurine (Rydapt®) (Kim, 2017; Schlenk and Kayser, 2018), est un exemple récent. Il s'agit d'un dérivé de la staurosporine, molécule de la famille des indolocarbazoles, isolée notamment chez les organismes marins comme l'ascidie *Eudistoma toealensis* et le plathelminthe *Pseudoceros* sp. La staurosporine est un inhibiteur de protéines kinases qui induit la PCD. Cette découverte s'inscrit comme une preuve de concept de l'intérêt au monde marin et à ses ressources afin de caractériser des inhibiteurs de protéines kinases, comme inducteurs de mort applicables en traitement anticancéreux. Elle s'ajoute à d'autres études qui ont orienté les choix effectués au cours de ce travail de thèse (pour revue voir Bharate et *al.* 2013).

1. La mort cellulaire programmée

1.1. Généralités

La **mort cellulaire programmée** (ou *programmed cell death*, PCD) est par définition sous le contrôle d'une cascade d'événements moléculaires. Elle peut être initiée de façon physiologique ou induite par un facteur extrinsèque (comme l'exposition à des produits chimiques). Une ou plusieurs cascade de transduction peuvent éventuellement êtres activées et aboutissent à la mort de la cellule (Zakeri and Lockshin, 2008).

Il existe différentes classifications de la PCD, selon 1) l'apparence morphologique (comme la mort apoptotique, nécrotique, autophagique ou liée à la mitose), 2) le critère enzymologique (avec ou sans l'implication des nucléases ou de différentes classes de protéases telles que les caspases, les calpaïnes, les cathepsines et les trans-glutaminases), 3) l'aspect fonctionnel (la mort programmée ou accidentelle, la mort physiologique ou pathologique), ou encore 4) des caractéristiques immuno-modulatrices (anti-inflammatoire/tolérogène, pro-inflammatoire/immunogène) (Kroemer et al., 2005; Zakeri and Lockshin, 2008). En outre, selon la façon dont les cellules meurent par rapport à l'immunogénicité, les PCD sont classées en quatre groupes : 1) mourir discrètement (l'apoptose et l'anoïkis), 2) mourir brutalement (la nécrose régulée et la nécroptose), 3) mourir finalement (l'autophagie, la catastrophe mitotique et l'entose) et 4) mourir singulièrement (la nétose, la cornification et la pyroptose) (Cabon et al., 2013).

Avec les recommandations formulées en 2005 et 2009, le Comité de la Nomenclature sur la Mort Cellulaire (ou *The Nomenclature Committee on Cell Death*, NCCD) a suggéré un ensemble unique de critères pour décrire et classifier les différents types de mort cellulaire du point de vue morphologique, biochimique et fonctionnel (Kroemer et al., 2005, 2009). Selon ces recommandations, les phénotypes de mort sont présentés de façon systématique et conventionnelle, incluant l'apoptose, l'autophagie, la nécroptose, la cornification, la catastrophe mitotique, l'anoikis, l'excitotoxicité, la dégénérescence wallérienne, la paraptose, la pyroptose, la pyronécrose et l'entose (Kroemer et al., 2009). Après 2009, la recherche continue de progresser et de nouveaux mécanismes orchestrant de multiples voies de mort cellulaire sont dévoilés. Une classification actualisée des sous-programmes de mort cellulaire centrés sur les aspects mécaniques essentiels du processus est alors proposée, comprenant

l'apoptose, la nécroptose, la ferroptose, l'autophagie, la catastrophe mitotique et d'autres voies de mort cellulaire (Cabon et al., 2013; Galluzzi et al., 2018). Ces principaux sous-programmes de PCD sont présentés dans la **Figure 1** et le **Tableau 1**.

Ces définitions et descriptions plus précises et mesurables permettent ainsi d'éviter les dénominations imprécises ou parfois déroutantes. La cellule morte ('*dead cell'*) est différente de la cellule mourante (*'dying cell'*), toujours vivante, qui est engagée dans un processus irréversible aboutissant à la mort. Une cellule morte possède les caractéristiques morphologiques suivantes : la perte d'intégrité de la membrane plasmique, la fragmentation cellulaire et l'exposition de signaux de phagocytose (Galluzzi et al., 2018). L'apoptose n'est plus la seule forme de PCD connue. La nécrose n'est plus considérée que comme une mort accidentelle, elle peut être régulée dans certaines conditions (Degterev et al., 2005). Par ailleurs, on distingue désormais 'l'autophagie' et 'la mort cellulaire par la voie autophagique' (Tasdemir et al., 2008). La catastrophe mitotique, un mécanisme de progression cellulaire, peut induire la PCD, qui est alors nommée 'la mort précédée d'une catastrophe mitotique', 'la mort cellulaire précédée par une multi-nucléation' ou encore 'la mort cellulaire apparaissant pendant la métaphase'(Vakifahmetoglu et al., 2008). Le terme de cornification est utilisé en remplaçant le terme de kératinisation, pour décrire la mort des kératinocytes épidermiques, qui forme ensuite l'enveloppe cornée de la peau (Candi et al., 2005). La sénescence, par laquelle les cellules sont bloquées dans le cycle cellulaire, n'est plus considérée comme une mort cellulaire, même si les cellules meurent au final (Galluzzi et al., 2018).

Le Comité de la Nomenclature sur la Mort Cellulaire a conseillé une nomenclature, largement acceptée afin de faciliter la communication entre les scientifiques et de soutenir le développement continu de ce champ de recherche.

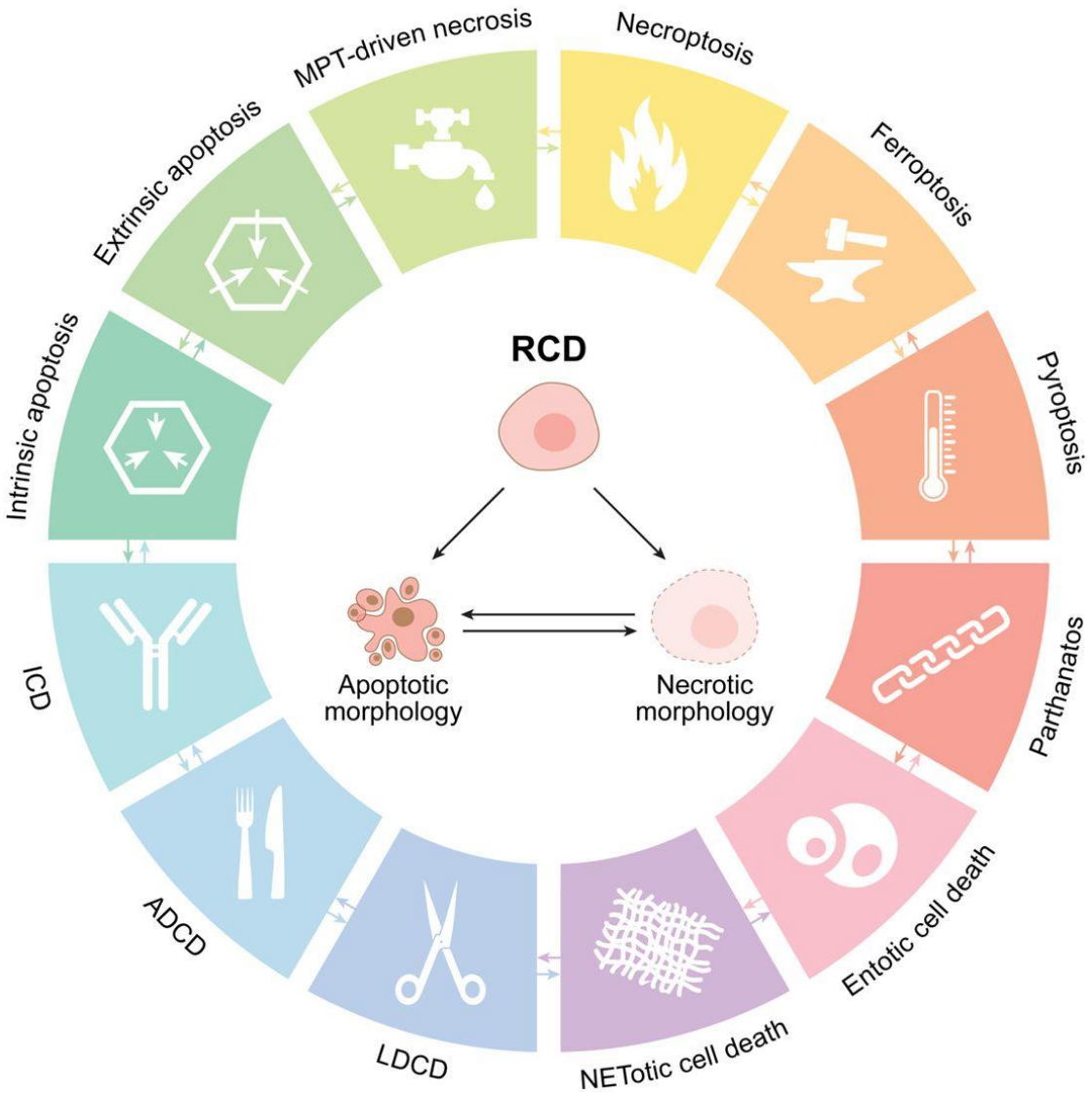


Figure 1 : Principaux sous-programmes de mort cellulaire. *RCD: regulated cell death; ADCD: autophagy-dependent cell death; ICD: immunogenic cell death; LDCD: lysosome-dependent cell death; MPT: mitochondrial permeability transition.* Source : [Galluzzi et *al*. *Cell Death & Differentiation* **2018**] (Galluzzi et al., 2018).

Tableau 1 : Définition des voies de mort cellulaire programmée.

Source : (Galluzzi et al., 2018; Kroemer et al., 2009).

Mort cellulaire programmée	
Anoïkis	Forme d'apoptose induite par le détachement de cellules de l'ECM
Apoptose	Suicide cellulaire ou mécanisme d'autodestruction en réponse à un signal intrinsèque ou extrinsèque de mort cellulaire
Autophagie	Dégradation partielle du cytoplasme d'une cellule en utilisant ses propres lysosomes
Catastrophe mitotique	Mort cellulaire par apoptose ou nécrose, liée à un retard de mitose, induite par de multiples facteurs comme les rayonnements, les drogues ou l'hyperthermie
Dégénérescence wallérienne	Dégénérescence d'un axone nerveux et de sa gaine de myéline sans affecter le corps cellulaire principal
Cornification	Différenciation et mort des kératinocytes épidermiques, conduisant à la formation de l'enveloppe cornée nécessaire au fonctionnement de la peau
Entose	Cannibalisme cellulaire induit par le détachement de cellules de l'ECM
Ferroptose	Nécrose programmée fer-dépendante liée à la peroxydation massive des lipides et au stress oxydatif
Nécroptose	Mort cellulaire due à des facteurs, ayant lieu quand l'apoptose est inhibée et induisant une réaction inflammatoire
NETose	Mort des cellules neutrophiles programmée induite par les agents pathogènes entraînant une formation de NETs
Paraptose	Mort cellulaire génétiquement contrôlée induite par l'IGF-1
Pyronécrose	Nécrose programmée caspase-1-dépendante en réponse à une infection bactérienne des macrophages liée à *Shigella flexneri*
Pyroptose	Nécrose programmée caspase-1-dépendante en réponse à une infection microbienne par l'activation de l'inflammasome
Parthanatose	Mort cellulaire dépendante de l'activation de la PARP-1 et de la translocation de l'AIF en réponse à un stress génomique extrême

ECM: extracellular matrix; NETs: neutrophil extracellular traps; IGF: insulin-like growth factors; PARP: poly (ADP-ribose) polymerase; AIF: apoptosis-inducing factor.

Malgré la diversité des phénotypes de mort cellulaire proposés par la NCCD, les auteurs préfèrent, en général, utiliser des critères morphologiques pour les décrire, avec trois phénotypes principaux : l'apoptose, l'autophagie et la nécrose. De plus, l'utilisation des chiffres romains (type I, type II et type III) pour classifier ces voies de mort existe encore mais elle est limitée et non-recommandée par le NCCD. La complexité de la PCD est illustrée non seulement par sa diversité mais également par la combinaison entre les phénotypes. De nombreuses études ont ainsi montré qu'une mort cellulaire peut apparaître sous plusieurs formes associant l'apoptose et la nécrose, ou encore l'apoptose et l'autophagie (Amaravadi and Thompson, 2007; Conrad et al., 2016). La description d'une mort cellulaire doit donc utiliser plusieurs critères tels que la morphologie cellulaire, la biochimie mais aussi les rôles en conditions physiologiques et pathologiques. La caractérisation d'une mort cellulaire est complexe mais la compréhension fine de ses mécanismes a pour objectif de pouvoir la moduler (par induction ou inhibition), de prédire les conséquences de cette modulation *in vivo*, en suivant les réponses inflammatoire et immunitaire, et ainsi d'adapter un traitement à chaque maladie impliquant la mort cellulaire.

Par ailleurs, bien que la mort cellulaire soit facilement observable *in vitro*, elle a difficilement été détectée *in vivo* car les cellules constituant les tissus *in vivo* meurent souvent avant d'émettre un signal détectable engendré par l'apoptose, la nécrose ou n'importe quelle voie de mort. C'était un des grands défis de la recherche sur la mort cellulaire : définir des marqueurs caractérisant le déclenchement de morts cellulaires. On peut citer entre autres, des analyses biochimiques comme la fragmentation de l'ADN (*acide désoxyribonucléique*) et l'activation de caspases sont utilisées pour diagnostiquer une mort cellulaire apoptotique *in vivo*. Cependant, les caractéristiques et les mécanismes d'action précis de nombreux phénotypes de mort cellulaire restent encore inconnus à ce jour. Le **Tableau 2** décrit les principaux phénotypes de la PCD.

Tableau 2 : Caractéristiques des principaux phénotypes de mort cellulaire programmée. Source : (Galluzzi et al., 2018; Kroemer et al., 2009)**.**

Phénotypes	**Apoptose**	**Autophagie**	**Nécroptose**	**Ferroptose**	**Catastrophe mitotique**
Déclencheur	Activation par des signaux intrinsèque ou extrinsèque	Famine alimentaire (manque de nutriment extra- et intracellulaire)	Activation de récepteurs de mort cellulaire (TNF-R, TRAIL-R et FAS-R) ou de récepteurs Toll-like (TLR3, TLR4) avec inhibition de la caspase 8	Erastine	Inactivation de la survivine
Protéines-clés	Caspases	PI3K, IL3	RIPK1, RIPK3, MLKL	GPX4	CDK1/cycline B
Réponse inflammatoire	Non	Non	Oui	Oui	
Morphologie	Arrondissement et rétrécissement de la cellule Condensation de la chromatine Fragmentation de l'ADN Formation de fragments cellulaires	Vacuolisation massive du cytoplasme Accumulation de vacuoles autophagiques Manque de condensation de la chromatine	Gonflement du cytoplasme Perméabilisation et rupture de la membrane plasmique Condensation modérée de la chromatine Libération du contenu cytoplasmique	Rétrécissement de la cellule Augmentation de densité de la membrane mitochondriale	Micronucléation Multinucléation Fragmentation du noyau
Inhibiteurs références	Z-VAD-FMK	3-Méthyladénine	Nécrostatine-1	Ferrostatine-1	
Méthodes de détection	Inhibition de l'apoptose Activation de la caspase 3 Microscopie fluorescente Western blot FACS Absorbance/ Fluorescence	Inhibition de l'autophagie Activation de mTOR Microscopie fluorescente Western blot	Inhibition de la nécroptose Phosphorylation de la MLKL Western blot FACS	Inhibition de la ferroptose Accumulation de peroxydes lipidiques Western blot FACS	Microscopie fluorescente Western blot
Rôle physiopathologique	Développement et morphogenèse ; cancer	Survie et maintien de l'homéostasie ; Voie de mort alternative (hyper-activation mitochondriale)	Réponses immunes et inflammatoires ; Voie de mort alternative (inactivation de l'apoptose)	Maladies neurodégénératives ; Voie de mort alternative (peroxydation lipidique excessive)	Voie de mort alternative (dysfonctionnement mitotique)

1.1.1 L'apoptose

En 1972, le terme '**apoptose**' (issu du grec *'apo'*, au loin, et *'ptosis'*, chute ; en anglais *apoptosis*) a été utilisé pour la première fois par Kerr, Wyllie et Curie pour nommer un suicide programmé des cellules, en comparaison à la chute de feuilles qui est programmée chaque automne (Kerr et al., 1972). L'apoptose est caractérisée morphologiquement par une condensation de la chromatine et du cytoplasme, suivie par une fragmentation de l'ADN et des bourgeonnements de la membrane plasmique, aboutissant à des corps apoptotiques qui seront éliminés jusqu'à la disparition complète de la cellule (Galluzzi et al., 2018; Kroemer et al., 2009). Le processus apoptotique d'une cellule est déclenché par l'activation de caspases et peut être inhibé par des composés tels que le Z-VAD-FMK, un inhibiteur irréversible qui se fixe au site catalytique des caspases reconnaissant la séquence peptidique « VAD » (Nicholson, 1999). Des études génétiques d'organismes tels que les souris ont démontré que chez les Mammifères, l'apoptose se déroule selon des étapes bien définies et spécifiques (Joza et al., 2002). Ces caractéristiques morphologiques et biochimiques de l'apoptose sont similaires et conservées au cours de l'évolution au sein des Métazoaires. Comme mentionné précédemment, des analyses biochimiques spécifiques comme la fragmentation de l'ADN ou l'activation de caspases peuvent être utilisées pour caractériser une mort apoptotique (Brady, 2004).

En général, le processus apoptotique peut être activé par les voies extrinsèque ou intrinsèque. La voie extrinsèque est déclenchée par un signal extracellulaire dû à la fixation d'un ligand extracellulaire à son récepteur transmembranaire. Ces ligands sont, par exemple, FAS-L (*FAS ligand*), TNF-α (*Tumor Necrosis Factor – α*) et TRAIL (*TNF – related apoptosis inducing ligand*). Cette voie extrinsèque nécessite une cascade de signalisation dans laquelle l'activation de caspases joue un rôle central (Nicholson, 1999). La voie intrinsèque (ou voie mitochondriale) de l'apoptose implique quant à elle le contrôle des protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 (ex : Bcl-2, Bcl-xL ou Mcl-1) (Singh et al., 2019). Cette voie est activée par un stress intracellulaire tel que la diminution des facteurs de croissance, les lésions de l'ADN et l'hypoxie (Brenner and Mak, 2009). Le mécanisme de cette mort cellulaire est résumé dans la **Figure 2**.

En conditions physiologiques, l'apoptose est un mécanisme essentiel dans le maintien de l'homéostasie tissulaire, dans le développement et la différenciation d'une cellule et plus généralement dans la régulation du fonctionnement d'un organisme vivant. Par ailleurs, elle peut être déclenchée volontairement, dans certains traitements médicaux (radiothérapie,

chimiothérapie), afin de provoquer des réponses immunitaires ou de lutter contre les cancers. Enfin, les pathologies telles que le cancer, les maladies auto-immunes, les maladies neurodégénératives ou les lésions associées à l'ischémie peuvent impliquer un dysfonctionnement de l'apoptose (Elmore, 2007).

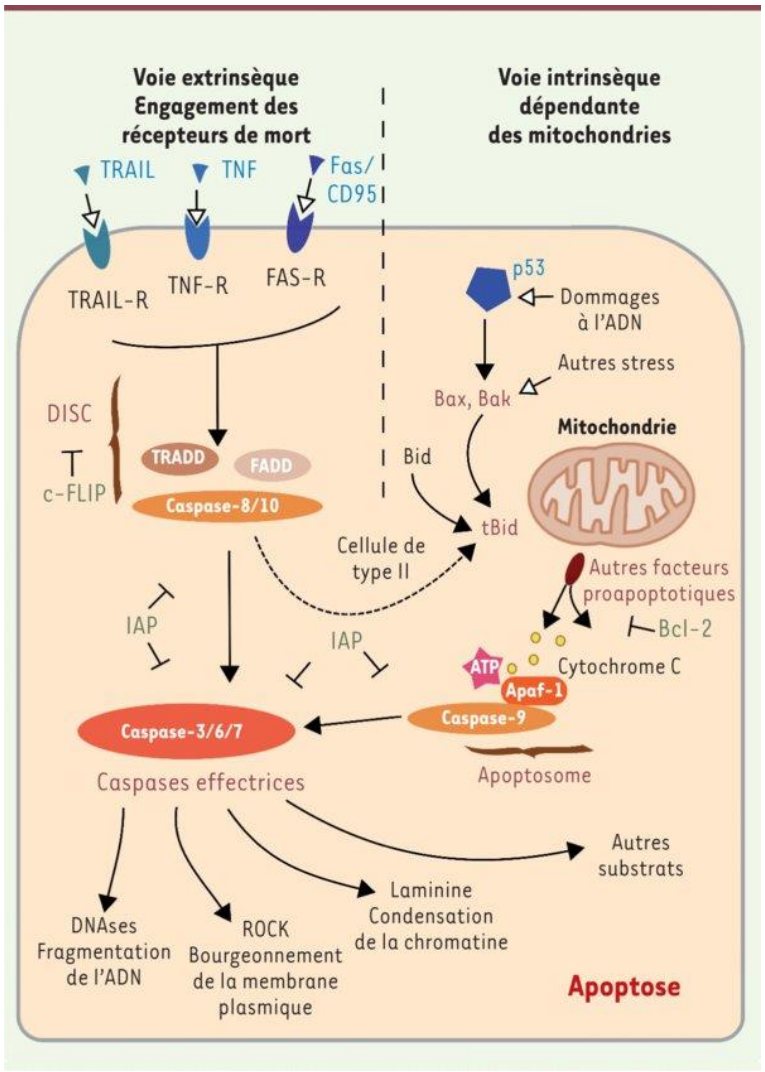


Figure 2 : Illustration des voies intrinsèque et extrinsèque de l'apoptose. *L'apoptose est déclenchée par deux voies différentes : extrinsèque (avec l'engagement des récepteurs de mort cellulaire comme TRAIL-R, TNF-R et FAS-R) ou intrinsèque (avec l'activation des mitochondries). Une cascade de signalisation est activée via la formation du complexe TRADD/FADD/caspase-8 dans la voie extrinsèque ou de l'apoptosome dans la voie intrinsèque. Cette cascade de signalisation aboutit aux changements morphologiques de la cellule : fragmentation de l'ADN, bourgeonnement de la membrane plasmique et condensation de la chromatine. L'apoptose est inhibée par Bcl-2, c-FLIP et IAP.* Source : [Cabon et *al. Médecine/ science* **2013**] (Cabon et al., 2013).

1.1.2 L'autophagie

Apparu en 1963, le terme '**autophagie**' est utilisé pour décrire une dégradation des cellules soumises à un stress ou à un manque de nutriments. Cette voie permet la mise à disposition d'énergie ou de matériel nécessaire à la néo-synthèse en cas de carence mais également d'éliminer des composants intracellulaires altérés ou des agents pathogènes (Kroemer & Levine, 2008; Levine & Klionsky, 2004; Mizushima, 2007). L'autophagie régule l'homéostasie cellulaire et assure le maintien du fonctionnement des organites (Choi et al., 2013; Chun and Kim, 2018).

L'autophagie est contrôlée par la protéine mTOR (*mammalian Target Of Rapamycin*), une sérine/thréonine kinase. L'inactivation de mTOR induit une cascade de signalisation, qui commence par la formation du complexe ULK1 (ULK1-FIP200-Atg13-Atg101), la conjugaison de LC3/Atg8 à la phosphatidyléthanolamine, et se termine par la formation des autophago-lysosomes également nommés auto-lysosomes (Hurley and Young, 2017; Xie and Klionsky, 2007) (**Figure 3**). Au niveau morphologique, l'autophagie est caractérisée par la vacuolisation massive du cytoplasme, l'accumulation de vacuoles autophagiques et une absence de condensation de la chromatine (Galluzzi et al., 2018; Kroemer et al., 2009).

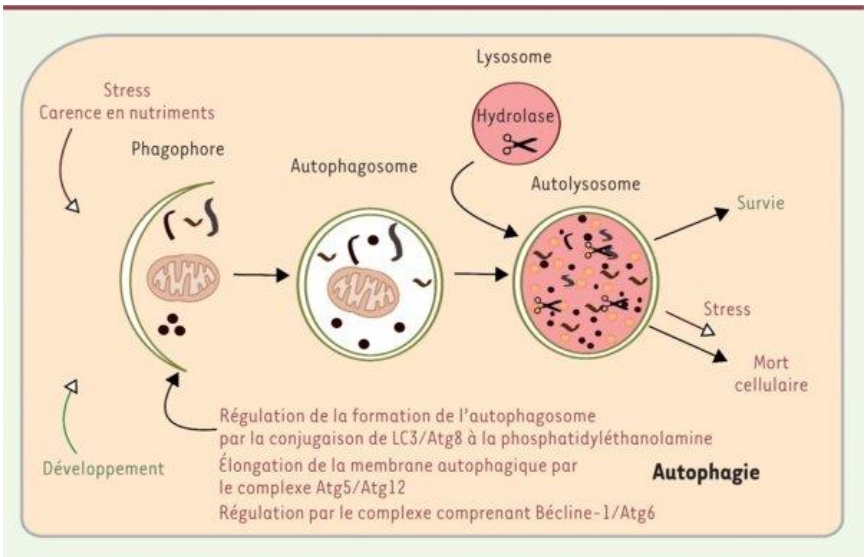


Figure 3 : L'autophagie et la régulation de cette voie de mort cellulaire. *L'autophagie est induite par un stress ou un manque de nutriments. Le processus commence par la formation des autophagosomes, puis des autolysosomes et se termine par une survie ou une mort cellulaire autophagique. Cette voie de mort est régulée par des protéines Atg. Atg : autophagy-related protein.* **S**ource : [Cabon et *al*. *Médecine/ science* **2013**] (Cabon et al., 2013).

1.1.3 La nécroptose

Depuis le XIXème siècle, le terme '**nécrose**' (du grec *'nekrosis'*, mortification ; en anglais *necrosis*) a été utilisé pour tous les types de mort cellulaire. Après la découverte de l'apoptose, une PCD, en 1972, la nécrose a été identifiée comme une mort cellulaire accidentelle/ non-programmée, déclenchée dans les cas aigus tels qu'un traumatisme ou une blessure afin d'éliminer des cellules endommagées. Les principaux processus qui peuvent engendrer la nécrose sont : l'altération mitochondriale, les dommages à l'ADN, le stress oxydatif, l'augmentation de la concentration de calcium intracellulaire et l'activation de protéases non-caspases. La nécrose se caractérise par une condensation modérée de la chromatine, un gonflement du cytoplasme, une perméabilisation suivie d'une rupture de la membrane plasmique et enfin une libération rapide du contenu cytoplasmique dans l'environnement tissulaire (Edinger and Thompson, 2004; Shen and Vandenabeele, 2014).

En 2005, un criblage phénotypique a permis de mettre en évidence la nécrostatine-1 comme modulateur chimique de la nécrose (Degterev et al., 2005). Cet inhibiteur de la nécrose agit via l'inhibition de la protéine kinase RIPK1 (*RIPK : Receptor-Interacting Protein Kinase*). Cette découverte a ouvert de nouvelles perspectives thérapeutiques pour les pathologies liées à cette mort cellulaire : la nécrose est dite « druggable » et peut être modulée en utilisant des petits composées chimiques (Berghe et al., 2010). Le terme '**nécroptose**' a permis ainsi de fixer cette différence avec la nécrose accidentelle. De nombreuses études ont été réalisées afin de mieux décrire la nécroptose. Elles ont permis d'ajouter des acteurs clés, tels que la kinase RIPK3 et la pseudokinase MLKL (*mixed lineage kinase domain like pseudokinase*), et ont montré que la nécroptose possède toutes les caractéristiques morphologiques et biochimiques de la nécrose mais se distingue par son caractère régulé, puisqu'elle est déclenchée et maintenue de façon programmée (Galluzzi et al., 2018; Kroemer et al., 2009; Vandenabeele et al., 2010).

Comme l'apoptose, le processus nécroptotique est activé par deux voies principales : extrinsèque ou intrinsèque. La voie extrinsèque est initiée par un signal extracellulaire dû à la fixation d'un ligand extracellulaire (ex : FAS-L, TNF-α, TRAIL et LPS) à son récepteur transmembranaire. La voie intrinsèque est déclenchée, par un stress ou un dommage intracellulaire (stress métabolique, endommagement de l'ADN, production de ROS), en activant la PARP-1. Dans les deux voies, la nécroptose a besoin de la formation d'un nécrosome, un complexe composé de RIPK1 et de RIPK3 (Cabon et al., 2013; Conrad et al., 2016). Le mécanisme de la nécroptose est résumé dans la **Figure 4**.

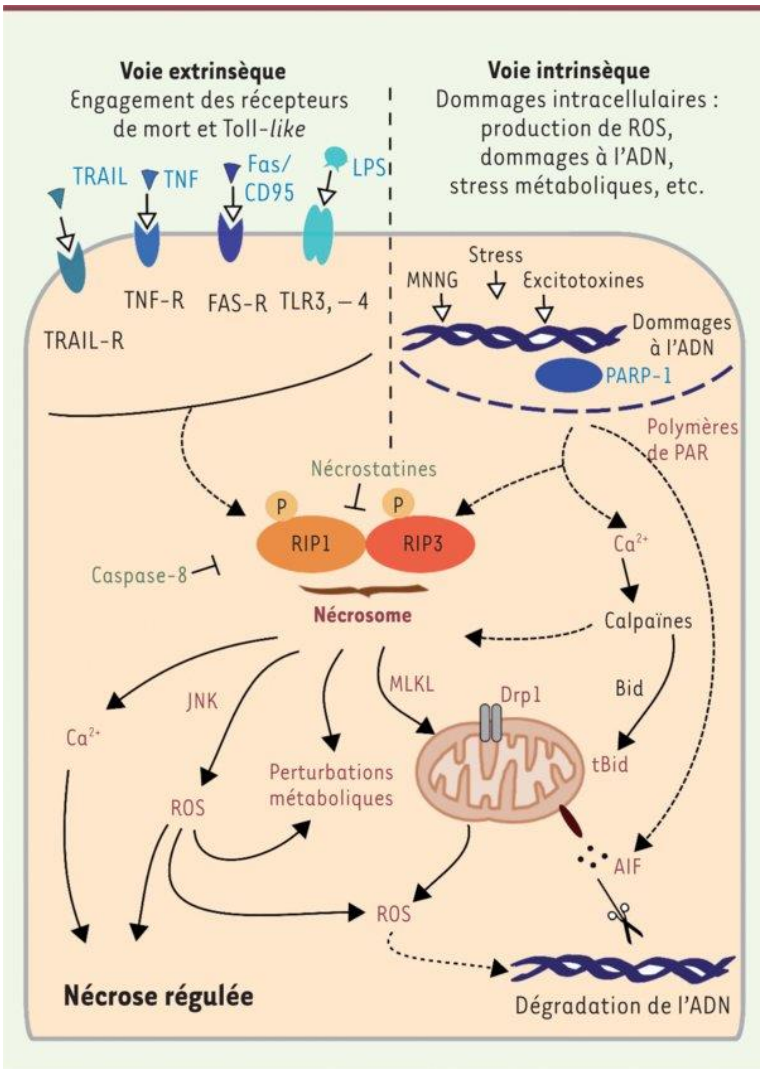


Figure 4 : Déroulement de la nécroptose, une nécrose régulée. *La nécroptose est déclenchée par deux voies différentes : extrinsèque (avec l'engagement des récepteurs de mort cellulaire TRAIL-R, TNF-R, FAS-R et des récepteurs Toll-like TLR3,-4) ou intrinsèque (avec l'activation des mitochondries par des stress ou des dommages intracellulaires). L'appariement de deux kinases RIPK1 (ou RIP1) et RIPK3 (ou RIP3) forme le nécrosome et induit la nécroptose (ou nécrose régulée). Ce complexe peut être inhibé par la caspase-8 ou des nécrostatines. Dans la voie intrinsèque, la PARP-1 est activée. La nécroptose peut perturber les métabolismes cellulaires, augmenter la concentration du calcium intracellulaire et des ROS ainsi que promouvoir la dégradation de l'ADN via l'AIF.* Source : [Cabon et *al. Médecine/ science* **2013**] (Cabon et al., 2013).

Dans les conditions physiologiques, la nécroptose joue un rôle important dans l'élimination des cellules infectées par des virus ou des bactéries (Nailwal and Chan, 2019; Pan et al., 2014; Robinson et al., 2012). Par ailleurs, elle est impliquée dans les processus

pathologiques tels que les maladies inflammatoires (sclérose en plaques, sclérose latérale amyotrophique et la maladie de Crohn) ou encore dans les lésions de reperfusion ischémique (Weinlich et al., 2017; Zhou and Yuan, 2014).

Outre la nécroptose, d'autres formes de nécrose régulée ont été caractérisées telles que l'entose, la ferroptose, la NETose, la paraptose, la pyronécrose, la pycroptose et la parthanotose (Galluzzi et al., 2018; Kroemer et al., 2009) (**Tableau 1**). Chaque phénotype de mort cellulaire possède son propre mécanisme mais il se déroule selon l'ordre commun d'activation suivant : le signal/déclencheur, le médiateur et enfin l'effecteur pour induire la mort nécrotique régulée (Vanden Berghe, Linkermann, Jouan-Lanhouet, Walczak, & Vandenabeele, 2014) (**Figure 5**).

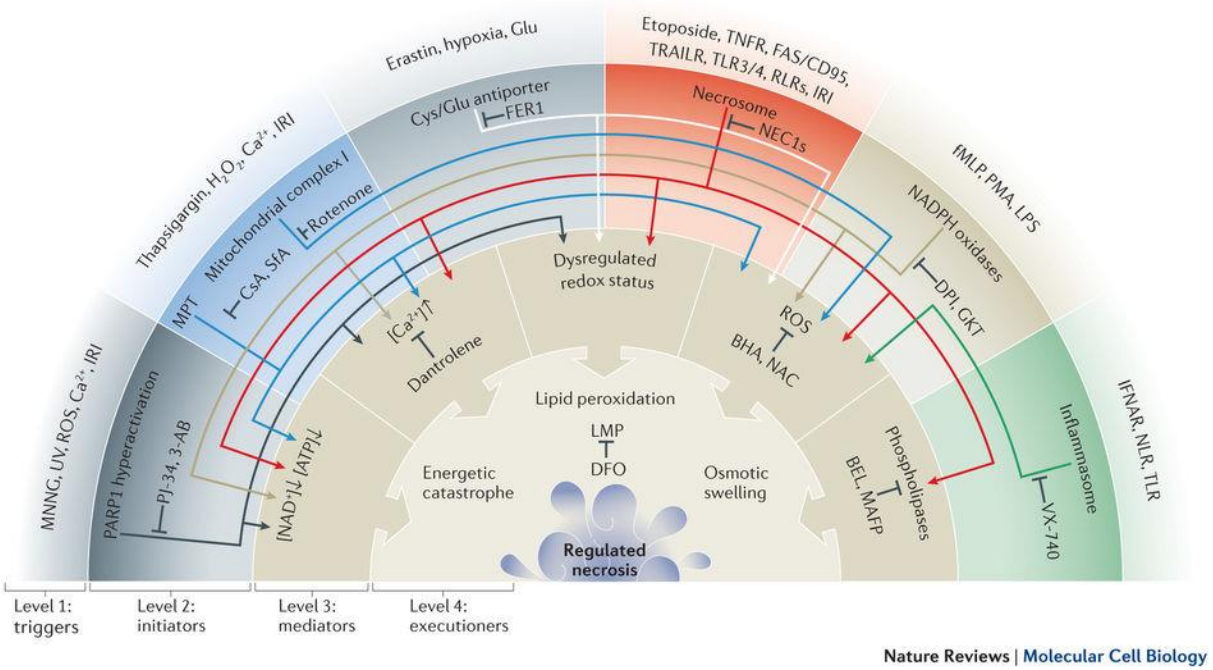


Figure 5 : Vue intégrée des nouveaux modes de nécrose régulée. *La nécrose régulée peut être induite par l'hyper-activation de PARP-1 ; la transition de perméabilité mitochondriale (MPT) ; l'inhibition du complexe mitochondrial I, de l'antiporteur Cys/Glu et des oxydases NADPH ; ou encore la formation du nécrosome et de l'inflammasome. Diverses conditions physiopathologiques peuvent déclencher (niveau 1) ces initiateurs (niveau 2), qui peuvent être bloqués par les inhibiteurs spécifiques listés. Des flèches colorées indiquent les liaisons établies entre les signaux initiateurs et les médiateurs de la nécrose régulée (niveau 3). Certains processus tels que la catastrophe énergétique, la peroxydation lipidique et le gonflement osmotique cellulaire (niveau 4), sont ainsi activés pour induire une nécrose régulée.*

Source : [(Vanden Berghe et *al. Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2014**] (Vanden Berghe et al., 2014).

1.1.4 La ferroptose

En 2003, en criblant des composés pour leur capacité anticancéreuse sur des fibroblastes humains immortalisés, Dolma et *al*. ont découvert une nouvelle forme de mort cellulaire non-apoptotique ainsi que le premier inducteur chimique de cette mort : l'érastine. Au niveau morphologique, ils ont observé un rétrécissement de la cellule, une augmentation de densité de la membrane mitochondriale mais aucun changement au niveau du noyau ou de l'ADN (Dolma et al., 2003).

Il faut attendre 2012 pour que le terme '**ferroptose**' soit utilisé pour la première fois, par Dixon et *al*., pour nommer la mort induite par l'érastine ainsi que par d'autres composés ayant un effet similaire (Dixon et al., 2012). Depuis, la littérature sur la ferroptose n'a pas cessé de s'enrichir comparativement à d'autres morts cellulaires programmées (Cao and Dixon, 2016). De façon intéressante, aucune corrélation n'a été observée entre la ferroptose et les autres voies de mort décrites jusqu'à maintenant (Lei et al., 2019). En effet, elle est décrite comme une forme de la nécrose régulée fer-dépendante et possède ses propres caractéristiques. Ainsi, elle peut être déclenchée par une inhibition de l'antiporteur cystine/glutamate (appelé système X_c^-) ou par la perte d'activité de l'enzyme glutathione peroxydase GPX4, responsable de la réduction des hydroperoxydes lipidiques en présence de glutathion réduit (Imai et al., 2016). Le système X_c^- membranaire est impliquée dans la régulation des réponses immunitaires, des cancers et du fonctionnement du système nerveux central (Lewerenz et al., 2013, 2018). Les mécanismes d'induction et de régulation de la ferroptose sont présentés dans la **Figure 6** (Yang and Stockwell, 2016).

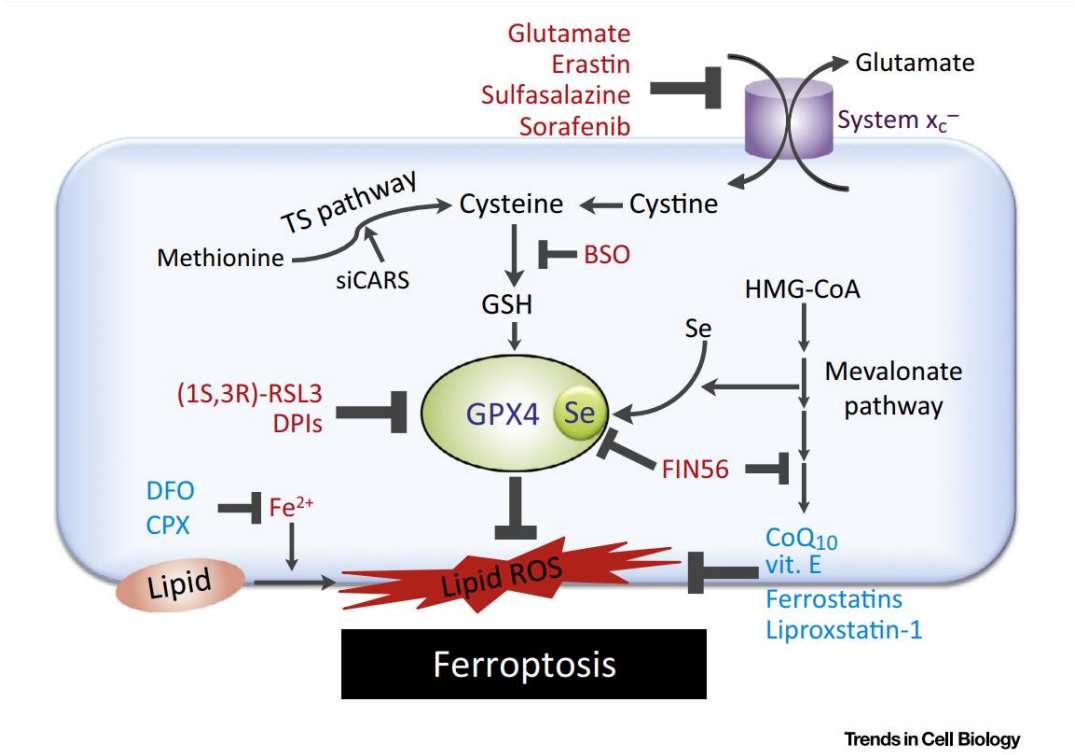


Figure 6 : La voie de mort ferroptotique et ses régulateurs. *En présence des inducteurs de la ferroptose (glutamate, érastine, sulfasalazine ou sorafénib), le système d'échange cystine/glutamate X_c^- est bloqué ce qui entraîne une diminution de la concentration en cystéine intracellulaire et de la synthèse de glutathion (GSH). Cette diminution provoque une chute de l'activité enzymatique de GPX4 dépendante du glutathion. GPX4 peut également être inhibée par des composés chimiques tels que RSL3, DPIs ou FIN56. L'inhibition de GPX4 augmente l'accumulation d'hydroperoxydes lipidiques (lipid ROS), produits par la réaction de Fenton nécessitant la disponibilité du fer libre. Cette dernière étape est cruciale dans le déclenchement de la mort ferroptotique. En conséquence, cette mort peut être inhibée par les chélateurs du fer (DFO, CPX), les antioxydants (CoQ10, vit. E) ou les inhibiteurs de la peroxydation des lipides (ferrostatin-1, liproxstatin-1).* Source : [Yang and Stockwell. *Trends Cell Biol.* 2016] (Yang and Stockwell, 2016).

1.1.5 La catastrophe mitotique

En 1986, Russell & Nurse ont décrit une mort cellulaire impliquant la perturbation de la mitose chez la levure *Schizosaccharomyces pombe* induite par une surexpression de la protéine phosphatase Cdc25 (Russell and Nurse, 1986). Cette mort cellulaire a été nommée '**la catastrophe mitotique**' et l'altération nucléaire globale en est le trait morphologique le plus caractéristique. En 2002, son étude a été étendue aux cellules de mammifères, et la participation

de la protéine kinase CDK1/cycline B (*Cyclin-Dependent Kinase 1*) a été mise en évidence (Castedo et al., 2002). En réponse à l'endommagement de l'ADN ou aux perturbations de la machinerie mitotique, les cellules sont arrêtées en mitose et subissent généralement une catastrophe mitotique suivie d'une mort cellulaire (Galluzzi et al., 2018; Kroemer et al., 2009; Okada and Mak, 2004).

Dans les cellules somatiques, la phase M du cycle cellulaire se compose de deux processus : la mitose, dans laquelle les chromatides sœurs sont alignées afin d'être séparées dans les deux cellules filles, et la 'cytokinèse', dans laquelle le cytoplasme et son contenu sont partagés entre ces deux cellules. La mitose est divisée en cinq phases essentielles : prophase, prométaphase, métaphase, anaphase et télophase. Le processus mitotique est surveillé par trois points de contrôle afin de contrôler le bon état de l'ADN (possible endommagement) et le positionnement correct des chromosomes sur la plaque métaphasique (mauvais alignement possible). Les protéines kinases essentielles impliquées dans la régulation mitotique sont : CDK1/cycline B, PLK1 (*Polo-Like Kinase 1*), AURKs (Aurora kinases), Haspine et BUBR-1 (sérine/thréonine-protéine kinase mitotique *'checkpoint'*) (Castedo et al., 2004; Feizbakhsh et al., 2017). Une surexpression de la CDK1 ou une inhibition de protéines contrôles peut conduire les cellules à entrer prématurément en mitose avec de nombreux défauts post-mitotiques non-réparés. Ceci peut induire la catastrophe mitotique qui sera suivie d'une mort cellulaire (Okada and Mak, 2004; Vitale et al., 2011).

La catastrophe mitotique aide à éliminer les défauts mitotiques irréparables qui peuvent aboutir à des instabilités génétiques, entrainant une aneuploïdie. Sa perturbation peut entraîner une division cellulaire asymétrique (la micronucléation), la génération de cellules polyploïdes (la multinucléation) ainsi que la formation de tumeurs (la tumorigenèse) et la progression tumorale (Vitale et al., 2011). L'induction de cette voie de mort constitue une nouvelle approche pour la thérapie humaine, particulièrement dans le traitement anticancéreux. Le déroulement d'une mort mitotique suivant une catastrophe mitotique et d'autres aberrations de la mitose est expliqué dans la **Figure 7**.

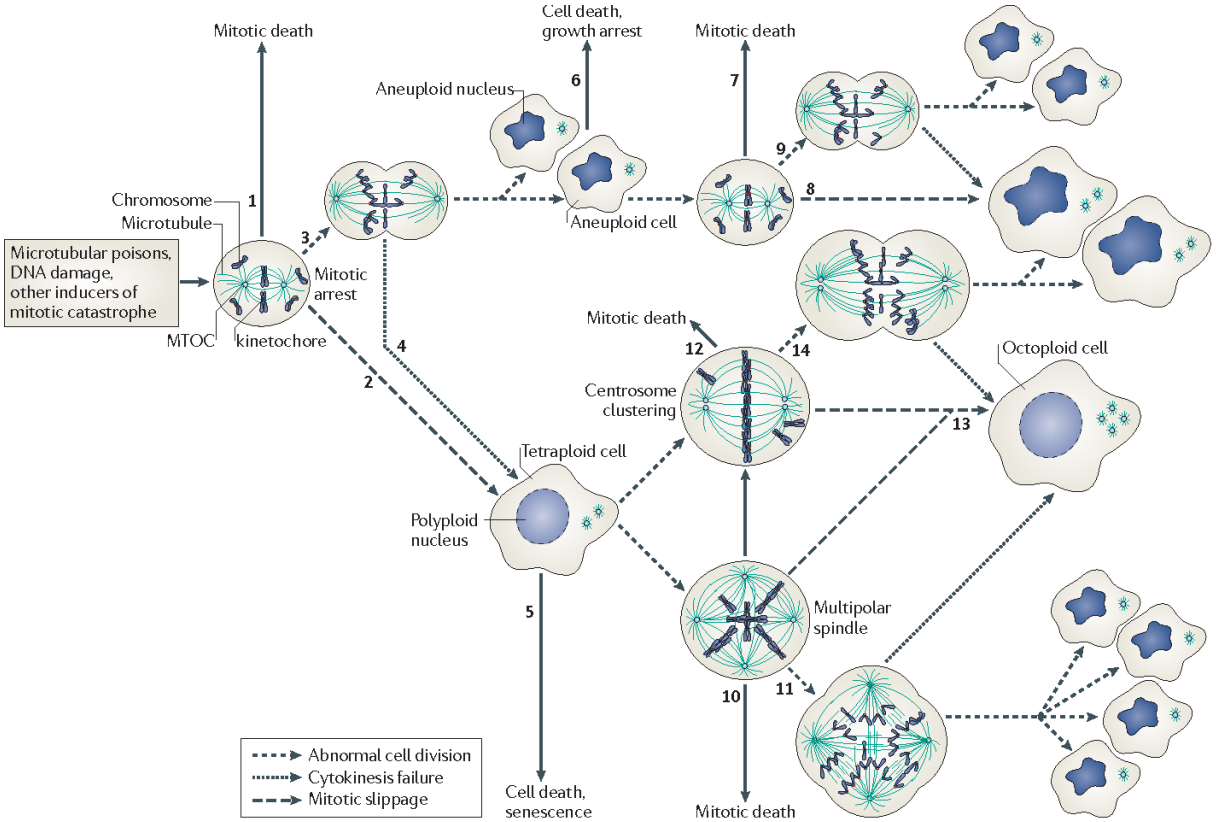


Figure 7 : Conséquences de l'échec de la mitose et la mort cellulaire suivant une catastrophe mitotique. *En réponse à l'endommagement de l'ADN ou aux perturbations de la machinerie mitotique, les cellules sont arrêtées en mitose et subissent généralement une catastrophe mitotique suivie d'une mort cellulaire (**1**). Cependant, les cellules peuvent aussi échapper à l'arrêt de la mitose en passant directement à l'interphase, un « glissement » mitotique (**2**), ou en subissant une phase de mitose aberrante (**3**). La division ne peut pas être complétée et la cytokinèse échoue (**4**), des cellules tétraploïdes sont générées, dont la plupart meurent ou deviennent sénescentes (**5**). Par contre, lors de la division aberrante (**3**), des cellules aneuploïdes potentiellement tumorigénétiques se forment, dont la plupart meurent ou subissent un arrêt de la croissance (**6**). Les autres cellules aneuploïdes progressent dans le cycle mais sont susceptibles de surbir une catastrophe mitotique au cours de la phase M suivante (**7**), un glissement mitotique (**8**) ou un autre cycle de mitose aberrante (**9**). Certaines cellules tétraploïdes prolifèrent mais sont vulnérables au programme de mort mitotique (**10**), de division multipolaire (**11**), de groupement de centrosomes suivi par une mort mitotique (**12**), un glissement mitotique (**13**) ou une mitose aberrante conduisant à la formation de cellules filles aneuploïdes (**14**).* Source : [Vitale et *al. Nature Reviews Molecular Cell Biology*. **2011**] (Vitale et al., 2011).

1.2. Rôle physiologique de la mort cellulaire programmée et mécanismes de dérégulation

La PCD qui se déroule de façon prévisible a été observée pour la première fois par Vogt en 1842, dans le système neuronal en développement d'embryons d'amphibiens (crapauds) (Vogt, 1842). De nombreuses études génétiques sur la PCD ont été réalisées sur des organismes modèles, comme le nématode (*Caenorhabditis elegans*), la drosophile (*Drosophila melanogaster*) et la souris (*Mus musculus)* (Ellis and Horvitz, 1986; Grether et al., 1995; Motoyama et al., 1995). La PCD a également été observée dans le développement des plantes et des bactéries (Greenberg, 1996; Lewis, 2000). Ces études ont permis de disséquer les mécanismes moléculaires à l'origine de la PCD de cellules spécifiques, mais aussi de mieux comprendre les différents types de voies qui régulent ces mécanismes de mort naturelle, au cours du développement de ces espèces (Clarke and Clarke, 2012; Conradt, 2009). Dans les conditions physiologiques, la PCD joue un rôle fondamental dans le maintien de l'homéostasie tissulaire et le développement des organismes (Baehrecke, 2002; Fuchs and Steller, 2011) (voir la **Figure 8**).

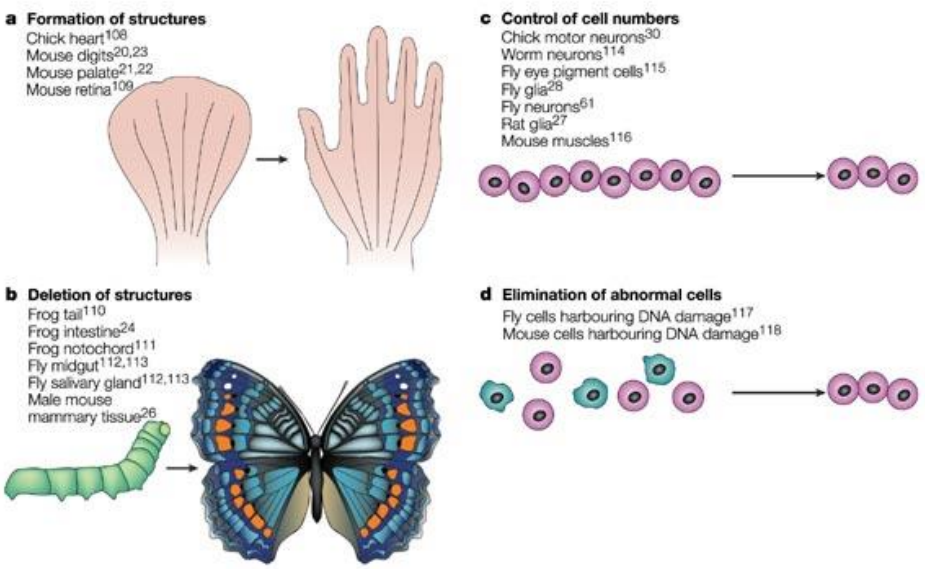


Figure 8 : Mort cellulaire programmée dans le développement. *La PCD est impliquée dans* ***(a)*** *la différenciation des doigts et des orteils d'un fœtus,* ***(b)*** *la suppression de structures larvaires d'un insecte,* ***(c)*** *le contrôle du nombre de cellules normales, et* ***(d)*** *l'élimination des cellules anormales qui hébergent des mutations.* Source : [Baehrecke et *al. Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2002**] (Baehrecke, 2002).

Parmi les différentes voies de mort cellulaires programmées certaines ont été plus particulièrement bien élucidées.

L'apoptose est un phénomène actif, intrinsèquement programmé, qui peut être initié ou inhibé par divers stimuli environnementaux, à la fois physiologiques et pathologiques (Singh, 2007). Elle est impliquée dans le renouvellement cellulaire dans de nombreux tissus adultes sains et est responsable de l'élimination basale des cellules au cours du développement embryonnaire normal. Dans un cadre médical, elle peut également être déclenchée dans certains traitements afin de provoquer des réponses immunitaires ou de lutter contre certains cancers. La pathogénicité de nombreuses maladies telles que les cancers, les maladies neurodégénératives, auto-immunes, cardiaques, infectieuses (dont le sida), est liée à des phénomènes d'apoptose aberrante (Singh, 2007). Citons par exemple, une mort cellulaire excessive ou insuffisante qui peut être induite par la perturbation de l'équilibre entre les membres, pro-apoptotiques et anti-apoptotiques (pro-survie), de la famille Bcl-2 (Singh et al., 2019).

L'autophagie agit comme un mécanisme cellulaire basal de survie en conditions de stress, en régénérant les précurseurs métaboliques de la cellule et en éliminant les débris subcellulaires (Chun and Kim, 2018). Elle peut impliquer des réarrangements cytosoliques spécifiques nécessaires à la prolifération, à la mort et à la différenciation au cours de l'embryogenèse et du développement postnatal. Ainsi, l'autophagie est largement impliquée dans les processus pathologiques tels que les cancers, les désordres métaboliques et neurodégénératifs, les maladies cardiovasculaires et pulmonaires ainsi que les maladies infectieuses (Choi et al., 2013; Saha et al., 2018). A titre d'exemple, l'autophagie est stimulée afin de fournir une protection dans certaines maladies cardiaques (Bravo-San Pedro et al., 2017) et les lésions de reperfusion ischémique (Ma et al., 2015), ou encore dans de nombreuses maladies pulmonaires (Nakahira et al., 2016; Wang et al., 2019). Dans les maladies infectieuses, elle joue un rôle direct dans l'élimination des agents pathogènes intracellulaires, comme les bactéries et les virus, et participe également à la régulation des réponses inflammatoires et immunitaires (Mawatwal et al., 2017; Tallóczy et al., 2002).

La nécroptose est particulièrement activée dans certaines conditions physiopathologiques telles que les infections, l'inflammation ou encore les ischémies (Delehouzé et al., 2017; Shan et al., 2018; Weinlich et al., 2017) (**Figure 9**). Elle joue un rôle important dans l'élimination des cellules infectées par des bactéries ou des virus. Il s'agit d'une

réponse immunitaire qui protège les cellules contre des agents pathogènes en limitant leur réplication dans l'hôte et en activant l'inflammation bénéfique (Nailwal and Chan, 2019; Zhou and Yuan, 2014). A titre d'exemple, une infection par *Salmonella Typhimurium*, *Mycobacterium tuberculosis* ou encore par un cytomégalovirus murin active la production de cytokines et déclenche la nécroptose dans les macrophages (Robinson et al., 2012; Roca and Ramakrishnan, 2013; Upton et al., 2010). Par ailleurs, les lymphocytes T CD4+, au cours d'une infection par le virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1), subissent également une nécroptose (Pan et al., 2014). Dans une revue de 2017, Kearney, C. J. & Martin, S. J. ont suggéré que, dans certaines circonstances, la nécroptose aurait un effet anti-inflammatoire, en freinant la production excessive de cytokines inflammatoires induite par le TNF-α et les TLR (Kearney and Martin, 2017). Il est à noter que le laboratoire pharmaceutique GlaxoSmithKline développe actuellement en essai clinique (phase 2) un inhibiteur sélectif de RIPK1, le GSK2982772, pour les traitements du psoriasis et de la colite ulcéreuse (données extraites du site Clinicaltrials.gov).

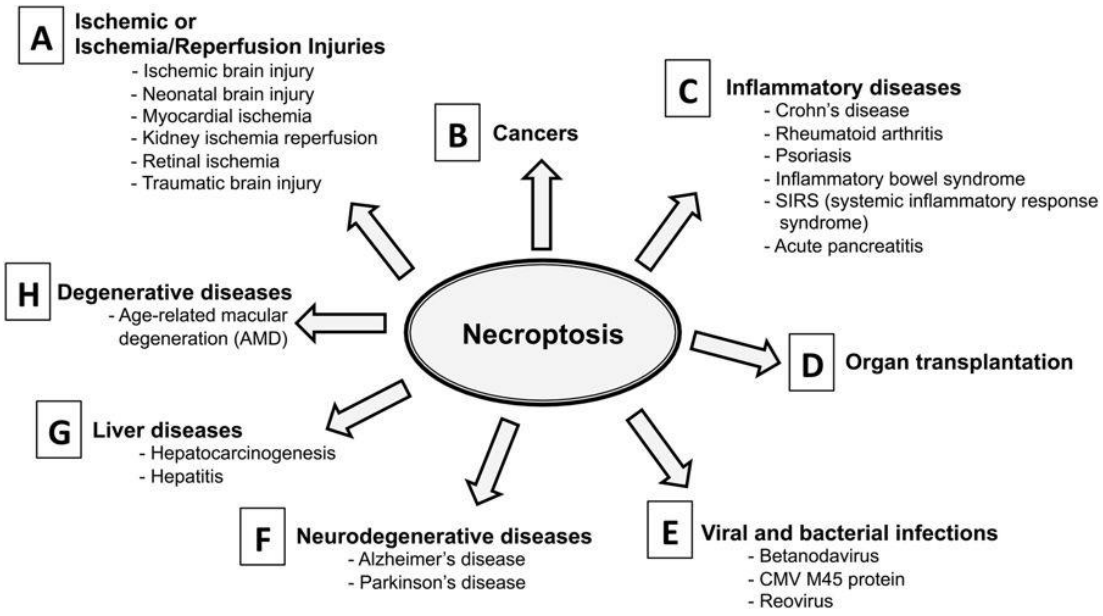


Figure 9 : Implication de la nécroptose dans des pathologies humaines. Source : [Delehouzé. *Scientific Reports* **2017**] (Delehouzé et al., 2017).

La ferroptose est caractérisée par l'accumulation fer-dépendante d'hydroperoxydes lipidiques (Dixon et al., 2012; Yang and Stockwell, 2016). Le rôle de cette voie de mort au cours du développement des organismes est souvent mal connu. Dans les conditions pathologiques, bien qu'elle ait été identifiée pour la première fois dans les cellules cancéreuses

(Dolma et al., 2003), la ferroptose a des implications significatives dans plusieurs maladies neurologiques, telles que les accidents ischémiques et hémorragiques, la maladie d'Alzheimer et la maladie de Parkinson (Magtanong and Dixon, 2019; Weiland et al., 2019). Elle joue un rôle crucial dans l'initiation et le développement de ces maladies. Dans un contexte thérapeutique, l'inhibition de la ferroptose pourrait donc contribuer à améliorer le pronostic de la maladie (Angeli et al., 2017; Cong et al., 2019).

La catastrophe mitotique est provoquée par une cascade de signalisation complexe et encore mal comprise, mais d'un point de vue fonctionnel, elle peut être définie comme un mécanisme oncosuppresseur qui précède l'apoptose, la nécrose ou la sénescence (Vitale et al., 2011). La perturbation de la catastrophe mitotique accélère donc la tumorigenèse et la progression du cancer. Son induction constitue donc un objectif thérapeutique (Mc Gee, 2015; Zhang et al., 2019).

1.3. Mort cellulaire programmée dans les pathologies humaines

Dans cette partie, nous nous intéresserons plus spécifiquement aux voies de mort cellulaire principales, associées à deux sortes de pathologies humaines : les cancers et les maladies neurodégénératives. Cette partie ne se voulant pas exhaustive, il est à noter que d'autres voies de PCD sont aussi impliquées dans différents processus pathologiques mais ne seront pas présentées ici, telle que la pyroptose, voie pro-inflammatoire aux multiples implications pathologiques incluant la maladie d'Alzheimer, le cancer ou encore le sida (Cookson and Brennan, 2001; Haque et al., 2016; Kantono and Guo, 2017; Tan et al., 2014).

1.3.1 Exemple dans le cancer

Tumorigenèse et métastases

Le cancer est une des principales causes de mortalité chez l'homme, avec 17,08 % du nombre total de décès en 2017 (Ritchie and Roser, 2018). Il y a plus de cent types de cancer affectant différents organes, tels que les poumons, les organes digestifs et urogénitaux, ou encore la peau. Lorsque des modifications génétiques interfèrent sur l'équilibre entre la division, la mort et la différentiation des cellules, celles-ci commencent alors à se développer de manière incontrôlable (Hanahan and Weinberg, 2000). Ces cellules cancéreuses peuvent se structurer afin de former une tumeur (*sarcome* et *carcinome*). Certains types de cancer ne

forment pas de tumeur. C'est notamment le cas des *leucémies*, des *lymphomes* et des *myélomes* (Clark, 1995; Hanahan and Weinberg, 2000). Une tumeur est généralement caractérisée par : 1) le maintien de la croissance cellulaire, 2) la résistance à la mort cellulaire, 3) l'induction de l'angiogenèse, 4) l'invasion et 5) les métastases (Hanahan and Weinberg, 2011; Labi and Erlacher, 2015). L'« Encyclopédie du Cancer », troisième édition (2018), fournit un aperçu complet et actualisé des multiples facettes de la maladie.

La métastase, processus par lequel le cancer se propage d'un site primaire à un site secondaire, est responsable de la majorité des décès liés au cancer (Welch and Hurst, 2019). Une tumeur est dite *maligne* si, après son apparition, elle se propage à d'autres parties du corps, ou *bénigne*, si elle ne se propage pas. La métastase est une caractéristique essentielle de la progression et de l'agressivité d'un cancer. Elle implique de nombreux facteurs, notamment la dégradation de la matrice extracellulaire (ECM), la transition épithéliale-mésenchymateuse (EMT), l'angiogenèse tumorale, le développement d'un microenvironnement tumoral inflammatoire et des anomalies du programme de mort cellulaire. Le processus métastatique se déroule en cinq étapes : invasion, intravasation, dissémination, extravasation et colonisation. La dernière étape de colonisation conduit à un faible taux de métastases (seulement environ 0,01%). Cette inefficacité pourrait être liée à l'activation des mécanismes de PCD par divers stress, avant ou après que les cellules aient atteint un nouvel environnement. La PCD, telles que l'apoptose, l'autophagie et la nécroptose, jouerait donc un rôle crucial dans le contrôle du processus métastatique (Su et al., 2015). Les cellules tumorales malignes doivent surmonter ces différentes formes de PCD pour métastaser. La compréhension des mécanismes de PCD nous permettrait de réguler le développement de métastases dans le traitement anticancéreux (Steeg and Theodorescu, 2008; Welch and Hurst, 2019).

La mort cellulaire programmée dans le cancer

Au cours de ces dernières décennies, la recherche fondamentale a conduit à des progrès remarquables dans notre compréhension de la biologie et de la génétique du cancer. Les rôles de trois mécanismes majeurs ont ainsi été soulignés : l'apoptose, l'autophagie et la nécroptose.

L'une des avancées des plus importantes est la prise de conscience que **l'apoptose**, et les gènes qui la contrôlent, ont un effet crucial sur le phénotype malin (Wong, 2011) (**Figure 10**). L'apoptose peut bloquer la métastase en tuant les cellules métastatiques. En outre, le détachement de cellules malignes de la matrice extracellulaire induit un type d'apoptose appelé

l'anoïkis. Ce sont les deux processus les plus importants pour limiter les métastases. En arrivant au site secondaire, les cellules malignes doivent devenir inactives, en phase dite « dormante », afin de survivre à la destruction dépendante des lymphocytes cytotoxiques et à des conditions environnementales défavorables. Les mutations génétiques ou les conditions du microenvironnement tumoral peuvent conduire les cellules à sortir de la dormance et à passer à un état anti-apoptotique et hautement prolifératif (Su et al., 2015). Dans un contexte thérapeutique, plusieurs études précliniques soulignent que la perturbation de l'apoptose, par mutation d'oncogène, peut favoriser la genèse de la tumeur et sa résistance au traitement. En effet, la surexpression/activation des protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 ou la sous-expression/inhibition de la p53 (*tumor suppressor*) donnent aux cellules cancéreuses une capacité de résistance à l'apoptose (Letai, 2017; Lowe and Lin, 2000; Zörnig et al., 2001).

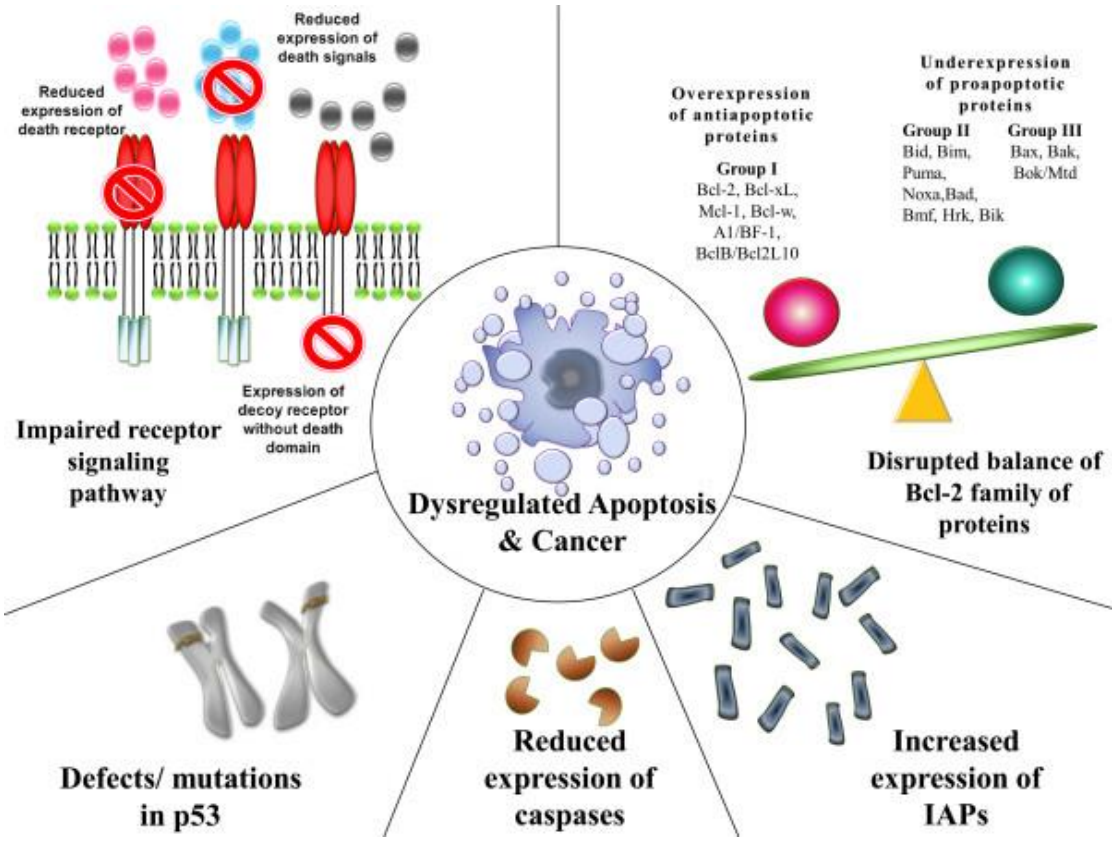


Figure 10 : Mécanismes contribuant à la dérégulation de l'apoptose et à la cancérogenèse. *Un cancer est le résultat d'un processus de changement génétique par lequel les cellules normales se transforment en cellules malignes capables d'échapper à l'apoptose. Il y a trois mécanismes principaux contribuant à la dérégulation de l'apoptose : [1] la perturbation de signalisation de récepteurs de mort (la voie extrinsèque), [2] la perturbation de la balance entre les protéines pro-apoptotiques et anti-apoptotiques (la voie intrinsèque) et*

[3] la diminution de la fonction des caspases (les deux voies). En outre, la sous-expression de p53 et la surexpression des IAPs peuvent donner aux cellules cancéreuses une capacité de résistance à l'apoptose. Source : [Wong. *J Exp Clin Cancer Res* **2011**] (Wong, 2011).

L'autophagie peut prévenir la tumorigenèse, en agissant comme suppresseur de tumeur (Cordani et al., 2017), mais peut aussi favoriser la survie et la croissance des cellules tumorales (Liao et al., 2018). Les cellules tumorales activent l'autophagie en réponse au stress cellulaire et à l'augmentation de la demande métabolique liée à la prolifération cellulaire rapide (Lin and Baehrecke, 2015; Yang et al., 2011). La perte monoallélique du gène essentiel de l'autophagie, Beclin 1, a été observée dans 40% à 75% des cancers du sein, de la prostate et des ovaires (Qu et al., 2003). Dans un contexte de métastase, l'autophagie peut inhiber les métastases en favorisant les réponses inflammatoires antitumorales ou en limitant l'expansion des cellules tumorales dormantes dans les macrométastases (*macrométastase* : métastase visible à l'œil nu). À l'inverse, l'autophagie peut favoriser la formation de métastases en améliorant l'aptitude des cellules tumorales à réagir aux stress environnementaux, tels que l'anoïkis, au cours de la progression métastatique. L'autophagie peut donc remplir des fonctions prométastatiques et antimétastatiques selon les contraintes environnementales imposées aux cellules tumorales tout au long du processus métastatique (Kenific et al., 2010).

Récemment, de nombreuses études sur la progression du cancer ont montré que **la nécroptose** présente, tout comme l'autophagie, à la fois des effets pro- et anti-tumoraux (Qin et al., 2019; Wang et al., 2017). Elle contribue à la mort des cellules cancéreuses mais favorise également la prolifération et les métastases. Ainsi, la nécroptose favorise l'inflammation qui alimente la croissance de la tumeur et contribue au phénotype métastatique. De plus, en détruisant les cellules endothéliales par nécroptose, les cellules tumorales passent au travers des vaisseaux sanguins par extravasation et génèrent ainsi des métastases, à distance de la tumeur primaire. En outre, la nécroptose stimule les cellules T CD8+ nécessaires à la défense immunitaire contre les cellules cancéreuses (Najafov et al., 2017). Au niveau génétique, une surexpression de TNF-α dans le microenvironnement tumoral est observée dans de nombreuses tumeurs malignes et est associée à un mauvais pronostic. Par ailleurs, la perte de l'expression de RIPK3 et de MLKL dans de nombreux cancers, aboutit à un défaut de nécroptose. Une publication issue du journal *Cell Research* en 2015 a montré que dans une majorité (> 65 %) des lignées explorées (60+), l'expression de RIPK3 est quasiment inexistante. Cette absence de

RIPK3 limite la réponse des cellules à la mort cellulaire nécrotique. L'expression de RIPK3 est restaurée en utilisant des agents hypométhylants comme la décitabine (5-AD) (Koo et al., 2015).

L'interaction entre différents types de mort cellulaire programmée et la métastase cancéreuse est montrée dans la **Figure 11**.

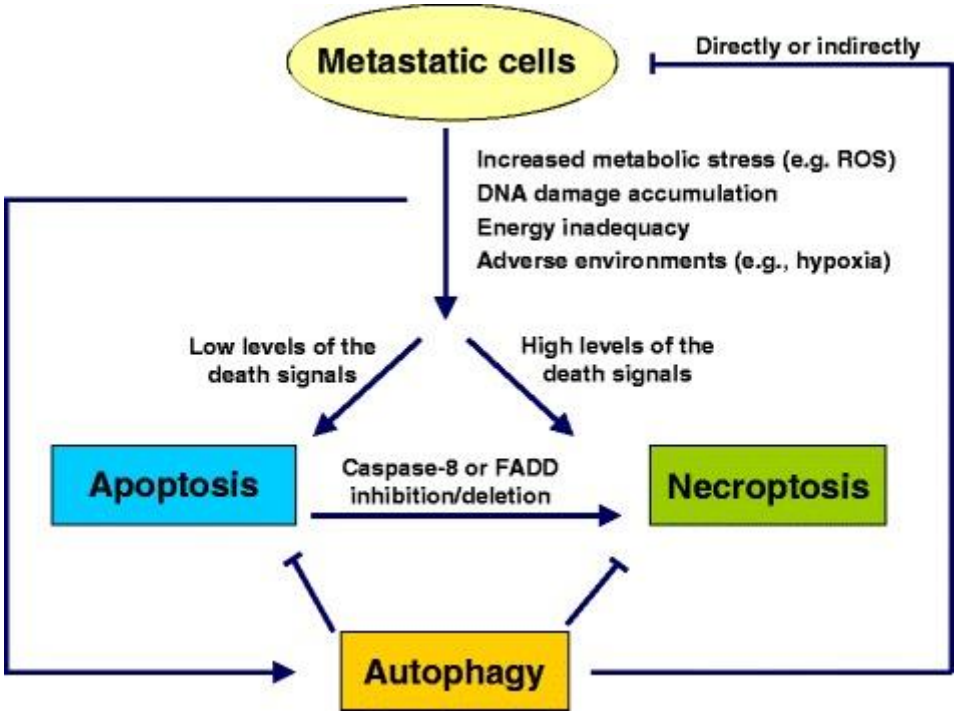


Figure 11 : Interaction entre différents types de PCD et la métastase cancéreuse. *Les cellules métastatiques doivent faire face à de nombreuses conditions défavorables, notamment le détachement de l'ECM, l'attaque des cellules immunitaires, l'hypoxie ou un environnement dépourvu de facteurs de croissance, entraînant une augmentation de la production de ROS cellulaires, des dommages à l'ADN et un statut énergétique insuffisant. Les faibles niveaux de signaux de mort stimulent l'apoptose, alors que les niveaux élevés de signaux de mort entraînent souvent la nécroptose. Ces mécanismes de mort inhibent la métastase de façon efficace. Par contre, l'autophagie présente des effets opposés : [1] d'une part, l'autophagie améliore l'aptitude des cellules métastatiques dans des conditions stressantes, à contrecarrer l'apoptose et la nécroptose ; [2] d'autre part, l'autophagie réduit la métastase en limitant la nécrose tumorale et en empêchant l'infiltration de cellules immunitaires inflammatoires ; et de plus, [3] l'autophagie induit la mort des cellules métastasées.* Source : [Su et *al. Molecular Cancer* **2015**] (Su et al., 2015).

1.3.2 Exemple dans les troubles neurodégénératifs

Les troubles neurodégénératifs

Les troubles neurologiques, telles que les maladies neurodégénératives, les lésions cérébrales ou encore les accidents vasculaires cérébraux, sont la deuxième cause de décès (après les maladies cardiaques), avec 16,5 % du nombre total de décès de 1990 à 2016 (Carroll, 2019). Les maladies neurodégénératives se manifestent par une perte progressive de la fonction neuronale, et peuvent être d'origine héréditaire, comme la maladie de Huntington (MH), ou apparaître avec l'âge de façon sporadique, comme la maladie d'Alzheimer (MA) et la maladie de Parkinson (MP). La perte neuronale est associée à une accumulation, extra- ou intracellulaire, de protéines mal repliées (protéinopathies neurodégénératives) (Forman et al., 2004; Jellinger, 2009). Les principaux mécanismes impliqués font intervenir des perturbations du système ubiquitine-protéasome-autophagie, des mitochondries, de l'appareil de Golgi neuronal, du transport axonal et un dysfonctionnement des neurotrophines (des protéines essentielles pour la survie et la différenciation des neurones). Un stress oxydatif et des processus neuroinflammatoires sont également impliqués dans la perte neuronale (Bredesen et al., 2006; Jellinger, 2010). Ces mécanismes interdépendants conduisent à la mort des cellules neuronales dans les maladies neurodégénératives chroniques (Sahab and Shah, 2018).

La maladie d'Alzheimer (MA) est une maladie neurodégénérative commune et dévastatrice chez les personnes de plus de 60 ans. Elle se caractérise cliniquement par une perte de mémoire progressive et un dysfonctionnement cognitif, entraînant une démence sévère (Blennow et al., 2006). La pathologie de la MA comprend 1) la perte de neurones pyramidaux de moyenne et grande taille dans les régions de l'hippocampe, 2) la présence de plaques extracellulaires contenant des filaments amyloïdes (Aβ) et 3) des enchevêtrements neurofibrillaires intracellulaires composés de la protéine Tau hyperphosphorylée. Il a été montré que des mutations génétiques, au niveau des protéines associées au métabolisme des Aβ, sensibilisent les neurones à la mort (Ulep et al., 2018).

La maladie de Parkinson (MP) est la deuxième maladie neurodégénérative la plus répandue, elle touche principalement les personnes de plus de 55 ans (Dauer and Przedborski, 2003). Pathologiquement, elle se caractérise par la dégénérescence de neurones dopaminergiques dans la *substantia nigra* et par la présence d'inclusions intracytoplasmiques éosinophiles (corps de Lewy) dans les neurones survivants. Cela entraîne une diminution en

dopamine dans le striatum, qui est la cause directe des signes cliniques de bradykinésie, de tremblements au repos et de rigidité. La MP est un bon exemple de maladie neurodégénérative dans laquelle la perte de cellules neuronales (environ 50-60% des neurones dopaminergiques) est directement responsable des caractéristiques cliniques observées (Beitz, 2014).

La maladie de Huntington (MH) est un désordre lié à l'accumulation de fragments toxiques de la Huntingtine mutée (ou mHtt) par répétitions de résidus glutamine (polyQ). Le symptôme clinique principal est la survenue de mouvements involontaires généralisés, conséquence de la perte sélective des neurones épineux moyens dans le striatum (McColgan and Tabrizi, 2018).

La mort neuronale dans les maladies neurodégénératives

Bien qu'il ait été montré que les neurones meurent dans les maladies neurodégénératives, le type de mort cellulaire est souvent mal connu. Les preuves de la mort neuronale dans ces maladies sont difficiles à rassembler à cause : 1) de la nature prolongée de la plupart des maladies neurodégénératives, dont seulement une petite portion des cellules est en train de mourir à un moment donné, 2) de la complexité de la mort cellulaire neuronale qui est le résultat de plusieurs mécanismes et 3) du manque de marqueurs spécifiques pour détecter une mort neuronale (Gorman, 2008). Cependant, de plus en plus d'études montrent que les cellules neuronales peuvent mourir de différentes manières, notamment par apoptose, nécrose, autophagie, ferroptose et d'autres voies de mort (Fricker et al., 2018). L'utilisation combinée de modèles *in vitro* et de nouvelles techniques analytiques permet de caractériser les voies de la mort neuronale et leurs implications dans les maladies neurodégénératives (Jellinger, 2010; Ostapchenko et al., 2019). Ces voies de mort cellulaire impliquent notamment les agrégats des protéines cruciales telles que : la protéine Tau, le peptide amyloïde bêta, l'alpha-synucléine et l'huntingtine (Chi et al., 2018). Bien que la mort cellulaire elle-même puisse survenir relativement tard au cours du processus dégénératif, les médiateurs des voies de mort cellulaire sous-jacents se sont révélés prometteurs comme cibles thérapeutiques potentielles.

L'apoptose est nécessaire à la formation du système nerveux au cours du développement. Cependant, si elle est déclenchée dans le système nerveux adulte, elle conduira à une maladie neurodégénérative. Les analyses de la fragmentation de l'ADN et de l'activation de caspases dans le tissu cérébral post-mortem indiquent que l'apoptose neuronale se produit dans les maladies neurodégénératives (Dragunow et al., 1995; Rohn et al., 2001). Récemment,

le développement d'un biomarqueur ciblé par la caspase-3, permet la détection précoce de ces maladies, y compris la MA, *in vivo* et *ex vivo* dans le cerveau de modèles murins (Ostapchenko et al., 2019). L'apoptose, plus que la nécrose, est considérée comme le mécanisme dominant de la neurodégénérescence dans la MP. En outre, dans un modèle cellulaire de MP, l'apoptose est déclenchée par la voie intrinsèque caspase-indépendante. Diverses mutations génétiques, notamment sur le gène PARK2 qui code pour la protéine Parkin, constituent des facteurs de risque important pour la MP (Ghavami et al., 2014). Les preuves de l'activation de caspases dans les cerveaux MH impliquent le rôle de l'apoptose dans cette maladie. De façon intéressante, la Htt elle-même est un substrat pour les caspases (caspase-6, par exemple), générant des fragments toxiques de mHtt. Par ailleurs, l'excitotoxicité induite par les récepteurs NMDA du glutamate, la translocation de la kinase InsP6K2 du noyau vers le cytoplasme sous l'effet d'un stress, et l'interaction de la protéine HIP-1 avec la mHtt et la HIPPI, sont les facteurs qui induisent l'apoptose caspase-dépendante ou caspase-indépendant dans la MH (Ghavami et al., 2014).

L'autophagie est une voie conservée dans les cellules vivantes qui transmet le contenu cytoplasmique au lysosome en vue de sa dégradation. Elle joue un rôle crucial dans la physiopathologie des maladies neurodégénératives (Bar-Yosef et al., 2019; Fujikake et al., 2018; Moloudizargari et al., 2017; Puyal et al., 2012). Par l'élimination des protéines toxiques, elle agit comme un neuroprotecteur dans ces maladies (Rubinsztein, 2006; Zheng et al., 2010). De nombreuses études ont montré une accumulation de vacuoles autophagiques dans le cerveau de MA, de PD et de HD (Boland et al., 2008; Levine and Kroemer, 2008). L'autophagie étant essentielle à la survie neuronale, sa dérégulation peut conduire à une neurodégénérescence (Cheung and Ip, 2011; Son et al., 2012). Des études en microscopie électronique réalisées sur des modèles murins de la MA ont montré une stimulation de l'autophagie suite à 1) une augmentation de formation d'autophagosomes qui s'accompagne d'une production importante de peptides amyloïde-β (Aβ), et à 2) une altération de la clairance des vacuoles autophagiques qui pourrait contribuer à l'accumulation de vacuoles autophagiques dans le cerveau atteint de la MA (Boland et al., 2008; Nixon et al., 2005; Yu et al., 2005). Par ailleurs, une inhibition de l'autophagie augmente l'agrégation et la toxicité de la protéine Tau (Wang et al., 2009). Dans la MP, l'autophagie est impliquée dans la clairance de l'α-synucléine (Spencer et al., 2009). L'inhibition de ce processus entraîne une formation d'inclusions contenant de l'α-syn dans les neurones (Sato et al., 2018). En outre, les mutations de Parkin et de PINK1 sont associées à un ciblage défectueux des mitochondries endommagées sur la voie de la mitophagie

(Lynch-Day et al., 2012). Bien que l'autophagie joue un rôle protecteur dans la MP, elle peut entraîner une perte de cellules (Karabiyik et al., 2017; Lynch-Day et al., 2012). Dans le cas de la MH, l'expression des protéines mHtt est associée à une mauvaise reconnaissance des transporteurs cargos et à une diminution de la fusion entre les autophagosomes et les lysosomes, conduisant à une accumulation de substances toxiques et d'autophagosomes vides dans le cytoplasme (Croce and Yamamoto, 2019; Martin et al., 2015).

L'utilisation d'un inhibiteur « modèle » de RIPK1, la nécrostatine-1 (Nec-1), a montré l'implication de la nécroptose dans divers modèles de maladies neurodégénératives. En effet, la Nec-1 a amélioré le comportement neurologique des souris et la survie des cellules neuronales, traitées à l'aluminium (Al) (Qinli et al., 2013). De plus, la Nec-1 a atténué la déficience cognitive avec une réduction des anomalies d'Aβ et de Tau dans le modèle de souris APP/PS1, un modèle de MA, qui exprime la protéine précurseur d'amyloïde humain (APP) et la protéine préséniline 1 (PS1) mutantes, provoquant la formation précoce de plaques amyloïdes (Yang et al., 2017). Citons un autre exemple : la Nec-1 a la capacité de bloquer la nécroptose et protège les neurones dopaminergiques dans certains modèles de MP, tels que les cellules neuronales murines PC12 traitées par 6-hydroxydopamine (6-OHDA) ou des souris traitées par 1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine (MPTP) (Iannielli et al., 2018; Wu et al., 2015). En ce qui concerne la MH, la Nec-1 augmente la survie des cellules ST14A 8plx, exprimant de manière stable la mHtt, et atténue les symptômes de la MH chez la souris transgénique R6/2, qui exprime l'exon 1 du gène mHtt humain (Zhu et al., 2011).

D'autres formes de mort cellulaire, telles que la ferroptose et la catastrophe mitotiques, sont également étudiées au niveau des neurones, pour déterminer leur rôle dans les maladies neurodégénératives. La localisation cytoplasmique aberrante de l'histone H3 phosphorylée indique une catastrophe mitotique qui conduit à un dysfonctionnement neuronal et à une neurodégénérescence dans la MA (Ogawa et al., 2003). Les perturbations de l'homéostasie du fer et de l'accumulation de fer sont présentes dans plusieurs troubles neurodégénératifs, dont la MA et la MP. Des chélateurs du fer ou des agents anti-ferroptotiques peuvent être des produits neurothérapeutiques (Masaldan et al., 2019).

La **Figure 12** présente certains mécanismes de mort cellulaire neuronale.

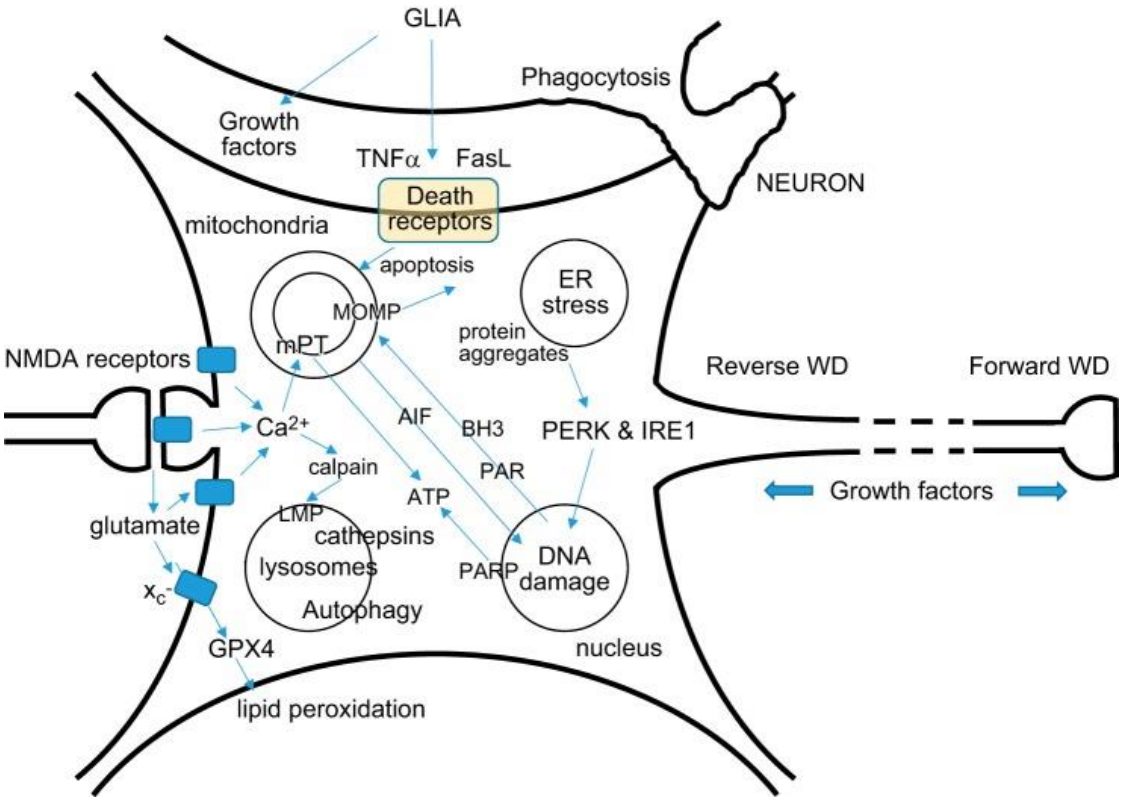


Figure 12 : Représentation schématique des principaux mécanismes impliqués dans la mort neuronale. Source : [Fricker et *al. Physiological Reviews* **2018**] (Fricker et al., 2018).

1.3.3 Modulation chimique des voies de mort cellulaire programmée comme nouvelles approches thérapeutiques

Comme vu précédemment, la PCD joue un rôle physiologique crucial dans le développement des êtres vivants. A l'opposé, une dérégulation des voies de cette mort peut causer le cancer, des désordres pathologiques tels que les maladies auto-immunes et les maladies neurodégénératives. Les outils génétiques et les inhibiteurs chimiques sont utilisés afin de comprendre la régulation au niveau moléculaire de ces voies. En outre, ces inhibiteurs peuvent également être utilisés en thérapie humaine afin de moduler cette mort en conditions pathologiques (Dong et al., 2015).

Ainsi, l'objectif d'une modulation chimique de la mort cellulaire est : (i) d'induire ou (ii) d'inhiber la mort cellulaire dans les conditions pathologiques.

(i) L'induction de la mort cellulaire des cellules cancéreuses, particulièrement sur les lignées résistantes à l'apoptose, est devenue un objectif de la thérapie anticancéreuse.

La plupart des traitements anticancéreux se concentrent sur l'induction sélective de l'apoptose et des réseaux de mort cellulaire associés, pour éliminer les cellules malignes (Hassan et al., 2014). Cependant, dans le cancer, la signalisation apoptotique dérégulée, en particulier l'activation d'un système anti-apoptotique, permet aux cellules cancéreuses d'échapper à ce programme. Cela entraîne une prolifération incontrôlée, conduisant à la survie tumorale, à la résistance thérapeutique et à la récurrence du cancer (Hanahan and Weinberg, 2000). Cette résistance est un phénomène complexe qui résulte des interactions de différentes molécules et voies de signalisation (Baguley, 2010). Par ailleurs, la thérapie anticancéreuse rencontre d'autres obstacles comme la susceptibilité différente entre les cellules tumorales et les tumeurs, ou l'interconnexion entre les voies de mort cellulaire. La conception de nouvelles stratégies anticancéreuses efficaces est nécessaire pour vaincre la résistance à l'apoptose et améliorer les résultats thérapeutiques chez les patients atteints de cancer. Différentes stratégies thérapeutiques sont possibles : 1) utiliser des agents pour sensibiliser des cellules cancéreuses à la PCD, 2) utiliser des traitements ciblant de multiples voies de mort cellulaire, et 3) utiliser des combinaisons de traitements afin de créer un effet synergique (interventions chirurgicales, chimio-thérapeutiques, radio-thérapeutiques, immuno-thérapeutiques) (Dominguez-Brauer et al., 2015; Galluzzi et al., 2011; Hassan et al., 2014; Hu et al., 2007; Mohammad et al., 2015; Mou et al., 2019; Su et al., 2016).

Les agents anticancéreux, qui provoquent l'apoptose, les plus couramment utilisés en clinique sont : le 5-fluorouracile (5-FU), des vinca-alcaloïdes, des taxanes et le cisplatine (Hassan et al., 2014). De nouvelles stratégies ciblant l'apoptose sont en cours de développement afin de trouver une thérapie moins toxique et moins mutagène que les précédentes. Citons par exemple : [1] l'inhibition des activités anti-apoptotiques (en ciblant les membres anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2, la voie NF-κB et la voie PI3K/Akt); [2] la restauration des activités pro-apoptotiques (en ciblant la p53) ; ou encore [3] la sélection, chez les cellules cancéreuses, de cibles stimulant la mort cellulaire (des récepteurs de mort, le cycle cellulaire, le système de réparation de l'ADN et les protéines chaperonnes de choc thermique) (Galluzzi et al., 2011; Hassan et al., 2014; Mohammad et al., 2015; Wang and Liu, 2019; Yang et al., 2018) (**Tableau 3**).

En ce qui concerne l'autophagie, bien qu'elle soit un mécanisme de suppression de la tumeur, elle confère également une tolérance au stress qui permet aux cellules tumorales de survivre dans des conditions défavorables (Yang et al., 2011). Ainsi, deux types de modulateurs

de l'autophagie sont utilisés en thérapie anticancéreuse : les inducteurs et les inhibiteurs (Bishop and Bradshaw, 2018; Fulda, 2017; Marinković et al., 2018; Mulcahy Levy et al., 2017; Thorburn et al., 2014) (**Tableau 3**). De nombreuses études ont montré que l'inactivation génétique ou l'inhibition pharmacologique de l'autophagie, induites par divers médicaments anticancéreux dans des modèles précliniques, peuvent favoriser la mort des cellules tumorales (Marinković et al., 2018; Mulcahy Levy et al., 2017; Thorburn et al., 2014). De nombreuses combinaisons thérapeutiques liées à l'inhibition de la voie autophagique sont également utilisées pour traiter les cancers (Marinković et al., 2018). En conclusion, la thérapie par la voie autophagique doit être utilisée avec une grande prudence, l'autophagie est qualifiée « d'épée à double tranchant » (Bishop and Bradshaw, 2018).

D'autre part, certaines thérapies anticancéreuses associées à la nécroptose sont étudiées au stade clinique et préclinique (Gong et al., 2019)(**Tableau 3**). L'induction de la nécroptose peut induire des réponses immunitaires anti-tumorales (Meng et al., 2016; Snyder et al., 2019). Cependant, l'immunogénicité des cellules nécroptotiques peut favoriser la métastase (Strilic et al., 2016) et conduire au développement de maladies inflammatoires chroniques (Weinlich et al., 2017). L'application thérapeutique de la nécroptose demande donc une grande prudence en regardant à la fois les avantages et les inconvénients de cette voie de mort (Qin et al., 2019; Wang et al., 2017).

La ferroptose peut conduire à des nouveaux traitements contre le cancer. En effet, certaines lignées cellulaires cancéreuses semblent être sensibles à la ferroptose, telles que les cellules cancéreuses du rein et les cellules leucémiques (Yang et al., 2014). D'autre part, sur certaines lignées cellulaires, l'utilisation d'inducteurs de la ferroptose, comme l'érastine, peut améliorer l'effet thérapeutique d'autres agents tels que le temozolomide ou le cisplatine (Chen et al., 2015; Yu et al., 2017). D'autres inducteurs de la ferroptose sont présentés dans le **Tableau 3** (Mou et al., 2019). Récemment, certaines études ont montré que le co-traitement avec l'acide docosahexaénoïque DHA, un acide gras oméga-3 polyinsaturé (PUFAs, *polyunsaturated fatty acids*,), donnent aussi un effet adjuvant qui peut améliorer l'efficacité de médicaments anticancéreux par la voie ferroptotique (Bougnoux et al., 2009; Du et al., 2019; Newell et al., 2017; Park and Kim, 2017; Siddiqui et al., 2011; Vaughan et al., 2013).

Les agents anticancéreux déclenchant la catastrophe mitotique sont divisés en deux groupes essentiels : 1) les modulateurs de la dynamique des microtubules, regroupant les inhibiteurs de la polymérisation de la tubuline et les agents stabilisants des microtubules ; et 2)

les modulateurs des protéines mitotiques (Dominguez-Brauer et al., 2015; Mc Gee, 2015) (**Tableau 3**). Le premier groupe montre des activités anticancéreuses impressionnantes *in vitro*, mais il présente également des limites pour son utilisation en clinique à cause de sa forte toxicité chez les patients (Dumontet and Jordan, 2010). De ce fait, le second groupe des inducteurs de catastrophe mitotique, qui cible spécifiquement des protéines mitotiques, est en cours d'évaluation préclinique et clinique (Hussain et al., 2018; Huszar et al., 2009; Liu, 2015; Peyressatre et al., 2015; Qiu et al., 2018; Tang et al., 2017; Xiao and Li, 2015; Zhang et al., 2014). Ce groupe d'inhibiteurs pourrait permettre de développer des anticancéreux plus efficaces et moins toxiques, que ceux issus du premier groupe.

Tableau 3 : Agents chimio-thérapeutiques anticancéreux qui déclenchent la PCD en essais clinique et préclinique.

Voie de mort cellulaire	Classe	Agent
Apoptose	Agents traditionnels	5-Fluorouracil (5-FU), agents anti-microtubules (alcaloïdes Vinca, taxanes), ciplastin
	Modulateurs de membres de la famille Bcl-2	Inhibiteurs de Bcl-2, inhibiteurs de Mcl-1, mimétiques de BH3, corticostéroïdes, inhibiteurs de HDAC, inhibiteurs d'IAPs
	Inhibiteurs du protéasome	Bortézomib, EGCG
	Inhibiteurs de mTOR	Rapamycine, apigénine
	Inhibiteurs de CRM1/XPO1	SINEs (SINE KPT-330 ou selinexor)
	Agents sensibilisant aux récepteurs de mort	ABT-373, CDDO, TRAIL
	Agents endommageant l'ADN	Cyclophosphamide, hydroxychavicol, mitomycine c
	Inhibiteurs de la topoisomérase I	Camptothécine, étoposide, mitoxantrone
	Inhibiteurs de Hsp90	Geldanamycine, tanespimycin, ganetespib, gamitrinibs
	Inhibiteurs de kinases	Erlotinib, gefitinib
	Anticorps monoclonaux	Bevacizumab, cetuximab, trastuzumab
	Molécules naturelles	EGCG, resvératrol, curcumin, quercetin, Isothiocyanates, molécules naturelles marines
Autophagie	Inhibiteurs lysosomaux	Chloroquine (CQ), hydroxychloroquine (HCQ), 3-MA
	Inhibiteurs de la voie PI3K/Akt/mTOR	Rapamycine, temsirolimus, évérolimus, deforolimus, sorafenib, dactolisib
	Combinaisons des agents	HCQ + gemcitabine/abraxane/ capecitabine/ixabepilone/sorafenib/erlotinib, HCQ + gemcitabine + nab-paclitaxel, gemcitabine + nab-paclitaxel + HCQ +/− avelumab, CQ + taxane/5-FU/erlotinib/vorinostat/bortézomib/ SIRPαD1-Fc/imatinib/acide valproïque/sorafenib/ sunitinib/vandetanib/bevacizumab, CQ + gefitinib + cisplatin, 3-MA + 5-FU/imatinib, Imipramine + ticlopidine

	Inducteurs de l'autophagie	Témozolomide, mimétiques de BH3, obatoclax, tétrahydrocannabinol, inhibiteurs de HDAC
Nécroptose	Activateurs de RIPKs ou MLKL, d'origine naturelle	Shikonine, staurosporine, resibufogénine, néoalbaconol
	Inhibiteurs de protéines kinases	Bl2536, dorsomorphine, sorafenib, inhibiteurs d'Aurora kinase
	Ligands de récepteurs de mort	TRAIL, CD95L
	Nanoparticules métalliques	AgNPs, SeNPs, ZnO
	D'autres agents	Mimétiques de SMAC, inhibiteurs du protéasome, obatoclax, PolyI:C, inhibiteurs de NUPR1
Ferroptose	Inhibiteurs du système X_c^-	Sulfasalazine, sorafenib, lanperisone, glutamate, erastine, buthionine sulfoximine
	Inhibiteurs de l'enzyme GPX4	Cisplatin, RSL3, FIN56
	Inducteurs de la ferroptose fer-dépendante	Artesunate, lapatinib, salinomycine, ironomycine
	Inhibiteurs de la ferroptose	Témozolomide (TMZ), baicaléine, vitamine E
	D'autres agents	BAY87–2243, ATRA, artenimol artemisinin, bromélaine, cotylénine A, vitamin C, PUFAS
	Combinaisons des agents	TMZ + erastin, lapatinib + siramesine
Catastrophe mitotique	Inhibiteurs de la polymérisation de la tubuline	Colchicine, alcaloïdes Vinca
	Agents stabilisants du microtubule	Taxanes, épothilones
	Inhibiteurs des kinases CDK1, Aurora, PLK1, CHK1, MSP1	Flavopiridol, dinaciclib ; danusertib, alisertib, barasertib ; BI-2536, volasertib ; UCN-01, AZD7762 ; NMS-P715, MPS1-IN-3, BAY-1161909, BAY-1217389, CFI-402257, S81694
	Inhibiteurs des kinésines KSP, HsEg5, CENP-E, MCAK, MKLP-1	GSK-923295 ; AZD-4877, ispinesib, ARRY-520
	Inhibiteurs des séparases, de CHFR, de survivine	Sepin-1 ; purvalanol A

(ii) A l'opposé du mode « induction », empêcher ou inhiber la mort cellulaire (**Tableau 4**) conduit à des résultats encourageants dans le traitement des lésions de reperfusion ischémique (ou *ischemia-reperfusion injury*, IRI) ou des maladies neurodégénératives comme la MA, la MP et la MH (Conrad et al., 2016; Fricker et al., 2018; Vila and Przedborski, 2003).

Des agents thérapeutiques sont en cours de développement pour interférer avec les voies apoptotiques et conférer ainsi aux cellules, un effet neuroprotecteur. En effet, le traitement par des inhibiteurs de l'apoptose contribue à la survie des neurones *in vitro* et in *vivo* (Bilsland et al., 2002; Fricker et al., 2018; Han et al., 2011; Hetz et al., 2005; Jiang et al., 2016; Raoul et al., 1999; Vila and Przedborski, 2003) (**Tableau 4**). De plus, il a été démontré que des médicaments dotés de propriétés anti-oxydantes et de nouveaux agonistes de la dopamine protégeaient également les cellules neuronales de l'apoptose (Deigner et al., 2000).

Comme présenté précédemment, l'autophagie joue un rôle protecteur des cellules neuronales. Ainsi, l'induction de l'autophagie freine généralement l'évolution de la pathologie

(Fujikake et al., 2018). Cependant, une inhibition de l'autophagie, par l'inactivation génétique des Atgs ou des agents chimio-thérapeutiques, peut améliorer l'état des patients atteints de la MA ou de la MP (Li et al., 2017; Nah et al., 2015; Niu et al., 2016; Xing et al., 2012). Ainsi, sur la base du rôle ambivalent de l'autophagie dans les différents états pathologiques, la modulation de l'autophagie doit être effectuée avec prudence, dans le but d'améliorer le syndrome et de prolonger la survie des patients.

L'utilisation des inhibiteurs des kinases RIPK1, RIPK3 et de la pseudo-kinase MLKL peut prévenir la nécroptose neuronale dans les modèles neurodégénératifs *in vitro* et *in vivo* (Conrad et al., 2016; Le Cann et al., 2017; Mandal et al., 2014; Wang et al., 2018; Zhang et al., 2017).

Enfin, l'inhibition de la ferroptose pourrait être une stratégie thérapeutique dans les maladies neurodégénératives (Fricker et al., 2018; Masaldan et al., 2019).

Les thérapies disponibles pour les maladies neurodégénératives traitent uniquement les symptômes, mais pas la cause de la maladie. Mieux comprendre les mécanismes de mort cellulaire neuronale ainsi qu'améliorer la capacité de diagnostic, aux stades pré-symptomatique et précoce, est crucial. Cela permettra très probablement de mettre au point des traitements pour ralentir ou arrêter la neurodégénérescence.

Tableau 4 : Inhibiteurs de la PCD en cours de développement clinique et préclinique.

Voie principale	Classe	Agent
Apoptose	Inhibiteurs de caspase-8	Z-IETD-fmk
	Inhibiteurs pan-caspase	Z-VAD-fmk, Q-VD-OPh, minocycline
	Stabilisant complexe II/SDH	Compound A
	Inhibiteurs de Bax	VPALR, BCI1, BCI2
	Anticorps bloquant l'interaction entre FAS et FASL	Fas-Fc
	D'autres agents	Flupirtine, N-acétylcystéine, idébénone, mélatonine, ropinirole, pramipexole, cérébrolysine
Autophagie	Inducteur de l'autophagie	Nilotinib
	Inhibiteurs lysosomaux	ATRA
	Inhibiteurs de MAPK	SP600125, U0126
	Inhibiteurs de PI3K	3-méthylalanine, Cpd-18
	Inibiteur de mTOR	Rapamycine
Nécroptose	Inhibiteurs de RIPK1	Nécrostatine-1, Nec-1-s, PN10, Cpd27, GSK2982772, sibiriline
	Inhibiteurs de RIPK3	GSK'840, GSK'843, GSK'872
	Inhibiteurs de MLKL	Nécrosulfonamide, compound 1
Ferroptose	Chélateurs du fer	Déféroxamine, défériprone, ciclopirox olamine, 2,2-bipyridyl
	Capteurs de ROS lipidiques	Ferrostatine-1, liproxstatine-1, vitamine E, coenzyme Q10, NAC, GSH
	Inhibiteurs de LOX	Zileuton, ML351

Conclusion sur les mécanismes de mort cellulaire programmée

En général, les phénotypes de mort cellulaire sont étudiés indépendamment les uns des autres. Cependant, de nombreuses études ont montré qu'il existe une **interconnexion** entre certaines voies de mort. Citons par exemple, l'inhibition de caspases peut prévenir l'apoptose mais promouvoir la nécrose (Vercammen et al., 1998) ; l'inhibition de RIPK1 peut induire une mort cellulaire RIPK3-indépendante dans les cellules endothéliales (Takahashi 2014) mais une mort cellulaire RIPK3-dépendante dans les kératinocytes (Dannappel 2014) ; ou encore le traitement ciblé de plusieurs voies de mort cellulaire peut donner un effet synergique (Chen et al., 2014). Dans la transplantation d'organes, la mort cellulaire, comme la nécroptose, peut provoquer une réponse inflammatoire conduisant à un rejet d'organes (Linkermann and Green, 2014).

La PCD *in vivo* implique l'interaction complexe entre l'apoptose, l'autophagie et la nécroptose. Dans certains cas, un stimulus spécifique déclenche un seul type de PCD, mais dans d'autres situations, le même stimulus peut initier plusieurs processus de mort cellulaire. Différents types de mécanismes peuvent coexister et interagir les uns avec les autres au sein

d'une cellule, mais en fin de compte, un mécanisme dominera les autres. La décision prise par une cellule de subir l'apoptose, l'autophagie ou la nécroptose est régie par divers facteurs, notamment les niveaux d'énergie/ATP, l'étendue des dommages ou du stress, et la présence d'inhibiteurs de voies spécifiques (par exemple, les inhibiteurs de caspases). L'épuisement de l'ATP active l'autophagie. Cependant, si l'autophagie ne parvient pas à maintenir les niveaux d'énergie, une nécroptose se produit. Des lésions légères à modérées, et de faibles taux de signalisation de la mort, induisent généralement l'apoptose, alors que des lésions graves et des taux de mortalité élevés entraînent souvent une nécroptose. Bien que l'apoptose soit souvent le premier mode de mort cellulaire et que la nécroptose ne soit déclenchée que comme un mécanisme de secours garantissant la mort cellulaire, de nouvelles preuves ont montré que la voie de la nécroptose peut prédominer dans certaines conditions pathologiques (Amaravadi and Thompson, 2007) (**Figure 13**).

Le mécanisme de chaque voie de mort cellulaire est particulièrement complexe et les interactions entre toutes les voies de mort cellulaire sont encore mal connues. Il n'y a pas qu'une seule voie de réponse aux signaux cellulaires spécifiques, mais un ensemble de réponses qui utilise un réseau biochimique cellulaire commun. Lors du développement de thérapies par des modulateurs de la mort cellulaire, cette complexité doit être évaluée, de façon sérieuse, par des études pharmacologiques, biochimiques et génétiques.

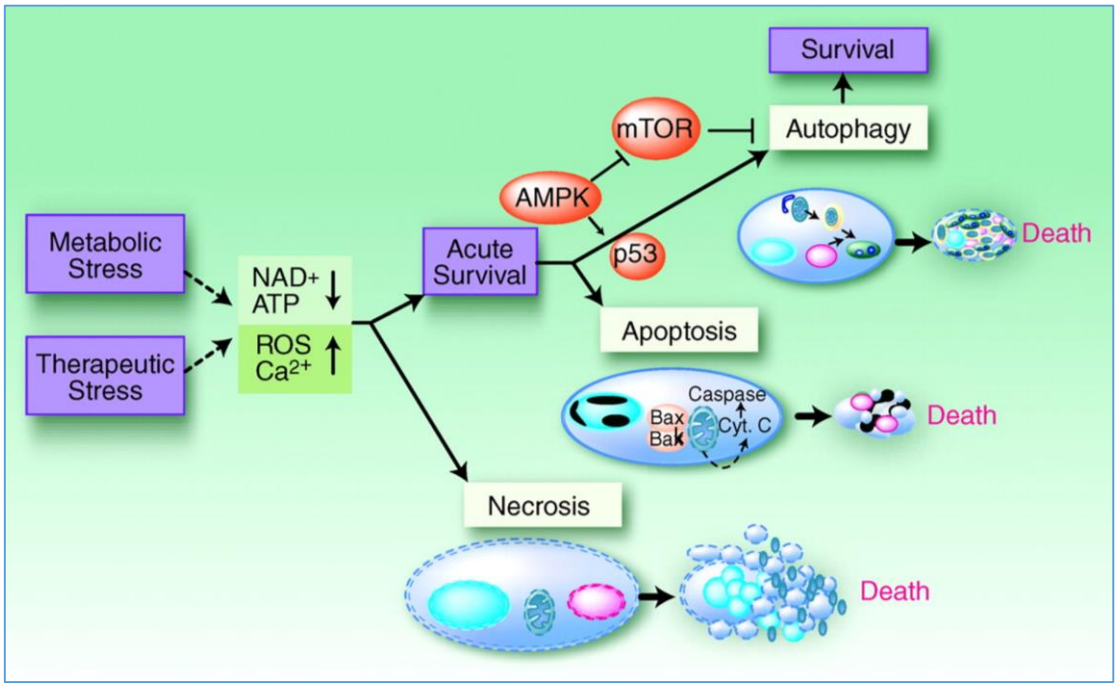


Figure 13 : La relation entre nécrose, autophagie et apoptose. *Les stress métaboliques et thérapeutiques conduisent à une diminution aiguë en NAD+ et en ATP accompagnée d'une augmentation du calcium intracellulaire et des ROS. Les cellules qui ne s'adaptent pas à ces changements subissent une mort cellulaire nécrotique. L'activation de régulateurs de stress, tels que l'AMPK, permet aux cellules de survivre efficacement à ces changements. La phosphorylation dépendante de l'AMPK entraîne l'inhibition de mTOR, qui inhibe l'autophagie. La phosphorylation dépendante de l'AMPK active également p53, ce qui peut conduire à une autophagie ou à une apoptose, par l'activation de Bax et Bak, la libération cytoplasmique du cytochrome C (Cyt. C) et l'activation des caspases. Contrairement à l'apoptose ou à la nécrose, l'autophagie induite par le stress peut entraîner la mort des cellules autophages ou leur survie.* Source : adaptée de [Amaravadi and Thompson. *Clinical Cancer Research* **2007**] (Amaravadi and Thompson, 2007).

La **Figure 14** présente le mécanisme de la mort cellulaire induite par le TNF-α et sa régulation par des agents chimiques, elle souligne parfaitement la complexité de la régulation de la PCD (Conrad et al., 2016). Dans le cas du TNF-α, c'est l'interaction entre la nécroptose et l'apoptose qui est complexe. Il est à noter que des inhibiteurs de la caspase-8 peuvent déclencher une nécroptose. Au contraire, l'inhibition de la nécroptose, par des inhibiteurs de RIPK3, peut induire l'apoptose médiée par la RIPK1 et la caspase-8. Il faut donc être prudent dans l'utilisation de ces inhibiteurs et dans l'évaluation des résultats expérimentaux.

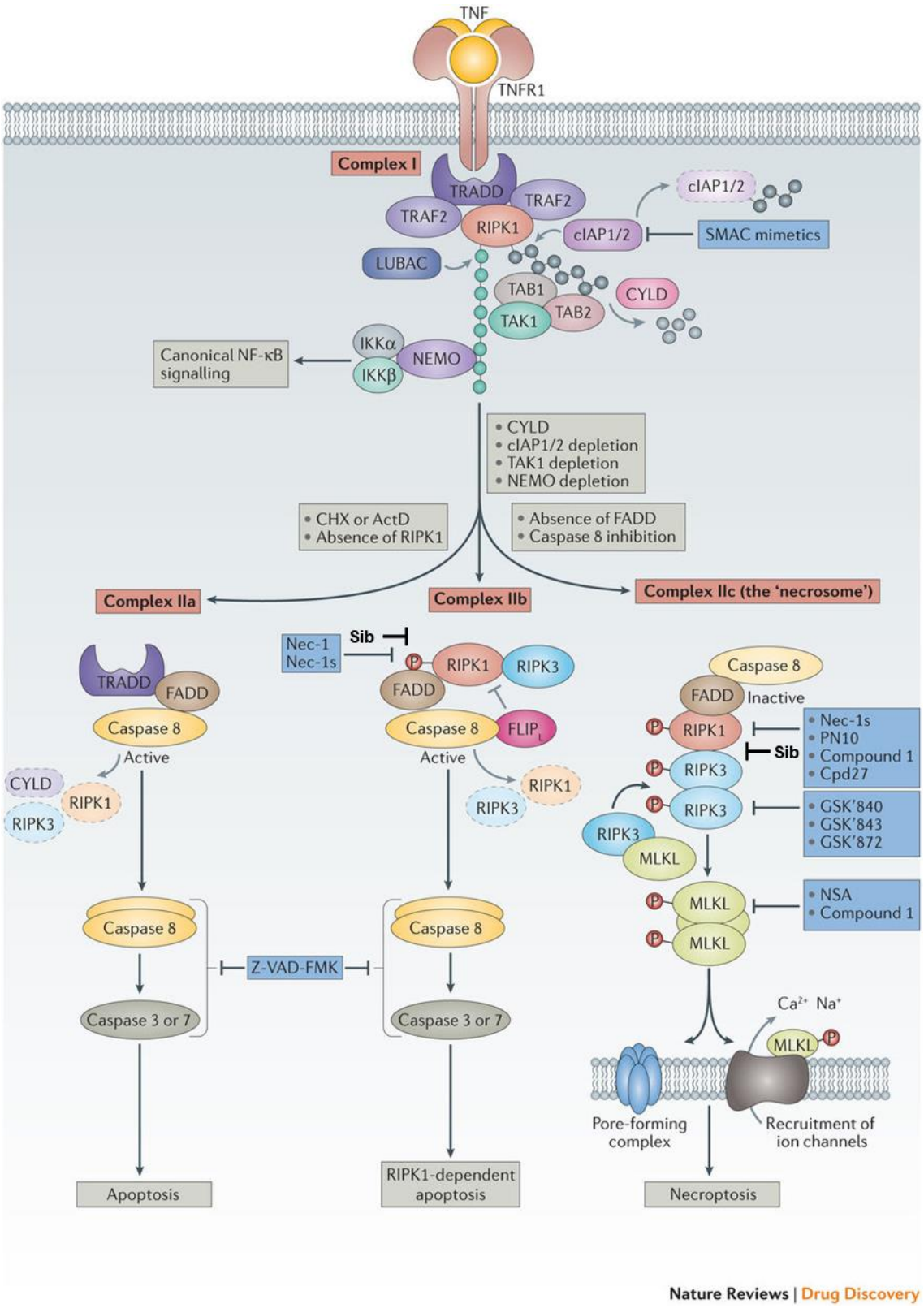


Figure 14 : Mécanisme de la mort cellulaire programmée induite par le TNF et ses modulateurs. *La liaison du facteur de nécrose tumorale (TNF) à son récepteur apparenté TNFR1 déclenche l'assemblage du* ***complexe I*** *(TNFR1- TRADD- RIPK1), associé au TRAF2. Le complexe I fournit la plate-forme pour l'ubiquitination de RIPK1 par cIAP1/2 ou LUBAC*

liée à la signalisation de survie ou de mort cellulaire. En présence de cycloheximide (CHX), un inhibiteur de traduction, la stimulation du TNF conduit à la formation du ***complexe IIa*** *dans lequel la RIPK1 disparaît, alors que l'interaction du domaine FADD et TRADD conduit à l'activation des caspases 8, 3 et 7 et induit l'apoptose. En présence de déubiquitinase CYLD ou lors d'une réduction de cIAP1/2, de TAK1 ou de NEMO, le* ***complexe IIb*** *est formé. Le complexe IIb consiste en RIPK1, RIPK3, FADD et caspase 8 et favorise l'apoptose dépendante de l'activité RIPK1. Avec une expression suffisante de RIPK3 et une inhibition concomitante ou une expression réduite de la pro- caspase 8 et du FLIPL, le* ***complexe IIc*** *(nécrosome) est formé. Le complexe IIc implique l'association de RIPK1 et RIPK3 suivie d'une série d'événements d'auto- et de trans-phosphorylation de RIPK1 et RIPK3, recrutant MLKL pour former un complexe multi-protéique à la membrane plasmique, induisant la nécroptose. Certains inhibiteurs de la mort cellulaire sont indiqués sur cette image.* Source : adaptée de [Conrad et *al*. *Nature Reviews Drug Discovery* **2016**] (Conrad et al., 2016).

2. Les protéines kinases

2.1. Généralités

Les protéines kinases sont des enzymes qui catalysent le transfert d'un groupe γ-phosphate de l'adénosine triphosphate (ATP) au groupe hydroxyle des acides aminés sérine, thréonine ou tyrosine des protéines substrats (**Figure 15**). Les protéines kinases agissent sur différents substrats spécifiques pour induire une réponse appropriée à un signal cellulaire. Elles régulent donc les activités d'une cellule, telles que le métabolisme, la croissance, la division, la différenciation, le transport membranaire, la contraction musculaire, l'immunité, l'apprentissage et la mémorisation (Manning et al., 2002).

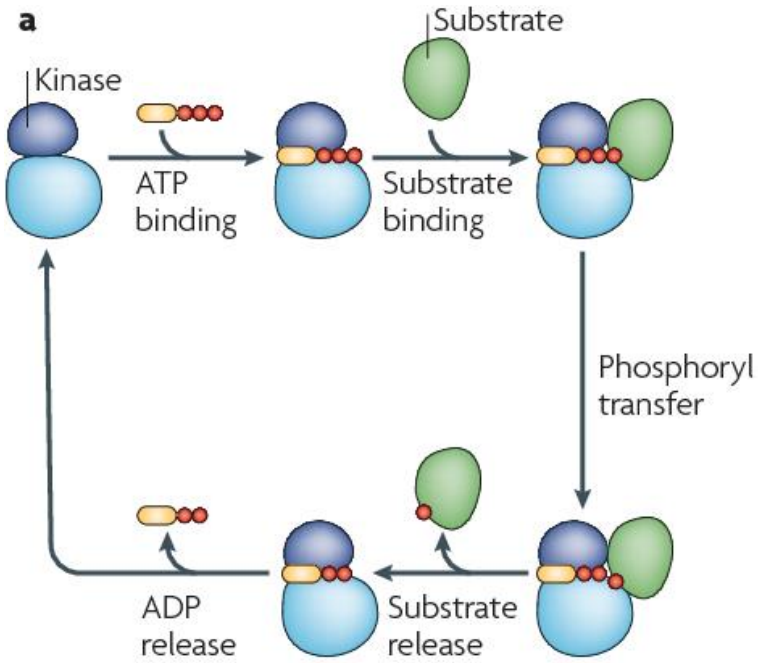


Figure 15 : Le cycle catalytique de base de la phosphorylation d'un substrat par une protéine kinase. *En commençant en haut à gauche, l'ATP se lie au site actif de la kinase, suivi par la liaison du substrat. Le γ-phosphate de l'ATP (rouge) est alors transféré sur un résidu Ser, Thr ou Tyr du substrat. Après phosphorylation, le substrat est libéré de la kinase, suivi par la libération de l'ADP du site actif. L'ordre des étapes peut être différent suivant les kinases considérées. Ainsi, certaines kinases se lient à leurs substrats protéiques avant de se lier à l'ATP, et d'autres libèrent l'ADP avant de libérer le substrat protéique phosphorylé.*

Source : [Ubersax and Ferrell Jr. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2007**] (Ubersax and Ferrell Jr, 2007).

Toutes les protéines kinases ont une structure tridimensionnelle similaire, caractérisée par des repliements protéiques, comprenant deux lobes : un lobe N-terminal constitué principalement de structures en feuillets β (N-lobe) ; un lobe C-terminal essentiellement composé d'hélices α (C-lobe) ; et d'une région flexible, appelée segment d'activation ou boucle T, impliquée dans la régulation de l'accès au substrat. A l'interface des deux lobes se trouve la fente catalytique au niveau de laquelle est positionné le site de liaison de l'ATP. Une caractéristique de toutes les kinases est la présence d'une boucle d'activation modulant l'activité de la kinase. La boucle d'activation commence par la séquence constituée de trois résidus, Asp-Phe-Gly (*'DFG motif'*), où l'aspartate coordonne le magnésium au site actif. Dans la configuration active de la kinase, appelée '*DFG-in',* le résidu phénylalanine du motif DFG se trouve dans une poche hydrophobe. Pour de nombreuses kinases, l'inactivation de la kinase se produit lorsque cette phénylalanine sort de la poche hydrophobe, perturbant l'orientation de l'aspartate, ce qui empêche la coordination de l'aspartate et du magnésium, et bloque ainsi stériquement le site de liaison à l'ATP. Cet état est alors appelé configuration *'DFG-out'*. Ce mouvement libère une poche allostérique adjacente au site de liaison à l'ATP, également appelée *'back-pocket'*. Les principaux éléments de structure typique d'une protéine kinase sont présentés sur la **Figure 16**. En outre, un résidu appelé *'gatekeeper'*, localisé dans le site de liaison à l'ATP (**Figure 17**), semble jouer un rôle dans la sensibilité de nombreuses protéines kinases vis à vis des inhibiteurs (Zuccotto et al., 2010). Une mutation du *'gatekeeper'* ne change pas l'activité de la kinase mais peut induire sa résistance à l'inhibiteur ce qui est très problématique notamment lors d'un usage en traitement anticancéreux (Bhullar et al., 2018).

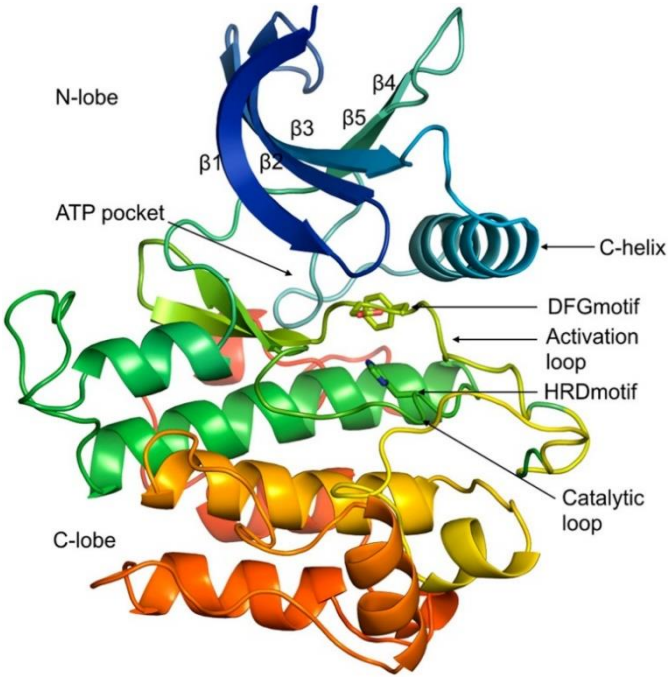


Figure 16 : Organisation tridimensionnelle classique d'un domaine kinase (INSR kinase, PDB ID code : 1GAG). *Le N-lobe constitué principalement de structures en feuillets β (bleue), le C-lobe constitué d'hélices α (vert, orange et jaune), le site de liaison à l'ATP ('ATP pocket') constituant le site actif.* Source : [Modi and Dunbrack. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2019**] (Modi and Dunbrack, 2019).

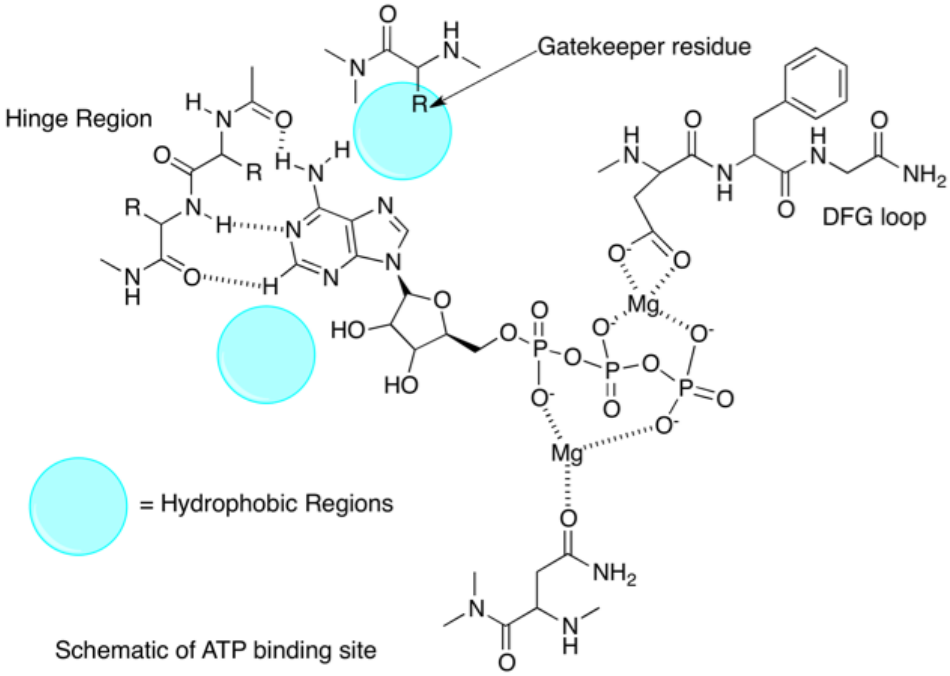


Figure 17 : Schéma du site de liaison à l'ATP. Source : [(« Kinase Inhibitors | Cambridge MedChem Consulting » **2019**].

En 2002, Manning et *al*. ont décrit de façon exhaustive la famille des protéines kinases humaines codées par le génome humain. Cet ensemble, appelé aussi kinome, est constitué de 518 membres incluant 478 kinases typiques et 40 kinases atypiques (Manning et al., 2002) (**Figure 18**). Selon la nature des résidus phosphorylés, ces enzymes sont classées en 3 groupes : les sérine/thréonine kinases (385), les tyrosine kinases (90) et les *tyrosine kinases-like* (TKL, 43). De plus, il existe deux types de tyrosine kinases : les tyrosine kinases transmembranaires (58) agissant en tant que récepteurs, et les tyrosines kinases cytoplasmiques (43) associées à des récepteurs (van der Geer et al., 1994). Notons cependant que certaines kinases ont une double spécificité (phosphorylation sur résidus sérine/thréonine et tyrosine) : par exemple, MEK (MAPKK), qui est impliquée dans la cascade de MAP kinases (*Mitogen-Activated Protein Kinases*) (Manning et al., 2002).

Les protéines kinases représentent 2,5 % des gènes contenus dans le génome humain (500 gènes kinases parmi 20 000 gènes humains) et leur dérégulation peut être à l'origine de nombreuses maladies dont le cancer (244 kinases sont déjà ciblées dans les traitements contre le cancer) (Manning et al., 2002). Il est à noter que Manning et *al*. ont créé une base de données, nommée KinBase, sur les protéines kinases humaines et également celles d'autres organismes modèles. Elle est consultable en ligne (http://kinase.com/kinbase/index.html).

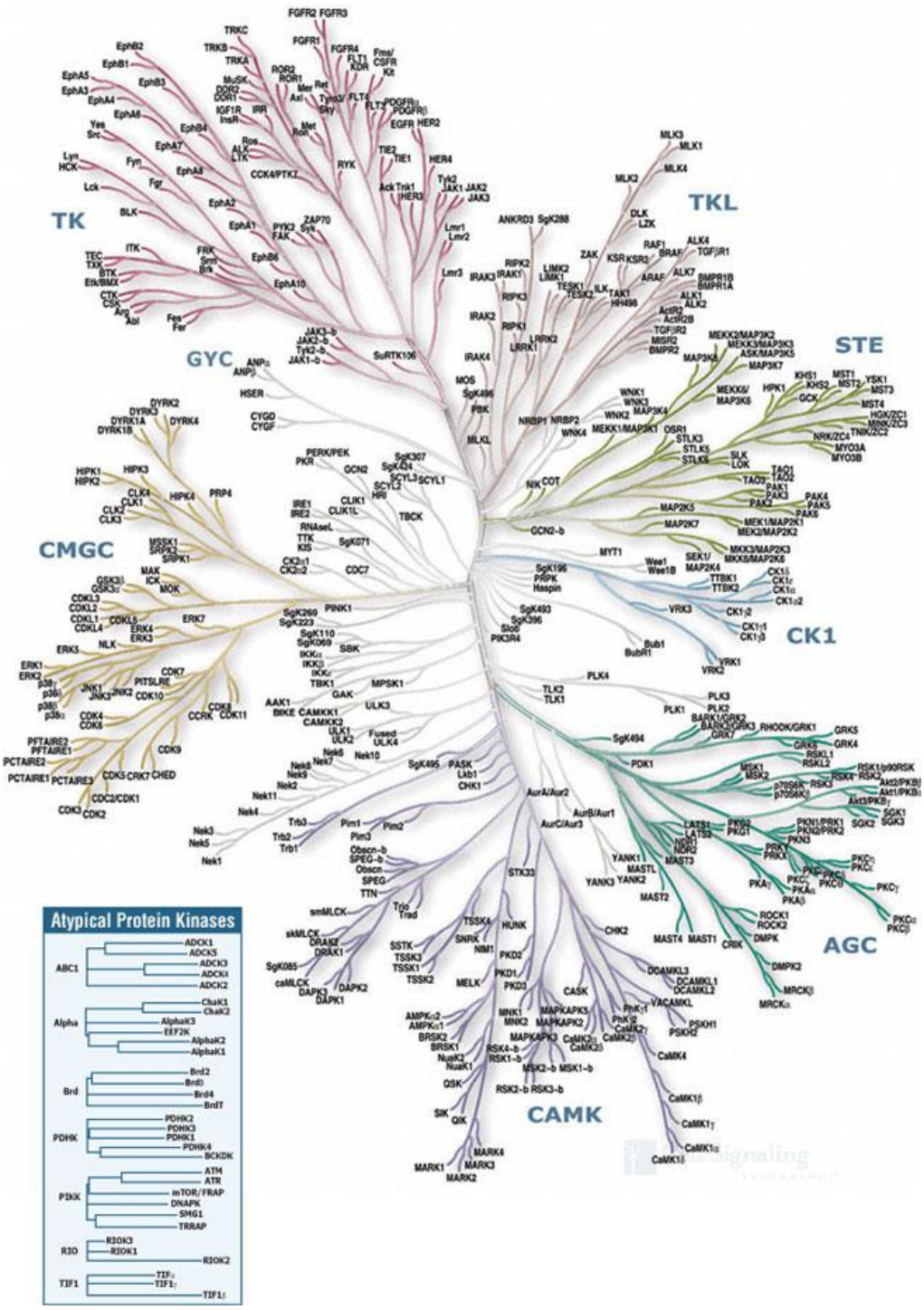


Figure 18 : L'arbre du kinome humain. *Le kinome est organisé en 9 groupes distincts : AGC contenant les familles TK PKA, PKC, PKG ; CAMK contenant les protéines kinases dépendantes du calcium/calmoduline ; CK1 caséine kinase 1 ; CMGC contenant les familles CDK, MAPK, GSK3, CLK ; STE contenant les homologues des kinases de levure Sterile 7, Sterile 11, Sterile 20 ; TK tyrosine kinase ; TKL tyrosine kinase-like ; GYC kinase et un groupe de kinases atypiques.* Source : [Illustration reproduite depuis une ressource propriété de **Cell Signaling Technology, Inc.**].

2.2. Les protéines kinases en tant que cibles thérapeutiques

Des mutations, la surexpression et la dérégulation des protéines kinases jouent un rôle essentiel dans la genèse de nombreuses maladies telles que l'asthme, les maladies auto-immunes, cardiovasculaires, inflammatoires, les maladies neuronales ainsi que les cancers. Cette famille enzymatique est, de ce fait, devenue la première classe de cibles étudiées par les sociétés pharmaceutiques afin de mettre en évidence des nouveaux principes actifs médicamenteux, et concentre 20 à 30% du budget recherche-développement de ces sociétés (Roskoski, 2019).

Le développement des inhibiteurs de protéines kinases (PKIs, *protein kinase inhibitors*) dans le traitement du cancer a débuté au cours des années 70. En 1978, le premier oncogène a été identifié comme étant une protéine kinase, Src ou *sarcome* (Collett and Erikson, 1978). En 1982, les esters de phorbol, connus comme promoteurs de tumeurs ont été décrits comme des activateurs puissants de la protéine kinase C (PKC) (Castagna et al., 1982). Dans les années 80, les premiers inhibiteurs de protéines kinases, des naphtalènes sulfamides et isoquinolines sulfamides, ont été synthétisés dans le laboratoire de Hiroyoshi Hidaka (Hidaka et al., 1984). Mais le développement des PKIs s'est accéléré avec la découverte de la staurosporine, une molécule antifongique, caractérisée comme inhibiteur de la PKC, à une concentration au nanomolaire (Ward and O'Brian, 1992). Cette molécule toxique n'a pas été utilisée comme médicament, mais sa structure a permis de produire plusieurs analogues actifs en tant qu'inhibiteurs de kinases. En 1991, la structure 3D de la protéine kinase A (PKA) a été déterminée, ce qui a permis de caractériser le site de liaison à l'ATP (Knighton et al., 1991; Zheng et al., 1993). Cette découverte a mis en évidence le potentiel de développement des PKIs dans le traitement des maladies humaines (Cohen, 2002). Cependant, l'intérêt pour les protéines kinases en thérapie humaine a vraiment commencé avec la découverte de l'imatinib, un inhibiteur de la tyrosine kinase de fusion BCR-ABL, approuvé par la FDA en 2001 pour le traitement de la leucémie myéloïde chronique dite à « chromosome de Philadelphie » (LMC) (Hopkin et al., 2010). La **Figure 19** présente les PKIs selon leur ordre d'approbation par la FDA.

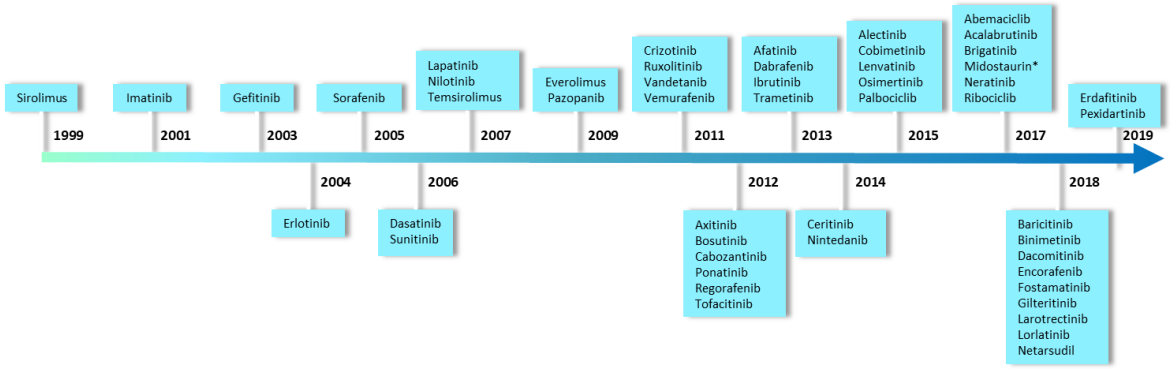


Figure 19 : Chronologie du développement des inhibiteurs de protéines kinases approuvés par la FDA. Source : (Nguyen *et al.*, soumis à Marine Drugs **2019).**

Plus de 6000 structures cristallines de protéines kinases ont été déterminées par diffraction aux rayons X (*X-ray crystal structures*). Elles ont permis de grandes avancées dans le développement de médicaments. Environ 212 inhibiteurs de protéines kinases sont actuellement à différents stades de développement en essai clinique (http://www.icoa.fr/pkidb). La FDA, à ce jour, a approuvé 50 molécules inhibitrices de protéines kinases pour leur utilisation thérapeutique (**Tableau 5**). L'administration de ces médicaments se fait par voie orale pour 47 d'entre eux, oculaire pour le netarsudil et par voie intraveineuse pour le temsirolimus et le copanlisib. La majorité de ces inhibiteurs (37) ciblent des tyrosines kinases, et certains autres (13) ciblent des sérines/thréonines kinases. Les cibles les plus courantes comprennent les kinases ALK, B-Raf, BCR-ABL, EGFR (*epidermal growth factor receptor*) et VEGFR (*vascular endothelial growth factor receptor*). Concernant leur mode d'action, ces inhibiteurs sont, en grand majorité, des compétiteurs de l'ATP. Certains (6 d'entre eux) font exception et forment des liaisons covalentes avec leurs enzymes cibles. Selon les données de la littérature, la plupart de ces PKIs (45) sont utilisés pour lutter contre les tumeurs malignes, telles que les tumeurs solides incluant les lymphomes (38), et les tumeurs non-solides, comme les leucémies (7). 7 PKIs sont utilisés comme médicaments pour d'autres pathologies comme la polyarthrite rhumatoïde (Carles et al., 2018; Roskoski, 2019).

Tableau 5 : Listes des PKIs approuvés par la FDA, leurs cibles et leurs indications thérapeutiques (mise à jour en août 2019). Source : [(Carles et al., 2018; Roskoski, 2016, 2019), http://www.icoa.fr/pkidb/ et http://www.brimr.org/PKI/PKIs.htm].

Médicament (code)	**Nom commercial**	**Approuvé en**	**Cibles primaires**	**Type**	**Indication thérapeutique**
Sirolimus (AY22989)	Rapamycin	1999	FKBP12/mTOR	IV	Greffe rénale, lymphangioleiomyomatose
Imatinib (STI571)	Gleevec	2001	BCR-ABL	IIA	LMC ou LLA à chromosome Philadelphie positif, mastocytose systémique agressive, leucémies à éosinophiles chroniques, dermatofibrosarcome protuberans, syndrome hyperéosinophilique, tumeurs stromales gastro-intestinales, maladie myélodysplasique / myéloproliférative
Gefitinib (ZD1839)	Iressa	2003	EGFR	I	NSCLC
Erlotinib (OSI-774)	Tarceva	2004	EGFR	I, I1/2B	NSCLC, cancers du pancréas
Sorafenib (BAY 43-9006)	Nexavar	2005	VEGFR	IIA	Carcinome hépatocellulaire, carcinome rénal, cancer de la thyroïde (différenciés)
Dasatinib (BMS-354825)	Sprycell	2006	BCR-ABL	I, I1/2A	LMC
Sunitinib (SU11248)	Sutent	2006	VEGFR	I1/2B,IIB	Tumeur stromal gastro-intestinal, tumeur neuroendocrine du pancréas, carcinome rénal
Lapatinib (GW572016)	Tykerb	2007	EGFR	I, I1/2A	Cancer du sein HER2-positif
Nilotinib (AMN107)	Tasigna	2007	BCR-ABL	IIA	LMC à chromosome Philadelphie positif
Temsirolimus (CCI-779)	Torisel	2007	FKBP12/mTOR	IV	Carcinome rénal avancé
Everolimus (RAD001)	Afinitor	2009	FKBP12/mTOR	IV	Cancer du sein HER2-négatif, tumeur neuroendocrine du pancréas, carcinome rénal, angiomyolipome, astrocytome sous-épendymaire à cellules géantes
Pazopanib (GW786034)	Votrient	2009	VEGFR	I	Carcinome rénal, sarcome des tissus mous
Crizotinib (PF 2341066)	Xalkori	2011	ALK	I, I1/2B	NSCLC ALK-ou ROS1-postif
Ruxolitinib (INCB-018424)	Jakafi	2011	JAK1/2/3 & TYK2	I	Myélofibrose, polycythémie virale
Vandetanib (ZD6474)	Zactima	2011	VEGFR	I	Cancer médullaire de la thyroïde
Vemurafenib (PLX-4032)	Zelboraf	2011	B-Raf	I1/2A	Mélanome à mutation de BRAF V600E
Axitinib (AG-013736)	Inlyta	2012	VEGFR	IIA	Carcinome rénal avancé
Bosutinib (SKI-606)	Bosulif	2012	BCR-ABL	I/IIB	LMC
Cabozantinib (BMS-907351)	Cometriq	2012	RET	I	Cancer médullaire avancé de la thyroïde
Ponatinib (AP 24534)	Iclusig	2012	BCR-ABL	IIA	LMC ou LLA à chromosome Philadelphie positif

Regorafenib (GSK2118436)	Tafinlar	2012	VEGFR	IIA	Cancer colorectal
Tofacitinib (CP-690550)	Tasocitinib	2012	JAK3	I	Polyarthrite rhumatoïde
Afatinib (BIBW 2992)	Tovok	2013	EGFR	VI	NSCLC
Dabrafenib (GSK2118436)	Tafinlar	2013	B-Raf	I,I1/2A	Mélanome à mutation de BRAF-positif et NSCLC
Ibrutinib (PCI-32765)	Imbruvica	2013	BTK	VI	LLC, LCM, LZM, maladie du greffon contre l'hôte
Trametinib (GSK1120212)	Mekinist	2013	MEK1/2	III	Mélanome
Ceritinib (LDK378)	Zykadia	2014	ALK	I1/2B	NSCLC ALK-positif résistant au crizotinib
Idelalisib*	Zydelig	2014	PIK3CD	ND	LLC, lymphome non hodgkinien
Nintedanib (BIBF-1120)	Vargatef	2014	FGFR	IIB	Fibrose pulmonaire idiopathique
Alectinib (CH5424802)	Alecensa	2015	ALK	I/1/2B	NSCLC ALK-positif
Cobimetinib (GDC-0973)	Cotellic	2015	MEK1/2	III	Mélanome à mutation de BRAF-positif et NSCLC en combinant avec le vemurafenib
Lenvatinib (AK175809)	Lenvima	2015	VEGFR, RET	I1/2A	Cancer thyroïdien différencié
Osimertinib (AZD-9292)	Tagrisso	2015	EGFR	VI	NSCLC
Palbociclib (PD-0332991)	Ibrance	2015	CDK4/6	I	Cancer du sein avec récepteurs aux œstrogènes et HER2-positif
Abemaciclib (LY2835219)	Verzenio	2017	CDK4/6	I/1/2B	Cancer du sein (traitement combiné ou monothérapie)
Acalabrutinib (ACP-196)	Calquence	2017	BTK	VI	LCM
Brigatinib (AP 26113)	Alunbrig	2017	ALK	I	NSCLC ALK-positif
Copanlisib*	Aliqopa	2017	PIK3CA, PIK3CB	ND	Lymphome folliculaire en rechute
Midostaurin (CPG 41251)	Rydapt	2017	FLT3	ND	LMA, mastocytose, leucémie à mastocytes
Neratinib (HKI-272)	Nerlynx	2017	ERBB2	VI	Cancer du sein HER2-positif
Ribociclib (LEE011)	Kisqali	2017	CDK4/6	I1/2B	Cancer du sein (traitement combiné)
Baricitinib (LY 3009104)	Olumiant	2018	JAK1/2/3 & TYK	ND	Polyarthrite rhumatoïde
Binimetinib (MEK162)	Mektovi	2018	MEK1/2	III	Mélanome
Dacomitinib (PF-00299804)	Visimpro	2018	EGFR	VI	NSCLC EGFR-mutant
Duvelisib*	Copiktra	2018	PIK3CD, PIK3CG	ND	LLC en rechute ou réfractaire, petit lymphome lymphocytaire
Encorafenib (LGX818)	Braftovi	2018	B-Raf	ND	Mélanome BRAFV600E/KBRAFV600E/K (traitement combiné)
Fostamatinib (R788)	Tavalisse	2018	SYK	I	Thrombocytopénie immunitaire chronique
Gilteritinib (ASP2215)	Xospata	2018	FLT3	ND	LMA
Larotrectinib (LOXO-101)	Vitrakvi	2018	TRK	ND	Tumeur solide avec protéines de fusion NTRK

Lorlatinib (PF-06463922)	Lorbrena	2018	ALK	ND	NSCLC ALK-positif
Netarsudil (AR11324)	Rhopressa	2018	ROCK1/2	ND	Glaucome
Erdafitinib	Balversa	2019	FGFR1	I	Cancer de la vessie
Pexidartinib	Plexxikon	2019	CSFR1/KIT	I	Tumeur ténosynoviale à cellules géantes

** : inhibiteur de lipide kinase ; LMC : leucémie myéloïde chronique ; LMA : leucémie myéloïde aiguë ; LLA : leucémie lymphoblastique aiguë ; LLC : leucémie lymphoïde chronique ; LCM : lymphome à cellules du manteau ; LZM : lymphome dans la zone marginale ; NSCLC (non-small cell lung cancer) : le cancer du poumon non à petites cellules.*

2.3. Inhibiteurs de protéines kinases

Classification

Les inhibiteurs des protéines kinases (PKIs, *protein kinase inhibitors*) sont classés en six catégories selon leur mode d'interaction avec les kinases.

Les PKIs qui ciblent préférentiellement le site d'attachement de l'ATP, sont des ***compétiteurs*** de l'ATP (**Figure 20**). Parmi eux, on distingue trois types : type I, type II et type I ½. Les inhibiteurs de type I occupent le site de liaison à l'ATP et se lient à la configuration active de la kinase (*DFG-in*). Ce sont les inhibiteurs les moins sélectifs, induisant des effets secondaires indésirables tels que la cardiotoxicité. Les inhibiteurs de type II s'étendent généralement dans la poche allostérique adjacente et stabilisent la protéine dans la configuration inactive (*DFG-out*). Les inhibiteurs de type I ½ adoptent un mode de liaison intermédiaire entre le type I et le type II. Ils se lient à la protéine kinase dans une configuration active et s'étendent vers la poche hydrophobe sans l'occuper. Les inhibiteurs de type I, I ½ et II sont aussi divisés en ***sous-types A et B***. Les inhibiteurs de type A occupent toute la poche ATP. Par contre, les inhibiteurs de type B ne se lient pas au '*back-pocket*' et se fixent donc moins fort à la kinase cible. Ces inhibiteurs sont moins efficaces que les inhibiteurs de type A. Les inhibiteurs de type III se lient exclusivement à la poche ***allostérique*** adjacente au site de liaison de l'ATP dans la configuration active (*DFG-in*) ou inactive (*DFG-out*) de la kinase. Les inhibiteurs de type IV se lient à une poche allostérique plus éloignée du site actif. Les inhibiteurs de type V se lient à deux régions différentes de la protéine kinases et sont donc des inhibiteurs bivalents. Les inhibiteurs de type I à V sont dit ***réversibles***. Le mode réversible est typique d'une interaction par des liaisons non covalentes (de type liaisons hydrogène, interaction hydrophobes ou liaisons

ioniques), l'inhibiteur se lie au site actif de l'enzyme mais peut facilement être éliminé. Les inhibiteurs de type VI sont irréversibles. Dans le mode irréversible (ou covalent-réversible), l'inhibiteur, par interaction covalente, forme un complexe stable avec l'enzyme et l'inactive de façon permanente (Carles et al., 2018; Roskoski, 2016).

Presque tous les PKIs approuvés comme médicament occupent le site de liaison à l'ATP et interagissent donc avec les résidus de la boucle catalytique située à proximité. Des études par cristallographie, permettent de caractériser le mode de liaison entre un inhibiteur et une kinase. Les données physico-chimiques obtenues contribuent à élaborer une base de données complète des PKIs utilisés en thérapie. La description détaillée sur le mode de liaison des inhibiteurs de protéines kinases, ainsi que leurs propriétés physicochimiques, sont présentées dans la revue de Roskoski (Roskoski, 2016).

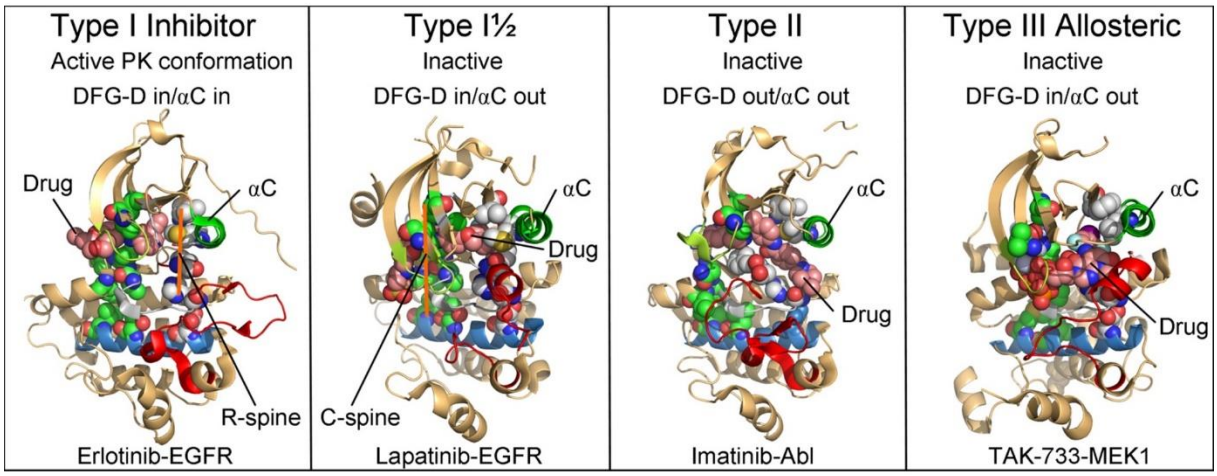


Figure 20 : Classification des inhibiteurs de protéines kinases à partir de la structure de leur complexe médicament-enzyme. *Les inhibiteurs de type I se lient à la configuration active de la protéine kinase (DFG-Asp in, αC-helix in). Les inhibiteurs de type I ½ se lient à la configuration inactive (DFG-Asp in, αC-helix out) tandis que les inhibiteurs de type II se lient à la configuration inactive de DFG-Asp out, αC-helix out. Les inhibiteurs de type I, I ½ et II occupent une partie de la poche de liaison à l'ATP et forment des liaisons hydrogènes avec la région charnière de la kinase. Les inhibiteurs de type III se lient à côté de la poche de liaison à l'ATP, ils sont de nature allostérique.* Source : [Roskoski. *Pharmacological Research* **2016**] (Roskoski, 2016).

Base de données PKIDB

Bien que certaines bases de données sur les PKIs soient publiquement disponibles, elles sont souvent uniquement centrées sur les PKIs approuvés (les molécules ayant atteint l'essai clinique de phase 4) mais mentionnent rarement le grand nombre de PKIs en développement, donc, ne donnent pas un aperçu global et à long terme sur la prochaine génération de PKIs. Pour faciliter les recherches de PKIs, Carles et *al*. on créé en 2018 la **PKIDB** (*protein kinase inhibitor data base*), une base de données mise à jour mensuellement sur le site http://www.icoa.fr/pkidb, qui fournit toutes les informations sur les PKIs approuvés ainsi que, sur ceux actuellement en essai clinique (Carles et al., 2018). Cet outil permet d'avoir accès à de nombreuses informations sur les 212 PKIs en développement ainsi que les 50 PKIs approuvés par la FDA (**Tableau 5**). Au regard de ces données, nous pouvons constater que les PKIs possèdent souvent des propriétés similaires, telles qu'une petite masse moléculaire (moyenne de 463,3 Da), une lipophilicité élevée (logP moyenne de 4,0) et un noyau principalement aromatique par rapport à des médicaments oraux « classiques ». Ces observations peuvent s'avérer utiles pour prioriser les composés en développement. La conception de nouvelles structures chimiquement diversifiées, pourrait ainsi produire la prochaine génération de PKIs, les plus sélectives possibles.

L'arbre de kinome

L'arbre du kinome est une façon schématique d'analyser la grande famille des protéines kinases. Sur l'arbre présenté en **Figure 21**, sont spécifiées les kinases ciblées par des PKIs (approuvés par la FDA ou en développement clinique). Nous observons que le groupe le plus ciblé est celui des tyrosines kinases (TKs). Les cibles importantes sont les kinases ABL, EGFR, KIT, PDGFR et FLT3, avec plus de dix inhibiteurs sur le marché. D'autres groupes de kinases tels que TKL, STE, CAMK et CMGC sont moins ciblés par les PKIs, avec moins de dix inhibiteurs approuvés par groupe. Par contre, pour les groupes CK1 et AGC, il n'existe actuellement aucun inhibiteur sur le marché. En regardant la famille des protéines kinases atypiques, nous constatons que les inhibiteurs actuellement disponibles ciblent essentiellement la sous-famille PIKK (Carles et al., 2018).

L'arbre du kinome nous montre également le potentiel des inhibiteurs de protéines kinases pour le développement de médicaments. En 2018, 73 et 52 inhibiteurs étaient respectivement en phase 2 et 3 d'essais cliniques, et 39 inhibiteurs étaient approuvés (phase 4).

Cette observation souligne l'importance des protéines kinases en tant que cibles essentielles dans l'industrie pharmaceutique (Carles et al., 2018).

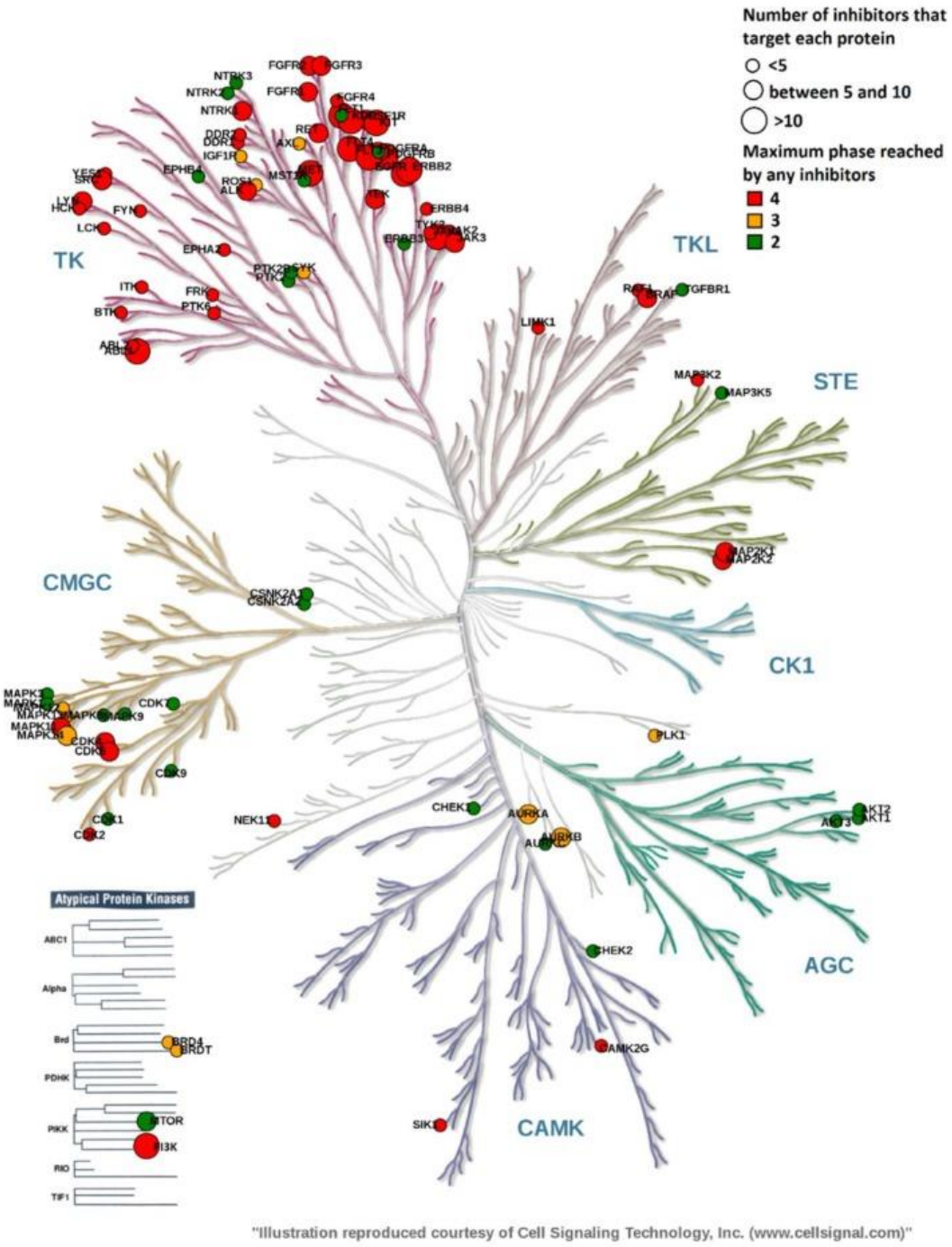


Figure 21 : Arbre du kinome humain présentant la répartition des inhibiteurs de protéines kinases selon le groupe ciblé. *Les ronds représentent les inhibiteurs répartis selon le groupe de kinases ciblées. La taille du rond indique le nombre de composés dans chaque groupe et la couleur du rond indique la phase d'essai clinique actuelle.* Source : [Carles et *al. Molecules* **2018**] (Carles et al., 2018).

Défis

Le développement des inhibiteurs de protéines kinases, malgré les résultats très encourageants obtenus, fait face à deux problèmes principaux : (i) le développement de résistances aux traitements (dus aux mutations dans le site de liaison de la kinase ciblée) et (ii) la toxicité et les effets indésirables des médicaments, chez les patients, souvent associés à un manque de sélectivité du composé actif. La sélectivité des inhibiteurs de kinases est un point crucial qui nécessite des études complémentaires et la mise en œuvre d'outils de chémobiologie (approche en chromatographie d'affinité, par exemple). Dans les essais cliniques, la stratégie de traitement par combinaison de deux inhibiteurs, ou d'un inhibiteur avec un médicament interagissant avec d'autres cibles, ou encore d'un inhibiteur avec une autre méthode de traitement comme la radiothérapie, sont autant de pistes de grand intérêt pour améliorer les pronostics. Cependant, ces combinaisons thérapeutiques (répondant au principe de la polypharmacologie) doivent être soumises à des études comparatives fines liées au manque d'efficacité de ces traitements ainsi qu'au manque de reproductibilité des résultats thérapeutiques, en comparaison à un traitement unique (Bhullar et al., 2018). Le fait d'intégrer de mieux en mieux les PKIs dans des protocoles de polypharmacologie permettra probablement d'avancer plus vite en thérapie humaine, en particulier dans le traitement des cancers. La médecine personnalisée, intégrant la dimension de séquençage systématique du génome des cellules tumorales, associée au développement d'outils informatiques puissants, pourra dans l'avenir contribuer à améliorer les stratégies thérapeutiques intégrant les PKIs.

3. Intérêt et potentiel des molécules marines

3.1. Diversité des molécules marines

La mer est riche en espèces et en écosystèmes. Malgré les nombreuses études réalisées depuis plus de 50 ans, la diversité moléculaire dans l'environnement marin est très probablement encore sous-évaluée. La mer fournit les ressources essentielles à la vie humaine : elle est une source majeure de nourriture ; l'écosystème marin joue un rôle indispensable dans la régulation du climat ; par ailleurs, le monde marin est également une source d'outils pour la recherche biomédicale (comme la *green fluorescent protein*, GFP, issue de méduses). Malgré tous ces intérêts, l'activité humaine continue à polluer la mer et à détruire des espèces et des écosystèmes. Il est donc urgent de développer une stratégie d'exploitation raisonnable, en parallèle de la conservation des ressources marines (Conservation, 1993).

La production de métabolites secondaires spécifiques par les organismes marins est un mécanisme essentiel d'adaptation pour la survie dans leur environnement (Rinehart, 1992). La diversité structurale des métabolites secondaires est liée à la biodiversité marine. Par ailleurs, certaines espèces morphologiquement identiques, appelées écotypes, produisent des métabolites très différents, dépendant strictement de la localisation géographique (environnement, profondeur) ce qui contribue également à la chimiodiversité marine (Pietra, 2002). Grâce aux techniques analytiques à haut débit, de nouvelles banques de structures ont été construites. La diversité biochimique, riche et unique, de ces produits naturels, est un réservoir important pour la recherche de nouveaux principes actifs médicamenteux (Giordano et al., 2015).

Dans le monde terrestre, les métabolites secondaires originaux proviennent principalement de plantes et d'arthropodes, tandis que dans le monde marin, ils sont essentiellement produits par les algues, les éponges (Spongiaires), les Cnidaires, les ectoproctes (Bryozoaires) et les ascidies (Urochordés). Certains autres groupes, tels que les bactéries, les archées et les champignons filamenteux, donnent des métabolites présentant le même type de structure dans les milieux marins et terrestres (Pietra, 2002).

Entre 2016 et 2018, Blunt at *al.* ont proposé une analyse sur les nouveaux produits naturels isolés de microorganismes marins (bactéries, champignons), phytoplancton, algues, etc. (Blunt et al., 2016, 2017, 2018) (**Figure 22**).

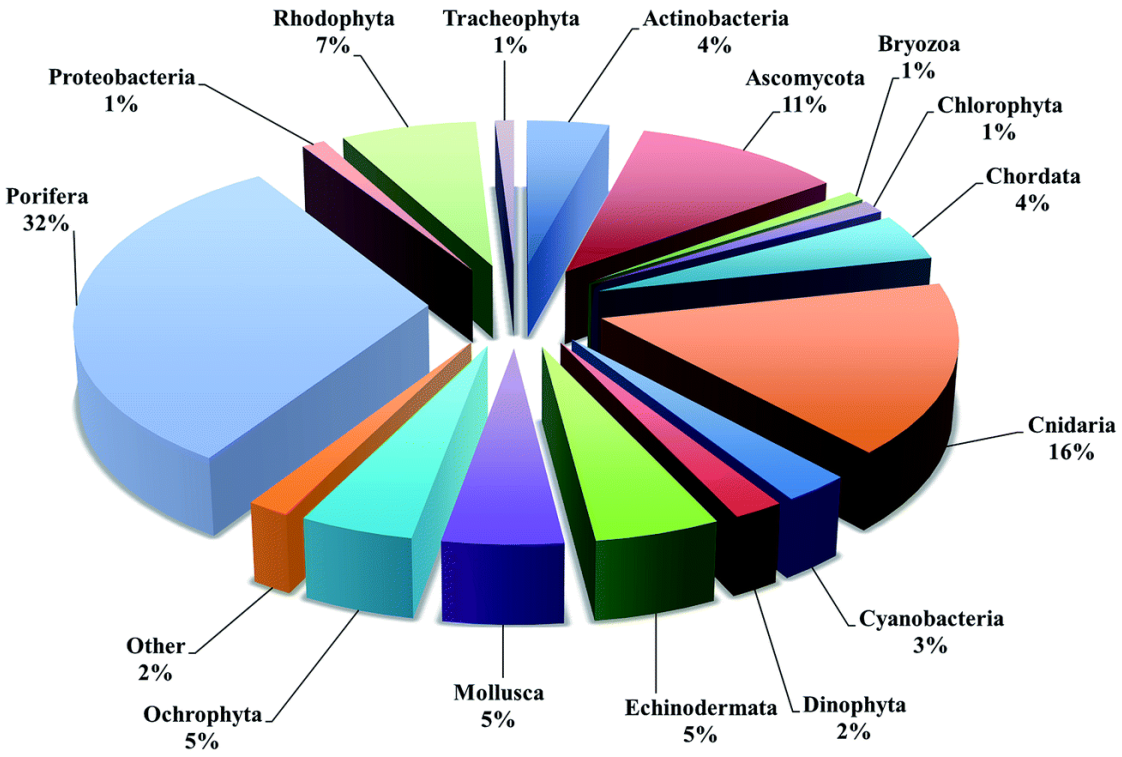


Figure 22 : Répartition par phylum des produits naturels marins identifiés au cours de la période 1971-2015. *La majorité des molécules marines a été extraite chez les Porifera (Spongiaires), Cnidaria (Cnidaires) et Ascomycota (Ascomycètes) avec respectivement des pourcentages de 32%, 16% et 11%.* Source : [Blunt et *al. Natural Product Reports* **2017**] (Blunt et al., 2017).

Dans l'Océan, les algues brunes synthétisent des diterpènes présentant des structures originales ; les algues rouges, des terpènes halogénés et des acétogénines C_{15} ; et les algues vertes produisent des cyclopeptides et des sesquiterpènes aldéhydes masqués. Les éponges marines produisent principalement des alcaloïdes, des sesterterpènes, des macrolides ou encore des polyéthers. Ce sont des structures uniques distinctes de celles des plantes terrestres. Par contre, les éponges d'eau douce ne sont connues que pour leur production d'acides gras (acides démospongiques), communs à ceux des éponges de mer. Les éponges calcaires marines peu profondes ont évolué vers la production d'alcaloïdes imidazolés liés au Zn (II) et de macrolides peu communs. Les Cubozoaires constituent une classe de Cnidaires, qui contient dans ses nématocystes (des organes venimeux), des polypeptides toxiques originaux. Chez les

Anthozoaires, les terpénoïdes sont similaires à ceux des plantes terrestres. Les Bryozoaires marins donnent d'autres macrolides comme des bryostatines. Parmi les mollusques, seules les espèces marines sont connues pour leurs métabolites peu courants tels que l'acide okadaïque, des toxines et des polyéthers. Les polypropionates sont issus de mollusques, de cyanobactéries, d'algues et d'invertébrés marins. Enfin, ce sont des alcaloïdes stéroïdiens, notamment des pyrazines et des squalamines, hautement bioactifs qui ont été caractérisés respectivement, chez des ascidies (*Ciona savignyi*) et des requins (*Scymnus borealis*) (Pietra, 2002). En conclusion, on constate que les organismes marins produisent des métabolites de structures particulièrement originales et peu courantes. Sur la base de leurs structures chimiques, les produits naturels marins identifiés appartiennent à plusieurs groupes chimiques : polykétides, terpènes, saponines stéroïdiennes ou triterpéniques, glucides, composés aliphatiques, acides aminés, alcaloïdes, peptides, lipopeptides et protéines. Les peptides constituent la proportion la plus élevée de composés bioactifs (Linderquist 2016).

Les éponges marines sont considérées comme une source importante de molécules thérapeutiques. Il existe plus de 5000 espèces différentes d'éponges marines riches en différents composés essentiels, tels que les acides gras, les protéines, les alcaloïdes, les peroxydes et les terpènes, montrant des effets antibactériens, antiviraux, antifongiques, antipaludéens, antihelminthiques, immunosuppresseurs et anti-inflammatoires (Anjum et al., 2016). Certains de ces composés sont connus pour leurs effets pro-apoptotiques (Ercolano et al., 2019) :

- ✓ Des alcaloïdes : aaptamine, isoaptamine, crambescidin 800, fascaplysine, lamellarine D, akulavamines, manzamine A, monanchocidine A, renieramycine M, nortopsentines A-C ;
- ✓ Des terpénoïdes : 10-acétylirciformonine B, hétéronémine, stellettines A et B, sménospongine ;
- ✓ Des macrolides : péloruside A, salarines, tedanolides ;
- ✓ D'autres classes : agelasine B, didesoxypetrosynol A, jasplakinolide, psammaplysene A.

3.2. Application des molécules marines en thérapie humaine

La majorité des molécules naturelles actuellement utilisées en thérapie humaine sont d'origine terrestre. Cependant, les molécules marines possèdent une grande diversité structurelle et bioactive. Dans les années 1950, l'identification de deux nucléosides (la

spongothymidine et la spongouridine) de l'éponge des Caraïbes *Cryptotethia crypta*, révéla le grand potentiel des molécules marines pour la thérapie humaine (BERGMANN and BURKE, 1955). Les molécules marines possèdent en effet un squelette moléculaire unique et semblent avoir une efficacité thérapeutique plus importante que les molécules terrestres, en particulier dans les traitements anticancéreux. A titre d'exemple, dans une étude comparative de 1999, 1,3 % des échantillons marins présentaient un potentiel anti tumoral contre 0,3 % des échantillons terrestres (les volumes testés sont respectivement de 8 412 et 18 727 échantillons) (Munro et al., 1999). C'est pourquoi, les métabolites marins sont considérés comme de nouvelles molécules chimiques prometteuses en thérapie humaine.

A ce jour, 28 785 molécules marines ont été identifiées (http://pubs.rsc.org/marinlit), parmi lesquelles 10 molécules ont été approuvées par la FDA et présentées sur le marché du médicament pour des traitements anticancéreux, antiviraux, anti-triglycérides et antidouleurs, (http://marinepharmacology.midwestern.edu/clinical_pipeline.html), https://www.fda.gov et (Kim, 2017) (voir le **Tableau 6**). Par ailleurs, 29 molécules marines sont dans diverses phases d'essai clinique (www.clinicaltrials.gov) : 5 molécules sont en phase III, 14 molécules en phase II et 10 molécules en phase I. Les propriétés cytotoxiques et anticancéreuses représentent l'activité biologique majeure pour les molécules marines (Simmons et al., 2005; Song et al., 2018). En outre, il est important de noter que le pipeline mondial de pharmacologie marine préclinique continue de générer des données considérables pour plusieurs classes pharmacologiques, telles que : antibactériennes, antidiabétiques, antifongiques, anti-inflammatoires, anti-protozoaires, antituberculeuses, antivirales, contre agents affectant les systèmes immunitaire et nerveux (Abadines et al., 2019; Blunt et al., 2018; Mayer et al., 2017a, 2010, 2017b).

Le **Tableau 6** présente les molécules marines approuvées par la FDA et celles en phase d'essai clinique. Des mises à jour du pipeline des produits pharmaceutiques marins, sont publiées sur le site Web : http://marinepharmacology.midwestern.edu/clinical_pipeline.html.

Tableau 6 : Liste des molécules approuvées pour un usage médicamenteux et en phase d'essais cliniques (mise à jour en juillet 2019).

Composé	**Organisme marin**	**Classe chimique**	**Compagnie/ Institue**	**Maladie**	**Etat clinique**
Cytarabine, ara-C (Cytosar-U®)	Eponge	Nucléoside	Pfizer	Cancer	Approuvé 1969*
Vidarabine, ara-A (Vira-A®)	Eponge	Nucléoside	Mochida Pharmaceuticals	Antiviral	Approuvé 1976*
Ziconotide (Prialt®)	Mollusque	Peptide	Jazz Pharmaceuticals	Douleur	Approuvé 2004*
Omega-3-acid ethyl esters (Lovaza®)	Téléostéen	Acides gras oméga-3	GlaxoSmithKline	Hyper-triglycéridémie	Approuvé 2004*
Midostaurin (Rydapt®)	Ascidie	Indolocarbazole	Novartis Pharmaceuticals, Inc.	Cancer	Approuvé 2007*
Eribulin mesylate (E7389, Halaven®)	Eponge	Macrolide	Eisai Inc.	Cancer	Approuvé 2010*
Brentuximab vedotin (Adcetris®)	Mollusque/ cyanobacterium	ADC (MMAE)	Seattle Genetics	Cancer	Approuvé 2011*
Trabectedin (ET-743, Yondelis®)	Ascidie	Alcaloïde	PharmaMar	Cancer	Approuvé 2015*
Plitidepsin (Aplidin®)	Ascidie	Depsipeptide	PharmaMar	Cancer	Approuvé 2018**
Polatuzumab vedotin (Polivy®)	Mollusque/ cyanobacterium	ADC (MMAE)	Genentech/Roche	Cancer	Approuvé 2019*
Plinabulin (NPI-2358)	Champignon	Dicétopipérazine	BeyondSpring Pharmaceuticals	Cancer	Phase III
Tetrodotoxin (Halneuron™)	Poisson-globe	Alcaloïde guanidine	Wex Pharmaceutical Inc.	Douleur	Phase III
Lurbinectedin (PM01183)	Ascidie	Alcaloïde	PharmaMar	Cancer	Phase III
Marizomib (Salinosporamide A, NPI-0052)	Bactérie	β-lactone-γ-lactame	Triphase	Cancer	Phase III
Enfortumab Vedotin ASG-22ME	Mollusque/ cyanobacterium	ADC (MMAE)	Seattle Genetics	Cancer	Phase III
GTS-21 (DMXBA)	Ver	Alcaloïde	Comentis	Schizophrénie cognitive	Phase II
AGS-16C3F	Mollusque/ cyanobacterium	ADC (MMAF)	Agensys & Astellas Pharma	Cancer	Phase II
Plocabulin (PM184)	Eponge	Polykétide	PharmaMar	Cancer	Phase II
Tisotumab Vedotin	Mollusque/ cyanobacterium	ADC (MMAE)	GenMab	Cancer	Phase II
GSK2857916	Mollusque/ cyanobacterium	ADC (MMAF)	GlaxoSmithKline	Cancer	Phase II
Ladiratuzumab vedotin (SGN-LIV1A)	Mollusque/ cyanobacterium	ADC (MMAE)	Seattle Genetics	Cancer	Phase II
Bryostatin	Bryozoaire	Lactone macrolide	Neurotrope BioScience	Maladie d'Alzheimer	Phase II
Telisotuzumab vedotin (ABBV-399)	Mollusque/ cyanobacterium	ADC (MMAE)	Abbvie	Cancer	Phase II
Pinatuzumab vedotin	Mollusque/ cyanobacterium	ADC (MMAE)	Genentech	Cancer	Phase II

Enapotamab vedotin (HuMax-AXL)	Mollusque/ cyanobacterium	ADC (MMAE)	GenMab	Cancer	Phase II
RC-48	Mollusque/ cyanobacterium	ADC (MMAE)	RemeGen	Cancer	Phase II
CAB-ROR2 (BA-3021)	Mollusque/ cyanobacterium	ADC (MMAE)	BioAtla	Cancer	Phase II
CX-2029	Mollusque/ cyanobacterium	ADC (MMAE)	Abbvie & CytomX Therapeutics	Cancer	Phase II
W0101	Mollusque/ cyanobacterium	ADC (MMAE)	Pierre-Fabre	Cancer	Phase II
ABBV-085	Mollusque/ cyanobacterium	ADC (MMAE)	Abbvie	Cancer	Phase I
ASG-67E	Mollusque/ cyanobacterium	ADC (MMAE)	Astellas & Seattle Genetics	Cancer	Phase I
ASG-15ME	Mollusque/ cyanobacterium	ADC (MMAE)	Astellas & Seattle Genetics	Cancer	Phase I
ARX-788	Mollusque/ cyanobacterium	ADC (MMAE)	Ambrex & Zhejiang Medicine	Cancer	Phase I
SGN-CD48A	Mollusque/ cyanobacterium	ADC (MMAE)	Seattle Genetics	Cancer	Phase I
XMT-1536	Mollusque/ cyanobacterium	ADC (Dolaflexin)	Mersana Therapeutics	Cancer	Phase I
ALT-P7	Mollusque/ cyanobacterium	ADC (MMAE)	3SBio & Alteogen	Cancer	Phase I
MORAb-202	Eponge	ADC (macrolide))	Eisai	Cancer	Phase I
PF-06804103	Mollusque/ cyanobacterium	ADC (Auristatin variant)	Pfizer & AbbVie	Cancer	Phase I
ZW-49	Mollusque/ cyanobacterium	ADC (Auristatin variant)	Zymeworks & BeiGene	Cancer	Phase I

* Approuvé par la FDA (USA) ; ** approuvé par l'Australie ; Ara-A : 9-β-D-arabinofuranosyladénine ; Ara-C : cytosine arabinoside ; ADC (*antibody-drug conjugate*) : conjugue anticorps-médicament ; MMAE : monométhylauristatine E ; MMAF : monométhylauristatine F.

3.3. Inhibiteurs de protéines kinases d'origine marine

Au cours des dix dernières années, afin d'améliorer l'efficacité et la sélectivité des molécules actives, notamment dans le développement de médicaments anticancéreux, les criblages dirigés contre des cibles thérapeutiques spécifiques se sont beaucoup développés comparativement aux criblages de produits cytotoxiques. Comme indiqué précédemment, les protéines kinases sont devenues les cibles les plus utilisées pour mettre en évidence de nouvelles molécules d'intérêts thérapeutiques (Bharate et al., 2013).

Treize PKIs d'origine marine sont approuvés ou sont entrés dans des essais précliniques et cliniques : 3 inhibiteurs sont en phase III, 4 inhibiteurs en phase II, 1 inhibiteurs en phase I et 3 inhibiteurs sont en études précliniques (**Tableau 7**). Ces PKIs sont utilisés pour les traitements anticancéreux, à l'exception du CEP-1347 pour la maladie de Parkinson (Bharate et al., 2013; Ning et al., 2018; Song et al., 2018).

Comme mentionné dans la partie 2.2, la staurosporine est une source d'inspiration pour accélérer le développement de PKIs. Cet alcaloïde indolocarbazole a été découvert en 1977 chez une bactérie terrestre (*Streptomyces staurosporeus*) ainsi que chez certaines espèces marines telles que l'ascidie *Eudistoma toealensis* et le plathelminthe *Pseudoceros* sp. (Omura et al., 1977; Schupp et al., 1999, 2002). Elle est connue pour inhiber la prolifération de 12 lignées de cellules leucémiques (Schupp et al., 2001). Bien que cette molécule soit très toxique, des analogues sont développés et utilisés dans plusieurs phases d'essai clinique ou approuvés par la FDA, comme par exemple la midostaurine (Rydapt®, Novartis Pharmaceuticals, Inc., 2017) (Kim, 2017). Elle cible plusieurs protéines kinases telles que les FLT3 (*Fms-like tyrosine kinase 3*), les PKC (*protein kinases C)* et les VEGFRs (*vascular endothelial growth factor receptors*). Cette molécule a été étudiée notamment pour le traitement de la leucémie myéloïde aiguë. Elle empêche les cellules de se développer et de proliférer. En comparaison avec la structure de la staurosporine, l'ajout d'un groupe phénolique augmente la capacité de la molécule à être absorbée (le pic de concentration plasmatique est atteint en seulement 1 h après la première administration) et diminue la toxicité de la molécule (des doses de 50-225 mg/jour sont administrées). Ce groupe phénolique apporte donc efficacité et sécurité à la midostaurine. La tendance actuelle est de développer des inhibiteurs de kinase à partir de la structure d'un « hit », comme la staurosporine. L'utilisation d'un logiciel de docking *in silico*, dans la recherche de nouvelles molécules actives, est indispensable afin de mieux comprendre l'interaction avec la kinase ciblée et d'orienter la synthèse de dérivés chimiques. D'autres techniques telles que la cristallographie et la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN) sont également utilisées pour déterminer les structures tridimensionnelles qui seront ensuite utilisées dans les logiciels de docking. Toutes ces molécules d'origines marines, particulièrement la staurosporine, constituent de très bons candidats dans le développement de médicaments utilisés en thérapie humaine (Bharate et al., 2013).

Tableau 7 : Inhibiteurs de protéines kinases d'origine marine en développement clinique.

Inhibiteur	Source marine	Cibles kinases	Classe chimique	Compagnie/ Institue	Maladie	Etat clinique
Midostaurin (Rydapt®)	Ascidie	FLT3, PKC, VEGFRs	Indolocarbazole	Novartis Pharmaceuticals, Inc.	Cancer	Approuvé 2007
Plitidepsin (Aplidin®)	Ascidie	EGFR, Src, JNK, and p38 MAPK	Depsipeptide	PharmaMar	Cancer	Approuvé 2018
Meisoindigo	Mollusque; semi-synthétique	CDK	Indole	National University of Singapore	Cancer	Phase III
Lestaurtinib (CEP-701)	Ascidie	FLT3, JAK-2, TRK-A, TRK-B, ET TRK-C	Indolocarbazole	National Cancer Institute	Cancer	Phase III
Enzastaurin (LY317615)	Ascidie	PKCβ, GSK-3β	Indolocarbazole	Eli Lilly	Cancer	Phase III
UCN-01	Ascidie	PKC	Indolocarbazole	National Cancer Institute	Cancer	Phase II
Kahalalide F	Limace de mer	Erb-B2, PI3K/Akt	Tridécapeptide	PharmaMar	Cancer	Phase II
CEP-2563	Ascidie	TRK-A, TRK-B, TRK-C	Indolocarbazole	Cephalon	Cancer	Phase II
CEP-1347 (KT7515)	Ascidie	JNKs	Indolocarbazole	Cephalon	Parkinson	Phase II
Isokahalalide F (PM02734, elisidepsin)	Limace de mer	ERBB2	Tridécapeptide	PharmaMar	Cancer	Phase I
Staurosporine (AM-2282)	Ascidie	PKC, JAK2, CamKIII	Indolocarbazole	Kyowa Hakko Kirin (originator)	Cancer	Pré clinique
Variolin B (PM-01220)	Eponge	CDK1, CDK2	Pyrrol pyrimidine	PharmaMar	Cancer	Pré clinique
Fascaplysin	Eponge	CDK4	Bis indole	Cornell University; University of Utah	Cancer	Pré clinique

3.4. Inhibiteurs de la mort cellulaire programmée d'origine marine

Grâce à l'évolution de nos connaissances sur le mécanisme d'action des voies de PCD et sur leurs rôles physiopathologiques, de nouvelles thérapies ciblant le processus de mort cellulaire se sont développées, en particulier dans le traitement des cancers. Comme mentionnée précédemment, le développement des médicaments d'origine marine est une nouvelle tendance, car la mer renferme une grande diversité biologique et chimique encore largement méconnue. Cette tendance de recherche se concentre sur la caractérisation des produits naturels marins qui modulent la mort cellulaire et présentent un intérêt en thérapie humaine. Le **Tableau 8** classe les modulateurs de la PCD, d'origine marine, selon leur mécanismes d'action (Guzmán, 2019). Citons par exemple, de nombreux composés naturels marins induisent l'apoptose selon

différents mécanismes, notamment : 1) l'inhibition des protéines anti-apoptotiques (renieramycine M) ; 2) l'activation des protéines pro-apoptotiques (marinopyrrole A) ; ou encore 3) la sensibilisation des cellules cancéreuses à une induction de PCD (spongistatine 1) (Ercolano et al., 2019; Guzmán, 2019; von Schwarzenberg and Vollmar, 2013). D'autres molécules marines affectent la dynamique des microtubules, engendrent une catastrophe mitotique, et peuvent induire une mort cellulaire apoptotique (De and Chatterji, 2017; Liu et al., 2014; Miller et al., 2018). Par ailleurs, de nombreux composés naturels marins peuvent également moduler d'autres voies de PCD comme l'autophagie (Guzmán et al., 2019; Kallifatidis et al., 2013; Ratovitski, 2016; Rubiolo et al., 2014; Wan et al., 2018) et la ferroptose (Berrué et al., 2012; Dai et al., 2018). Trois modulateurs de PCD d'origine marine, approuvés ou en cours d'évaluation cliniques, sont : trabectedin (ET-743, Yondelis®), bryostatin-1 et kahalalide F.

Tableau 8 : Certains groupes de modulateurs de la PCD, d'origine marine.

Voie de mort cellulaire	Classe	Agent
Apoptose	Inhibiteurs de HDAC	Largazole, psammapline A
	Inhibiteurs de CDKs	Varioline, désoxy-varioline B
	Agents ciblant le réticulum endoplasmique	Céphalostatine-1
	Agents ciblant la dynamique mitochondriale	Aurilide
	Stimulateurs de protéines pro-apoptotiques	Marinopyrrole A (Maritoclax®), analogues de la jahanyne
	Inhibiteurs de protéines anti-apoptotiques	Renieramycine M
	Inducteurs de l'anoïkose	Spongistatine 1
	Modulateurs de la voie NF-κB	Salinosporamide A, bengamides, spongiatriol, microsclérodermine A
	Agents pour sensibiliser à la PCD	Manzamine A, chromomycines A2-A3, aplysine
Catastrophe mitotique	Agents stabilisants du microtubule	Discodermolide
	Modulateurs de la dynamique du microtubule	Leiodermatolide
Autophagie	Inducteurs de l'autophagie	Chromomycine A2, psammapline A, ilimaquinone, coibamide A, apratoxine A, yessotoxine
	Inhibiteurs de l'autophagie	Manzamine A, scalarin
Ferroptose	Inducteurs de la ferroptose	β-carboline RSL-3
	Inhibiteurs de la ferroptose	Acanthifolioside G

Conclusion sur le potentiel des molécules marines en thérapie humaine

Les études de nombreuses structures chimiques issues de différents organismes marins, ont montré qu'elles sont capables d'induire une variété de mécanismes de mort cellulaire dans différents types de cellules tumorales. Cette grande variété de mécanismes d'action permet de

lutter contre les résistances des cellules cancéreuses aux traitements actuels. Les produits marins, et leurs dérivés synthétiques, constituent donc une source importante pour des chimiothérapies anticancéreuses, en usage unique ou combinées à d'autres approches thérapeutiques.

Malgré le grand potentiel de recherche de nouveaux médicaments à partir de produits naturels marins, seulement dix composés marins ont été approuvés pour un usage chez l'homme. La plupart des molécules marines qui ont été développées en clinique ont été retirées en raison de toxicités indésirables. En parallèle de la recherche des nouveaux agents thérapeutique d'origine marine, des modifications chimiques de ces nouvelles molécules sont ainsi nécessaires, afin d'améliorer leur bioactivité et de diminuer les effets secondaires.

Objectifs de la thèse

Le cancer est la première cause de décès avant l'âge de 65 ans, en France et dans le monde. Selon l'Institut National du Cancer, en France en 2018, 382 000 nouveaux cas de cancers ont été diagnostiqués (un Français sur 175), et 157 400 personnes en sont mortes. Le cancer du poumon est responsable de plus du quart des décès causés par un cancer. Le cancer se caractérise par une multiplication anarchique de cellules altérées. Il y a plusieurs facteurs qui peuvent conduire à un cancer : l'âge, les habitudes de vie, l'environnement et des facteurs héréditaires. Pour lutter contre les différents types de cancer, plusieurs sortes de traitements peuvent être appliqués : l'intervention chirurgicale associée à la radiothérapie (exemple du traitement contre le cancer du sein) ; la chimiothérapie qui peut être associée à la greffe de moelle osseuse dans le cas de cancers du sang (leucémies) ; l'immunothérapie avec l'utilisation de pembrolizumab (Keytruda®, Merck) pour le traitement du mélanome, du cancer du poumon non à petites cellules et du lymphome de Hodgkin classique. Des traitements préventifs existent également tels que, la vaccination contre le virus de l'hépatite B, responsable de certains cancers du foie, et contre le virus papillome humain, cause principale du cancer du col de l'utérus. Le taux de guérison dépend de plusieurs facteurs : le type de cancer, l'étendue du cancer au moment du diagnostic, la malignité des cellules, ou encore la disponibilité d'un traitement efficace.

La chimiothérapie est un traitement anticancéreux médicamenteux systémique. Dans un grand nombre de cancers, elle est utilisée seule ou en association avec d'autres traitements anticancéreux (chirurgie, radiothérapie). La chimiothérapie peut guérir un cancer ou ralentir l'évolution de la maladie, donc prolonger l'espérance de vie ou améliorer la qualité de vie des patients atteints du cancer. L'objectif principal de la chimiothérapie est d'induire l'apoptose des cellules cancéreuses. Cependant, de nombreuses cellules cancéreuses, grâce à des mutations, ont acquis la capacité de surmonter la mort cellulaire. Ainsi, il existe un besoin urgent de nouvelles stratégies thérapeutiques basées sur de nouvelles molécules anticancéreuses puissantes, ciblant des sous-programmes canoniques et non canoniques de mort cellulaire. Diverses voies de mort cellulaire, telles que la nécroptose, la ferroptose et la catastrophe mitotique, ont été caractérisées et sont considérées comme des voies alternatives dans les cancers apoptose-résistants. Par conséquent, la caractérisation de nouveaux déclencheurs chimiques de la mort cellulaire, est nécessaire pour comprendre le mécanisme conduisant à la

mort cellulaire et développer des nouveaux médicaments potentiels, destinés aux traitements anticancéreux.

Ces travaux de thèse avaient pour objectif d'étudier le mode d'action de nouvelles molécules marines modulant la mort cellulaire programmée impliquée dans des conditions pathologiques : (i) l'induction de la mort des cellules d'ostéosarcome U-2 OS et (ii) l'inhibition de la mort des cellules neuronales HT-22 induite par le glutamate. Cette approche chémobiologique d'étude de la mort cellulaire a permis d'illustrer deux applications des molécules marines en santé humaine, ainsi que de montrer la complexité de la modulation des voies de mort cellulaire. Les connaissances qui ont été générées au cours de ce travail pourront être utilisées afin d'améliorer les stratégies thérapeutiques ciblant la modulation de la PCD, notamment dans le cas des cancers résistants aux chimiothérapies ou encore des maladies neurodégénératives. Nous espérons que ce travail incitera la communauté scientifique à développer des programmes de recherche de molécules modulatrices du destin cellulaire provenant d'une des plus grandes sources de biodiversité de notre planète : l'écosystème marin.

(i) Pour étudier l'induction de la mort des cellules cancéreuses, nous avons testé des produits marins (extraits et molécules purifiées) dont la majorité nous a été fournie par le laboratoire « Produits Naturels Marins » de l'Institut de Chimie de Nice, dirigé par le Dr. Mohamed Mehiri (UMR 7272, Université Côte d'Azur). Dans un premier temps, des extraits naturels ont été testés par criblage primaire sur un panel de protéines kinases associées à des maladies humaines, notamment dans les cancers pour les kinases PIM1, CDK2/CyclineA, CDK5/p25, CDK9/CyclinT, Aurora B et Haspin. Ce criblage a été réalisé sur la plate-forme de criblage moléculaire KISSf, dirigée par les docteurs Stéphane Bach et Sandrine Ruchaud (UMR 8227, Station Biologique de Roscoff). L'activité inhibitrice détectée sur kinase a ensuite été utilisée pour guider la purification du produit naturel actif à partir de l'extrait brut. Dans un second temps, nous avons évalué les effets antiprolifératifs de ce produit naturel, sur différentes lignées cellulaires cancéreuses [de la leucémie (A3) à des tumeurs solides (U-2 OS, SH-SY 5Y, U-87, Hep-G2, MCF-7, AsPC-1, HT-29 et PANC-1)] et non-cancéreuses humaines (hTERT RPE-1, HEK-293 et RC-124) ou murines (HT-22). De plus, sur la lignée cellulaire tumorale la plus sensible de ce panel : les cellules d'ostéosarcome U-2 OS, nous avons déterminé les mécanismes par lesquels la molécule marine P3 affecte la viabilité.

(ii) Pour étudier l'inhibition de la mort des cellules neuronales, nous avons également étudié la protection, apportée par certains pigments marins (diadinoxanthine, lutéine et

violaxanthine), contre la mort des cellules HT-22 d'hippocampe de souris, induite par le glutamate ou l'érastine. La mort des cellules neuronales, liée à l'accumulation de protéines mal repliées, est un point crucial dans les maladies neurodégénératives les plus courantes : la maladie d'Alzheimer (MA), la maladie de Parkinson (MP), et la maladie de Huntington (MH). La chronologie de la plupart des maladies neurodégénératives et le manque de marqueurs spécifiques pour détecter une mort neuronale en compliquent le diagnostic. Dans le cadre de cette thèse, nous avons utilisé les modèles HT-22/glutamate et HT-22/érastine pour étudier la mort neuronale programmée *in cellulo*. Cette approche a fait intervenir des modulateurs chimiques disponibles commercialement afin de caractériser les effets neuroprotecteurs de pigments marins. En plus de l'activité antiproliférative sur des cellules cancéreuses, nous avons souhaité nous concentrer sur une autre application potentielle de ces caroténoïdes, en explorant leur rôle d'« alicaments » en nutraceutique.

Résultats

1. Etude du mécanisme d'induction de la mort cellulaire par des molécules marines de *Crambe tailliezi* et *Crambe crambe* sur certaines lignées de cellules cancéreuses

Dans la première partie des résultats, je présenterai respectivement : la caractérisation du produit P3 isolé de l'éponge de Méditerranée *Crambe tailliezi*, qui induit la mort cellulaire programmée des cellules cancéreuses U-2 OS (ostéosarcome) ; et la caractérisation, au niveau chimique et biologique, de nouveaux métabolites secondaires issus de l'éponge marine d'atlantique *Crambe crambe*.

Phylum : Porifera

Classe : Demospongiae

Ordre : Poecilosclerida

Famille : Crambeidae

Genre : *Crambe*

Espèce : *Crambe tailliezi* ou *Crambe crambe*

Crambe tailliezi

doris.ffessm.fr © Jean VACELET

Crambe crambe

doris.ffessm.fr © Jacques GACON

Figure 23 : Photos de *Crambe tailliezi* (Vacelet & Boury-Esnault, 1982) et *Crambe crambe* (Schmidt, 1862). Source : [doris.ffessm.fr].

1.1. Caractérisation du composé P3 isolé de l'éponge de Méditerranée *Crambe tailliezi*

Contexte et résumé de l'article 1

Comme mentionné dans les objectifs de la thèse, afin de caractériser des nouvelles molécules d'intérêt thérapeutique, notre étude a été réalisée dans le cadre d'une collaboration entre le groupe "Produits Naturels Marins" de l'Institut de Chimie de Nice (CNRS et Université Côte d'Azur) et la plate-forme KISSf de la Station Biologique de Roscoff. Nous avons effectué un criblage enzymatique primaire dans le but d'orienter la sélection des extraits et de purifier des molécules actives à partir des extraits d'intérêt. Des évaluations de bio-activités ont ensuite été conduites pour construire un profil complet de ces molécules purifiées, dans le but d'explorer le potentiel de la ressource marine en thérapie humaine.

Nous avons exploré un panel de 12 protéines kinases impliquées dans diverses pathologies. Le criblage enzymatique primaire d'une collection originale de 30 extraits d'organismes marins, recueillis en mer Méditerranée, a permis d'identifier un extrait de l'éponge *Crambe tailliezi* et l'un de ses produits purifiés de haut poids moléculaire (appelé « P3 ») comme inhibiteur des protéines kinases Aurora A et B. Ces deux kinases sont essentielles à la mitose et sont des cibles exploitées par l'industrie pharmaceutique pour les traitements anticancéreux. Ce résultat a orienté notre analyse du phénotype cellulaire induit par P3. Cette molécule a montré une activité antiproliférative sur des lignées cellulaires cancéreuses humaines, de la leucémie à des tumeurs solides affectant les tissus mammaires, colorectaux, hépatiques, osseux, pancréatiques et cérébraux. De plus, nous avons montré que le traitement des cellules d'ostéosarcome U-2 OS par le P3 induit une mort cellulaire apoptotique complexe. Cette voie de mort induite par P3 est sensible à la nécrostatine-1 mais ne fait pas intervenir la kinase clé RIPK1. La dépendance à l'activation des caspases de cette voie ne semble pas obligatoire, sachant qu'un traitement avec 50 µM d'un pan-inhibiteur de caspases (Z-VAD-FMK) n'inhibe pas l'apoptose tardive déclenchée par le P3. Des désordres mitotiques ont également pu être décrits.

En utilisant une variété de techniques telles que la culture cellulaire, la microscopie à fluorescence, la cytométrie en flux, la vidéo-microscopie sur les cellules vivantes, nous avons détaillé le phénotype de PCD induit par la molécule P3 de *Crambe tailliezi*. L'effet d'inhibition de la viabilité de sphéroïdes U-2 OS, par P3, a également été observé.

Article 1 *(soumis)*

Kinase-based screening of marine natural extracts leads to the identification of a cytotoxic high molecular weight metabolite from the Mediterranean sponge *Crambe tailliezi*

Thi-Ngoc-Dung Nguyen [1,2], Omid Feizbakhsh [1], Estelle Sfecci [3], Blandine Baratte [1,4], Claire Delehouzé [1,5], Adrien Garcia [3], Corentin Moulin [3], Pierre Colas [1], Sandrine Ruchaud [1,*], Mohamed Mehiri [3,*] and Stéphane Bach [1,4,*]

[1] Sorbonne Université, CNRS, Station Biologique de Roscoff, UMR 8227, Integrative Biology of Marine Models Laboratory (LBI2M), CS 90074, 29688 Roscoff Cedex, France; dnguyenthingoc@sb-roscoff.fr; omid.feizbakhsh@sb-roscoff.fr; blandine.baratte@sb-roscoff.fr; colas@sb-roscoff.fr; sandrine.ruchaud@sb-roscoff.fr; bach@sb-roscoff.fr

[2] University of Medicine and Pharmacy, Faculty of Pharmacy, Department of Chemical Analysis and Drug Quality Control, Ho Chi Minh City, Vietnam; ntndung@upm.edu.vn; nguyenngocdung_py@yahoo.com

[3] Université Côte d'Azur, Institut de Chimie de Nice, CNRS, UMR 7272, Marine Natural Products Team, 06108 Nice, France; estelle.sfecci@univ-cotedazur.fr; adrien.garcia@univ-cotedazur.fr; corentin.moulin@univ-cotedazur.fr; mohamed.mehiri@univ-cotedazur.fr

[4] Sorbonne Université, CNRS, Station Biologique de Roscoff, FR 2424, Plateforme de criblage KISSf (Kinase Inhibitor Specialized Screening facility), Place Georges Teissier, 29682 Roscoff, France

[5] SeaBeLife Biotech, Place Georges Teissier, 29682 Roscoff, France; claire.delehouze@seabelife.com

[*] Correspondence: sandrine.ruchaud@sb-roscoff.fr (S.R.); mohamed.mehiri@univ-cotedazur.fr (M.M.); bach@sb-roscoff.fr (S.B.); Tel.: +33-298-292-309 (S.R.); +33-492-076-154 (M.M.); +33-298-292-391 (S.B.); Fax: +33-492-076-151 (M.M.); +33-298-292-526 (S.R. and S.B.)

Received: date; Accepted: date; Published: date

Abstract: Regulated cell death (RCD) results from the activation of one or more signal transduction modules both in physiological or pathological conditions. It is now established that RCD is involved in numerous human diseases, including cancer. As regulated cell death processes can be modulated by pharmacological tools, the research reported here aims to characterize new marine compounds acting as RCD modulators. Protein kinases (PKs) are key signaling actors in various RCD notably through the control of either mitosis (e.g. the PKs Aurora A and B) or necroptosis (e.g. RIPK1 and RIPK3). From the primary screening of 30 various extracts of marine organisms, collected in the Mediterranean Sea, we identified an extract and subsequently a purified high molecular weight compound dubbed P3, isolated from the marine sponge *Crambe tailliezi*, acting as a selective inhibitor of PKs Aurora A and B. We further showed that P3 induced apoptosis, decreased proliferation and mitotic index of human osteosarcoma U-2 OS cells.

Keywords: Screening, kinase inhibition; regulated cell death; high molecular weight metabolite; marine natural products; *Crambe tailliezi*

1. Introduction

"Live or die" is the binary choice that a cell has to make in order to maintain the balance in the functions of a multicellular organism (also known as the homeostasis). Thus, similarly to the control of cell division, cell death is also tightly regulated [1]. The concept of "programmed cell death (PCD)", which first appeared in the early 1960s, designates the natural process of regulated cell death that

occurs during organisms' development and tissue homeostasis [2,3]. PCD is now considered as a particular form of "regulated cell death" (RCD) that occurs in strictly physiological scenarios [4]. Death signaling pathways can be activated by internal or external signals. It is a natural process to eliminate undesirable cells including tumor ones. Thus, RCD plays a crucial role in either physiological or pathological conditions. Abnormal RCD can cause disorders such as cancer, inflammatory diseases and neurodegenerative diseases [1,5]. Apoptosis was the first RCD described (1972) [6] and the most studied until now. The classical apoptosis pathway is triggered and mediated by cysteine-aspartic proteases called caspases [7]. The main goal in cancer chemotherapy is to induce apoptosis but many cancer cells gain the ability to overcome RCD by mutations giving them a survival advantage. Therefore, there is an urgent need of new therapeutic strategies based on new potent anticancer molecules activating canonical and non-canonical cell-death subroutines [8]. Indeed, recently, several groups have discovered and described other types of RCD that can be targeted, like necroptosis, autophagy, ferroptosis or death by mitotic catastrophe [4,9]. These alternative RCD pathways may represent opportunities to trigger cell death when facing apoptosis resistance [10]. However, various open questions need to be addressed regarding their controls and regulatory crosstalk. Therefore, the characterization of new chemical triggers of RCD can kill two birds with one stone: (i) deciphering the molecular mechanisms leading to cell death and (ii) characterizing new putative drugs for cancer therapy.

The great potential of marine products for human therapy was discovered in the 1950s with the discovery of two nucleosides spongothymidine and sponguridine from the Caribbean sponge *Cryptotethia crypta* [11–13]. Nowadays, it is well known that marine organisms can be new sources of drugs modulating various RCD processes [14]. Marine sponges (and their associated microbiota) are among the most promising group because of the chemical diversity of their secondary metabolites and their strong bioactivity as cytotoxic agents or protein kinase inhibitors (PKIs), among other activities [15–17]. Protein kinases are involved in the regulation of numerous cellular processes, often in response to an external stimulus. This family of enzymes has become one of the most important supplier of drug targets and perhaps up to one third of drug discovery efforts worldwide are focused on the discovery of new PKIs [18]. The number of approved PKIs continues to grow and as of August 2019, 50 drugs have reached the US market (Figure 1), 85% of which are used for the treatment of malignancies [18]. More than 200 orally effective PKIs are currently in clinical trials worldwide (a complete and updated listing of PKIs in clinical trials can be found at www.icoa.fr/pkidb/) [19,20].

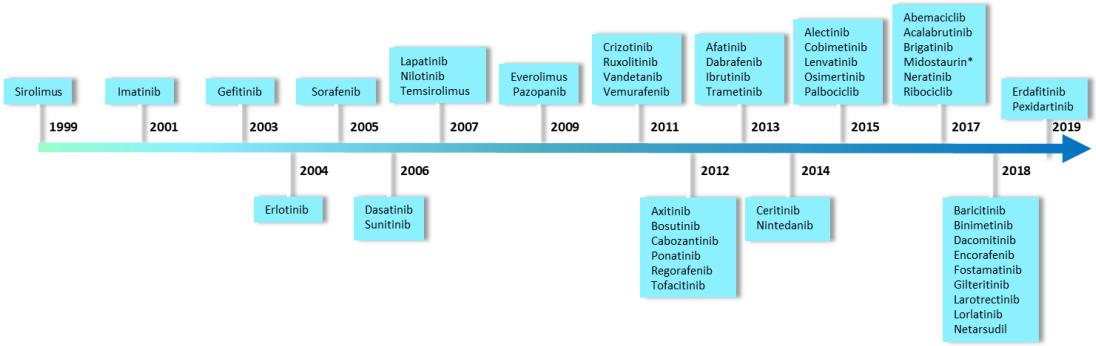


Figure 1. FDA-approved protein kinase inhibitors as of August 2019. This timeline was performed using the data reported in Roskoski R., 2019. * Midostaurin is a derivative of a marine natural compound.

Manning et *al*. have first catalogued the 518+ protein kinases encoded by the human genome (the "kinome"). The kinome was classified based on protein sequences into eight typical groups (AGC, CAMK, CK1, CMGC, STE, TK, TKL and Other, see the legend of Figure 2 for details) and 13 atypical families [21].

In keeping with the high chemodiversity of PKIs described in marine sponges [15], we used a panel of 11 protein kinases as filtering technique to associate a marine natural product with a disease-

related cellular phenotype. Following this primary enzymatic screening campaign of an original collection of 30 extracts from marine organisms collected in the Mediterranean Sea, we found that an extract from *Crambe tailliezi* and one of its purified product (P3) inhibited Aurora A and B kinases. This result oriented our analysis on the cellular phenotype induced by the natural product P3. We showed that P3 could induce the programmed cell death of human cancer cell lines derived from leukemia and solid tumors affecting breast, colorectal, liver, bone, pancreas and brain tissues. Moreover, we showed that the treatment of osteosarcoma U-2 OS cell line with P3 triggered apoptotic cell death.

2. Results

The methodological workflow used to characterize new bioactive extracts and purified fractions from a set of selected marine organisms is schematically represented in Figure 2. The primary screening was performed on a panel of defined targets (kinases), an approach often referred to as reverse chemical genetics / biology. Note here that the so-called forward chemical genetics / biology approaches entail phenotypic screening (e.g. used in neuropsychiatric drug discovery [22]).

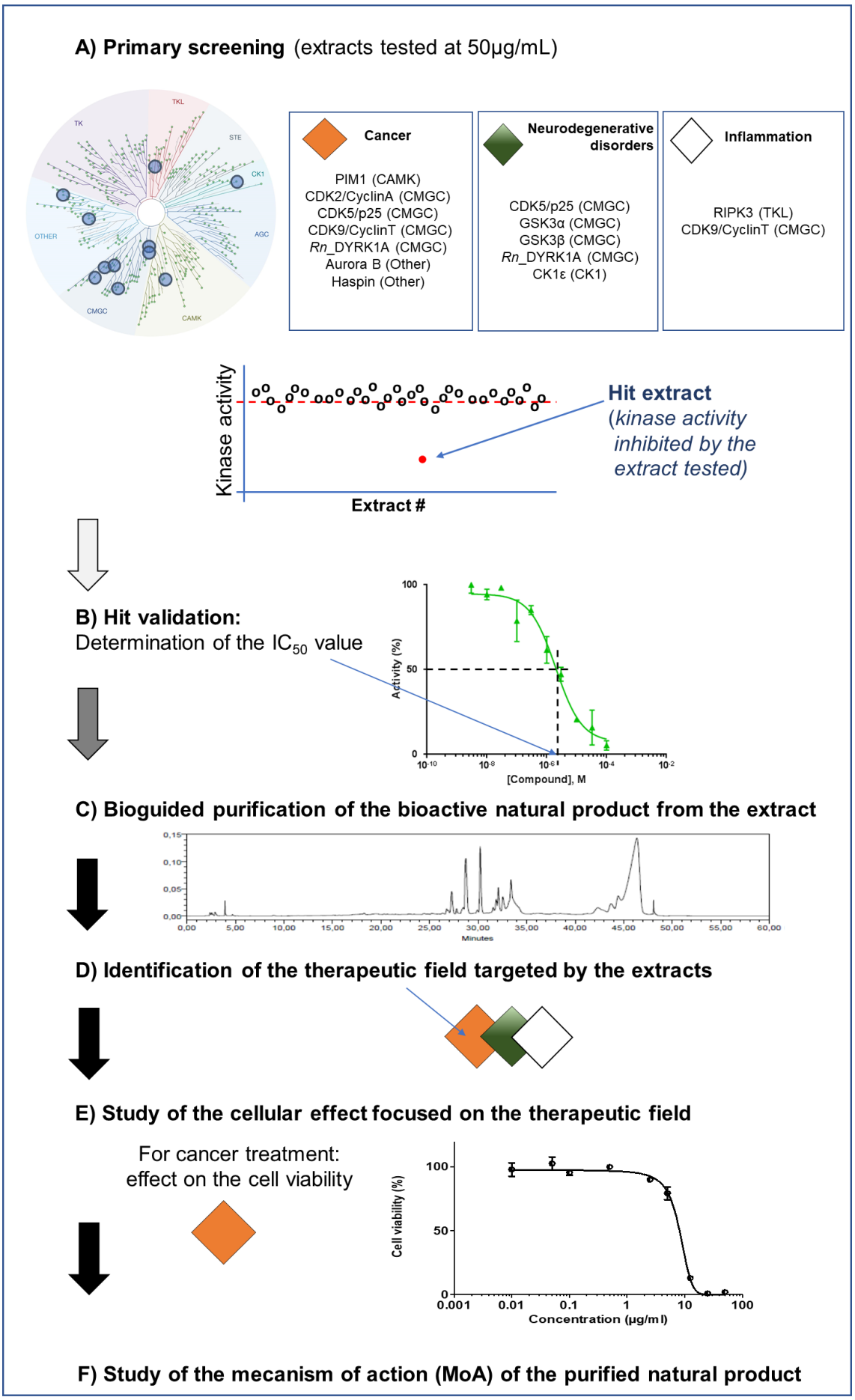

A) Primary screening (extracts tested at 50µg/mL)
TKL
TK
STE
CK1
OTHER
AGC
CMGC
CAMK
Cancer
PIM1 (CAMK)
CDK2/CyclinA (CMGC)
CDK5/p25 (CMGC)
CDK9/CyclinT (CMGC)
Rn_DYRK1A (CMGC)
Aurora B (Other)
Haspin (Other)
Neurodegenerative disorders
CDK5/p25 (CMGC)
GSK3α (CMGC)
GSK3β (CMGC)
Rn_DYRK1A (CMGC)
CK1ε (CK1)
Inflammation
RIPK3 (TKL)
CDK9/CyclinT (CMGC)
Kinase activity
Extract #
Hit extract
(kinase activity inhibited by the extract tested)
B) Hit validation:
Determination of the IC50 value
Activity (%)
[Compound], M
C) Bioguided purification of the bioactive natural product from the extract
Minutes
D) Identification of the therapeutic field targeted by the extracts
E) Study of the cellular effect focused on the therapeutic field
For cancer treatment:
effect on the cell viability
Cell viability (%)
Concentration (µg/ml)
F) Study of the mecanism of action (MoA) of the purified natural product

Figure 2. Workflow of the kinase-based screening assay of the marine extracts. (**A**) During the first step, a primary screening is performed against a disease-related panel of protein kinases. These targets are selected among the human kinome as mentioned on the figure by blue dots on the circular tree. This image was generated using TREEspot™ Software Tool and reprinted with permission from KINOMEscan®, a division of DiscoverX Corporation (© DISCOVERX CORPORATION 2010). The codes reported on this figure indicate the subclasses of protein kinases: CMGC for CDKs, MAP kinases, GSK and CDK-like kinases; AGC for protein Kinase A, C, and G families (PKA, PKC, PKG); CAMK for Ca2+/calmodulin-dependent protein kinases; CK1, Cell/Casein Kinase 1; STE, STE Kinases (Homologs of yeast STErile kinases); TKL, Tyrosine Kinases-Like; TK, Tyrosine Kinases. All protein kinases used here are human unless specified *Rn, Rattus norvegicus*. As mentioned on this theoretical scatter plot, an extract is selected as screening hit when it is shown to inhibit the kinase activity of the tested kinase. (**B**) In a second step, the IC_{50} s were then calculated from dose-response curves in order to validate the first hits. (**C**) Kinase inhibition was then used to guide the purification of the natural products from the crude extracts. From this step, the identification of the inhibited kinase drives the selection of both the therapeutic field (**D**) and the study of the cellular effects of the tested natural product (**E**). Here is shown the study of a compound that can inhibit kinase(s) involved in cancer (e.g Aurora B kinase). The phenotype studied is the "*dose-dependent modulation of the cellular viability by the natural product*". (**F**) In an optimal case, the final step is the study of the mechanism of action and if possible the characterization of the cellular targets of the selected marine products.

2.1. *Primary screening of a selected set of purified marine extracts against a panel of disease-related kinases*

We screened the inhibitory activity of 30 extracts of marine organisms collected in the Mediterranean Sea (see the Materials and Methods section for details on the protocol used to obtain the extracts) against a panel of 11 disease-related protein kinases (listed on Figure 2): Aurora B, CDK2/CyclinA, CDK5/p25, CDK9/CyclinT, CK1ε, GSK3α, GSK3β, Haspin, Pim1, RIPK3 kinases, and rat DYRK1A. The results obtained are reported in Table 1.

The screen revealed that several extracts from *Crambe tailliezi, Hexadella* sp., *Pseudaxinyssa* sp., *Ircinia oros, Sarcotragus foetidus* and *Sarcotragus spinosulus* showed interesting kinase inhibitory properties. We obtained a very high hit score of 50% calculated from the number of extracts inhibiting at least one kinase. Four ascidium extracts tested here did not show as much activity towards kinases as sponge extracts. We also found that GSK3 isoforms α and β were the most frequently targeted kinases.

The extract E13 from *Crambe tailliezi* inhibited the mitotic kinase Aurora B whereas the extract E12 from *Crambe crambe*, which is also a member of the *Crambeidea* family, did not. In regard to the rather good selectivity toward the kinase tested, we decided to select *Crambe tailliezi* for further fractionation and isolation of the active natural products. Indeed, within the *Crambeidea* family, *Crambe tailliezi* [23], an encrusting marine sponge also distributed in the Mediterranean Sea, is only poorly studied for either its chemical composition or its biological effects, contrary to *Crambe crambe* [24] that has been widely explored chemically since the 90's [25–28].

Table 1. Target-based screening of extracts from various marine organisms from Mediterranean Sea. Characterization of extracts with kinase inhibitory activity.

Extract	Marine organism	Hs_CDK2/ CyclinA	Hs_CDK5/ p25	Hs_CDK9/ CyclinT	Hs_Haspin	Hs_PIM1	Rn_DYRK1A	Hs_CK1ε	Hs_GSK3α	Hs_GSK3β	Hs_RIPK3	Hs_AuroraB
E1	Ascidium *Aplidium* sp.	81	≥100	100	63	≥100	97	94	≥100	76	87	99
E2	Ascidium *Cystodytes* sp.	68	58	52	25	62	29	89	54	70	77	83
E3	Ascidium *Halocynthia papillosa*	85	73	81	65	90	95	≥100	91	97	91	100
E4	Ascidium *Polysyncraton* sp.	69	82	≥100	94	92	≥100	≥100	≥100	88	86	90
E5	Sponge *Acanthella acuta*	100	≥100	83	86	≥100	87	78	≥100	69	≥100	≥100
E6	Sponge *Agelas oroides*	71	74	46	26	67	19	46	23	35	80	69
E7	Sponge *Axinella polypoides*	≥100	≥100	87	84	≥100	81	77	≥100	67	≥100	≥100
E8	Sponge *Axinella* sp.	98	≥100	91	93	87	63	82	68	71	87	≥100
E9	Sponge *Axinyssa* sp.	71	63	80	96	≥100	51	≥100	96	88	96	83
E10	Sponge *Cacospongia* sp.	≥100	≥100	71	79	100	≥100	92	88	68	93	96
E11	Sponge *Cliona viridis*	64	≥100	94	≥100	≥100	85	98	100	85	95	100
E12	Sponge *Crambe crambe*	66	62	47	≥100	16	37	19	84	≥100	≥100	79
E13	Sponge *Crambe tailliezi*	77	57	48	78	54	27	22	21	28	87	8
E14	Sponge *Haliclona mediterranea*	91	≥100	89	87	≥100	61	96	84	≥100	97	100
E15	Sponge *Hemimycale columella*	≥100	≥100	≥100	84	≥100	100	≥100	92	62	91	94
E16	Sponge *Hexadella* sp.	98	65	7	17	63	4	2	2	10	65	61
E17	Sponge *Ircinia oros*	40	≥100	30	34	≥100	26	17	13	9	72	91
E18	Sponge *Ircinia variabilis*	100	92	58	42	75	50	≥100	41	37	88	94
E19	Sponge *Oscarella* sp.	66	≥100	96	89	92	≥100	≥100	≥100	≥100	97	98
E20	Sponge *Phorbas* sp.	≥100	≥100	91	77	≥100	75	88	93	69	98	≥100
E21	Sponge *Pleraplesila spinifera*	≥100	≥100	78	79	≥100	≥100	≥100	98	54	90	87

Extract	Marine organism	Hs_CDK2/ CyclinA	Hs_CDK5/ p25	Hs_CDK9/ CyclinT	Hs_Haspin	Hs_PIM1	Rn_DYRK1A	Hs_CK1ε	Hs_GSK3α	Hs_GSK3β	Hs_RIPK3	Hs_AuroraB
E22	Sponge *Pseudaxinyssa* sp.	96	≥100	31	12	≥100	35	1	5	25	84	≥100
E23	Sponge *Pseudoceratina* sp.	91	34	≥100	44	14	≥100	53	90	100	81	52
E24	Sponge *Ptilocaulis fusiformis*	90	71	26	71	37	37	95	19	25	64	62
E25	Sponge *Reniera fulva*	65	≥100	≥100	61	≥100	83	≥100	100	58	≥100	99
E26	Sponge *Reniera mucosa*	88	86	28	25	96	50	17	14	45	64	43
E27	Sponge *Reniera sarai*	≥100	76	36	11	50	42	42	28	51	86	86
E28	Sponge *Sarcotragus foetidus*	60	≥100	66	14	79	29	21	13	4	92	97
E29	Sponge *Sarcotragus spinosulus*	65	≥100	62	35	40	6	7	8	12	86	91
E30	Sponge *Verongida* sp.	≥100	98	≥100	≥100	96	≥100	≥100	≥100	≥100	100	98

Kinase activities in the presence of extracts (50 µg/mL) were measured by ADP-Glo luminescent assay (Promega, Madison, WI, USA), using 10 µM of ATP. Data are mean (n=2) expressed in % of maximal activity, compared with a DMSO control. CDK: cyclin-dependent kinase, Haspin: haploid germ cell-specific nuclear protein kinase, PIM: proto-oncogene proviral integration site for moloney murine leukemia virus, DYRK1A: dual specificity tyrosine phosphorylation regulated kinase 1A, CK1: casein kinase 1, GSK3: glycogen synthase kinase 3, RIPK: receptor-interacting protein kinase. Kinases are from human origin, *Hs, Homo sapiens*, unless specified *Rn, Rattus norvegicus*.

2.2. *P3, a high molecular weight natural product, isolated from Crambe tailliezi sponge selectively inhibits protein kinases Aurora A and Aurora B*

As the dichloromethane-methanol extract E13 from *Crambe tailliezi* was shown to inhibit few protein kinases from the panel tested, we decided to isolate the active compound from this crude organic extract. The marine natural product P3 was thus found as the main component of the extract (see the materials and methods section for details and Figure S 1). Therefore, we tested if the kinase inhibition properties of the extract were maintained in the purified product. As shown on Table 2, P3 inhibited the kinase activity of Aurora B in a dose-dependent manner with half-maximal inhibitory concentrations (IC_{50}) of 2.63 μg/mL. We further tested the activity of the extracts E13 and purified product on Aurora A, a closely related Aurora B kinase, also essential to mitosis. Both the extracts E13 and P3 showed an inhibitory activity on Aurora A, with IC_{50} values of 14.7 and 7.58 μg/mL respectively, in a concentration range close to the one obtained against Aurora B. Interestingly, in comparison with the extract E13, the purified compound showed greater inhibitory activity on both kinases Aurora A and Aurora B (Table 2 and Figure S 2), which strongly suggests that P3 is the main if not sole molecule that accounts for the inhibitory activity of E13.

Table 2. IC_{50} values obtained for P3 natural product from the kinase inhibition assay.

		IC_{50} (μg/mL)	
Extract/Compound	**Marine organism**	**Aurora A**	**Aurora B**
E12	Sponge *Crambe crambe*	N/A	124.9
E13	Sponge *Crambe tailliezi*	14.7	7.51
P3	Sponge *Crambe tailliezi*	7.58	2.63

Extracts and P3 compound were tested at various concentrations on human Aurora A and B kinases to calculate the IC_{50} values. Activities were assessed in duplicate using the ADP-Glo luminescent assay, using 10 μM of ATP. N/A: non active at the maximal concentration tested.

2.3. *P3 inhibits the viability of human cancer cell lines*

The kinase-based screening showed an inhibition of Aurora A and B kinases by P3. These proteins are important for faithful transition through mitosis. They are overexpressed in a wide variety of human tumors and are thus considered as pertinent targets for developing new cancer therapies. Known inhibitors of Aurora A and B, such as Alisertib (MLN8237) [29,30], display anti-proliferative activity in a wide range of human tumor cell lines [31–33]. We thus decided to explore the effect of P3 on cell viability.

We tested P3 on nine human cancer cell lines: Hep G-2 (hepatocellular carcinoma), MCF-7 (breast adenocarcinoma), U-87 (glioblastoma), SH-SY5Y (neuroblastoma), HT-29 (colorectal adenocarcinoma), U-2 OS (osteosarcoma), PANC-1 (pancreatic epithelioid carcinoma), AsPC-1 (pancreatic adenocarcinoma), A3 (acute T cell leukemia). Four non-cancerous cell lines were also tested: hTERT RPE-1 (human retinal pigmented epithelial cell line), RC-124 (kidney primary cell line), HEK-293 (embryonic kidney cell line), HT-22 (mouse hippocampal neuronal cell line). As shown in Table 3, a 24-hours exposure with P3 induced a dose-dependent reduction of cell-survival in all cell lines tested. We observed that 50 μg/mL of P3 decreased over 90% of cell viability after 24 h of treatment (Figure S 3A). The half-maximal effective concentrations (EC_{50}) of P3 on cells ranged from 6.6 to 22.4 μg/mL (Table 3 and Figure S 3B).

Table 3. Effect of a treatment by P3 on cell viability of various cell lines.

Cell type	Cell line	Tissue	EC_{50} (µg/mL)
Leukemia	A3	T lymphocyte	7.0
Solid malignancies	U-2 OS	Bone	6.6*
	SH-SY5Y	Bone marrow	8.9
	U-87	Brain	10.6
	Hep G-2	Liver	11.8
	MCF-7	Breast	12.2
	AsPC-1	Pancreas	12.4
	HT-29	Colon	20.4
	PANC-1	Pancreas	22.4
Non-malignant	hTERT RPE-1	Retina, eye	7.2
	HEK-293	Kidney	11.2
	RC-124	Kidney	13.3
	HT-22	Brain (mouse)	14.0

Cells were incubated with increasing doses of P3 (ranging from 0.01 to 50 µg/mL). Human cells were used, except HT-22, an immortalized mouse hippocampal cell line. Cell viability was measured by MTS reduction assay as mentioned in the Materials and Methods. EC_{50} values are determined from the dose-response curves using Graphpad PRISM software (data are mean, n=3; and * N=2 for U-2OS).

Further investigations on the mechanism(s) by which P3 affects cell viability were carried out in U-2 OS cells, the most sensitive solid tumor-derived cell line of the panel used here. Cell viability was evaluated by detection of MTS reduction. As the reduction of tetrazolium reagents can be occasionally observed under conditions in which cell death does not occur, we also used the lactate dehydrogenase (LDH) release assay, as independent cell death assay. As shown on Figure 3, the treatment of U-2 OS with increasing doses of P3 product induced a dose-dependent reduction of cell survival that correlated with the similar dose-dependent induction of cell death.

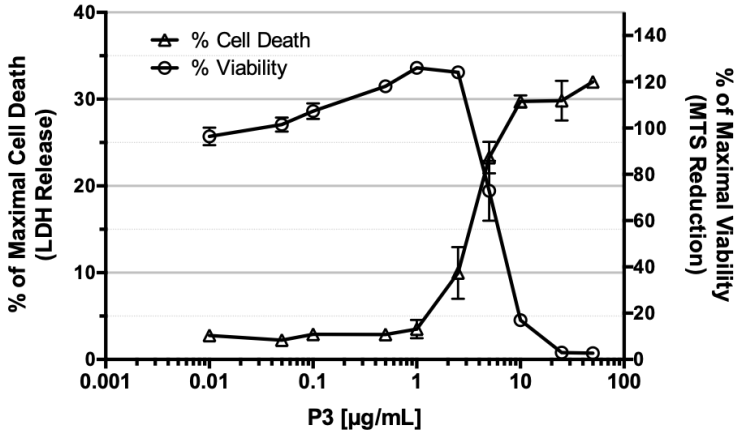


Figure 3. Dose-dependent induction of cell death in U-2 OS cells by P3 product. U-2 OS cells were exposed for 24-hours to increasing concentrations of P3 (ranging from 0.01 to 50 µg/mL). Cell viability was assessed by MTS reduction assay and is plotted in % of maximal viability (detected in DMSO-treated cells, right axis). A similar experiment was performed to evaluate cell death (LDH release assay, left axis). Results are plotted in % of maximal LDH release (cell lysis). Data are mean ± SD (n=3).

2.4. *P3 induces apoptotic death in osteosarcoma U-2 OS cell line*

In order to visualize the dynamics of living cell nuclei, we imaged U-2 OS cells expressing Histone H2B fused to the RFP (red fluorescent protein), treated or not with 7.5 µg/mL of P3. We observed that,

in P3-treated cells, chromatin became hyper-condensed (strong fluorescent signal), starting from 5 h after beginning of treatment (1 h of movie time) (Figure 4A). By 6 h of treatment, all nuclei showed condensed chromatin, a typical phenotype of apoptotic cells. Note that the cell with condensed chromatin, appearing in the control culture by 2 h of movie time, is in mitosis and ultimately divided (see Supplementary Materials Section, Video S 1 and S2). In addition, we also measured the mitotic index (MI), the ratio of mitotic cell number over total cell number. We observed a significant decrease of the mitotic index in P3-treated cells (0,7%), compared with control cells (4,4%) (Figure 4B), suggesting that cell division was severely affected.

Then, we evaluated the dose- and time-dependent effects of P3 on cell proliferation and on externalization of phosphatidylserine (an early apoptosis feature) in U-2 OS cells, by real-time live-imaging (Figure 4C, D). We measured the evolution of cell confluence (Figure 4C) as well as the number of apoptotic cells, by annexin V staining (Figure 4D). The results obtained confirmed that treatments with 2.5 to 12.5 µg/mL of P3 inhibited cellular proliferation and induced apoptosis simultaneously. Higher dose of P3 (25 µg/mL) induced massive cell death (Figure 4C, D). We next evaluated the effect of P3 treatment on tumor cell proliferation using scratch wound migration assay (Figure S 4). We observed a delay in wound closure after 48h of treatment with P3 at 5 and 12.5 µg/mL, which occurred concomitantly to cell death.

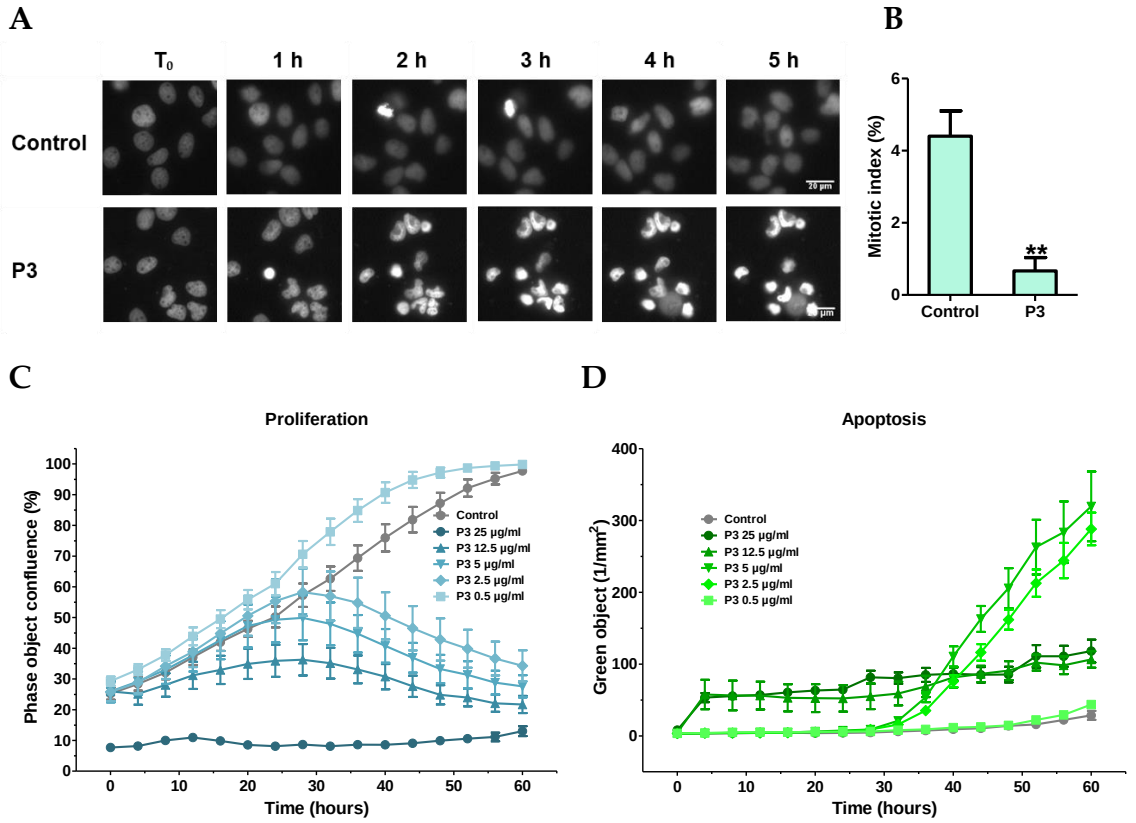


Figure 4. P3 induces apoptosis and affects mitosis in U-2 OS cells. (**A**) Real-time imaging of chromatin dynamics in P3-treated U-2 OS cells expressing Histone H2B-RFP. Image recording started 4 h after treatment with 7.5 µg/mL of P3, by fluorescence microscopy at 20x magnification. (**B**) Mitotic indexes of cells were recorded after 24 h of treatment with 7.5 µg/mL of P3. Data are mean ± SD (n=3); ** $P < 0.01$, compared with control cells (student's *t*-test). (**C**) and (**D**) Dose- and time-dependent effects of P3 on cell proliferation (**C**) and on apoptosis (**D**) in U-2 OS cells. Cells were stained with annexin V-FITC and treated with P3 (0.5-25 µg/mL) over 60 h. Images were acquired by real-time live-cell imaging. Images were analysed in order to quantify cell confluence (**C**) and apoptotic cell number (green fluorescent object) (**D**). Data are mean ± SD (n=3).

2.5. Characterization of P3- induced apoptotic death in osteosarcoma U-2 OS cells

We next investigated the type of P3-induced cell death in U-2 OS cells. Cells were treated with three concentrations (5, 7.5 and 12.5 μg/mL) of P3 for 24 h in presence or in absence of reference inhibitors of two programmed cell death subroutines: (i) Z-VAD-FMK (pan-caspase inhibitor that inhibits caspase-dependent apoptosis) [34] or (ii) necrostatin-1s (nec-1s, specific inhibitor of receptor-interacting kinase-1, RIPK1 kinase, which inhibits necroptosis and RIPK1-dependent apoptosis) [35]. Cell viability was measured using MTS reduction assay. As reported on Figure 5A, P3 strongly reduced cell survival (40% at 7.5 μg/mL and 80% at 20 μg/mL). This effect, obtained with 7.5 μg/mL of P3, was significantly reversed by 10 μM and 50 μM of Z-VAD-FMK, indicating a role of caspases in the mechanism of action of P3 compound (see also the Figure S 5, left panel). Oppositely, the effect of P3 on cell survival was not inhibited by 50 μM of nec-1s. This data suggests that RIPK1 is not involved in the cellular effects triggered by P3. We also tested high doses of a less specific inhibitor of RIPK1, necrostatin-1 (Figure S 5, right panel). Interestingly, 50 μM and 125 μM of nec-1 were shown to inhibit significantly the effect of P3 on cell survival, suggesting a possible role of unknown off-targets of nec-1 in the death process initiated by P3.

Consequently, we quantified apoptotic cells by flow cytometry. After 24 h of treatment with P3, we stained U-2 OS cells with both annexin V conjugated to fluorescein isothiocyanate (FITC annexin V) and PI (propidium iodide) to detect necrosis and early or late apoptosis in total cell population (as shown on Figure 5C). We found that P3 induced mostly late apoptosis in treated cells (42.6% of total cell population when treated with 12.5 μg/mL of P3, Figure 5B). We also tested the effect of 50 μM of Z-VAD-FMK and showed that this high dose of pan-caspase inhibitor cannot inhibit the late apoptosis triggered by P3.

The P3-induced apoptosis was also observed by microscopy (Figure 5D). It is accompanied with apoptosis morphological changes (cell roundup and nuclear condensation) and with positive signals for both annexin V and PI staining, the hallmark of the late apoptosis phase.

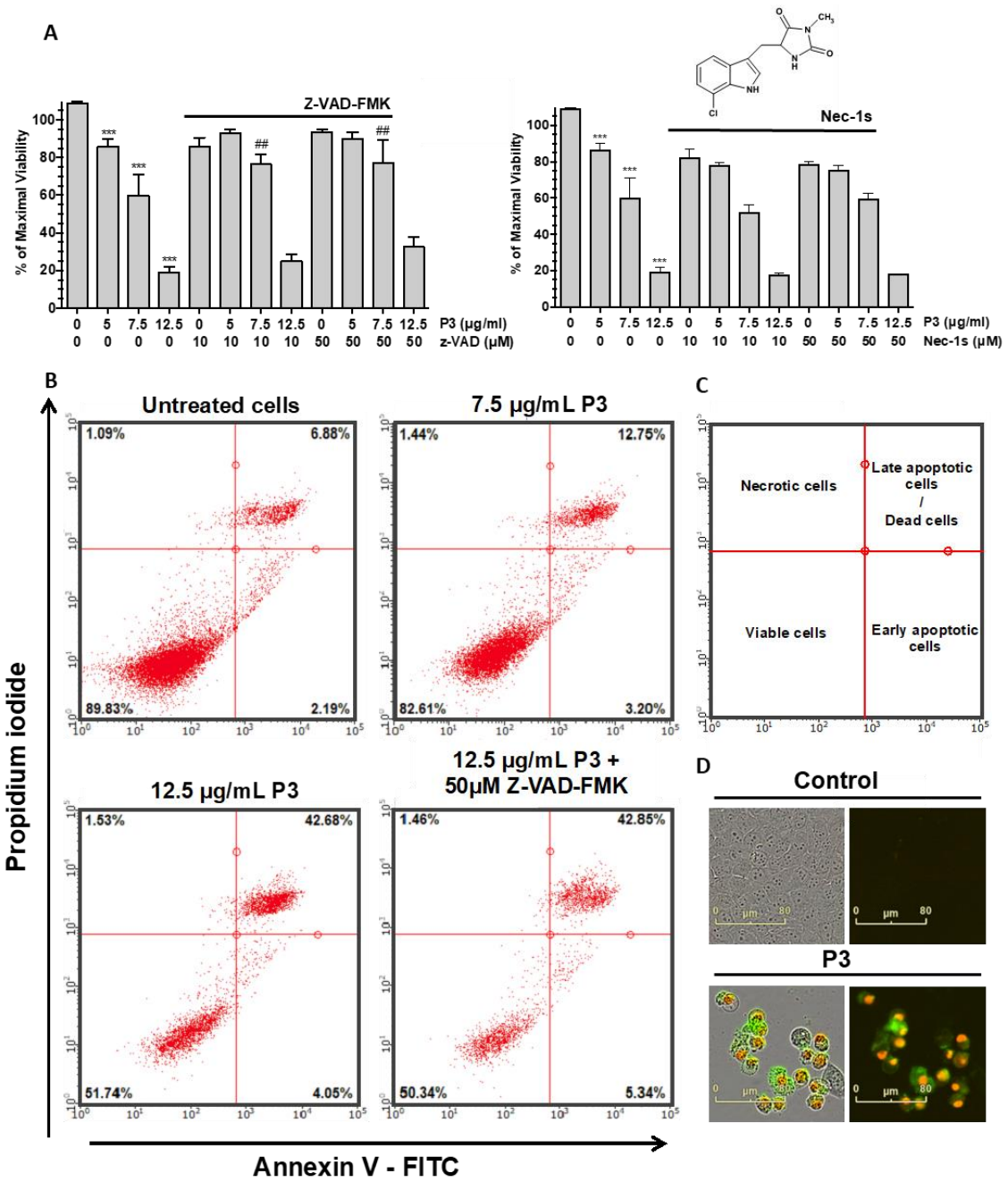


Figure 5. Analysis of apoptosis pathway induced by P3 in U-2 OS cells. (**A**) P3-induced inhibition of cell survival in U-2 OS cells. Cells were treated with Z-VAD-FMK (10 or 50 µM) or Nec-1 (10 or 50 µM) and P3 (7.5 or 12.5 µg/mL) for 24 h. Cell viability was measured by MTS reduction assay. Data are mean ± SD (n=3); *** $P < 0.001$ compared with control cells; # # $P < 0.01$, compared with 7.5-µg/mL-P3 without Z-VAD-FMK group (Student's *t*-test). (**B**) Apoptosis detection by flow cytometry (FACS) analysis after annexin V-FITC/PI staining in a 24-hours treatment of U-2 OS cells by (i) DMSO (untreated control cells), (ii and iii) 7.5 µg/mL or 12.5 µg/mL of P3 compound and (iv) 12.5 µg/mL of P3 compound with 50 µM of Z-VAD-FMK. The right schematic panel describes cell features appearing in each quadrant. (**C**) Schematic description of cell repartition in each quadrant from the experiment in **B**. (**D**) Visualization of the cells treated for 24-hours with P3 by microscopy. Cell were labelled as in **B**, with annexin V FITC (green) et PI (red). Representative merged phase-contrast/ fluorescence and fluorescence images were taken at 20x magnification.

2.6. *P3 affects U-2 OS spheroids viability and integrity*

As we validated the effect of P3 on programmed cell-death of two-dimensional (2D) monolayer cells, we next investigated *in vitro* effect on single spheroids as experimental models of three-dimensional (3D) cell populations. Multicellular spheroid cultures were initially developed in 1970 to recapitulate the functional phenotype of human tumor cells and their responses to radiotherapy [37,38]. Compared to the traditional 2D format, the 3D spheroid system provides a more accurate and reproducible model for drug development: they are able to closely mimic the main features of human solid tumors, including the structural organization, increased cell survival as well as nutrients-metabolites and oxygen gradients. Numerous studies have shown a good correlation between 3D-culture experiments and clinical trials, especially in human solid tumors [39]. In order to study the effect of P3 on 3D-cell culture, we generated U-2 OS spheroids and treated them with P3. The viability of spheroids was estimated by MTS reduction assay after a 96 h treatment. As shown in 6A, treatments with 12.5 and 25 µg/mL of P3 significantly reduced the viability of spheroids. To complete this analysis, we next observed the morphology as well as the size of spheroids by microscopy. The data obtained indicated that a treatment of U-2 OS spheroids with 12.5 µg/mL of P3 expanded and collapsed the three-dimensional cellular organization of the spheroids (Figure 6B).

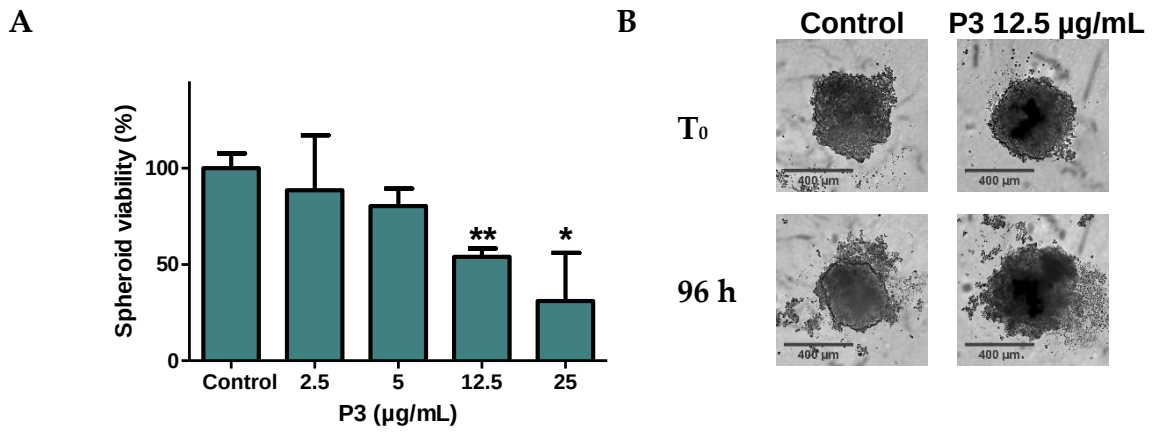


Figure 6. Effects of P3 on the growth and viability of U-2 OS spheroids. (**A**) Dose-dependent effect of a 96-hours treatment with P3 (from 2.5 to 25 µg/mL) on the viability of U-2 OS spheroids. Spheroid viability was quantified by MTS reduction assay. Data are mean ± SD (n=3); * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with DMSO-treated control spheroids (Student's *t*-test). (**B**) Spheroid morphology was analysed by microscopy. Bright field images showing the morphology of U-2 OS spheroids were taken at 4x magnification using IncuCyte® (Sartorius, Ann Arbor, MI, USA).

3. Discussion

In the present work, we used a protein kinase target-based screening strategy to identify extracts from marine organisms with potential bioactivity. We isolated a high molecular weight metabolite, P3, from the sponge *Crambe tailliezi* (sampled in the Mediterranean Sea) as a new cytotoxic marine natural product that inhibits the Aurora protein kinases. Note here that one of the 50 FDA-approved protein kinase inhibitors is Midostaurin (as Rydapt®, Novartis Pharmaceuticals, Inc.). This direct derivative of staurosporine is a multitarget kinase inhibitor for the treatment of adult patients with newly diagnosed acute myeloid leukemia (AML) who harbor mutations in FMS-like tyrosine kinase 3 (FLT3) [40]. Both are indolocarbazole alkaloids that can be found in numerous marine species from invertebrates (e.g. from the ascidian *Eudistoma toealensis*) to marine sponge-associated actinomycetes [15,41].

Within the Crambeidea family, *Crambe tailliezi* [23], is an encrusting marine sponge also scarcely distributed in the Mediterranean and the Macaronesian Seas, which remains poorly investigated for either its chemical composition or the biological properties of its metabolites, contrary to *Crambe crambe*

[24] that has been widely explored chemically since the 90's [25–27]. Among the compounds already described in *C. crambe*, the guanidine alkaloids, crambescins and crambescidins, showed a wide range of bioactivities such as antibacterial, antiviral, antifungal properties and cytotoxic activities against several cancer cell lines [28,42–44]. The present study is thus focused on an untapped marine resource.

The primary screening performed on a selected panel of protein kinases showed that *C. tailliezi* P3 is a dual inhibitor of Aurora A and B kinases. Aurora kinases are known to play pleiotropic roles during mitosis. They are notably important for the capture, alignment and segregation of chromosomes and thus were subjects of intensive screening campaign to characterize new potent inhibitors: 50+ clinical trials were performed in solid and hematological tumors [45]. Following the screening on kinases, we showed that P3 decreased the viability of two- and three-dimensional cell cultures and induced apoptosis of U-2 OS cells.

Numerous cell death subroutines are now described and classified as reported by Galluzzi et *al*. [4]. Here, we showed that P3 induces an apoptotic-like programmed cell death. Indeed, our results suggested that caspases have no crucial role in the process triggered by P3. As shown by FACS analysis, even co-treated with 50 μM of Z-VAD-FMK, the cells died by late apoptosis (PI+/ Annexin V-FITC+). It has been proposed that no single experimental system exists in which Z-VAD-FMK can save cells from dying [46]. Consequently, additional studies will be crucial to prove that active caspases are not a prerequisite for execution of cell death induced by P3. Interestingly, the effect of P3 on cell survival was not inhibited by 50 μM of nec-1s, whereas the same dose of a less specific inhibitor of RIPK1, nec-1, can inhibit this phenotype. This indicates that P3 induces necrostatin-1-inhibitable cell death independent of RIPK1 kinase (as it was previously observed for nitric oxide-induced cell-death of pancreatic β-cells [47]. It would be now very important to characterize the targets of necrostatin-1 that are responsible for this inhibition. This chemobiological approach should provide crucial insights to pinpoint the molecular pathway involved in P3-induced cell death.

We were also unable to determine the chemical structure of P3 compound. The complexity of its structure is highlighted by its molecular size (2200-2800 Da) estimated by positive-ion reflectron MALDI-TOF MS analysis (Figure S 6). NMR spectra of P3 contain several signals suggestive of batzelladines [28] (Figure S 7 and Figure S 8). Structural determination of P3, based on chemical degradation, NMR and MS analyses, was unsuccessful due to the low quantities of P3 and its associated fragments recovered after isolation. Similarly, another preliminary study reported also that isolation and structure elucidation of the major compound produced by *C. tailliez*i is extremely complicated [48]. New strategies have now to be explored such as the co-crystallization with Aurora A or B kinase following X-ray structure determination.

The results reported here, notably on three-dimensional cell culture of osteosarcoma cells, should motivate follow up studies on *C. tailliezi* and more precisely on the P3 natural product as a new putative source of anti-cancer compounds. The purpose of this work was also to underline the use of kinase-based screening as a potent approach to identify new bioactive products from untapped marine resources. Protein kinases constitute one of the largest protein families, accounting for approximately 2% of the genes in any given eukaryotic genome, and they are critically involved in the regulation of all cellular processes and signaling pathways [49]. The workflow described in this study can be applied to the vast majority of marine extracts and to a wide spectrum of therapeutic applications.

4. Materials and Methods

4.1. Preparation of natural extracts and of P3 pure compound

All organic solvents used for material extraction and HPLC analyses were analytical grade and purchased from Sigma Aldrich (France). Formic acid of HPLC grade was purchased from Merck (France). 2,5-Dihydroxybenzoic acid (DHB), used as the matrix for MALDI-TOF experiments, was of the highest grade available and used without further purification was purchased from Sigma Aldrich (France).

^{1}H and ^{13}C NMR spectra were recorded with a 500 MHz Bruker Avance NMR spectrometer. Chemical shifts (δ) are recorded in ppm with CD3OD (δ_H 3.31 ppm and δ_C 49.0 ppm) as internal standard with multiplicity (s singlet, d doublet, t triplet, m multiplet). High resolution mass spectra (HRMS) were conducted on a Voyager DE-STR MALDI-TOF mass spectrometer (ABSciex, Les Ulis, France), equipped with a 337 nm pulsed nitrogen laser (20 Hz) and a Acquiris®2 GHz digitizer board, was used for all experiments. Mass spectra were obtained in reflectron positive ion mode with the following settings: accelerating voltage 20 kV, grid voltage 62% of accelerating voltage, extraction delay time of 100 ns. The laser intensity was set just above the ion generation threshold to obtain peaks with the highest possible signal-to-noise (S/N) ratio without significant peak broadening. All data were processed using the Data Explorer software package (ABSciex).

HPLC-PDA-ELSD analyses were performed with a Waters Alliance 2695 HPLC system (Waters Corporation, Milford, MA) coupled with a Waters 996 photodiode array detector and a Sedex 55 evaporative light-scattering detector (SEDERE, France), using a bifunctional Macherey-Nagel NUCLEODUR® Sphinx RP column (250 x 4.6 mm, 5 μm) consisting of a balanced ration of propylphenyl and C18 ligands. The mobile phase was composed of H_2O (plus 0.1% HCO_2H) and acetonitrile (CH_3CN - plus 0.1% HCO_2H) and the following gradient was used: H_2O:CH_3CN 90:10 for 5 min, H_2O:CH_3CN 90:10 to 0:100 for 30 min, 0:100 for 5 min, 0:100 to 90:10 for 15 min (flow: 1.0 mL.min^{-1}, injection volume: 20 µL). Chromatograms were extracted at the following detection wavelengths for visual inspection: 214, 254 and 280 nm.

Aplidium sp., *Cystodytes* sp., *Halocynthia papillosa, Polysyncraton* sp., *Acanthella acuta*, *Agelas oroides* (Schmidt, 1864), *Axinella polypoides* (Schmidt, 1862), *Axinella* sp., *Axinyssa* sp., *Cacospongia* sp., *Cliona viridis* (Schmidt, 1862), *Crambe crambe, Crambe tailliezi* (Vacelet & Boury-Esnault, 1982), *Haliclona mediterranea* (Griessinger, 1971), *Hemimycale columella* (Bowerbank, 1874), *Hexadella* sp., *Ircinia oros* (Schmidt, 1864), *Ircinia variabilis* (Schmidt, 1862), *Oscarella* sp., *Phorbas* sp., *Pleraplysilla spinifera* (Schulze, 1879), *Pseudaxinyssa* sp., *Pseudoceratina* sp., *Ptilocaulis fusiformis* (Lévi, 1967), *Reniera fulva* (Topsent, 1893), *Reniera mucosa* (Griessinger, 1971), *Reniera sarai* (Pulitzer-Finali, 1969), *Sarcotragus foetidus* (Schmidt, 1862), *Sarcotragus spinosulus* (Schmidt, 1862), *Verongida* sp.

Each freeze-dried species was grounded to give a homogenous dry powder. A small portion (1 g) was exhaustively extracted three times during 10 min with 10 mL of a mixture of MeOH/CH_2Cl_2 (1:1, v/v) in an ultrasonic bath. The filtrates of each extraction were combined, mixed with 0.5 g of RP C18 silica gel and evaporated to dryness. The latter were then loaded onto C18 Solid Phase Extraction (SPE) cartridges beforehand conditioned (2 g, Phenomenex Strata). The SPE columns were first washed with 10 mL of H_2O for desalting and then eluted with 10 mL of MeOH/CH_2Cl_2 (1:1, v/v) in a 20 mL volumetric flask. The resulting organic phase, obtained after concentration under reduced pressure, were used for HPLC–PDA–ELSD analyses and biological screenings.

Crambe tailliezi desalted crude organic extract (128 mg), resuspended in MeOH, was subjected to a Sephadex LH-20 size exclusion chromatography in MeOH to afford 6 fractions (fr. 1–6). Subfr. 3 yielded pure compound P3 (46.8 mg).

Moreover, each crude organic extract was analysed by HPLC/ESI-MS/MS in both positive and negative ion modes using an Agilent 1100 Series HPLC coupled with a Thermo Finnigan LCQ Advantage mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA) and an ESI source operated with Xcalibur (version 2.0, Thermo Finnigan) software package. A bifunctional Macherey-Nagel NUCLEODUR® Sphinx RP column (150 x 4.6 mm, 3 µm) consisting of a balanced ration of propylphenyl and C18 ligands was used with an injection volume of 25 µL and a flow rate of 0.3 mL.min^{-1}. The mobile phase was composed of H_2O (plus 0.1% HCO_2H) and acetonitrile (CH_3CN - plus 0.1% HCO_2H) and the following gradient was used: H_2O:CH_3CN 90:10 for 5 min, H_2O:CH_3CN 90:10 to 0:100 for 30 min, 0:100 for 5 min, 0:100 to 90:10 for 15 min. The MS instrument parameters were: nebulization gas, N_2, 50 au sheath and 10 au auxiliary gas flow; pray voltage, ± 4.5 kV; capillary temperature, 275 °C; capillary voltage, − 10 V (negative ion mode) or 37 V (positive ion mode); tube lens offset, − 50 V (negative ion mode) or 30 V (positive ion mode). MS/MS experiments were carried out with normalized collision energy 35%.

4.2. Protein kinase assays

Kinase enzymatic activities were assayed in 384-well plates using the ADP-Glo™ assay kit (Promega, Madison, WI, USA): a high-throughput screening method to measure kinase activity by quantifying the amount of ADP produced [50]. Briefly, the reactions were carried out in a final volume of 6 µl for 30 min at 30°C in appropriate kinase buffer, with either protein or peptide as substrate in the presence of 10 µM ATP. After that, 6 µL of ADP-Glo™ Kinase Reagent was added to stop the kinase reaction. After an incubation time of 50 min at room temperature (RT), 12 µL of Kinase Detection Reagent was added for one hour at RT. The transmitted signal was measured using the Envision (PerkinElmer, Waltham, MA) microplate luminometer and expressed in Relative Light Unit (RLU). Peptide substrates were obtained from Proteogenix (Schiltigheim, France). The following buffers were used for the kinases tested: (Buffer "A") 10 mM $MgCl_2$, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 25 mM Tris-HCl pH 7.5, 50 µg/mL heparin; (Buffer "B") 25 mM MOPS, pH 7.2, 12.5 mM β-glycerophosphate, 25 mM $MgCl_2$, 5 mM EGTA, 2 mM EDTA, 0.25 mM DTT; (Buffer "C") Tris 50 mM pH 7.5, 20 mM $MgCl_2$, 2 mM $MnCl_2$; (Buffer "D") 5 mM MOPS pH 7.2, 2.5 mM β-glycerophosphate, 4 mM $MgCl_2$, 2.5 mM $MnCl_2$, 1 mM EGTA, 0.5 mM EDTA, 50 µg/mL BSA, 0.05 mM DTT.

The following kinases were analysed during this study:

*Hs*Aurora A (kind gift of Professor Claude Prigent, IGDR Rennes, France) was assayed in buffer B with 0.2 µg/µL of MBP as substrate;

*Hs*Aurora B (human, recombinant, expressed by baculovirus in Sf9 insect cells, SignalChem, product #A31-10G) was assayed in buffer B with 0.2 µg/µL of MBP as substrate;

*Hs*CDK2/CyclinA (cyclin-dependent kinase-2, human, kindly provided by Dr. A. Echalier-Glazer, Leicester, UK) was assayed in buffer A with 0.8 µg/µL of Histone H1 as substrate;

*Hs*CDK5/p25 (human, recombinant, expressed in bacteria) was assayed in buffer A with 0.8 µg/µL of Histone H1 as substrate;

*Hs*CDK9/CyclinT (human, recombinant, expressed by baculovirus in Sf9 insect cells) was assayed in buffer A with 0.27 µg/µL of the following peptide: YSPTSPSYSPTSPSYSPTSPSKKKK, as substrate;

*Hs*CK1ε (human, recombinant, expressed by baculovirus in Sf9 insect cells) was assayed in buffer A with 0.022 µg/µL of the following peptide: RRKHAAIGSpAYSITA ("Sp" stands for phosphorylated serine) as CK1-specific substrate;

*Hs*HASPIN-kd (human, kinase domain, amino acids 470 to 798, recombinant, expressed in bacteria) was assayed in buffer A with 0.007 µg/µL of Histone H3 (1-21) peptide (ARTKQTARKSTGGKAPRKQLA) as substrate;

*Hs*PIM1 (human proto-oncogene, recombinant, expressed in bacteria) was assayed in buffer A with 0.8 µg/µL of Histone H1 (Sigma #H5505) as substrate;

*Hs*RIPK3 (human, recombinant, expressed by baculovirus in Sf9 insect cells) was assayed in buffer D with 0.1 µg/µL of MBP as substrate;

*Hs*GSK3α and *Hs*GSK3β (human, recombinant, expressed by baculovirus in Sf9 insect cells) were assayed in buffer A with 0.010 µg/µL of GS-1 peptide, a GSK-3-selective substrate (YRRAAVPPSPSLSRHSSPHQSpEDEEE);

*Rn*DYRK1A-kd (*Rattus norvegicus*, amino acids 1 to 499 including the kinase domain, recombinant, expressed in bacteria, DNA vector kindly provided by Dr. W. Becker, Aachen, Germany) was assayed in buffer A with 0.033 µg/µL of the following peptide: KKISGRLSPIMTEQ as substrate.

4.3. Cell lines and cell culture

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), RPMI 1640 Medium, DMEM/F-12 Medium, Fetal Bovine Serum (FBS), Penicillin-Streptomycin (5000 U/mL), Trypsin-EDTA (0.25%), Phosphate-Buffered Saline (PBS) were obtained from Thermo Fisher Scientific (USA). The human cell lines A3, U-2 OS, SH-SY5Y, U-87, Hep G-2, MCF-7, AsPC-1, HT-29, PANC-1, hTERT RPE-1, HEK-293, RC-124 and the mouse cell line HT-22 used in this study were obtained from ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA) and cultured in medium supplemented with 10% FBS, 50 U/mL penicillin and 50

μg/mL streptomycin. The cells were incubated under a 5% CO_2 atmosphere at 37 °C and passed twice a week for a use within two months.

4.4. Cell viability and LDH-release assays

Evaluation of cell viability: From $5.0x10^4$ to $2.0x10^5$/mL cells were seeded in 96-well plates (#CC7682-7596, CytoOne®, USA) following 24 h of incubation. Cells were exposed to compounds for 24 h, 48 h or 72 h. Cell viability was determined by MTS reduction assay (CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay from Promega, Madison, WI, USA), according to the manufacturer's instructions. This method is based on the reduction of MTS tetrazolium compound by viable cells to generate a coloured formazan product. After treatment with the tested compounds, cells were incubated with MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, Inner salt) for 3 hours at 37 °C. The absorbance was measured with microplate reader BioTek EL800 (BioTek Instruments, Inc., USA) at 490 and 630 nm. The percentage of viability was calculated by comparing values obtained from treatments with tested compounds to those of DMSO (used as control). Staurosporine, Z-VAD-FMK and necrostatin-1 were purchased from Enzo Life Science (Villeurbanne, France).

Evaluation of cell death: $5.0x10^3$ U-2 OS-cells were seeded per well in 96-well plates following 24 h of incubation. Cells were exposed to P3 natural product for 24 h. Cell death was evaluated by measurement of activity of lactate dehydrogenase (LDH). LDH is a stable enzyme normally found in the cytosol of all cells but rapidly releases into the supernatant upon damage of plasma membrane. The % of maximal cell death was determined by using the CyQUANT™ LDH Cytotoxicity Assay Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), according to the manufacturer's instructions.

4.5. Time-lapse assay

The cell line U-2 OS H2B-RFP, which expresses Histone 2B fused to red fluorescent protein, was used to observe chromosome dynamics in live cells. Cells (25 000 cells/ well) were seeded in 4-well plates adapted to video-microscopy (Lab-Tek II Chamber coverglass, Thermo Fisher Scientific, USA) for 24 h. Cells were exposed to P3 or DMSO for 24 h. During the treatment time, cells were visualized under an inverted fluorescence microscopy (Zeiss, Germany) and images were recorded every 20 minutes by an EMCCD camera (Zeiss, Germany). Images were analysed by MetaMorph® Software (MetaMorph Inc., USA).

4.6. Live-cell imaging of apoptosis in U-2 OS

U-2 OS cells (5 000 cells/ well) were seeded in 96-well plates (#CC7682-7596, CytoOne®, USA) 24 h prior to treatment. Cells were then exposed to compounds for as long as 60 h. During the treatment, cell morphology was observed and images recorded using an automatic microscope IncuCyte® S3 Live-Cell Analysis System (Sartorius, Ann Arbor, MI, USA). Moreover, cells were stained with FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I (#556547, BD Biosciences, USA) to detect cell apoptosis. Cell confluence (phase object) and apoptotic cell number (green fluorescent object) were analysed with IncuCyte® S3 Sotfware.

4.7. Detection of apoptosis by flow cytometry

In early apoptotic cells, phosphatidylserine (PS) is translocated from the inner to the outer leaflet of the plasma membrane, thus exposing PS to the external cellular environment. Annexin V labelled with fluorescein has a high affinity for PS exposed on the outer leaflet and is used to identify apoptotic cells [51,52]. PI intercalating DNA enters the cells in the case of late apoptosis or necrosis where the cellular membrane becomes permeable [53]. Living cells give negative signals with both annexin V and PI. In this assay, U-2 OS cells (50 000 cells/ well) were seeded in 12-well plates (#CC7682-7512, CytoOne®, USA) for 24 h. Cells were exposed to compounds for 24 h. Cells were harvested, washed twice with cold PBS and then re-suspended in 1X Binding Buffer. Finally, cells were stained with FITC

Annexin V Apoptosis Detection Kit I (#556547, BD Biosciences, USA) for 15 min at RT (25 °C) in the dark. The stained cells were analyzed by flow cytometer BD FACSCanto II (BD Biosciences, USA). Data were analyzed with BD FACSDiva Software 8.0 (BD Biosciences, USA). Each experiment was performed in duplicate.

4.8. Scratch wound assay to evaluate the cellular migration and proliferation

U-2 OS cells (20 000 cells/ well) were grown in DMEM with 10% FBS in 96-well ImageLock plates (#4379, Essen BioScience, USA) for 6 h to reach approximately 100% of confluence. The ImageLock® plate technology is enabled by fiducial markers on the bottom of the plate which provide points from which image locations can be accurately referenced. After creating wounds using the IncuCyte® WoundMaker (96-pin wound making tool), cells were washed twice with DMEM then exposed to compounds for 72 h. During the treatment, cell morphology was observed by using IncuCyte® S3 Live-Cell Analysis System (Sartorius, Ann Arbor, MI, USA). Data were analysed with IncuCyte® S3 Software. Data were analysed with IncuCyte® S3 Software.

4.9. Spheroid assay

U-2 OS cells (5 000 cells/ well) were seeded in Corning® 96-well Round Bottom Ultra Low Adhesion-ULA plates (#7007, Corning Incorporated, USA). After being centrifuged at 1000 RPM for 10 minutes, plates were incubated under a 5% of CO_2 at 37 °C for 72 h to produce spheroids (400 µm diameter). Spheroids were then treated with compounds for 96 h. During the treatment, cell morphology was observed using IncuCyte® S3 Live-Cell Analysis System (Sartorius, Ann Arbor, MI, USA). Data were analysed with IncuCyte® S3 Sotfware: the size of the spheroids was measured using an automated algorithm that masked the largest brightfield object in the field of view. After 96 h of treatment, viability of spheroids was also quantified by MTS reduction assay (CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay from Promega, Madison, WI, USA).

4.10. Statistical analyses

Data were acquired from a minimum of three independent experiments. They are expressed as means ± SD. Statistical analyses were performed with student's *t*-test or one-way ANOVA. All statistical analyses were performed with GraphPad Prism6 software (GraphPad Software, San Diego, CA).

Supplementary Materials: The following are available online at www.mdpi.com/xxx/s1, Figure S1: title, Table S1: title, Video S1: title.

Author Contributions: Conceptualization, Thi-Ngoc-Dung Nguyen, Sandrine Ruchaud, Mohamed Mehiri and Stéphane Bach; Formal analysis, Thi-Ngoc-Dung Nguyen, Omid Feizbakhsh, Mohamed Mehiri; Funding acquisition, Thi-Ngoc-Dung Nguyen, Sandrine Ruchaud, Mohamed Mehiri and Stéphane Bach; Investigation, Thi-Ngoc-Dung Nguyen, Omid Feizbakhsh, Estelle Sfecci, Blandine Baratte, Claire Delehouzé, Adrien Garcia, Corentin Moulin, Sandrine Ruchaud and Mohamed Mehiri; Project Administration, Sandrine Ruchaud, Mohamed Mehiri and Stéphane Bach; Resources, Estelle Sfecci, Adrien Garcia and Mohamed Mehiri; Supervision, Sandrine Ruchaud, Mohamed Mehiri and Stéphane Bach; Validation, Thi-Ngoc-Dung Nguyen, Sandrine Ruchaud, Mohamed Mehiri and Stéphane Bach; Visualization, Thi-Ngoc-Dung Nguyen, Omid Feizbakhsh, Sandrine Ruchaud, Mohamed Mehiri and Stéphane Bach; Writing – Original Draft Preparation, Thi-Ngoc-Dung Nguyen; Writing - Review and Editing, Thi-Ngoc-Dung Nguyen, Pierre Colas, Sandrine Ruchaud, Mohamed Mehiri and Stéphane Bach.

Funding: This research was funded by the Government of Vietnam/ the French Embassy in Vietnam (Campus France)/ and the Medicine and Pharmacy University at Hochiminh city (Vietnam) (Thi-Ngoc-Dung Nguyen is recipient of a "Project 911" PhD fellowship), La Ligue Contre le Cancer (PhD Thesis grant for O. Feizbakhsh); the Cancéropôle PACA; European Union's Horizon 2020 research and innovation program (EMBRIC project, EU grant No 654008); ANR/Investissements d'Avenir program (OCEANOMICs project, grant #ANR-11-BTBR-0008).

Acknowledgments: Thi-Ngoc-Dung Nguyen is recipient of a "Project 911" PhD fellowship from the Government of Vietnam. We would like to thank the Government of Vietnam, the French Embassy in Vietnam (Campus France) and the Medicine and Pharmacy University at Ho Chi Minh City (Vietnam) for their continuous support of our

research. We also would like to thank Dr. Philippe Amade for sampling the biological material, Marc Gaysinski, Lionel Massi (PFTC, ICN, UMR 7272 CNRS), Morgane Ratin and Dominique Marie (Sorbonne Université, CNRS, UMR 7144, Station Biologique de Roscoff), for technical support in RMN, GC-MS and flow cytometry, respectively. The authors thank the Cancéropôle Grand Ouest (axis: natural sea products in cancer treatment), IBiSA (French Infrastructures en sciences du vivant: biologie, santé et agronomie) and Biogenouest (Western France life science and environment core facility network) for supporting the KISSf screening facility, FR2424, Roscoff. O. Feizbakhsh was a recipient of the Région Bretagne ARED fellowship program and is supported by La Ligue Contre le Cancer (CSIRGO). S. Ruchaud is supported by research funding from La Ligue Contre le Cancer (CSIRGO). M. Mehiri is supported by research funding from the Cancéropôle PACA, INCa, the Région PACA SUD and the EMBRIC project (EU grant No 654008). S. Bach is supported by ANR/Investissements d'Avenir program via the OCEANOMICs project (grant #ANR-11-BTBR-0008) and INCa ("NECROTRAIL" Program). The authors wish to thank Dr. Claude Prigent (IGDR, University of Rennes 1) for the generous gift of recombinant Aurora A kinase.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Baehrecke, E.H. How death shapes life during development. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2002**, *3*, 779–787.
2. Lockshin, R.A.; Williams, C.M. Programmed cell death—II. Endocrine potentiation of the breakdown of the intersegmental muscles of silkmoths. *Journal of Insect Physiology* **1964**, *10*, 643–649.
3. Lockshin, R.A. Programmed cell death. Activation of lysis by a mechanism involving the synthesis of protein. *Journal of Insect Physiology* **1969**, *15*, 1505–1516.
4. Galluzzi, L.; Vitale, I.; Aaronson, S.A.; Abrams, J.M.; Adam, D.; Agostinis, P.; Alnemri, E.S.; Altucci, L.; Amelio, I.; Andrews, D.W.; et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death & Differentiation* **2018**, *25*, 486.
5. Fuchs, Y.; Steller, H. Programmed Cell Death in Animal Development and Disease. *Cell* **2011**, *147*, 742–758.
6. Kerr, J.F.R.; Wyllie, A.H.; Currie, A.R. Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wide-ranging Implications in Tissue Kinetics. *British Journal of Cancer* **1972**, *26*, 239–257.
7. Nicholson, D.W. Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death and Differentiation* **1999**, *6*, 1028–1042.
8. Su, Z.; Yang, Z.; Xie, L.; DeWitt, J.P.; Chen, Y. Cancer therapy in the necroptosis era. *Cell Death & Differentiation* **2016**.
9. Dixon, S.J.; Lemberg, K.M.; Lamprecht, M.R.; Skouta, R.; Zaitsev, E.M.; Gleason, C.E.; Patel, D.N.; Bauer, A.J.; Cantley, A.M.; Yang, W.S.; et al. Ferroptosis: An Iron-Dependent Form of Nonapoptotic Cell Death. *Cell* **2012**, *149*, 1060–1072.
10. Conrad, M.; Angeli, J.P.F.; Vandenabeele, P.; Stockwell, B.R. Regulated necrosis: disease relevance and therapeutic opportunities. *Nature Reviews Drug Discovery* **2016**, *15*, 348–366.
11. Bergmann, Werner.; Burke, D.C. Contributions to the study of marine products. XXXIX. The nucleosides of sponges. III.1 spongothymidine and spongouridine2. *The Journal of Organic Chemistry* **1955**, *20*, 1501–1507.
12. Hussain, S.; Fareed, S.; Ansari, S. Marine natural products: A lead for Anti-cancer. *Indian Journal of Geo-Marine Scieneces* **2012**, *41*, 13.
13. Kijjoa, A.; Sawangwong, P. Drugs and Cosmetics from the Sea. *Marine Drugs* **2004**, *2*, 73–82.
14. Guzmán, E.A. Regulated Cell Death Signaling Pathways and Marine Natural Products That Target Them. *Marine Drugs* **2019**, *17*, 76.
15. Bharate, S.B.; Sawant, S.D.; Singh, P.P.; Vishwakarma, R.A. Kinase Inhibitors of Marine Origin. *Chemical Reviews* **2013**, *113*, 6761–6815.
16. Skropeta, D.; Pastro, N.; Zivanovic, A. Kinase Inhibitors from Marine Sponges. *Marine Drugs* **2011**, *9*, 2131–2154.

17. Li, T.; Wang, N.; Zhang, T.; Zhang, B.; Sajeevan, T.P.; Joseph, V.; Armstrong, L.; He, S.; Yan, X.; Naman, C.B. A Systematic Review of Recently Reported Marine Derived Natural Product Kinase Inhibitors. *Marine Drugs* **2019**, *17*, 493.
18. Roskoski, R. Properties of FDA-approved small molecule protein kinase inhibitors. *Pharmacological Research* **2019**.
19. Carles, F.; Bourg, S.; Meyer, C.; Bonnet, P. PKIDB: A Curated, Annotated and Updated Database of Protein Kinase Inhibitors in Clinical Trials. *Molecules* **2018**, *23*, 908.
20. Kim, E.S. Midostaurin: First Global Approval. *Drugs* **2017**, *77*, 1251–1259.
21. Manning, G.; Whyte, D.B.; Martinez, R.; Hunter, T.; Sudarsanam, S. The Protein Kinase Complement of the Human Genome. *Science* **2002**, *298*, 1912–1934.
22. Henry, J.; Wlodkowic, D. Towards High-Throughput Chemobehavioural Phenomics in Neuropsychiatric Drug Discovery. *Marine Drugs* **2019**, *17*, 340.
23. Crambe tailliezi Vacelet & Boury-Esnault, 1982 Available online: https://inpn.mnhn.fr/espece/cd_nom/71341 (accessed on Jan 14, 2019).
24. Crambe crambe (Schmidt, 1862) Available online: https://inpn.mnhn.fr/espece/cd_nom/71340 (accessed on Jan 14, 2019).
25. Berlinck, R.G.S.; Braekman, J.C.; Daloze, D.; Bruno, I.; Riccio, R.; Rogeau, D.; Amade, P. Crambines C1 and C2: Two Further Ichthyotoxic Guanidine Alkaloids from the Sponge Crambe crambe. *Journal of Natural Products* **1992**, *55*, 528–532.
26. Berlinck, R.G.S.; Braekman, J.C.; Daloze, D.; Bruno, I.; Riccio, R.; Ferri, S.; Spampinato, S.; Speroni, E. Polycyclic Guanidine Alkaloids from the Marine Sponge Crambe crambe and Ca^{++} Channel Blocker Activity of Crambescidin 816. *Journal of Natural Products* **1993**, *56*, 1007–1015.
27. Croué, J.; West, N.J.; Escande, M.-L.; Intertaglia, L.; Lebaron, P.; Suzuki, M.T. A single betaproteobacterium dominates the microbial community of the crambescidine-containing sponge *Crambe crambe*. *Scientific Reports* **2013**, *3*, 2583.
28. Sfecci, E.; Lacour, T.; Amade, P.; Mehiri, M. Polycyclic Guanidine Alkaloids from Poecilosclerida Marine Sponges. *Marine Drugs* **2016**, *14*, 77.
29. Görgün, G.; Calabrese, E.; Hideshima, T.; Ecsedy, J.; Perrone, G.; Mani, M.; Ikeda, H.; Bianchi, G.; Hu, Y.; Cirstea, D.; et al. A novel Aurora-A kinase inhibitor MLN8237 induces cytotoxicity and cell-cycle arrest in multiple myeloma. *Blood* **2010**, *115*, 5202–5213.
30. Zhou, N.; Singh, K.; Mir, M.C.; Parker, Y.; Lindner, D.; Dreicer, R.; Ecsedy, J.A.; Zhang, Z.; Teh, B.T.; Almasan, A.; et al. The investigational Aurora kinase A inhibitor MLN8237 induces defects in cell viability and cell-cycle progression in malignant bladder cancer cells in vitro and in vivo. *Clinical Cancer Research*. **2013**, *19*, 1717–1728.
31. Agnese, V.; Bazan, V.; Fiorentino, F.P.; Fanale, D.; Badalamenti, G.; Colucci, G.; Adamo, V.; Santini, D.; Russo, A. The role of Aurora-A inhibitors in cancer therapy. *Annals Oncology* **2007**, *18 Suppl 6*, vi47-52.
32. Yeung, S.-C.J.; Gully, C.; Lee, M.-H. Aurora-B kinase inhibitors for cancer chemotherapy. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry* **2008**, *8*, 1514–1525.
33. Bavetsias, V.; Linardopoulos, S. Aurora Kinase Inhibitors: Current Status and Outlook. *Frontiers in Oncology* **2015**, *5*.
34. Zhu, H.; Fearnhead, H.O.; Cohen, G.M. An ICE-like protease is a common mediator of apoptosis induced by diverse stimuli in human monocytic THP.1 cells. *FEBS Letters* **1995**, *374*, 303–308.
35. Xie, T.; Peng, W.; Liu, Y.; Yan, C.; Maki, J.; Degterev, A.; Yuan, J.; Shi, Y. Structural Basis of RIP1 Inhibition by Necrostatins. *Structure* **2013**, *21*, 493–499.
36. Martin, T.A.; Ye, L.; Sanders, A.J.; Lane, J.; Jiang, W.G. *Cancer Invasion and Metastasis: Molecular and Cellular Perspective*; Landes Bioscience, 2013;
37. Sutherland, R.M.; Inch, W.R.; McCredie, J.A.; Kruuv, J. A multi-component radiation survival curve using an in vitro tumour model. *International Journal of Radiation Biology and Related Studies in Physics, Chemistry and Medicine* **1970**, *18*, 491–495.

38. Sutherland, R.M.; McCredie, J.A.; Inch, W.R. Growth of multicell spheroids in tissue culture as a model of nodular carcinomas. *Journal of the National Cancer Institute* **1971**, *46*, 113–120.
39. Nunes, A.S.; Barros, A.S.; Costa, E.C.; Moreira, A.F.; Correia, I.J. 3D tumor spheroids as in vitro models to mimic in vivo human solid tumors resistance to therapeutic drugs. *Biotechnology and Bioengineering* **2019**, *116*, 206–226.
40. Schlenk, R.F.; Kayser, S. Midostaurin: A Multiple Tyrosine Kinases Inhibitor in Acute Myeloid Leukemia and Systemic Mastocytosis. In *Small Molecules in Hematology*; Martens, U.M., Ed.; Recent Results in Cancer Research; Springer International Publishing: Cham, 2018; pp. 199–214 ISBN 978-3-319-91439-8.
41. Schupp, P.; Eder, C.; Proksch, P.; Wray, V.; Schneider, B.; Herderich, M.; Paul, V. Staurosporine Derivatives from the Ascidian Eudistoma toealensis and Its Predatory Flatworm Pseudoceros sp. *Journal of Natural Products* **1999**, *62*, 959–962.
42. Jares-Erijman, E.A.; Sakai, R.; Rinehart, K.L. Crambescidins: new antiviral and cytotoxic compounds from the sponge Crambe crambe. *The Journal of Organic Chemistry* **1991**, *56*, 5712–5715.
43. Olszewski, A.; Sato, K.; Aron, Z.D.; Cohen, F.; Harris, A.; McDougall, B.R.; Robinson, W.E.; Overman, L.E.; Weiss, G.A. Guanidine alkaloid analogs as inhibitors of HIV-1 Nef interactions with p53, actin, and p56lck. *PNAS* **2004**, *101*, 14079–14084.
44. Mayer, A.M.S.; Rodríguez, A.D.; Taglialatela-Scafati, O.; Fusetani, N. Marine Pharmacology in 2012–2013: Marine Compounds with Antibacterial, Antidiabetic, Antifungal, Anti-Inflammatory, Antiprotozoal, Antituberculosis, and Antiviral Activities; Affecting the Immune and Nervous Systems, and Other Miscellaneous Mechanisms of Action. *Marine Drugs* **2017**, *15*, 273.
45. Tischer, J.; Gergely, F. Anti-mitotic therapies in cancer. *The Journal of Cell Biology* **2019**, *218*, 10–11.
46. Borner, C.; Monney, L. Apoptosis without caspases: an inefficient molecular guillotine? *Cell Death Differentiation* **1999**, *6*, 497–507.
47. Tamura, Y.; Chiba, Y.; Tanioka, T.; Shimizu, N.; Shinozaki, S.; Yamada, M.; Kaneki, K.; Mori, S.; Araki, A.; Ito, H.; et al. NO donor induces Nec-1-inhibitable, but RIP1-independent, necrotic cell death in pancreatic β-cells. *FEBS Letters* **2011**, *585*, 3058–3064.
48. Edrada-Ebel, R.; Jaspars, M. The 9th European Conference on Marine Natural Products. *Marine Drugs* **2015**, *13*, 7150–7249.
49. Manning, G.; Plowman, G.D.; Hunter, T.; Sudarsanam, S. Evolution of protein kinase signaling from yeast to man. *Trends in Biochemical Sciences* **2002**, *27*, 514–520.
50. Zegzouti, H.; Zdanovskaia, M.; Hsiao, K.; Goueli, S.A. ADP-Glo: A Bioluminescent and Homogeneous ADP Monitoring Assay for Kinases. *ASSAY and Drug Development Technologies* **2009**, *7*, 560–572.
51. Raynal, P.; Pollard, H.B. Annexins: the problem of assessing the biological role for a gene family of multifunctional calcium- and phospholipid-binding proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes* **1994**, *1197*, 63–93.
52. Vermes, I.; Haanen, C.; Steffens-Nakken, H.; Reutellingsperger, C. A novel assay for apoptosis Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *Journal of Immunological Methods* **1995**, *184*, 39–51.
53. Nicoletti, I.; Migliorati, G.; Pagliacci, M.C.; Grignani, F.; Riccardi, C. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Journal of Immunological Methods* **1991**, *139*, 271–279.

© 2019 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

SUPPLEMENTARY MATERIALS

Kinase-based screening of marine natural extracts leads to the identification of a cytotoxic high molecular weight metabolite from the Mediterranean sponge *Crambe tailliezi*

Thi-Ngoc-Dung Nguyen [1,2], Omid Feizbakhsh [1], Estelle Sfecci [3], Blandine Baratte [1,4], Claire Delehouzé [1,5], Adrien Garcia [3], Corentin Moulin [3], Pierre Colas [1], Sandrine Ruchaud [1,*], Mohamed Mehiri [3,*] and Stéphane Bach [1,4,*]

[1] Sorbonne Université, CNRS, Station Biologique de Roscoff, UMR 8227, Integrative Biology of Marine Models Laboratory (LBI2M), CS 90074, 29688 Roscoff Cedex, France; dnguyenthingoc@sb-roscoff.fr; omid.feizbakhsh@sb-roscoff.fr; blandine.baratte@sb-roscoff.fr; colas@sb-roscoff.fr; sandrine.ruchaud@sb-roscoff.fr; bach@sb-roscoff.fr

[2] University of Medicine and Pharmacy, Faculty of Pharmacy, Department of Chemical Analysis and Drug Quality Control, Ho Chi Minh City, Vietnam; ntndung@upm.edu.vn; nguyenngocdung_py@yahoo.com

[3] Université Côte d'Azur, Institut de Chimie de Nice, CNRS, UMR 7272, Marine Natural Products Team, 06108 Nice, France; estelle.sfecci@univ-cotedazur.fr; adrien.garcia@univ-cotedazur.fr; corentin.moulin@univ-cotedazur.fr; mohamed.mehiri@univ-cotedazur.fr

[4] Sorbonne Université, CNRS, Station Biologique de Roscoff, FR 2424, Plateforme de criblage KISSf (Kinase Inhibitor Specialized Screening facility), Place Georges Teissier, 29682 Roscoff, France

[5] SeaBeLife Biotech, Place Georges Teissier, 29682 Roscoff, France; claire.delehouze@seabelife.com

[*] Correspondence: sandrine.ruchaud@sb-roscoff.fr (S.R.); mohamed.mehiri@univ-cotedazur.fr (M.M.); bach@sb-roscoff.fr (S.B.); Tel.: +33-298-292-309 (S.R.); +33-492-076-154 (M.M.); +33-298-292-391 (S.B.); Fax: +33-492-076-151 (M.M.); +33-298-292-526 (S.R. and S.B.)

1. Videos

Video S1: Time-lapse imaging in living human osteosarcoma cells treated with control (DMSO) (cf. AVI video file).
Video S2: Time-lapse imaging in living human osteosarcoma cells treated with P3 (cf. AVI video file).

2. Figures

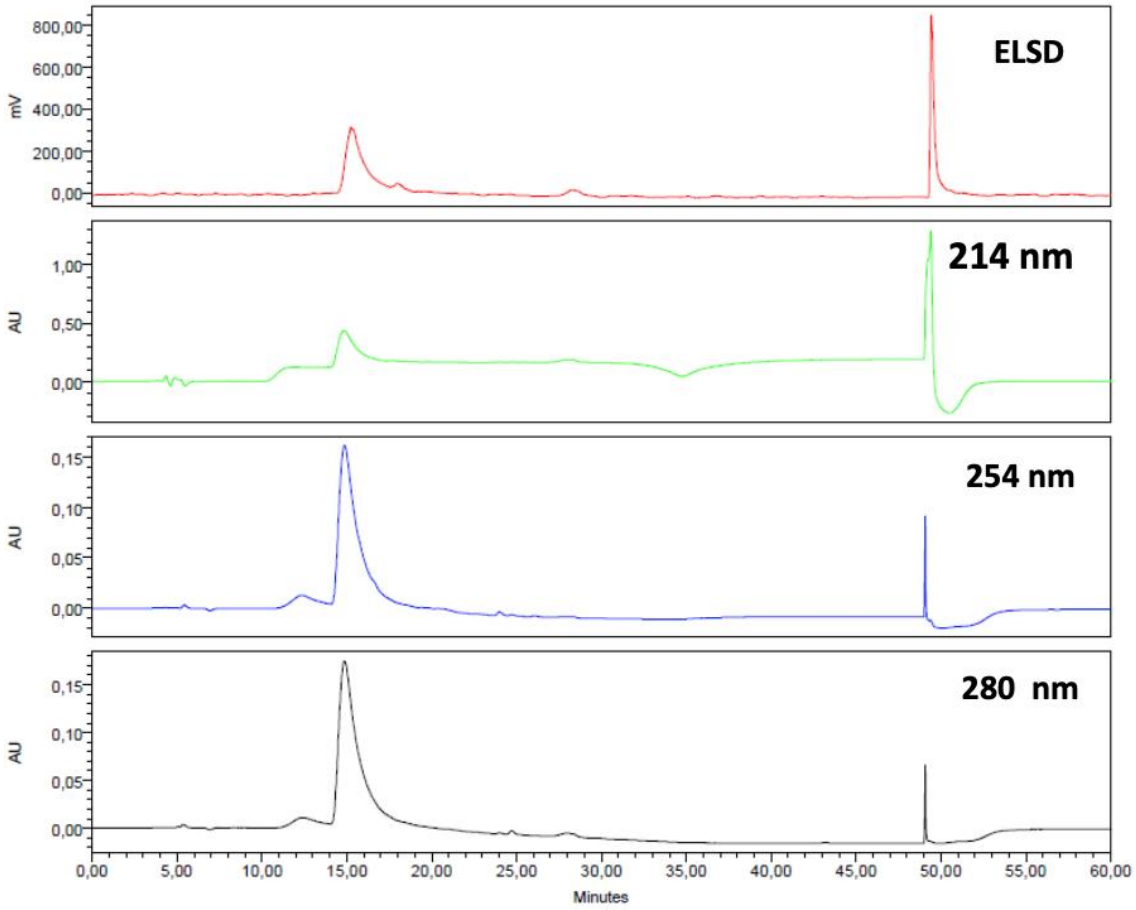


Figure S 1. HPLC-PDA-ELSD chromatogram of P3. Bifunctional Macherey-Nagel NUCLEODUR® Sphinx RP column (250 x 4.6 mm, 5 μm) consisting of a balanced ratio of propylphenyl and C18 ligands, gradient H_2O: CH_3CN 90:10 for 5 min, 90:10 to 0:100 for 30 min, 0:100 for 5 min and 0:100 to 90:10 for 15 min (flow: 1.0 mL.min^{-1}, injection volume: 20 µL).

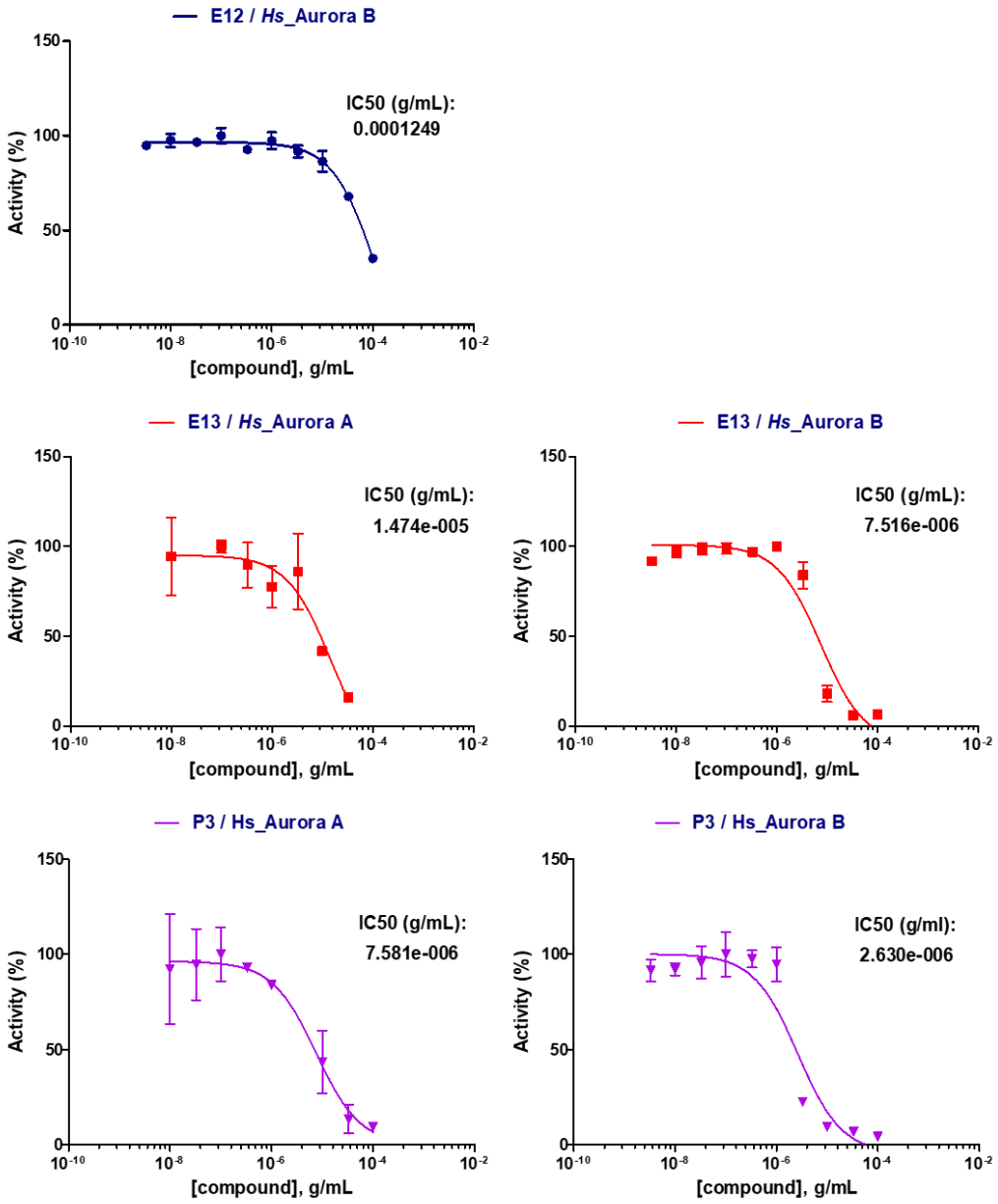


Figure S 2. Dose-dependent effect of extracts E12, E13 and of the compound P3 on Aurora A/B kinase activiies. Enzymatic activities were quantified using the ADP-Glo assay in the presence of 10 µM ATP. Data are mean (n=2) expressed in % maximal activity, i.e. measured in the absence of the tested natural product but with an equivalent dose of DMSO (solvent of the marine extracts).

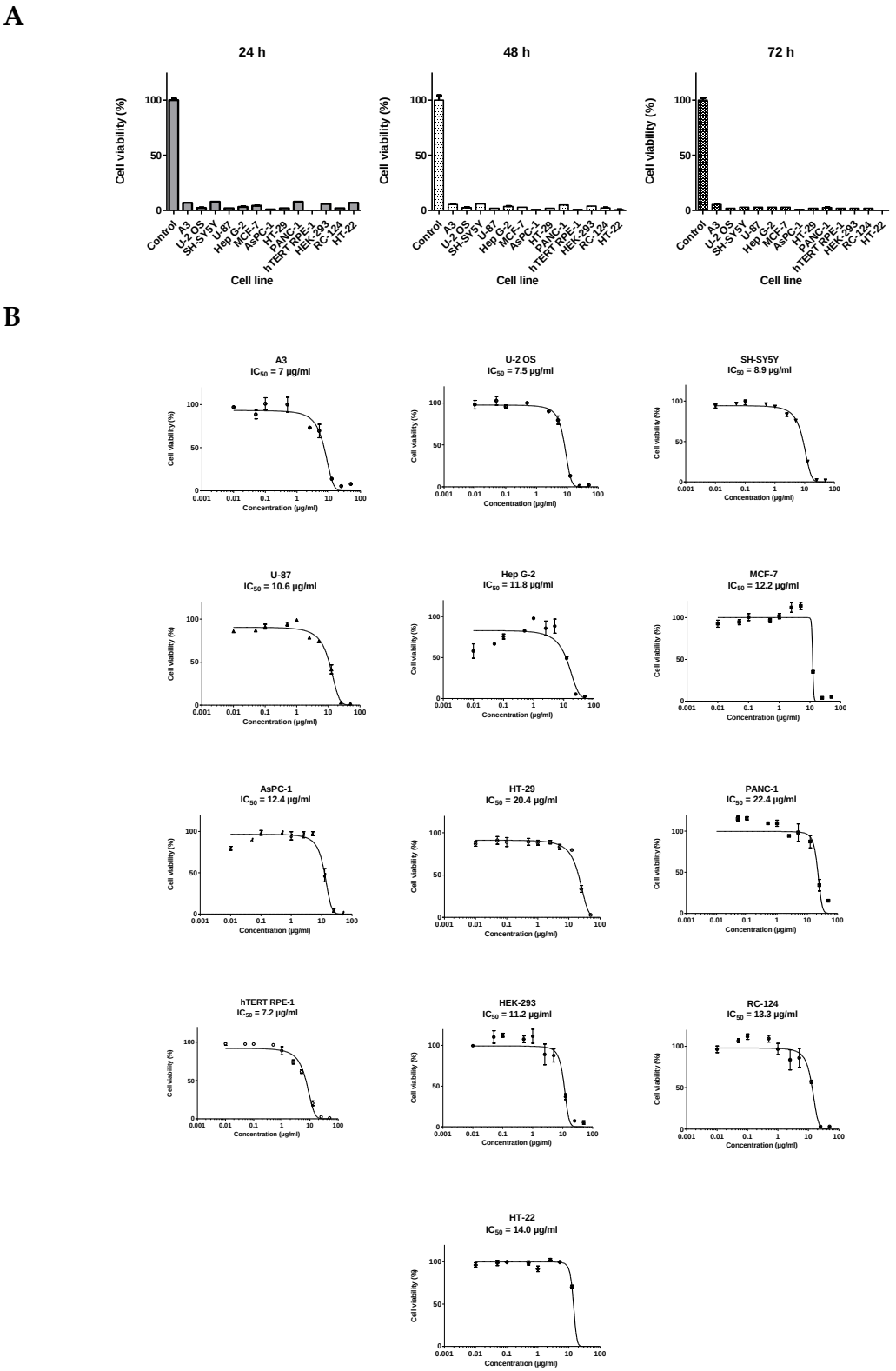


Figure S 3. Effect of P3 on the viability of human cancerous and non-cancerous cells: A3, U-2 OS, SH-SY5Y, U-87, Hep G-2, MCF-7, AsPC-1, HT-29, PANC-1, hTERT RPE-1, HEK-293, RC-124 and HT-22 cells. (A) Time-dependent effect of P3. Cells were treated with of P3 (50 µg/mL) for 24 h, 48 h and 72 h. (B) Dose-dependent effect of P3. Cells were treated with increasing concentrations of P3 (0.01-50 µg/mL) for 24 h. Cell viability was measured by MTS assay. Data are mean ± SD (n=3) expressed in % of survival cells, compared with control cells. Half-maximal inhibitory concentrations (IC_{50}) are determined from the curves.

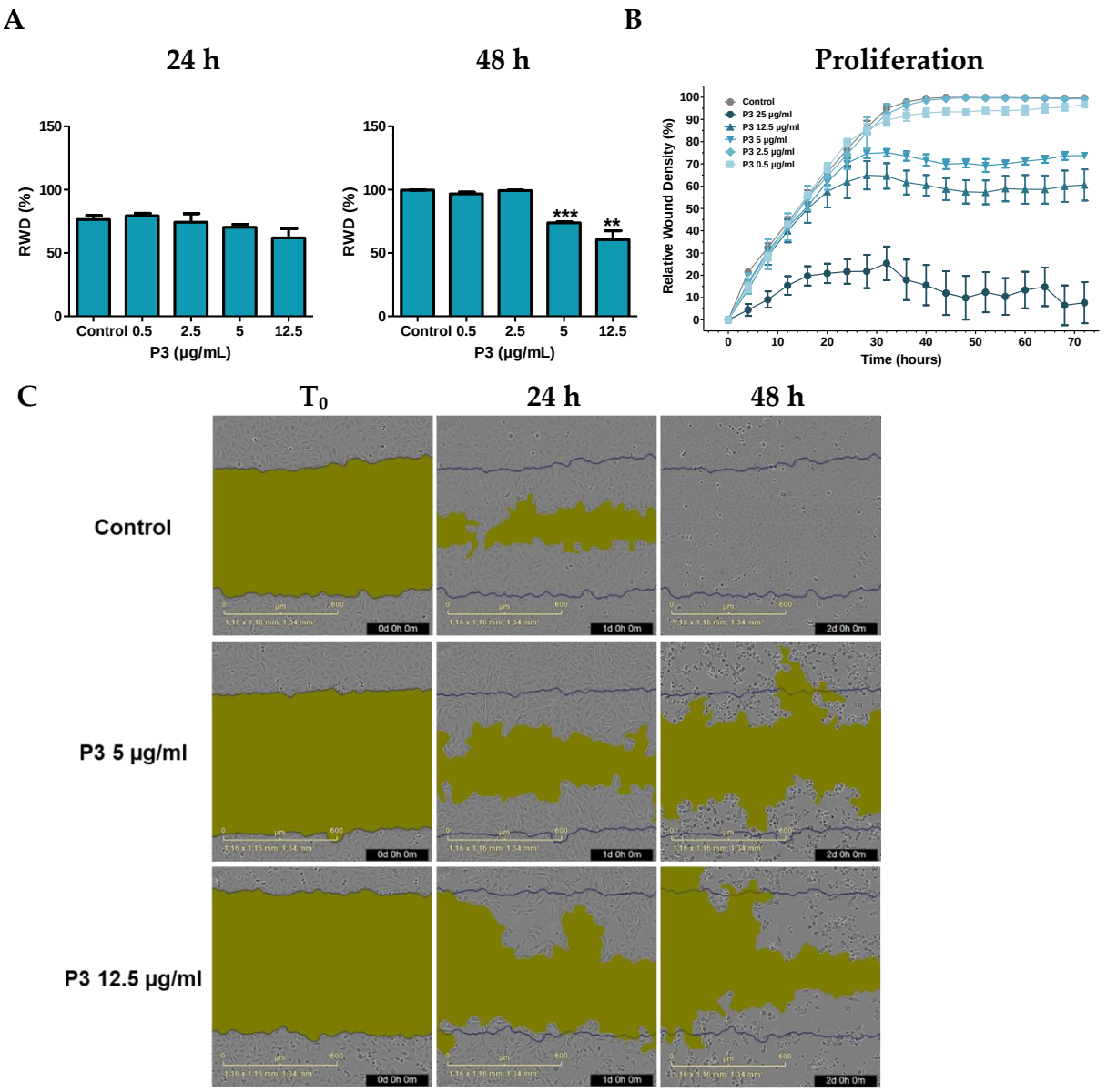


Figure S 4. P3 affects proliferation of U-2 OS cells. (**A**) Effect of increasing dose of P3 (0.5 – 12.5 µg/mL) of U-2 OS cells after 24 h and 48 h. (**B**) Dose- and time-dependent effects of P3 on proliferation over 72 h. The Relative Wound Density (RWD) was used as the metrics to estimate the cellular proliferation. Cell-free zones were created by scratch wounds in cell monolayers and the assay was then initiated after addition of P3 or DMSO for the control culture. The progression of cell proliferation was visualized in real time by microscopy. Data are mean ± SD (n=3); ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ compared with control cells (Student's *t*-test). (C) Representative phase-contrast images, taken at 10x magnification, of U-2 OS cells migrating from **A**.

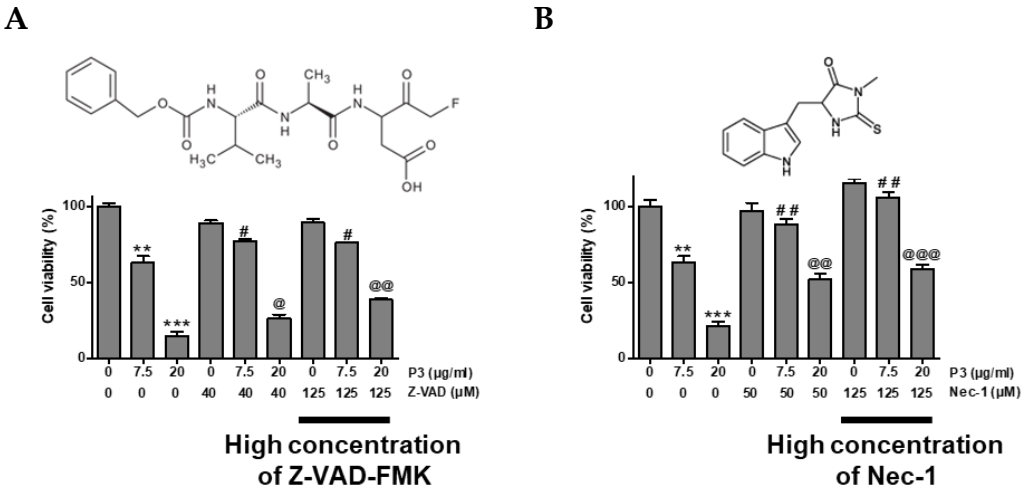


Figure S 5. Effect of co-treatment with P3 and high concentrations of Z-VAD-FMK (**A**) or necrostatin-1 (**B**) on the viability of U-2 OS cells. P3-induced inhibition of cell survival in U-2 OS cells. Cells were treated with Z-VAD-FMK (40 or 125 µM) or Nec-1 (50 or 125 µM) for 1 h prior to the treatment with P3 (7.5 or 20 µg/mL) for 24 h. Cell viability was measured by MTS reduction assay. Data are expressed in % of maximal viability (detected in DMSO-treated cells). Data are mean ± SD (n=3); * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ compared with control cells; # $P < 0.05$, # # $P < 0.01$, # # # $P < 0.001$ compared with 7.5-µg/mL-P3 treatment group; @ $P < 0.05$, @@ $P < 0.01$, @@@ $P < 0.001$ compared with 20-µg/mL-P3 treatment group (Student's *t*-test).

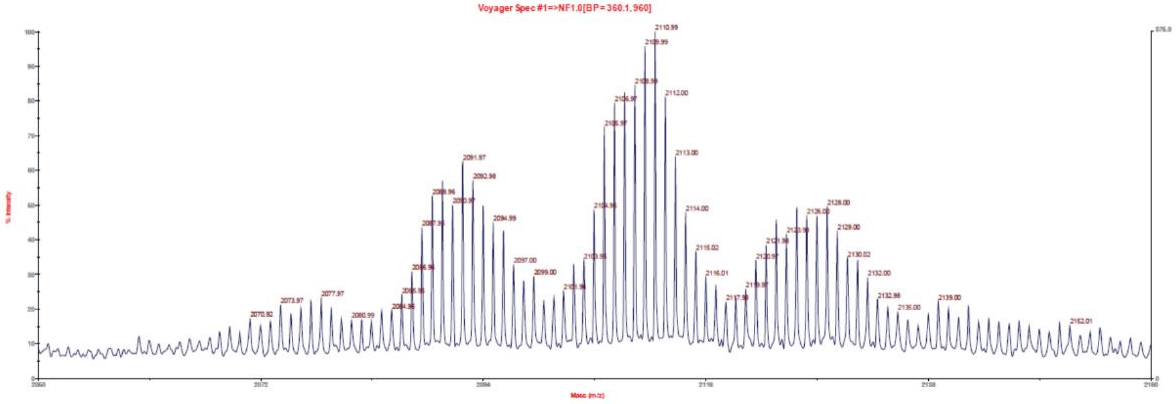


Figure S 6. MALDI-TOF analysis of P3 (reflectron positive ion mode, DHB matrix).

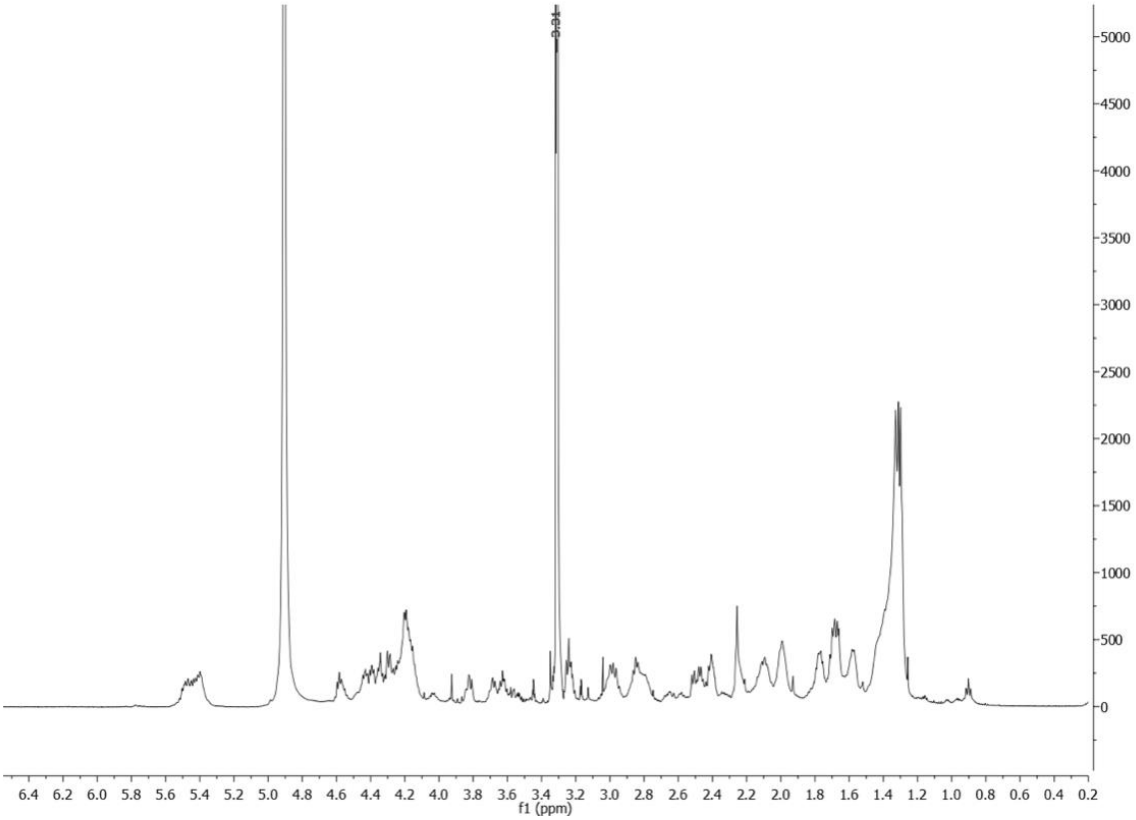


Figure S 7. ^{1}H NMR spectrum of P3 (CD_3OD, 500 MHz).

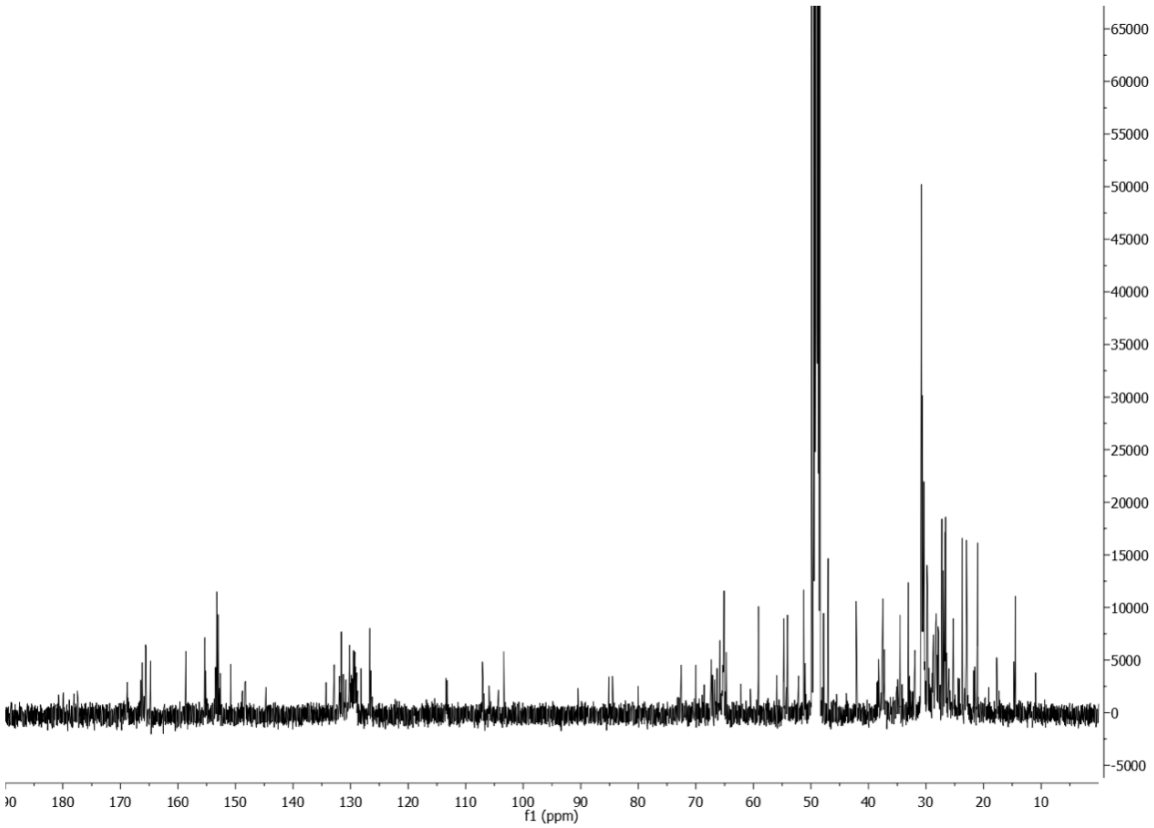


Figure S 8. ^{13}C NMR spectrum of P3 (CD_3OD, 125 MHz).

Discussion sur l'article 1

Le but de ce travail était de montrer l'intérêt d'un criblage basé sur les protéines kinases pour identifier de nouveaux produits bioactifs à partir de ressources marines inexploitées. Parmi 30 extraits issus d'organismes marins décrits, nous avons pu constater que plusieurs extraits présentaient des propriétés inhibitrices sur des kinases intéressantes. Ces extraits viennent de : *Crambe tailliezi, Hexadella* sp., *Ircinia oros, Pseudaxinyssa* sp., *Sarcotragus foetidus* et *Sarcotragus spinosulus*. Ces organismes marins peuvent donc être considérés comme des sources de composés bioactifs pour l'industrie pharmaceutique. Avec ces travaux, nous avons également souligné le rôle des éponges dans la production de métabolites secondaires d'intérêt thérapeutique. L'ensemble des résultats de ce travail nous a permis de caractériser un produit naturel purifié P3 de l'éponge de Méditerranée, *Crambe tailliezi*, comme un nouvel inhibiteur des protéines kinases mitotiques Aurora A et B. L'effet antiprolifératif de P3 a été observé *in vitro* sur des cultures cellulaires en deux et trois dimensions (sphéroïdes). Les cultures sous forme de sphéroïdes se sont révélées moins sensibles à la molécule P3 que les mêmes cellules en deux dimensions (adhérentes au plastique des flasks de culture).

Nous avons montré que la molécule P3 induit une mort cellulaire programmée de type apoptotique dans les cellules cancéreuses d'ostéosarcomes U-2 OS. Cependant, le co-traitement des cellules avec l'inhibiteur de caspase Z-VAD-FMK ne protège que partiellement de l'apoptose induite par P3. Ce dernier résultat suggère que la mort induite par P3 n'est que partiellement dépendante de l'activation des caspases. D'un autre côté, il a été suggéré qu'il n'existe pas de système expérimental unique dans lequel le Z-VAD-FMK puisse empêcher les cellules de mourir (Galluzzi et al., 2018). Par conséquent, des études supplémentaires seraient nécessaires pour démontrer que les caspases actives ne sont pas une condition préalable à l'exécution de la mort cellulaire induite par P3. Par ailleurs, l'effet de P3 sur la viabilité cellulaire n'a pas été inhibé par 50 µM de Nec-1s (inhibiteur de RIPK1), tandis qu'il a été inhibé par une même dose de l'inhibiteur moins spécifique Nec-1. Ces résultats indiquent que la molécule P3 induit une mort cellulaire inhibée par Nec-1, indépendante de la kinase RIPK1. Ainsi, il semble crucial d'identifier la ou les cibles de la Nec-1 responsables de cette inhibition. Cette approche chimio-biologique permettrait de décrire la signalisation moléculaire conduisant à l'induction de la mort cellulaire par le produit naturel P3. De plus, l'effet antiprolifératif de P3 a également été observé sur d'autres lignées cellulaires tumorales. Ces résultats sont prometteurs et permettent d'envisager de futures études sur *Crambe tailliezi* et plus précisément

sur le produit P3 en tant que nouvelle source de composés anticancéreux. Néanmoins, avant de pouvoir envisager son utilisation en thérapie humaine, il reste à résoudre la question de la cytotoxicité de P3 sur les cellules normales ainsi que la détermination de sa structure et sa modification chimique pour aller vers un composé plus efficace et moins toxique.

Résultats supplémentaires

Après le criblage primaire et l'essai d'inhibition de la kinase, nous avons montré que P3 inhibe sélectivement les kinases mitotiques Aurora A et Aurora B, impliquées dans la ségrégation des chromosomes, le point de contrôle du fuseau mitotique et la division cellulaire (Kallio et al., 2002). Comme attendu d'un inhibiteur d'Aurora, nous avons souhaité examiner des anomalies mitotiques, par exemple un défaut d'alignement des chromosomes et des cellules tétraploïdes ou multinucléées (générées après un défaut de cytokinèse), qui sont caractéristiques d'une inhibition ou d'une déplétion d'Aurora B. Cependant, de façon surprenante, nous n'avons pas pu clairement observer ces phénomènes au cours du traitement avec P3. En outre, nous avons vu une très légère diminution de la phosphorylation de la Ser10 de l'histone H3, un substrat connu d'Aurora B (**Supplémentaire Figure S**). Nous suggérons donc quelques hypothèses pour expliquer ces observations : 1) la grande taille de la molécule P3 (2200-2800 Da) pourrait limiter sa capacité à traverser la membrane plasmique afin d'atteindre sa/ses cibles intracellulaires ; 2) la formation du complexe CPC (Survivine-Borealine-INCENP-Aurora B) pourrait induire un encombrement stérique, qui empêcherait l'interaction entre la molécule P3 et Aurora B ; 3) la molécule P3 pourrait interagir avec ou inhiber un modulateur de l'activité d'Aurora B sur la phosphorylation de H3S10 (une autre kinase ou une phosphatase) ; ou encore 4) la molécule P3 pourrait inhiber partiellement l'activité d'Aurora B en limitant son accès à certains substrats. Des études supplémentaires sont donc nécessaires pour expliquer ce résultat. La détermination de la structure et du mode de liaison entre la kinase et P3 par co-crystallographie nous permettrait sans doute d'interpréter nos résultats mais aussi d'envisager la synthèse de la molécule après simplification de sa structure tout en conservant son activité sur la kinase.

Supplémentaires matériels et méthodes

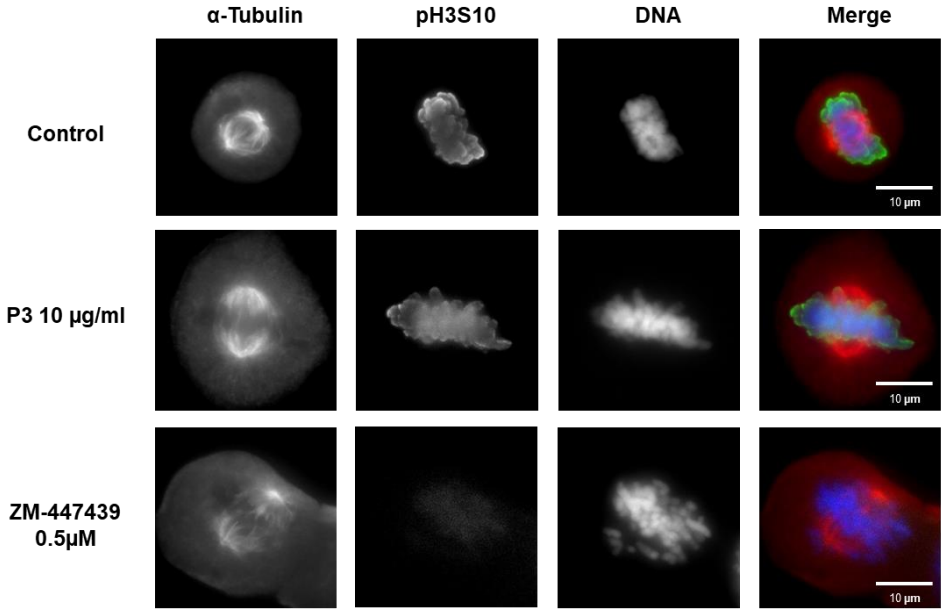
Les cellules (50 000 cellules / puits) ont été ensemencées dans des plaques à 6 puits (# CC7682-7506, CytoOne®, USA) pendant 24 h. Les cellules ont été exposées aux composés pendant 24 h. Après traitement, les cellules ont été fixées et colorées avec des anticorps

primaires spécifiques (1 : 2000) pendant 1 heure à température ambiante, suivies par les anticorps secondaires correspondants (1 : 1500) pendant 1 heure à température ambiante. La phosphorylation de H3T3, H3S10, le fuseau mitotique et l'alignement des chromosomes ont été visualisés en utilisant l'imagerie par immunofluorescence (Zeiss Axio Observer.Z1, Allemagne). Les images ont été analysées par MetaMorph® Software (MetaMorph Inc., USA).

Les anticorps primaires anti-α-tubuline (#T5168, Mouse Monoclonal Antibody, Sigma-Aldrich, USA), anti-phospho-histone H3 (Ser10) (#04-817, Rabbit Monoclonal Antibody, Sigma-Aldrich, USA) ; et les seconds anticorps marqués avec les colorants Alexa 488 et Alexa 594 (Thermo Fisher Scientific, USA). Les lames de microscope 76x26 mm (Thermo Scientific™ AGAA000080##32E, Thermo Fisher Scientific, USA) et les lamelles rondes de diamètre de 16 mm (#631-0152, VWR International, USA) ont été montées dans du Vectashield avec du 4',6-diamidino-2-phénylindole DAPI (Vectashield® Mounting Medium for fluorescence with DAPI, H1200, Vector Laboratories, Inc. USA).

Figure supplémentaire. P3 induit une très légère diminution de la phosphorylation de l'histone H3 sur Ser10 pendant la mitose des cellules U-2 OS. *Les cellules ont été traitées avec 10 µg/mL de P3 pendant 24 h. Elles ont ensuite été fixées et marquées avec les anticorps correspondants pour visualiser les signaux fluorescents de la tubuline (rouge), la phosphorylation de l'histone H3S10 (vert) et l'ADN (bleu) en utilisant un microscope à fluorescence inversée, à l'objectif de 100x. (**A**) et (**B**) La phosphorylation de H3S10 a été mesurée et exprimée en intensité de fluorescence relative de pH3S10/ADN. Les données correspondent à la moyenne ± SD (n = 3) ; *** P <0,001 par rapport aux cellules de contrôle (test t de Student). ZM-447439, un inhibiteur sélectif et compétitif de l'ATP pour Aurora A et Aurora B, a été utilisé comme contrôle positif.*

A



B

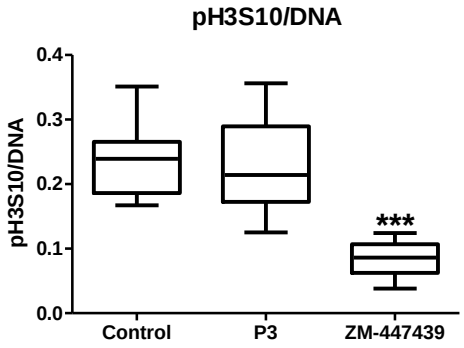


Figure supplémentaire. Thi-Ngoc-Dung Nguyen

Complément matériels et méthodes

Développement et optimisation de tests de tumeurs 3D sphéroïdes à l'aide du système d'analyse de cellules vivantes (*IncuCyte® S3 real-time live-cell analysis*) en temps réel

Dans le cadre de cette thèse, nous avons utilisé le système d'analyse de cellules vivantes IncuCyte® S3 pour étudier certaines caractéristiques physiologiques et phénotypiques des cellules. Les images sont acquises automatiquement au cours du temps sans sortir les cultures de l'incubateur. L'Incucyte® S3 permet de suivre en temps réel la prolifération, la migration ou encore la mort cellulaire. Il permet également une analyse en fluorescence grâce à l'utilisation de marqueurs spécifiques (iodure de propidium, annexin V marquée FITC par exemple). Ce système peut être combiné avec d'autres méthodes d'analyse, par exemple le test MTS afin d'analyser la viabilité cellulaire. J'ai notamment utilisé ce système pour évaluer l'effet du composé P3 sur les cellules d'ostéosarcome U-2 OS sous forme 3D (sphéroïdes).

La culture de sphéroïdes multicellulaires a été développée en 1970 pour reproduire le phénotype fonctionnel des cellules tumorales humaines et leurs réponses à la radiothérapie (Sutherland et al., 1970, 1971). Comparé au format 2D traditionnel, le système sphéroïde 3D fournit un modèle précis et reproductible pour le développement de médicaments : il est capable de reproduire fidèlement les principales caractéristiques des tumeurs solides humaines, y compris l'organisation structurelle, une augmentation de survie cellulaire, la métabolisation des drougues et des nutriments ainsi qu'un gradient d'oxygène partant de la surface vers le 'noyau' hypoxique. De nombreuses études ont montré une bonne corrélation entre les expériences de culture 3D et les essais cliniques, en particulier dans le cas des tumeurs solides humaines (Nunes et al., 2019).

La croissance des sphéroïdes dépend de la lignée cellulaire utilisée, du nombre de cellules ensemencées et du temps d'incubation. La densité d'ensemencement doit donc être optimisée avant de suivre l'activité du composé. Nous avons testé plusieurs conditions expérimentales sur les cellules U-2 OS, telles que : le type de plaque de travail, la densité d'ensemencement (1 000-10 000 cells/puits ou 10^4 à 10^5 cellules/ml), le volume de milieu de culture (50 et 100 µl/puits). Pour chacune des conditions testées, nous avons surveillé le changement de taille et de morphologie des sphéroïdes au cours du temps (1-10 jours) en souhaitant obtenir des sphéroïdes stables ayant un diamètre compris entre 200 et 500 µm. Nous avons changé le milieu de culture uniquement lorsque le sphéroïde était déjà en formation.

Finalement, pour notre étude, nous avons choisi la condition optimale qui correspond à une densité d'ensemencement de 5 000 cellules/100 µl/puits (plaque 96 puits) et un temps de 72h pour la formation d'un sphéroïde de 400 µm de diamètre (**Figure 24**).

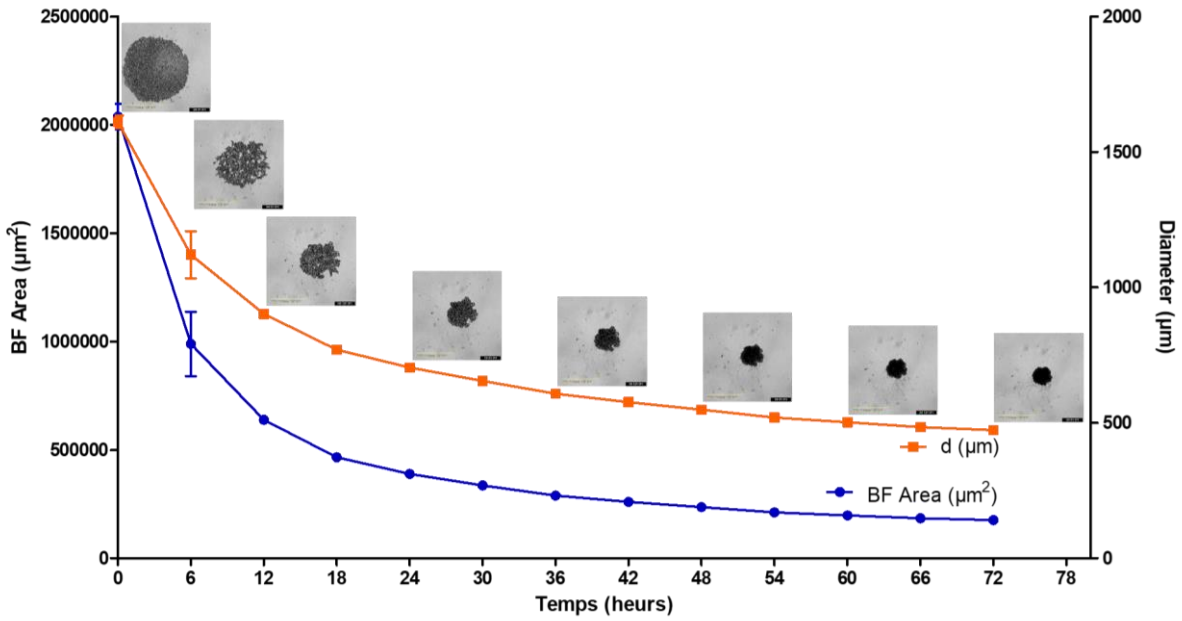


Figure 24. Cinétique de formation d'un sphéroïde au cours de 72 h. Le suivi morphologique a été effectué à l'aide d'un système d'analyse de cellules vivantes (IncuCyte® S3, Sartorius).

Protocole

Jour 0 : Ensemencement des cellules

- Ensemencer les cellules (5 000 cellules/100 µl/puits) en plaque ULA 96 puits (#7007, Corning® 96-well Round Bottom Ultra Low Adhesion plate, Corning Incorporated, USA).

- Centrifuger la plaque ULA (1 000 tr/min, 10 minutes) à température ambiante (20-25 °C).

Jour 0-3 : Formation des sphéroïdes

- Incuber la plaque dans le système d'analyse de cellules vivantes IncuCyte® S3.

- Surveiller la formation de sphéroïdes avec une acquisition d'image en contraste de phase (*brightfield*) toutes les 6 heures (magnification 4x ou 10x) à l'aide du logiciel IncuCyte® S3.

Jour 3 : Traitement des cellules

- Après 72 h d'ensemencement, les sphéroïdes atteignent la taille souhaitée (400 µm). Retirer la plaque ULA de l'incubateur et ajouter délicatement le milieu de culture contenant les composés à tester (100 µL par puits) préparé à une concentration d'essai finale 2x.

- Continuer à surveiller la croissance des sphéroïdes (toutes les 6 heures pendant 4 jours).

Remarque : dans cet essai, il n'est pas recommandé de changer le milieu de culture car cela perturberait les sphéroïdes contenant des cellules nécrosantes et apoptotiques.

Jour 7 : Détermination de la viabilité cellulaire

- Après 96 h de traitement, déterminer la viabilité des sphéroïdes en utilisant le test de réduction MTS (CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay from Promega, Madison, WI, USA).

- Après 3 h d'incubation avec le MTS, transférer 200 µl de surnageant en plaque 96 puits à fond plat et mesurer l'absorbance à l'aide d'un lecteur de microplaque BioTek EL800 (BioTek Instruments, Inc., USA) à 490 et 630 nm.

1.2. Caractérisation de nouveaux métabolites secondaires de l'éponge de l'Atlantique *Crambe crambe*

Contexte et résumé de l'article 2

Crambe crambe, une autre éponge de la famille *Crambeidae*, a été étudiée pour la recherche de nouveaux métabolites secondaires. Depuis les années 90, plusieurs alcaloïdes guanidiniques ont été isolés à partir de cette éponge ([CSL STYLE ERROR: reference with no printed form.]), notamment les crambescines A, B, C, les crambescidines 800, 816, 830, 844, et l'isocrambescidine 800 (Berlinck et al., 1990, 1992, 1993). Ces molécules présentent des bioactivités intéressantes telles que des propriétés antibactériennes et antivirales, ainsi qu'une activité cytotoxique puissante contre plusieurs lignées de cellules cancéreuses (Bondu et al., 2012; Jares-Erijman et al., 1991; Laille et al., 1998). Dans cette étude, nous décrivons l'isolement, la détermination de la structure et l'évaluation biologique de trois nouvelles crambescines C1 424, 438, 452, et d'un dérivé déjà connu, crambescine A2 364, de l'éponge marine de l'Atlantique *Crambe crambe*.

Au niveau biologique, nous avons montré que ces crambescines ont un léger effet antiprolifératif sur des cellules de différentes origines tissulaires (U-2 OS, A3, hTERT RPE-1 et HEK-293). Par ailleurs, deux composés testés (crambescines C1 438 et 452) ont un effet inhibiteur sur l'induction par le TNF-α (*Tumor Necrosis Factor- α*) de la voie pro-inflammatoire NF-κB dans les cellules colorectales HT-29. Dans ce modèle, le niveau d'expression de la luciférase dépend de l'activation ou de l'inhibition de la voie NF-κB. Le parthénolide, inhibiteur d'origine naturelle de la voie NF-κB, doté de puissantes propriétés anti-inflammatoires, est utilisé comme contrôle positif.

***Article 2** (en préparation)*

New Secondary Metabolites from the Atlantic Marine Sponge *Crambe crambe*

Thi-Ngoc-Dung Nguyen [a], Adrien Garcia [c], Estelle Sfecci [c], Amandine Bescond [a], Philippe Amade [c], Sandrine Ruchaud [a], Stéphane Bach [a,b], and Mohamed Mehiri [c,*]

[a] *Sorbonne Université, CNRS, UMR 8227, Integrative Biology of Marine Models, Station Biologique de Roscoff, CS 90074, 29688 Roscoff Cedex, France*

[b] *Sorbonne Université, CNRS, FR2424, Plateforme de criblage KISSf (Kinase Inhibitor Specialized Screening facility), Station Biologique de Roscoff, Place Georges Teissier, 29688 Roscoff, France*

[c] *University Côte d'Azur, CNRS, Institute of Chemistry of Nice, UMR 7272, Marine Natural Products Team, Nice, France.*

[*] *Correspondence: sandrine.ruchaud@sb-roscoff.fr (S.R.); mohamed.mehiri@univ-cotedazur.fr (M.M.); bach@sb-roscoff.fr (S.B.); Tel.: +33-298-292-309 (S.R.); +33-492-076-154 (M.M.); +33-298-292-391 (S.B.); Fax: +33-492-076-151 (M.M.); +33-298-292-526 (S.R. and S.B.)*

ABSTRACT: Three new cyclic guanidine alkaloids, crambescin C1 424 (**2**), crambescin C1 438 (**3**), and crambescin C1 452 (**4**) along with the known metabolite crambescin A2 364 (**1**) were isolated from the Atlantic marine sponge *Crambe crambe.* Structures of isolated compounds were deduced based on extensive NMR spectroscopy (1D and 2D) analyses and tandem mass spectrometry. Their absolute configurations were determined by direct comparison of their experimental ECD spectra with the theoretical ones reported in the literature. Biological evaluations revealed that crambescin C1 452 (**4**) exhibited a moderate cytotoxicity (IC_{50} 60-110 μM) against two cancerous cell lines (U-2 OS, Jurkat A3) and two non-cancerous cell lines (hTERT RPE-1, HEK293).

Keywords: *Alkaloids*, *Sponge*, *Crambe crambe*, *Crambescins.*

Introduction

Marine chemodiversity is tightly linked to marine biodiversity. Among sessile marine invertebrates (sponges, cnidaria, molluscs, tunicates…), sponges have provided more than a third of the new isolated molecules. They represent an incredibly attractive research target due to their ubiquity, high biodiversity and therefore their great chemical diversity, which is itself widened by the variable presence of microorganisms that sponges harbor (symbioses) or feed by filtration of sea water: bacteria, fungi, and microalgae. Marine sponges are divided into four main classes according to the composition of their skeletons: calcareous sponges (Calcarea), glass sponges (Hexactinellida), demosponges (Demospongiae), and homoscleromorphe sponges (Homoscleromorpha). Marine sponges of the orders Poecilosclerida and Axinellida (demosponges class) have provided structurally complex bicyclic, tricyclic, and pentacyclic guanidine alkaloids with a large array of bioactivities [1].

Since the 90's, several guanidine alkaloids were isolated from *Crambe crambe* (Schmidt, 1862), a red encrusting marine sponge widely distributed in the Mediterranean Sea, such as crambescins A, B, C, crambescidins 800, 816, 830, 844, isocrambescidin 800, and crambidine whose structures were revised after their total synthesis [2,3,4,5].

Crambescidins and crambescins display a large array of bioactivities. Crambescidins, in particular crambescidin 816, exhibit potent antibacterial properties and cytotoxic activities against several cancer

cell lines [6,7]. To date, crambescins B was reported to exhibit cytotoxic activities against L1210 murine leukemia cancer cells with an IC_{50} of 1 μg/mL and recently crambescin C1 was shown to protect human hepatocarcinoma cells HepG2 against oxidative injury at low doses and to inhibit tumor cell proliferation at higher concentrations [7,8]. Except these examples, reported biological properties of crambescins are very scarce in the literature due to the difficulties to isolate them in a pure state. Indeed, as they all are hydrophilic metabolites only differing by one or two methylene units, several crambescins homologues still remain to be isolated.

In the present paper, we report on the isolation, structure determination, and biological evaluation of three new crambescins C1 (crambescin C1 424 (**2**), crambescin C1 438 (**3**), and crambescin C1 452 (**4**) along with a known derivative, crambescin A2 364 (**1**), from the Atlantic marine sponge *Crambe crambe*.

Results and discussion

The freeze-dried marine sponge (37.8 g) was extensively extracted with a mixture of CH_2Cl_2/MeOH (1:1, v/v) to yield a crude organic extract (7.4 g) which was further fractionated by reverse phase silica gel chromatography into 13 subfractions, eluting with a gradient of decreasing polarity from H_2O to CH_2Cl_2. The resulting F6 fraction was subjected to semi-preparative Reverse Phase HPLC purification (Macherey-Nagel 250 x 10 mm Nucleodur Sphinx RP 5μm) eluted with a gradient of H_2O/CH_3CN/HFBA to give four pure compounds **1**, **2**, **3** and **4**.

Structural determination of the four purified compounds were found by a combination of spectrometric (HR-ESI-MS/MS) and spectroscopic (1D and 2D NMR) data. The molecular formula of **1** ($C_{18}H_{33}N_6O_2$, 6 DBE) was determined by the HR-ESI-MS (+) data which showed a pseudomolecular ion adduct $[M+H]^+$ at *m/z* 365.2674. The ^{1}H and ^{13}C NMR spectra of compounds **1** exhibit the following common functional groups: (a) five sp^2 carbons (one α,β-unsaturated carbonyl at δ_C 166.1 (C-6), two guanidine groups at δ_C 158.7 (C-1) and 153.1 (C-12), one olefin bond at δ_C 152.8 (C-8) and δ_C 103.3 (C-7)); (b) one carboxymethylene (δ_C 65.1, δ_H 4.22, CH_2-5); (c) two guanidinomethylene (δ_C 42.0, δ_H 3.23, CH2-2 and δ_C 49.7, δ_H 3.67-3.82, CH_2-11); (d) one methine (δ_C 51.3, δ_H 4.40, CH-13). The sequence of diastereotopic protons at 2.98 and 3.17 ppm (CH_2-9), 2.10 and 2.24 ppm (CH_2-10), and 3.67 and 3.82 ppm (CH_2-11) are characteristic of the pyrrolidine ring of the crambescins A subclass. HMBC correlations between CH_2-9 and C-8, and CH_2-11 and C-8 confirmed the substituted pyrrolidine group. HMBC correlations between the methine CH-13 and the three quaternary carbons of the guanidine cycle as well as those of CH_2-5 and CH_2-2 with C-6 made possible the connection of the two alkyl chains. [9] Because of signals overlapping, it was impossible to determine clearly the lengths of the alkyl side chains at C-13 and the guanidinoalkyl chain at C-6 only by NMR spectroscopy. Thus, we applied the Rinehart's methodology [5b].

HR-ESI-MS/MS (+) analysis was performed on **1** and furnished an ion adduct at *m/z* 241.1668 (fragment A) corresponding to the rupture of the cyclic guanidine which is representative of the crambescin A2 subclass and indicates a four-carbon guanidinoalkyl chain (m=2). Ions adducts at *m/z* 252.1717 (fragment D) and 114.1034 (fragment E) corresponding to a loss of a 4-guanidinobut-1-ene as well as peaks at *m/z* 234.1608 (fragment B) and 132.1138 (fragment C), providing from the ester fragmentation, confirmed the four-carbon guanidinoalkyl chain and so the crambescin A2 structure.

Crambescin A2 364 (**1**) has been already isolated from two sponges of the order Poecilosclerida: *Ptilocaulis spiculifer* and *Pseudaxinella reticulate* [9,10].

The molecular formula of compounds **2** ($C_{21}H_{41}N_6O_3$, 5 DBE), **3** ($C_{22}H_{43}N_6O_3$, 5 DBE), and **4** ($C_{23}H_{45}N_6O_3$, 5 DBE) were deduced from the HR-ESI-MS (+) data which showed pseudomolecular ions adducts $[M+H]^+$ at *m/z* 425.3250, 439.3425, and 453.3536, respectively. Compounds (**2**–**4**) differ only by one or two methylene units (differences of 14 or 28 Da). The ^{1}H and ^{13}C NMR spectra of compounds (**2**–**4**) exhibit the following common functional groups: (a) five sp^2 carbons (one α,β-unsaturated carbonyl at δ_C 166.1 (C-6), two guanidine groups at δ_C 158.6 (C-1) and 153.5 (C-12), one olefin bond at δ_C 149.0 (C-8) and δ_C 106.0 (C-7)); (b) one carboxymethylene (δ_C 65.8, δ_H 4.20-4.17, CH_2-5); (c) one oxymethylene (δ_C 62.1, δ_H 3.61, CH_2-11); (d) one methine (δ_C 51.1, δ_H 4.41, CH-13). The ^{1}H NMR signals at 2.79 and 2.84 (CH_2-9), 1.81 (CH_2-10), and 3.61 (CH_2-11) ppm are characteristic of the crambescin C subclass featuring a hydroxypropyl side chain. COSY spectra established three contiguous methylenes CH_2-9, CH_2-10 and CH_2-11 and HMBC correlations attached CH_2-9 to the cyclic olefin bond at C-8. The methine signals CH-13 displayed COSY correlation with CH_2-14 and HMBC correlations with the three quaternary carbons of the guanidine cycle C-7, C-8 and C12. HMBC correlations between CH_2-5 and C-6 as well as between CH_2-2 and C-1 complete the crambescin C structure (Table 1). The main differences in the ^{1}H NMR spectra of compounds (**2**–**4**) relies on the intensity of the broad signals around δ_H 1.30 and 1.40 ppm, assigned to the aliphatic side chains protons of the upper alkyl side chain at C-13 (n+2) and the lower guanidinoalkyl chain at C-6 (m+2). The lengths of the upper and lower alkyl side chains were deduced from the HR-ESI-MS/MS (+) fragmentation patterns of compounds (**2**–**4**). They exhibit very close intense ions adducts at *m/z* 174.1607, 174.1615, and 174.1596 (fragment C), respectively, characteristic of the loss of a 7-guanidinoheptan-1-ol fragment (m=5). Furthermore, the retro Diels-Alder reaction undergone by compounds (**2**–**4**) during MS/MS analyses yielding intense ions adducts at *m/z* = 252.1714, 266.1884 and 280.2011 (fragment B), allowed us to deduce the values of n for the upper alkyl side chains of **2**, **3** and **4**: 2 (pentyl), 3 (hexyl), and 4 (heptyl), respectively. Consequently, the isolated compounds are crambescin C1 424 (**2**), crambescin C1 438 (**3**), and crambescin C1 452 (**4**), new crambescins C1 homologues.

The absolute configurations of the stereogenic centers C-13 of crambescin A2 364 (**1**), crambescin C1 424 (**2**), crambescin C1 438 (**3**), and crambescin C1 452 (**4**) were determined by comparisons of the experimental ECD spectra with the predicted ECD ones obtained from TDDFT calculations [2]. The calculated ECD spectra predict for the crambescins C subclass strong positive Cotton Effects (CEs) for an *R* configuration and strong negative CEs for an *S* configuration and the opposite for the crambescins A subclass [2]. The experimental ECD spectra of **1**, **2**, **3** and **4** as HFBA salts exhibit strong positive CEs which suggest an absolute configuration *R* for crambescin A2 364 (**1**) (except for the HCl salt which underwent most probably an aromatization during the counter ion exchange process) and a *S* configuration for **2**, **3** and **4**. Although the absolute configurations for crambescin C1 424 (**2**), crambescin C1 438 (**3**), and crambescin C1 452 (**4**) at C-13 are similar to the ones reported for homologues isolated from *Crambe crambe*, the absolute configuration of crambescin A2 364 (**1**) is the opposite of crambescin A2 364 recovered from the Mediterranean sponge *C. crambe* and is the same of crambescin A2 364 obtained from *Pseudaxinella reticulata*. [2,9] These results raise again the question if sponges from the same order (especially the Poecilosclerida order) could produce both antipods of the same metabolite (any epimerization excluded during the purification process).

The cytotoxicity of crambescin A2 364 (**1**), crambescin C1 424 (**2**), crambescin C1 438 (**3**), and crambescin C1 452 (**4**) was evaluated against two cancerous cell lines: U-2 OS (osteosarcoma cell line), Jurkat A3 (lymphocytes from acute T cell leukemia) and two non-cancerous cell lines: hTERT RPE-1 (human retinal pigment epithelium cell line) and HEK293 (human embryonic kidney cell line). Cells were first treated with 10 or 100 µM of the four purified compounds (**1**-**4**) during 24 hours. These data are reported on Figure 1. In the next step, cells were treated with increasing concentrations of compounds (**1**-**4**) (0.05 – 250 μM) to evaluate the dose-dependent effect and to determine the corresponding half-

maximal inhibitory concentrations (IC_{50}) (reported on Table 1 and supplementary Figure 1). The crambescin C1 452 (**4**) was the most active structure inducing a light toxic effect at 100 µM on the four cell lines (Figure 1). As mentioned on Table 1, all the tested compounds affected cell viability in a dose-dependent manner: crambescin A2 364 (**1**) and crambescin C1 424 (**2**) were almost inactive (for concentrations < 250 μM) and crambescins C1 438 (**3**) and C1 452 (**4**) exhibited moderate cytotoxic effects with IC_{50} values around 65-165 μM for (**3**) and 60-110 μM for (**4**). Interestingly all the tested crambescins (**1-4**) were shown to be slightly more active on the two cancerous cell lines tested (Jurkat A3 and U-2 OS) when compared to the none-cancerous ones.

The main structural difference between the new crambescins C1 derivatives is the length of the upper alkyl side chain at position C-13. Furthermore, crambescin A2 364 (**1**) has the same upper alkyl chain than crambescin C1 424 (**2**) and we can observe the same lack of activity for the two compounds. These biological assays may suggest that the cytotoxicity of the crambescin C1 subclass was increased with the length of the upper alkyl side chain. Further investigations of fractions F6 and F7 are in progress to assess this hypothesis.

Table 1. Cytotoxicity of compounds (**1-4**) against U-2 OS, Jurkat A3, hTERT RPE-1 and HEK293 human cell lines. Values reported here are determined using dose-response curves (see Supplementary Figure S1).

IC_{50} (μM)				
	Crambescin A2 364 (1)	Crambescin C1 424 (2)	Crambescin C1 438 (3)	Crambescin C1 452 (4)
U-2 OS	> 250	160	80	60
Jurkat A3	130	100	65	62
RPE-1	> 250	225	165	80
HEK293	> 250	> 250	130	**110**

The length of the upper alkyl side chain in the structure of crambescin A2 364 (**1**), crambescin C1 424 (**2**), crambescin C1 438 (**3**) and crambescin C1 452 (**4**) induced the variation of biological effects. Otherwise, the influence of the hydrophobicity of ion-pairing reagent of compounds (**1-4**), trifluoroacetic acid (TFA), heptafluorobutyric acid (HFBA) and hydrochloric acid (HCl) used as eluents additive for HPLC, was also evaluated on cell viability of U-2 OS, Jurkat A3, RPE1 and HEK293 cells. Data obtained indicate that the ion-pairing of compounds does not affect dramatically the cellular activity of the tested products (Supplementary Figure S2).

As the purified compounds (**1-4**) have only a poor effect on cell viability, we assessed their effects on inflammation process. Cytokines such as TNF-α (*Tumor Necrosis Factor-α*), IL-1β (Interleukin), IL-6 and the potent chemoattractant IL-8, are keys elements produced during excessive inflammation. The expression level of these cytokines depends on the transcription factor NF-κB. We thus used a cellular reporter model, HT29/NF-κB pGreenfire human colon cancer cell line, to estimate the modulation of the NF-κB pathway by the tested compounds (**1-4**). In this model, the measured luciferase expression levels depend on the activation or the inhibition of the NF-κB pathway. Parthenolide, a natural sesquiterpene lactone and a known inhibitor of NF-κB with powerful anti-inflammatory properties, is used as positive control. Data obtained are reported on Figure 2. As expected, parthenolide was shown to inhibit NF-κB after stimulation with TNF-α. Only compounds (**3-4**) showed a significant cellular effect by inhibiting the NF-κB pathway at 100 µM. We thus estimated that these two compounds have light anti-inflammatory properties. The production of inflammatory cytokines in the presence of compounds (**3-4**) should now be tested notably by ELISA assay.

Materials and Methods

1. Reagents

Ethyl acetate (EtOAc), methanol (MeOH), and dichloromethane (CH_2Cl_2) used for extraction were purchased from VWR (Rectapur grade). Acetonitrile (CH_3CN), water (H_2O), formic acid (FA), trifluoroacetic acid (TFA) and heptafluorobutyric acid (HFBA) used for high performance liquid chromatography (HPLC) analyses were analytical grade and purchased from VWR (Chromanorm grade).

2. Instruments

HPLC analyses were performed with a Waters Alliance 2695 HPLC system (Waters Corporation, Milford, MA) coupled with a Waters 996 photodiode array (PDA) detector. Analyses were performed with a bifunctional Macherey-Nagel NUCLEODUR® Sphinx RP column (5 µm, 250 mm x 4.6 mm) consisting of a balanced ratio of propylphenyl and C18 ligands, at room temperature.
NMR (^{1}H and ^{13}C) analyses were performed in CD_3OD on a Bruker Avance 500 MHz spectrometer.
HR-MS analyses were performed on a Bruker Daltonics coupled with microTOF-QII and separation was carried on a HPLC Dionex U3000 RSLC.
HR-MS/MS analyses were performed on a Thermo Exactive coupled with LTQ-Orbitrap.
CD spectra were measured in methanol using a JASCO J-810 spectropolarimeter.

3. Extraction and isolation of Crambe crambe

The sponge was lyophilized to obtain 50 g of freeze-dried material. 37 g of this mass were ground and extracted with a mixture of CH_2Cl_2/MeOH (1:1, v/v) five times. The brown extract was then dried under reduced pressure to give a solid brown extract (7.41g).

RP C18 silica (27g) was added to the resolubilized crude extract. After mixing, the obtained mixture was then evaporated under reduced pressure to afford a thin powder and fractionated by Solid Phase Extraction over RP C18 silica gel (400g) with a step gradient of 600 mL H_2O (F1 fraction), 450 mL H_2O/MeOH 95:5 v/v (F2 fraction), 450 mL H_2O/MeOH 90:10 v/v (F3 fraction), 450 mL H_2O/MeOH 80:20 v/v (F4 fraction), 450 mL H_2O/MeOH 70:30 v/v (F5 fraction, 37 mg), 450 mL H_2O/MeOH 50:50 v/v (F6 fraction, 201 mg), 450 mL H_2O/MeOH 30:70 v/v (F7 fraction, 577 mg), 450 mL MeOH (F8.1 fraction, 271 mg), 450 mL MeOH (F8.2 fraction, 439 mg), 450 mL MeOH (F8.3 fraction, 397 mg), 450 mL MeOH (F8.4 fraction, 266 mg), 450 mL MeOH/ CH_2Cl_2 50:50 v/v (F9 fraction, 318 mg), 450 mL CH_2Cl_2 (F10 fraction, 200 mg).

The F6 fraction was subjected to semi-preparative HPLC purification (Macherey-Nagel 250 x 10 mm Nucleodur Sphinx RP 5µm) eluted with a gradient of H_2O/CH_3CN/HFBA: isocratic step from 0 to 5 min (77:23:0.05) and then gradient step from 5 to 85 min (from 77:23:0.05 to 50:50:0.05) with a flow rate of 3 mL.min^{-1} to give four pure compounds **1**, **2**, **3**, **4**.

Crambescin A2 364 (1)

Orange glass, HFBA salt; CD (MeOH, *c* 5.76 x 10^{-4} M) $\Delta\varepsilon$ (λ_{max} nm) -7.66 (213) +10.54 (249) +4.48 (292).

^{1}H NMR (500 MHz, CD_3OD), δ (ppm): 4.40 (*t*, ^3J = 5.6 Hz, 1H, CH, C13), 4.22 (*m*, 2H, CH_2, C5), 3.82 (*td*, ^3J = 9.0 Hz, ^3J = 2.9 Hz, 1H, CH_2, C11), 3.67 (*ddd*, ^3J = 10.0 Hz, ^3J = 8.0 Hz, ^3J = 2.2 Hz, 1H, CH_2, C11), 3.23 (*t*, ^3J = 7.0 Hz, 2H, CH_2, C2), 3.17 (*m*, 1H, CH_2, C9), 2.98 (*qt*, ^3J = 9.2 Hz, 1H, CH_2, C9), 2.24 (*m*, 1H, CH_2, C10), 2.10 (*m*, 1H, CH_2, C10), 1.76 (*m*, 2H, CH_2, C4), 1.68 (*m*, 2H, CH_2, C3), 1.58 (*m*, 2H, CH_2, C14), 1.41 (*m*, 2H, CH_2, C15), 1.31 (*m*, 2H, CH_2, C16), 1.31 (*m*, 2H, CH_2, C17), 0.91 (*t*, ^3J = 6.9 Hz, 3H, CH_3, C18).

^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD), δ (ppm): 166.1 (C, C6), 158.7 (C, C1), 153.1 (C, C12), 152.8 (C, C8), 103.3 (C, C7), 65.1 (CH_2, C5), 51.3 (CH, C13), 49.7 (CH_2, C11), 42.0 (CH_2, C2), 37.4 (CH_2, C14), 32.5 (CH_2, C9), 31.9 (CH_2, C16), 27.0 (CH_2, C4), 26.6 (CH_2, C3), 24.8 (CH_2, C15), 23.5 (CH_2, C10), 22.9 (CH_2, C17), 14.3 (CH_3, C18).

Crambescin C1 424 (2)

Orange glass, HFBA salt; CD (MeOH, *c* 5.74 x 10^{-4} M) $\Delta\varepsilon$ (λ_{max} nm) -8.20 (213) +31.23 (248).

^{1}H NMR (500 MHz, CD_3OD), δ (ppm): 4.41 (*dd*, ^3J = 7.9 Hz, ^3J = 4.4 Hz, 1H, CH, C13), 4.20 (*m*, 1H, CH_2, C5), 4.17 (*m*, 1H, CH_2, C5), 3.61 (*t*, ^3J = 6.4 Hz, 2H, CH_2, C11), 3.17 (*t*, ^3J = 7.0 Hz, 2H, CH_2, C2), 2.84 (*m*, 1H, CH_2, C9), 2.79 (*m*, 1H, CH_2, C9), 1.81 (*qt*, ^3J = 7.2 Hz, 2H, CH_2, C10), 1.71 (*m*, 2H, CH_2, C4), 1.60 (*m*, 2H, CH_2, C3), 1.60 (*m*, 2H, CH_2, C14), 1.41 (*m*, 2H, CH_2, C3A), 1.41 (*m*, 2H, CH_2, C3B), 1.41 (*m*, 2H, CH_2, C3C), 1.41 (*m*, 2H, CH_2, C15), 1.32 (*m*, 2H, CH_2, C16), 1.32 (*m*, 2H, CH_2, C17), 0.91 (*t*, ^3J = 6.8 Hz, 3H, CH_3, C18).

^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD), δ (ppm): 166.1 (C, C6), 158.6 (C, C1), 153.5 (C, C12), 149.0 (C, C8), 106.0 (C, C7), 65.8 (CH_2, C5), 62.1 (CH_2, C11), 51.1 (CH, C13), 42.4 (CH_2, C2), 37.0 (CH_2, C14), 32.5 (CH_2, C16), 32.0 (CH_2, C10), 29.9 (CH_2, C3B), 29.8 (CH_2, C3), 29.7 (CH_2, C4), 28.7 (CH_2, C9), 27.7 (CH_2, C3A), 27.1 (CH_2, C3C), 24.8 (CH_2, C15), 23.5 (CH_2, C17), 14.3 (CH_3, C18).

Crambescin C1 438 (3)

Orange glass, HFBA salt; CD (MeOH, *c* 5.11 x 10^{-4} M) $\Delta\varepsilon$ (λ_{max} nm) -8.23 (214) +28.07 (248).

^{1}H NMR (500 MHz, CD_3OD), δ (ppm): 4.41 (*dd*, ^3J = 7.9 Hz, ^3J = 4.3 Hz, 1H, CH, C13), 4.19 (*m*, 1H, CH_2, C5), 4.16 (*m*, 1H, CH_2, C15), 3.61 (*t*, ^3J = 6.4 Hz, 2H, CH_2, C11), 3.17 (*t*, ^3J = 7.0 Hz, 2H, CH_2, C2), 2.84 (*m*, 1H, CH_2, C9), 2.79 (*m*, 1H, CH_2, C9), 1.81 (*qt*, ^3J = 7.2 Hz, 2H, CH_2, C10), 1.70 (*m*, 2H, CH_2, C4), 1.59 (*m*, 2H, CH_2, C3), 1.59 (*m*, 2H, CH_2, C14), 1.39 (*m*, 2H, CH_2, C3A), 1.39 (*m*, 2H, CH_2, C3B), 1.39 (*m*, 2H, CH_2, C3C), 1.39 (*m*, 2H, CH_2, C15), 1.39 (*m*, 2H, CH_2, C16), 1.32 (*m*, 2H, CH_2, C17A), 1.29 (*m*, 2H, CH_2, C17), 0.91 (*t*, ^3J = 6.8 Hz, 3H, CH_3, C18).

^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD), δ (ppm): 166.1 (C, C6), 158.7 (C, C1), 153.5 (C, C12), 149.0 (C, C8), 106.0 (C, C7), 65.8 (CH_2, C5), 62.1 (CH_2, C11), 51.1 (CH, C13), 42.5 (CH_2, C2), 37.0 (CH_2, C14), 32.5 (CH_2, C17), 32.0 (CH_2, C10), 30.3 (CH_2, C3B), 30.3 (CH_2, C16), 29.9 (CH_2, C3), 29.7 (CH_2, C4), 28.7 (CH_2, C9), 27.7 (CH_2, C3A), 27.2 (CH_2, C3C), 24.8 (CH_2, C15), 23.6 (CH_2, C17A), 14.3 (CH_3, C18).

Crambescin C1 452 (4)

Orange glass, HFBA salt; CD (MeOH, *c* 6.00 x 10^{-4} M) $\Delta\varepsilon$ (λ_{max} nm) -9.36 (214) +38.71 (248).

^{1}H NMR (500 MHz, CD_3OD), δ (ppm): 4.41 (*dd*, ^3J = 7.7 Hz, ^3J = 4.4 Hz, 1H, CH, C13), 4.20 (*m*, 1H, CH_2, C5), 4.17 (*m*, 1H, CH_2, C5), 3.61 (*t*, ^3J = 6.5 Hz, 2H, CH_2, C11), 3.17 (*t*, ^3J = 7.0 Hz, 2H, CH_2, C2), 2.84 (*m*, 1H, CH_2, C9), 2.79 (*m*, 1H, CH_2, C9), 1.81 (*qt*, ^3J = 7.2 Hz, 2H, CH_2, C10), 1.70 (*m*, 2H, CH_2, C4), 1.59 (*m*, 2H, CH_2, C3), 1.59 (*m*, 2H, CH_2, C14), 1.41 (*m*, 2H, CH_2, C3A), 1.41 (*m*, 2H, CH_2, C3B), 1.41 (*m*, 2H, CH_2, C3C), 1.38 (*m*, 2H, CH_2, C15), 1.38 (*m*, 2H, CH_2, C16), 1.33 (*m*, 2H, CH_2, C17), 1.33 (*m*, 2H, CH_2, C17B), 1.29 (*m*, 2H, CH_2, C17A), 0.91 (*t*, ^3J = 6.8 Hz, 3H, CH_3, C18).

^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD), δ (ppm): 166.1 (C, C6), 158.7 (C, C1), 153.5 (C, C12), 149.0 (C, C8), 106.0 (C, C7), 65.8 (CH_2, C5), 62.1 (CH_2, C11), 51.1 (CH, C13), 42.4 (CH_2, C12), 37.0 (CH_2, C14), 32.9 (CH_2, C17A), 32.0 (CH_2, C10), 30.3 (CH_2, C3B), 30.2 (CH_2, C17), 29.9 (CH_2, C3), 29.9 (CH_2, C4), 29.7 (CH_2, C16), 28.7 (CH_2, C9), 27.6 (CH_2, C3A), 27.1 (CH_2, C3C), 25.1 (CH_2, C15), 23.7 (CH_2, C17B), 14.4 (CH_3, C18).

4. Cell culture and cell viability assay

The human cell lines used in this study, U-2 OS, Jurkat A3, hTERT RPE-1 and HEK293, were obtained from ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA) and cultured in DMEM medium supplemented with 10 % FBS, 100 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin. The cells were incubated under a 5 % CO_2 atmosphere at 37 °C.

Effects on cell viability of compounds (**1-4**) was determined by using CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega Coorporation, Madison, WI, USA), according to the manufacturer's instructions. This method is based on the reduction of MTS tetrazolium compound by viable cells to generate a colored formazan product. After treatment with the tested compounds, cells were incubated with MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, Inner salt) for 3 hours at 37 °C. The absorbance was measured with a microplate reader (BioTek EL800) at 490 and 630 nm. The percentage of viability was calculated by comparing values obtained from treatment with tested compounds to those of DMSO (used as control).

5. Monitoring the NFκB pathway activity.

HT29/NF-κB pGreenfire human colon cancer cell line is a gift of Prof. Peter Vandenabeele's laboratory (Inflammation Research Center, Ghent, Belgium). HT29/NF-κB pGreenfire was obtained after stable transfection with NF-κB pGreenfire vector including firefly luciferase as gene reporter. The expression of luciferase is under the control of NF-κB transcription factor. The kit "luciferase assay system" from Promega (# E4550 Promega, France) was used to monitor the expression of the reporter gene. In all experiments, the effect of the tested compounds was compared to cells treated with vehicle control, DMSO, at a final concentration of 0.1% or 1 %. Parthenolide (#P0667, Sigma-Aldrich, France), is used as positive anti-inflammatory control. The optimal concentration of parthenolide to be used to inhibit the NF-κB pathway was determined experimentally as 18 µM.

Cells were first incubated at 37°C, 5% CO_2 in Minimum Essential Medium Eagle (MEM, Gibco) containing 10% of fetal calf serum and 0.5 mg/mL G418 (Sigma-Aldrich, France) for 3 days to reach approximately 80% of confluence. Following this first amplification step, cells are then seeded in MEM at 10,000 cells/50 µl per well in 96-well plate (#655098, Greiner) for 24 hours before adding compounds at a final concentration of 10 and 100 µM for 1 hour. Then, TNF-α (Tumor Necrosis Factor-α Recombinant Human Protein, # 10602, Life Technologies), was added at a final concentration of 25 ng/mL and multi-well plates were incubated for 23 hours. After incubation, the luminescence was detected following this protocol: (i) cells were washed 3 times with warmed PBS; (ii) cells were lysed using cell culture lysis reagent (# E4550 Promega, France) for 45 minutes at room temperature; (iii) 100 µl of Luciferase Assay Reagent (# E4550 Promega, France) was added per well and the luminescence was measured immediately using a microplate reader (Mithras LB 940 luminometer, Berthold Technologie). The assays were performed in triplicate.

6. Statistical analyses

Data presented were acquired from a minimum of three independent experiments. They are expressed as means ± SD. Statistical analyses were performed with student's *t*-test. All statistical analyses were performed with GraphPad Prism6 software (GraphPad Software, San Diego, CA).

Acknowledgments

Authors would like to thank Prof. Peter Vandenabeele's laboratory (Inflammation Research Center, Ghent, Belgium) for the gift of HT29-NF-κB pGreenfire human colon cancer cell line. The authors also thank the Cancéropôle Grand-Ouest (axis: Nature sea products in cancer treatment), GIS IBiSA

(Infrastructures en Biologie Santé et Agronomie, France) and Biogenouest (Western France life science and environment core facilty network) for supporting KISSf screening facility (Roscoff, France). T.-N.-D. Nguyen is supported by the government of Vietnam (recipient of a "Project 911" PhD fellowship) and the French Embassy in Vietnam (Campus France). S. Bach is supported by ANR/Investissements d'Avenir program via the OCEANOMICs project (grant #ANR -11-BTBR-0008).

References

[1] J. N. A. Hooper, R. W. M. Van Soest, F. Debrenne, *Systema Porifera : A Guide to the Classification of Sponges*, vol. 2, New York, Kluwer Academic/Plenum, **2002**, 1708.

[2] S. Bondu, G. Genta-Jouve, M. Leiros, C. Vale, J.-M. Guigonis, L. M. Botana, O. P. Thomas, *RSC adv.* **2012**, *2*, 2828-2835.

[3] a) R. G. S. Berlinck, J. C. Braekman, D. Daloze, *J. Nat. Prod.* **1992**, *55*, 528-532; b) R.G. S. Berlinck, J. C. Braekman, D. Daloze, K. Hallenga, R. Ottinger, I. Bruno, R. Riccio, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 6531-6534.

[4] a) R. G. S. Berlinck, J. C. Braekman, D. Daloze, I. Bruno, R. Riccio, S. Ferri, S. Spampinato, E. Speroni, *J. Nat. Prod*. **1993**, *56*, 1007-1015; b) E. A. Jares-Erijman, R. Sakai, K. L. Rinehart, *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 5712-5715.

[5] a) B. B. Snider, Z. Shi, *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 3828-3839; b) E. A. Jares-Erijman, A. A. Ingrum, F. Sun, K. L. Rinehart, *J. Nat. Prod.* **1993**, *56*, 2186-2188.

[6] a) A. Olszewski, K. Sato, Z. D. Aron, F. Cohen, A. Harris, B. R. McDougall, W. E. Robinson Jr., L. E. Overman, G. A. Weiss, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101*, 14079-14084; b) K. L. Rinehart, E. A. Jares-Erijman, US Pat. 5756734A, **1998**.

[7] S. Ottinger, A. Kloppel, V. Rausch, L. Liu, G. Kallifatidis, W. Gross, M.-M. Gebhard, F. Brummer, I. Herr, *Int. J. Cancer* **2012**, *130*, 1671-1681.

[8] M. Roel, J. A. Rubiolo, E. Ternon, O. P. Thomas, M. R. Vieytes, L. M. Botana, *Mar. Drugs* **2015**, *13*, 4633-4653.

[9] M. T. Jamison, T. F. Molinski, *J. Nat. Prod*. **2015**, *78*, 557-561.

[10] S.-W. Yang, T-M. Chan, S. A. Pomponi, G. Chen, A. E. Wright, M. Patel, V. Gullo, B. Pramanik, M. Chu, *J. Antibiot.* **2003**, *56*, 970-972.

Figure Legends

Figure 1. Compounds (**1-4**) are slightly cytotoxic on a short panel of human cancerous and non-cancerous cells: U-2 OS, Jurkat A3, hTERT RPE-1 and HEK293 cells. 24 hours after treatment with 10 or 100 µM of compounds (**1-4**), cell viability was measured with a MTS reduction assay to determine the toxicity of the compounds towards either tested cells. Data are expressed in % of survival in cells treated with DMSO (n=3, mean ± SD, student's *t*-test: **P*<0.05; ***P*<0.01; ****P*<0.001).

Figure 2. Compounds (**3-4**) have a significant effect on the NF-κB pathway regulation. (**a**) The effect of a 24 hours' treatment with the tested compounds (**1-4**) on the viability of HT29/NF-κB pGreenfire human colon cancer cell line was tested with a MTS reduction assay. (**b**) Human HT29/NF-κB pGreenfire cancer cells were incubated for 24 hours with the tested compounds (**1-4**) before to perform the luciferase assay. (**c**) Human HT29/NF-κB pGreenfire cancer cells were incubated for one hour with the tested compounds (**1-4**) and then stimulated with 25 ng/mL of TNF-α for 23 hours before to perform the luciferase assay. Controls were performed with 1% DMSO and Parthenolide (known inhibitor of the NF-κB pathway) using the same experimental conditions. RLU: relative lumen units. (n=3, mean ± SD, student's *t*-test: **P*<0.05; ***P*<0.01; ****P*<0.001).

Supplementary Figure S1. Dose-dependent effect of Compounds (**1-4**) on the viability of human cancerous and non-cancerous cell lines: U-2 OS, Jurkat A3, hTERT RPE-1 and HEK293 cells. Cells were treated with increasing concentrations of tested compounds (from 0.05 to 250 µM). Cell viability was evaluated by MTS reduction assay, 24 hours after addition of tested compounds on cells and is expressed in % of survival in cells treated with DMSO (n=2, mean ± SEM). Half-maximal inhibitory concentrations (IC_{50}) are determined from these curves and reported in Table 1 of the manuscript.

Supplementary Figure S2. Changes of effects on cell viability of U2OS, Jurkat A3, RPE1 and HEK293 cell lines treated with various doses of ion-pairing of compounds (**1-4**). (**a**) Viability of cells treated with 10 and 100 µM of compounds during 24 hours at 37 °C was detected by the MTS assay. Data is mean ± SD of the three independent experiments, * $p < 0.05$ compared with control cells (student's *t*-test). (**b**) Cells were treated with increasing concentrations of compounds (0.05-250 µM) prior to detect the cell viability by MTS assay. Various biological activities of the four compounds corresponding to ion-pairing were evaluated.

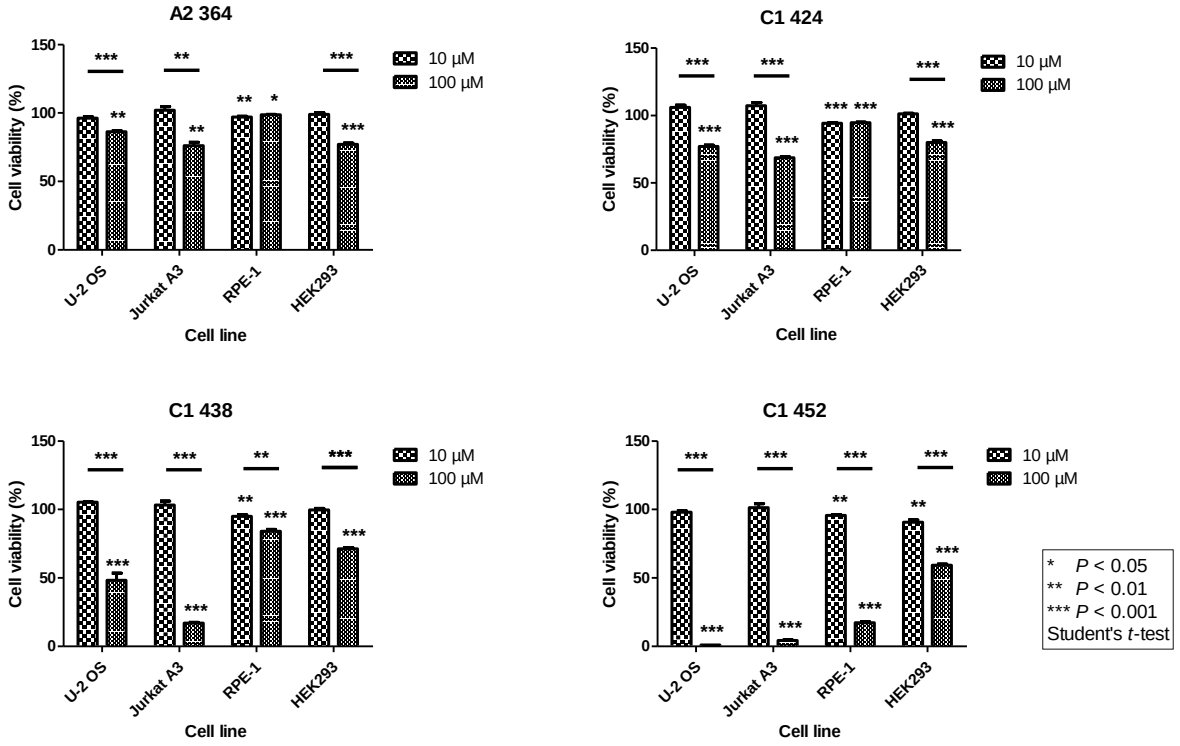


Figure 1. Thi-Ngoc-Dung Nguyen

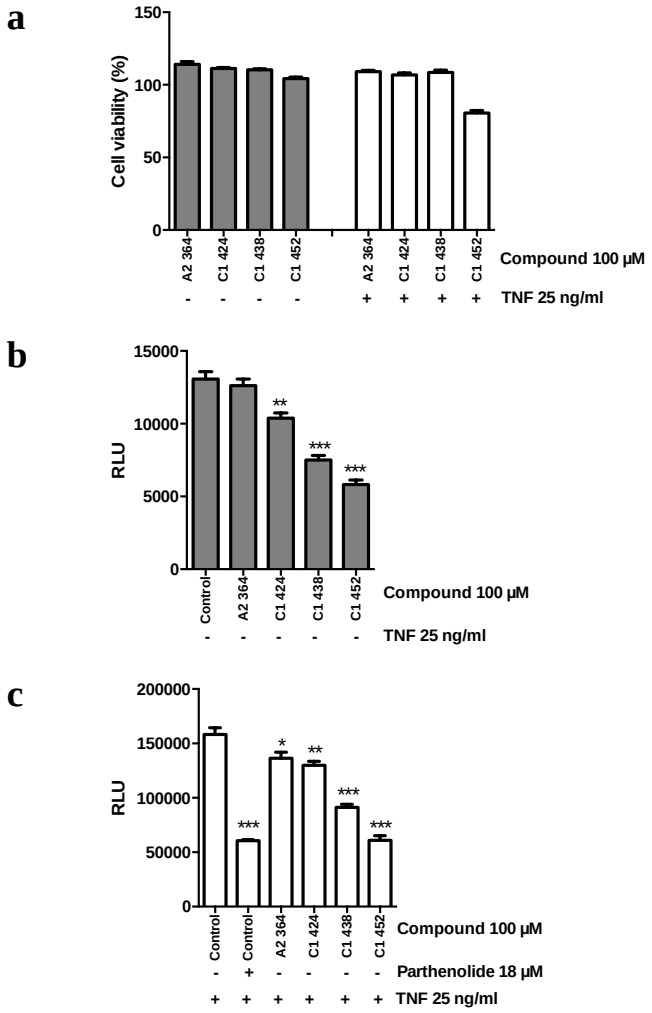
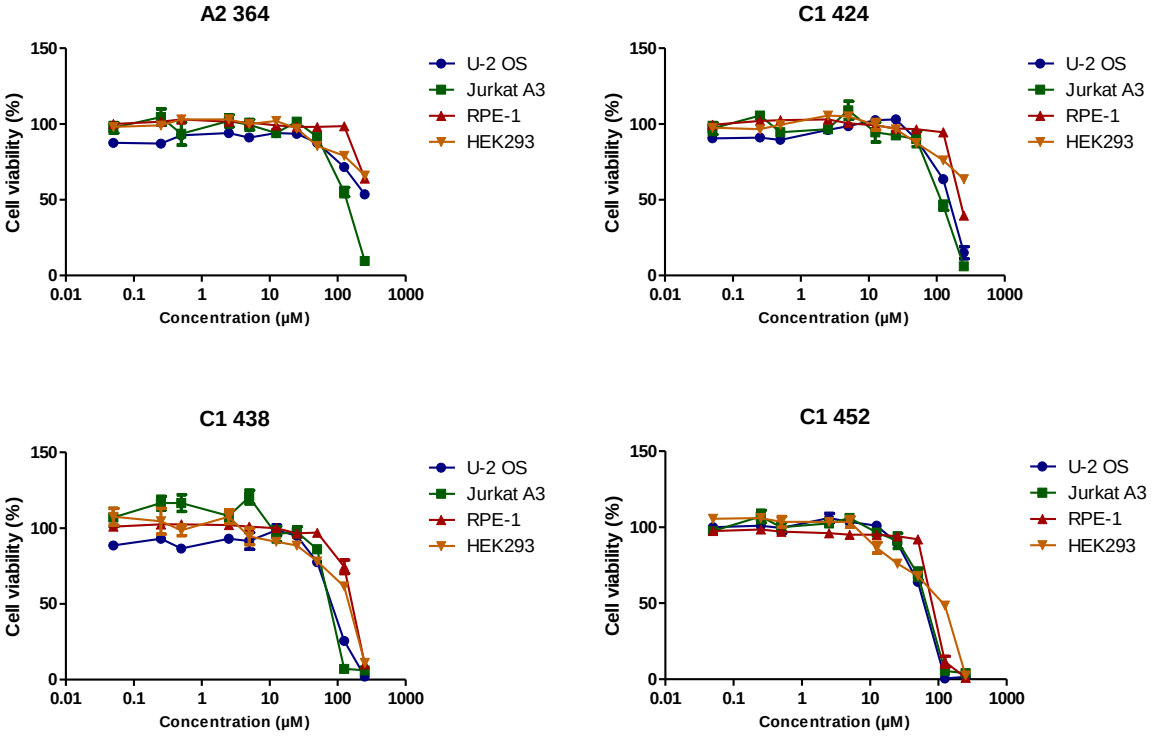
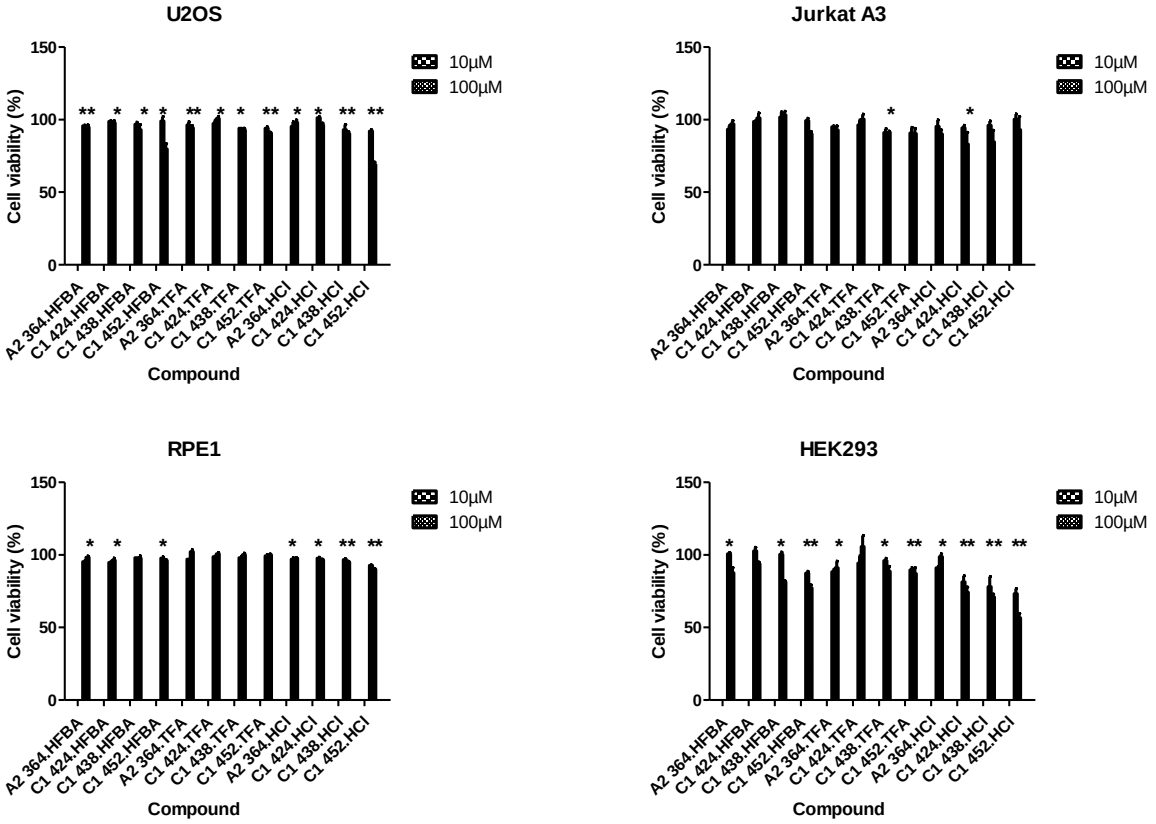


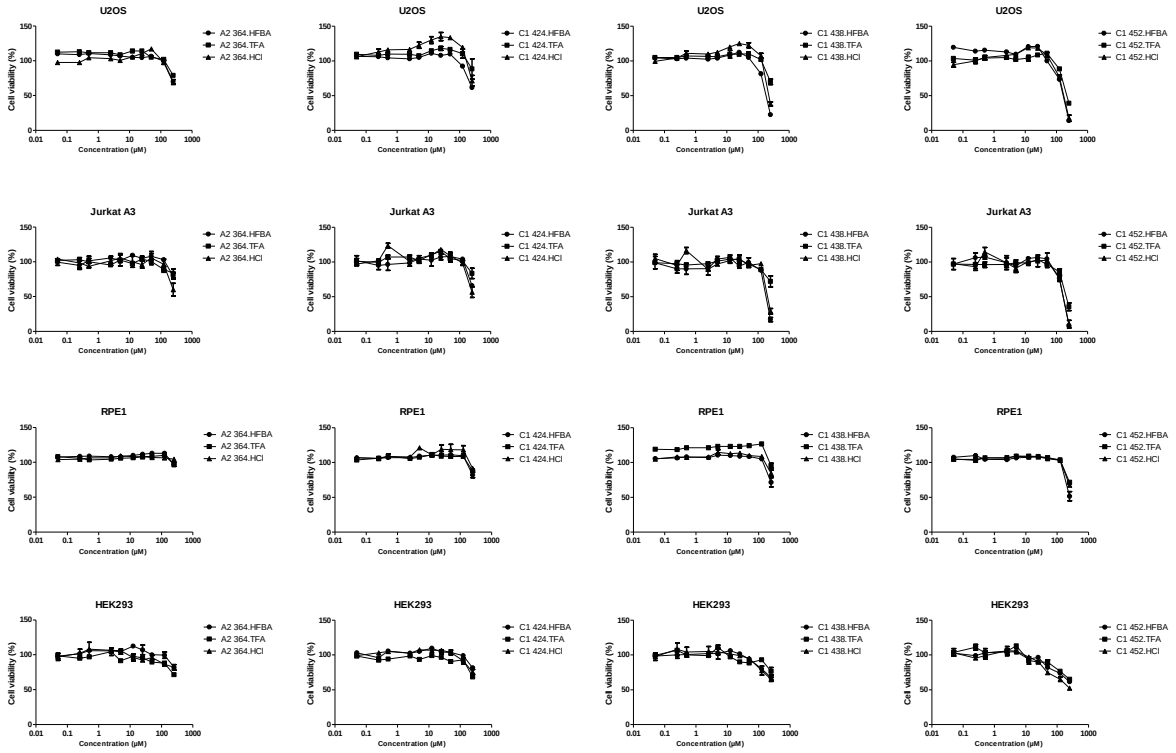
Figure 2. Thi-Ngoc-Dung Nguyen



Supplementary Figure S1. Thi-Ngoc-Dung Nguyen



Supplementary Figure S2a. Thi-Ngoc-Dung Nguyen



Supplementary Figure S2b. Thi-Ngoc-Dung Nguyen

Discussion sur l'article 2

Dans cette étude, nous avons caractérisé, aux niveaux chimique et biologique, quatre molécules purifiées à partir de 37,8 g d'éponges sèches recueillies dans l'Atlantique. Trois nouveaux alcaloïdes cycliques ont ainsi pu être purifiés et identifiés : la crambescine C1 424, la crambescine C1 438, et la crambescine C1 452. Une structure déjà décrite dans la littérature, la crambescine A2 364, a également été caractérisée. Bien que ces crambescines aient un léger effet antiprolifératif sur les cellules cancéreuses, ce sont leurs propriétés anti-inflammatoires qui semblent les plus prometteuses. En effet, les composés C1 438 et C1 452 inhiberaient la production de cytokines pro-inflammatoires via une inhibition de la voie NF-κB (*nuclear factor-kappa B*, contrôlant notamment la production de TNF-α, IL-1β, *et* IL-6) (Liu et al., 2017). Les résultats présentés dans ce travail fournissent ainsi une base pour des études futures sur le mécanisme d'action de ces structures, lié notamment à la modulation de l'inflammation rencontrée dans des pathologies lourdes telle que la polyarthrite rhumatoïde.

Par ailleurs, l'éponge marine *Crambe crambe* a été choisie comme modèle expérimental de mariculture durable en eaux peu profondes (environ 2,5 m de profondeur) en mer de Sardaigne (Méditerranée occidentale) afin de fournir une biomasse à fort potentiel en recherche appliquée (Padiglia et al., 2018). De nombreuses conditions de mariculture, par exemple la saison des semailles, la profondeur, la lumière ou encore la localisation, ont été évaluées. Il serait intéressant de vérifier et de quantifier la présence des crambescines que nous avons identifiés dans des extraits de ces éponges *Crambe crambe* produites en aquaculture en mer de Sardaigne. Ceci nous permettrait d'obtenir des indications sur l'influence, tout d'abord, de la localisation, mais aussi d'autres paramètres sur la production de ces composés par *Crambe crambe*. Ces futures études pourront contribuer à compléter le profil d'applications thérapeutiques de cette éponge en élargissant notamment au traitement de pathologies inflammatoires.

2. Etude du mécanisme de protection de la mort cellulaire neuronale par un panel de pigments d'origine marine

Contexte

Cette deuxième partie des résultats est centrée sur la modulation des voies de mort cellulaire induites par le glutamate et l'érastine, dans le modèle cellulaire neuronale HT-22. Pour moduler la mort, cette étude a nécessité l'utilisation d'une collection d'inhibiteurs commerciaux de mort cellulaire. Seront également présentés les résultats de la protection que peuvent apporter les pigments marins sur les cellules HT-22, dont la mort est induite par une forte dose de glutamate ou par l'érastine, deux molécules neurotoxiques. Au regard des propriétés antioxydantes des caroténoïdes marins dans les maladies associées au vieillissement, nous avons souhaité étudier l'intérêt de leur utilisation dans l'inhibition de la neurotoxicité, en utilisant le modèle de mort cellulaire HT-22/ glutamate. L'ensemble de ces travaux contribue à souligner l'intérêt d'étudier les molécules marines afin de mettre en évidence des molécules neuroprotectrices.

Introduction

a. Le modèle HT-22 pour l'étude de la neurotoxicité et de maladies neurodégénératives

HT-22 est une lignée de cellules neuronales immortalisées de l'hippocampe de souris. Ce modèle est particulièrement intéressant pour des études portant sur la neurotoxicité. En effet, les cellules HT-22 différenciées possèdent le récepteur N-méthyl-D-aspartate (NMDA) et l'antiporteur Cys/Glu, et sont donc sensibles au glutamate (He et al., 2013; Sagara and Schubert, 1998; Zhao et al., 2012). Le glutamate est un neurotransmetteur excitateur endogène important du système nerveux central mais qui se présente également, à fortes doses, comme un agent neurotoxique pouvant induire la mort neuronale dans certaines conditions (Hugon et al., 1996; Kritis et al., 2015). La connaissance des mécanismes de mort neuronale contribue à explorer le processus pathologique de maladies neurodégénératives telles que les lésions cérébrales et les troubles neurodégénératifs, rencontrés dans la MA, la MP et la MH (Chi et al., 2018).

La mort des cellules HT-22 induite par le glutamate est assez complexe. En effet, cette molécule peut déclencher diverses voies de mort cellulaire, notamment l'apoptose, la nécrose, la ferroptose, l'autophagie et également la cytotoxicité oxydative (Fukui et al., 2009; Kim et

al., 2009; Liu et al., 2015) (**Figure 30**). Afin de valider le modèle et d'estimer l'activation de ces voies de mort, nous avons testé les cellules HT-22 avec ou sans glutamate en présence ou en absence des modulateurs de mort cellulaire tels que le Z-VAD-FMK, les nécrostatines Nec-1 et Nec-1-s, la ferrostatine-1, la 3-méthyle adénine et l'acétylcystéine (**Tableau 9**).

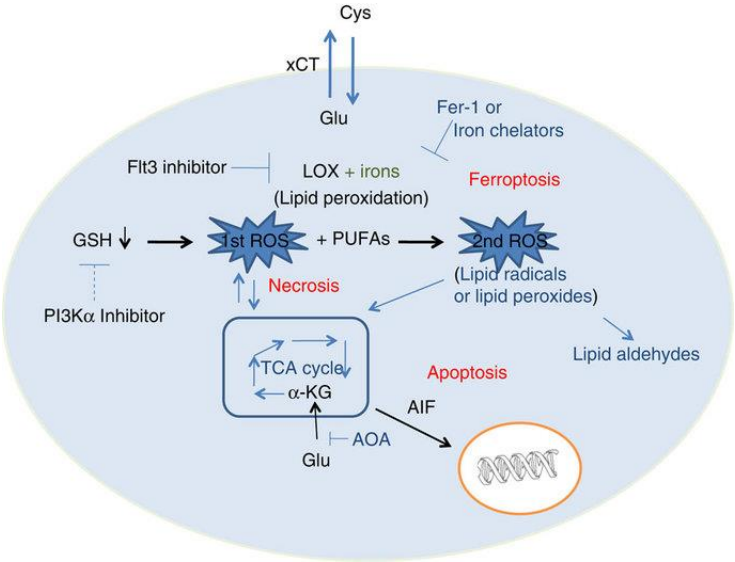


Figure 25 : Mécanismes de la mort des cellules HT-22, activés suite à un traitement par le glutamate. *Une concentration élevée (de l'ordre du mM) en glutamate bloque l'antiporteur* X_c^- *Cys(Cystine)/Glu, menant : [1] à une diminution de synthèse de glutathion (GSH, pseudo-tripeptide formé par la condensation d'acide glutamique, de cystéine et de glycine : γ-L-glutamyl-L-cystéinylglycine), suite à une diminution de cystéine intracellulaire et [2] à une hyperactivation mitochondriale via l'activité accrue du cycle de Krebs (ou tricarboxylic acid, TCA cycle). Cela conduit à une augmentation de dérivés réactifs de l'oxygène (ou reactive oxygen species, ROS) et induit la nécrose. La production de ROS peut faciliter la peroxydation des lipides (ou lipoperoxydation), catalysée par des lipoxygénases (LOX) et par le fer, menant à une seconde production de ROS et à la ferroptose. La deuxième vague de production de ROS endommage la mitochondrie. Il y a alors une translocation du facteur induisant l'apoptose AIF (Apoptosis Inducing Factor) de la mitochondrie endommagée vers le noyau et un déclenchement de l'apoptose. Certains modulateurs de mort cellulaire sont également présentés sur cette image : inhibiteurs de Flt3 ou de PI3Kα, aminooxyacetate (AOA), ferrostatine-1 (Fer-1) et chélateurs du fer.* Source : [Kang et *al. Nature Communications* **2014**] (Kang et al., 2014).

Tableau 9 : Inhibiteurs de la mort cellulaire.

N°	Modulateur	Abréviation	Cibles cellulaire	Inhibition	Références
1	Pan-caspase inhibiteur	Z-VAD-FMK	caspases	Apoptose	(Zhu et al., 1995)
2	Nécrostatine-1	Nec-1	RIPK1-IDO	Nécroptose RIPK1-dépendante et autres voies de mort caspases- & RIPK1- indépendante	(Degterev et al., 2005; Tamura et al., 2011; Vandenabeele et al., 2013; Xu et al., 2007)
3	Nécrostatine-1 stable	Nec-1-s	RIPK1	Nécroptose RIPK1-dépendante	(Teng et al., 2005)
4	Ferrostatine-1	Fer-1	GPX4	Ferroptose	(Dixon et al., 2012; Skouta et al., 2014)
5	3-Méthyladénine	3-MA	PI3K	Autophagie	(Seglen and Gordon, 1982)
6	N-acétylcystéine	NAC	ROS	Oxydation	(Zafarullah et al., 2003)
7	Tocophérol	TCP	ROS	Oxydation	(Evans et al., 1936)
8	Resvératrol	Res	LDL	Oxydation	(Frankel et al., 1993)

b. Les potentiels des pigments marins

Les caroténoïdes, et les pigments végétaux en général, sont des métabolites secondaires des lipides, qui jouent un rôle essentiel dans la photosynthèse des plantes (Lohr, 2009). Ce sont également des composés importants dans l'alimentation humaine. On leur porte beaucoup d'attention en raison de leurs propriétés antioxydantes et également en tant que colorants d'origine naturelle (principalement orange-rouge) (Vílchez et al., 2011). Ils sont présents en quantité abondante dans de nombreux fruits et légumes (comme l'orange, la tomate et la carotte, etc.). Les caroténoïdes jouent un rôle protecteur contre le cancer ainsi que vis à vis des maladies associées au vieillissement, notamment les maladies cardiovasculaires, la cataracte et la dégénérescence maculaire liée à l'âge (Kiokias et al., 2016; Rao and Rao, 2007). Dans les organismes, les caroténoïdes se transforment en rétinol, puis en acide rétinoïque ciblant certains organes pour réguler de nombreux processus biologiques tels que la différenciation et la prolifération cellulaire, la vision, la formation osseuse, le métabolisme et les processus immunologiques (Das et al., 2014). Les rétinoïdes sont largement utilisés pour traiter les maladies visuelles et dermatologiques. Leur rôle dans la prévention et le traitement du cancer a suscité beaucoup d'attention en raison de leurs effets antiprolifératif, pro-apoptotique et antioxydant (Bushue and Wan, 2010; Das et al., 2014). La **Figure 26** présente la structure générale d'un caroténoïde.

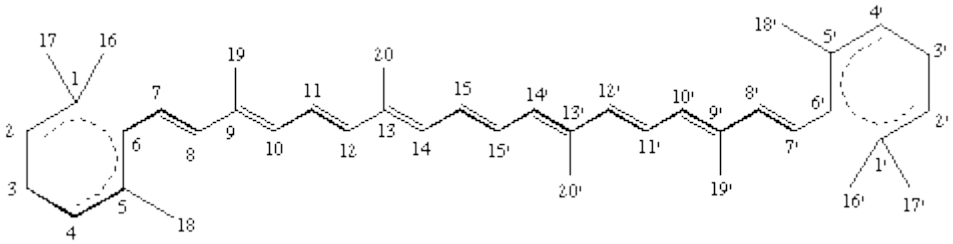


Figure 26 : Structure générale d'un caroténoïde : une chaîne centrale de doubles liaisons conjuguées avec ou sans groupements terminaux cycliques. Source : [carotenoid nomenclature *https://www.qmul.ac.uk/sbcs/iupac/carot/car1t7.html*].

Comme dans le cas des organismes terrestres, les caroténoïdes représentent le groupe de pigments le plus fréquent dans le monde marin. Ils sont généralement biosynthétisés par tous les organismes marins autotrophes, tels que les bactéries et les archées, les algues et les champignons. Certains organismes hétérotrophes contiennent également des caroténoïdes probablement acquis via leur régime alimentaire ou partiellement modifiés par des réactions métaboliques. Ces pigments naturels se divisent en deux classes chimiques : les carotènes (tels que le lycopène et les carotènes α et β), constitués d'hydrogène et de carbone, et les xanthophylles (tels que l'astaxanthine, la fucoxanthine et la lutéine), constitués d'hydrogène, de carbone et d'oxygène. Les caroténoïdes, en tant que composés antioxydants, jouent un rôle clé dans la protection des cellules. En raison de leurs avantages pour la santé humaine, les caroténoïdes sont couramment utilisés par l'industrie pharmaceutique, nutraceutique et cosmétique (Galasso et al., 2017; Gong and Bassi, 2016; Lohr, 2009; Serive and Bach, 2018; Vílchez et al., 2011).

Résultats

a. Effet neuroprotecteur de certains pigments marins, observé in vitro *chez les cellules HT-22*

A partir de la courbe montrant l'effet dose-dépendant du glutamate sur la viabilité des cellules HT-22 (**Figure 27**), nous avons déterminé la concentration efficace médiane (EC_{50}) du glutamate (0,8 mM). Nous avons observé que la concentration de 10 mM inhibe totalement la viabilité cellulaire. Cette forte dose a été utilisée par la suite pour les tests protecteurs.

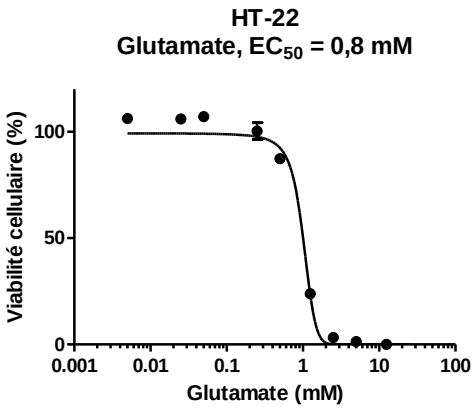


Figure 27 : Effet dose-dépendant du glutamate sur la viabilité cellulaire des cellules HT-22. *Les cellules HT-22 ont été cultivées 24 h en plaques 96 puits (5000 cellules/ puits) à 37°C et dans un air enrichi de 5% de CO_2. Elles ont ensuite été traitées avec des concentrations croissantes de glutamate (0,005-25 mM) pendant 24 h. La viabilité cellulaire a été déterminée par le test MTS (CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega Corporation, USA). Les données correspondent à la moyenne ± SD (n = 3) exprimée en % de cellules vivantes par rapport à des cellules contrôles (traitées avec l'équivalent en DMEM). L'EC_{50} est déterminée à partir de la courbe dose/réponse.*

Ensuite, nous avons utilisé des inhibiteurs de la mort cellulaire tels que le Z-VAD-FMK, la Nec-1, la Nec-1-s, la Fer-1, le 3-MA, la NAC pour étudier les voies de mort des cellules HT-22, induites par le glutamate. La cytotoxicité de chaque molécule ainsi que son effet protecteur ont été évalués (**Figure 28**).

Nous avons observé que les molécules testées n'ont pas d'influence sur la viabilité cellulaire de la lignée HT-22. Le 3-MA présente un léger effet négatif sur la viabilité cellulaire (**Figure 28A**). Cependant, certaines de ces molécules protègent les cellules HT-22 contre l'effet toxique du glutamate, avec une restauration significative de la viabilité cellulaire (**Figure 28B**). Ces observations permettent de souligner l'implication de multiples voies de mort dans le phénotype global observé, notamment la ferroptose, l'autophagie et le stress oxydatif. Il est intéressant de noter qu'en présence d'une forte dose de glutamate, le Z-VAD-FMK (inhibiteur de caspases et de l'apoptose) et la Nec-1-s (inhibiteur sélectif de RIPK et de la nécroptose) ne permettent pas de restaurer la viabilité cellulaire. La mort cellulaire induite par le glutamate ne résulte donc pas d'une apoptose ou d'une nécroptose. En outre, ceci souligne le fait que la Nec-1, de sélectivité réduite par rapport à Nec-1s, présente une/des cible(s) encore inconnue(s) mais impliquée(s) dans cette voie de mort cellulaire (**Tableau 9**).

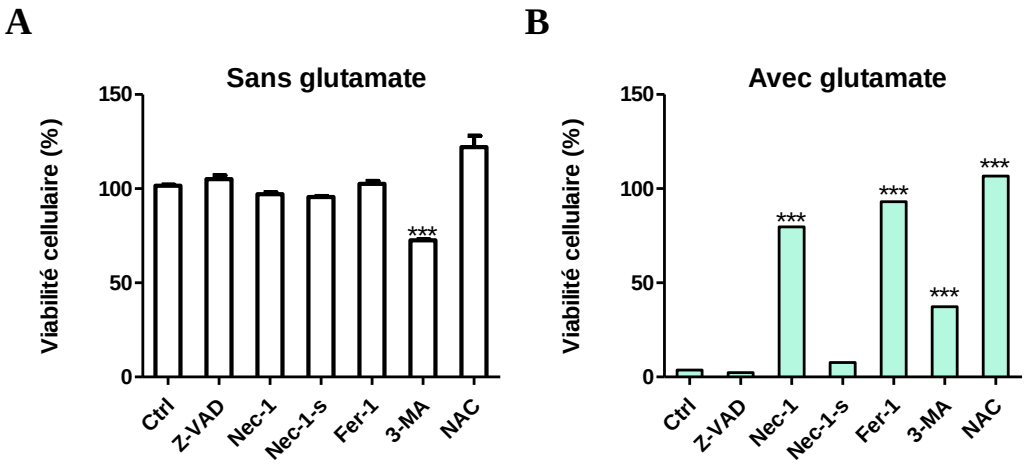


Figure 28 : Evaluation de l'effet de modulateurs de mort sur la viabilité de cellules HT-22 (A) et de leur effet protecteur contre la mort cellulaire induite par le glutamate (B). *Les cellules HT-22 ont été prétraitées avec des inhibiteurs pendant une heure, puis incubées sans (A) ou avec 10 mM de glutamate (B) pendant 24 h. La viabilité cellulaire a été déterminée par le test MTS. Les données représentent la moyenne ± SD (n = 3), *** P <0,001, exprimée en % de cellules vivantes par rapport à des cellules contrôles (Student's t-test).*

Après avoir validé le modèle HT-22/glutamate au laboratoire, nous avons remplacé les inhibiteurs chimiques par des pigments marins, afin d'observer leurs effets sur les cellules HT-22 traitées au glutamate. L'effet sur la viabilité cellulaire des pigments ainsi que l'effet protecteur de ces molécules ont été évalués (**Figure 29**). Nous avons observé que la plupart des pigments testés ne sont pas toxique sur ce type de cellules, sauf la fucoxanthine, le fucoxanthinol et la violaxanthine, en présence desquels on constate une diminution de la viabilité cellulaire (**Figure 29A**). D'autre part, en présence de glutamate, presque tous les pigments protègent significativement la viabilité des cellules HT-22. En évaluant le rapport entre l'efficacité de ces molécules et leur toxicité, nous avons choisi de poursuivre notre étude par d'autres tests réalisés avec les trois pigments suivants : la diadinoxanthine, la lutéine et la violaxanthine.

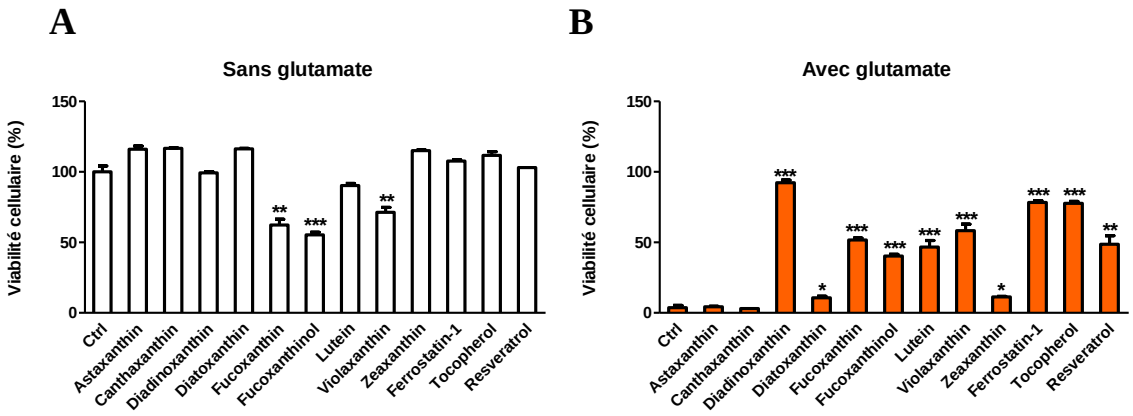
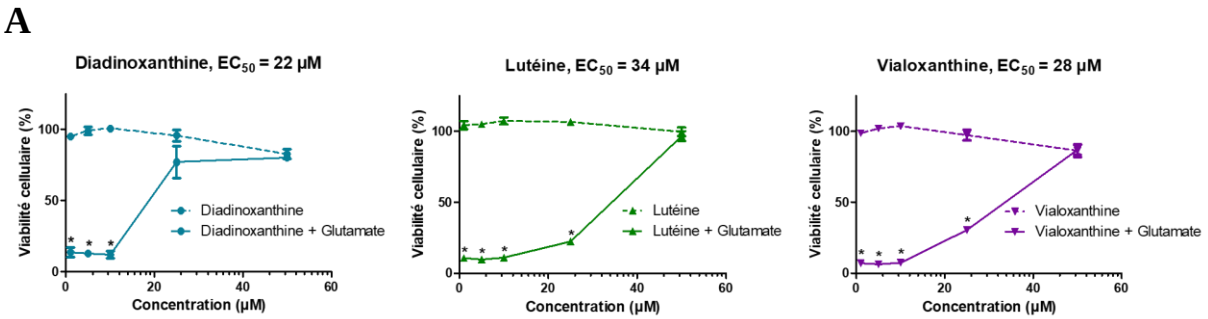


Figure 29 : Effet du traitement par des pigments marins sur la viabilité cellulaire (A) et sur la protection contre la mort cellulaire induite par le glutamate (B). *Les cellules HT-22 ont été prétraitées avec les pigments (50 µM) pendant une heure, puis incubées sans (**A**) ou avec 10 mM de glutamate (**B**) pendant 24 h. La viabilité cellulaire a été déterminée par le test MTS. Les données représentent la moyenne ± SD (n = 3), * P <0,05 ; ** P <0,01 ; *** P <0,001, exprimée en % de cellules vivantes par rapport à des cellules contrôles (Student's t-test).*

La protection apportée par ces trois pigments contre la mort cellulaire des cellules HT-22, induite par le glutamate, a été mise en évidence par microscopie en utilisant le système IncuCyte® S3. L'effet dose-réponse de chacun de ces pigments a également été évalué au cours de ces tests. Nous avons observé que ces pigments marins protègent les cellules de manière dose-dépendante (**Figure 30**). Le prétraitement des cellules avec les pigments peut restaurer 80 % de la viabilité cellulaire, et même presque 100 % dans le cas de la lutéine. La diadinoxanthine peut avoir un effet protecteur à une dose plus faible que celle nécessaire pour les deux autres pigments. Les EC_{50} (concentration efficace médiane) de ces pigments ont été déterminées à partir des courbes dose-réponse (**Figure 30A**). Elles sont respectivement de 22 µM ; 34 µM et 28 µM pour la diadinoxanthine, la lutéine et la violaxanthine. La morphologie cellulaire a été obtenue par microscopie à l'aide d'un IncuCyte® S3 (**Figure 30B**).



B

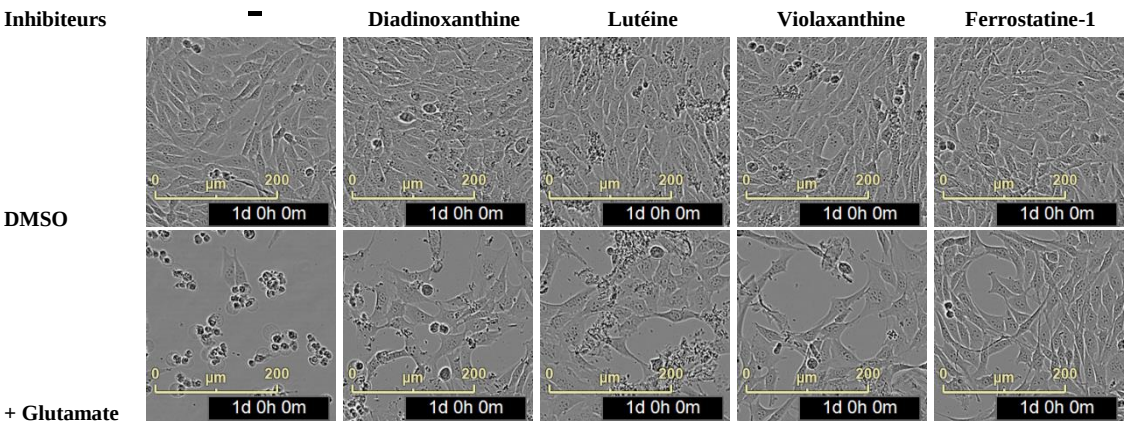


Figure 30 : Effet protecteur dose-dépendant des pigments marins sur la mort cellulaire des cellules HT-22 induite par le glutamate. *Les cellules ont été prétraitées avec des concentrations croissantes de pigments (1-50 µM) pendant une heure, puis incubées sans ou avec 10 mM de glutamate pendant 24 h. (**A**) La viabilité cellulaire a été déterminée par le test MTS. Les données représentent la moyenne ± SD (n = 3), * P <0,05 par rapport aux cellules non-traitées avec le glutamate (Student's t-test). Les concentrations efficaces médianes (EC_{50}) sont déterminées à partir des courbes. (**B**) La morphologie cellulaire, pour chaque condition, a été obtenue par microscopie (IncuCyte® S3 Live-Cell Analysis System, Sartorius, Ann Arbor, MI, USA). La ferrostatine-1 a été utilisée comme contrôle positif dans ce test.*

b. Effet neuroprotecteur de pigments marins sur le modèle HT-22-érastine

L'induction de la mort par de fortes doses de glutamate faisant intervenir le déclenchement de la mort ferroptotique (**Figure 30**), nous avons également évalué l'effet d'un traitement avec de l'érastine (de "*eradicator of RAS and small T (ST) antigen-expressing cells"*). L'érastine se lie et inhibe VDAC2 (*Voltage-dependent anion-selective channel protein 2*) et VDAC3 (modulateurs mitochondriaux) et inhibe fonctionnellement l'antiporteur de cystine-glutamate. L'érastine a été caractérisée comme induisant une mort cellulaire non apoptotique dépendante du fer, la ferroptose (Dixon et al., 2012; Dolma et al., 2003). Dans les deux modèles, le contrôle ferrostatine-1, inhibant la peroxydation lipidique, protège les cellules contre la mort. L'analyse de l'effet inhibiteur de pigments marins sur la ferroptose a été réalisée en comparant leur capacité à bloquer la mort des cellules HT-22 induite par le glutamate ou par l'érastine (**Figure 31** et **Figure 32**). Les trois pigments marins testés inhibent significativement ce type de mort neuronale, néanmoins, la restauration de la viabilité cellulaire est plus efficace sur la mort induite par le glutamate (**Figure 29B**) que sur celle induite par l'érastine (**Figure**

32B). Ces résultats suggèrent que grâce à leurs propriétés antioxydantes, les pigments marins protègent les cellules de l'hippocampe de souris contre plusieurs phénotypes de mort cellulaire dont la ferroptose est une voie importante.

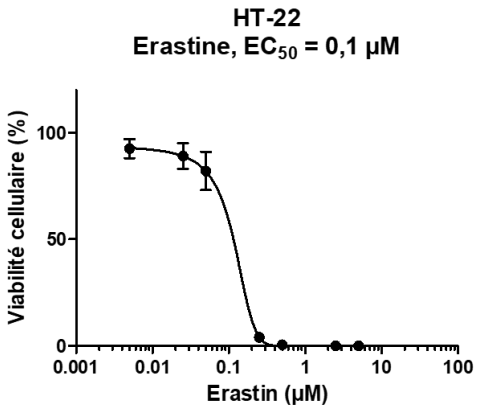


Figure 31 : Effet dose-dépendant de l'érastine sur la viabilité cellulaire des cellules HT-22. *Les cellules HT-22 ont été cultivées 24 h en plaques 96 puits (5000 cellules/ puits), puis elles ont été traitées avec des concentrations croissantes d'érastine (0,005-25 µM) pendant 24 h. La viabilité cellulaire a été déterminée par le test MTS. Les données représentent la moyenne ± SD (n = 3) exprimée en % de cellules vivantes par rapport à des cellules contrôles. L'EC$_{50}$ est déterminée à partir des courbes.*

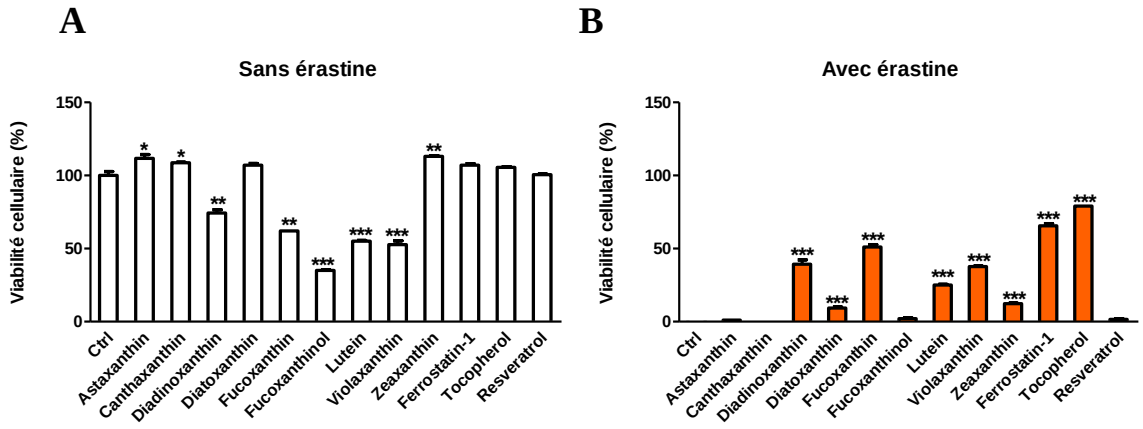


Figure 32 : Evaluation de la cytotoxicité des pigments marins (A) et leur effet protecteur contre la mort cellulaire de cellules HT-22 induite par l'érastine (B). *Les cellules ont été prétraitées avec les pigments (50 µM) pendant une heure, puis incubées sans (**A**) ou avec 1 µM d'érastine (**B**) pendant 24 h. La viabilité cellulaire a été déterminée par le test MTS. Les données représentent la moyenne ± SD (n = 3), * P <0,05 ; ** P <0,01 ; *** P <0,001, exprimée en % de cellules vivantes par rapport à des cellules contrôles (Student's t-*

test). Les puissants antioxydants, tocophérol (vitamine E) et resvératrol, sont utilisés comme contrôles.

c. Effet antiprolifératif de pigments marins sur les cellules cancéreuses

Par ailleurs, nous avons également évalué l'effet antiprolifératif de ces trois pigments marins sur plusieurs lignées de cellules cancéreuses humaines telles que AsPC-1 (cancer du pancréas), HepG-2 (cancer du foie), HT-29 (cancer du côlon), MCF-7 (cancer du sein), U-87 (neuroplastome) et Jurkat FADD (-/-) (leucémie). Nous avons observé que seule la lignée lymphocytaire Jurkat FADD (-/-) est sensible aux trois pigments marins testés (**Figure 33**). Il est à noter que les cellules Jurkat déficientes en FADD peuvent résister à l'apoptose extrinsèque, elles fournissent donc un modèle cellulaire adapté pour étudier l'effet anticancéreux de nouvelles molécules par d'autres voies de mort cellulaire. Il serait à présent très intéressant de tester si la lignée Jurkat sauvage (WT) est également sensible au traitement par les pigments. Cette expérience nous permettrait de voir si l'absence de la protéine FADD (*Fas-Associated protein with Death Domain*, également appelé MORT1) peut être associée à cette sensibilité. Nous avons également observé que la viabilité des cellules neuroblastomes U-87 est affectée par la diadinoxanthine (**Figure 33**). L'ensemble de ces observations peut mener à la réalisation d'études plus approfondies afin de caractériser le mécanisme d'induction de la mort cellulaire par ces pigments marins et notamment afin de pouvoir proposer des combinaisons thérapeutiques, qui ont déjà été étudiées sur les caroténoïdes terrestres (de Oliveira Júnior et al., 2019).

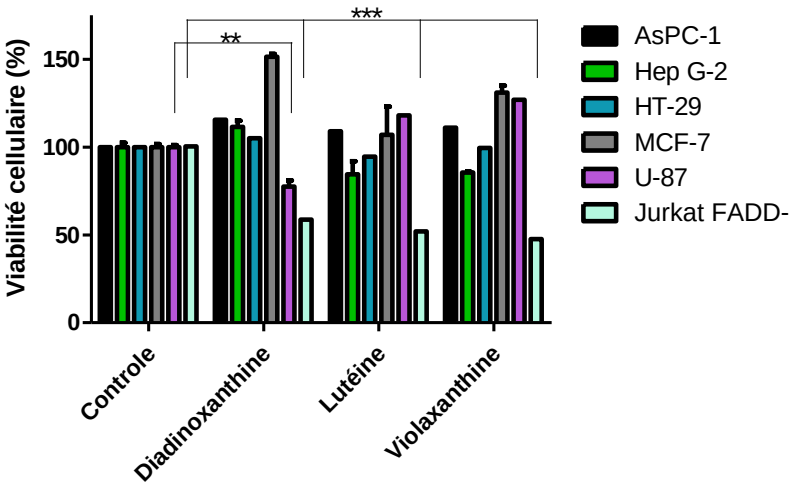


Figure 33 : Cytotoxicité de pigments marins sur diverses lignées de cellules cancéreuses. *Les cellules ont été traitées avec 50 µM de pigments pendant 24 h à 37 ° C. La*

*viabilité cellulaire a été déterminée en utilisant le test MTS. Les données représentent la moyenne ± SD (n = 3), ** P <0,01 ; *** P <0,001, exprimée en % de cellules vivantes par rapport à des cellules contrôles sans traitement (Student's t-test).*

Matériels et méthodes

a. Matériels

Les modulateurs chimiques de la mort cellulaire programmée (**Tableau 9**), le glutamate, l'érastine et les pigments marins utilisés dans cette étude, ont été achetés chez Sigma Aldrich (France). Toutes les solutions ont été préparées en DMSO, sauf la NAC et le glutamate qui ont été préparés respectivement dans de l'eau distillée et dans le milieu de culture.

b. Modèle et culture cellulaire

La lignée cellulaire de souris HT22 utilisée dans cette étude a été obtenue du Salk Institute (La Jolla, USA). Cette lignée est un sous-clone de la lignée HT-4 (Morimoto and Koshland, 1990). Les cellules HT-4 sont dérivées de tissus neuronaux de souris et immortalisées *in vitro* par introduction de l'oncogène viral tsA58, un variant de l'antigène T SV40-dérivé du polyomavirus SV40 qui est sensible à la température. Les lignées de cellules cancéreuses humaines AsPC-1, Hep G-2, HT-29, MCF-7, U-87 et Jurkat FADD- ont été obtenues auprès de l'ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA). Les cellules ont été cultivées dans les milieux de culture appropriés : en DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) pour les cellules Hep G-2, HT-29, MCF-7 et U-87 ; en RPMI 1640 pour les cellules AsPC-1 et Jurkat FADD. Chaque milieu a été supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (ou *Fetal Bovine Serum*, FBS) et 1% PS (Pénicilline-Streptomycine 5000 U/mL). Les milieux, la solution Trypsine-EDTA 0.25% et la solution PBS (Phosphate-Buffered Saline) ont été fournis par Thermo Fisher Scientific, USA. Les cellules ont été incubées à 37 °C sous une atmosphère à 5% de CO2 et passées deux fois par semaine pour une utilisation dans les deux mois.

c. Test de viabilité cellulaire

Les cellules (5 000 – 20 000 cellules/puits) ont été ensemencées en plaque 96 puits (#CC7682-7596, CytoOne®, USA) et incubées 24 h. Les cellules ont ensuite été exposées aux composés pendant 24 h. La viabilité cellulaire a été déterminée par le test MTS (CellTiter 96®

AQueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega Corporation, USA), conformément aux instructions du fournisseur. Cette méthode est basée sur la réduction du composé tetrazolium MTS (3- (4,5-diméthylthiazol-2-yl) -5- (3-carboxyméthoxyphényl) -2- (4-sulfophényl) -2H-tétrazolium, sel interne) par les cellules viables pour générer un produit coloré, le formazan. Après traitement avec les composés à tester, les cellules ont été incubées avec le MTS pendant 3 heures à 37 °C. L'absorbance a été mesurée avec un lecteur de microplaques BioTek EL800 (BioTek Instruments, Inc., USA) à 490 et 630 nm. Le pourcentage de viabilité a été calculé en comparant les valeurs obtenues avec les composés testés à celles du DMSO (utilisé comme contrôle).

d. Imagerie des cellules vivantes

Les cellules HT-22 (5 000 cellules/puits) ont été ensemencées en plaque 96 puits (#CC7682-7596, CytoOne®, USA) et incubées 24 h. Les cellules ont été exposées aux composés pendant 24 h. Pendant le traitement, la morphologie des cellules a été observée et les images ont été acquises à l'aide d'un microscope automatique du système d'analyse de cellules vivantes IncuCyte® S3 (Sartorius, Ann Arbor, MI, USA).

e. Analyses statistiques

Les données correspondent à la moyenne ± SD (n = 3) exprimée en % de cellules vivantes par rapport à des cellules contrôles (traitées avec l'équivalent en DMEM ou en DMSO) et analysées avec le test-*t* de Student. Toutes les analyses statistiques ont été effectuées avec le logiciel GraphPad Prism6 (Logiciel GraphPad, San Diego, USA).

Discussion sur la 3ème partie des résultats

Dans cette étude, nous avons montré l'activité neuroprotectrice *in vitro* de certains pigments marins, comme la diadinoxanthine, la lutéine et la violaxanthine, chez les cellules HT-22. L'inhibition de l'effet toxique du glutamate (à forte dose) par le 3-MA, le Fer-1 et la NAC, suggère que cette cytotoxicité passe par les voies de l'autophagie, de la ferroptose et du stress oxydatif. Ces trois pigments, non seulement, inhibent ces voies de mort induites par le glutamate mais aussi la ferroptose induite par l'érastine. Dans une récente étude, les dérivés flavonoïdes kaempféride et kaempférol, issus d'un extrait éthanolique de propolis verte brésilienne, ont donné un effet similaire (Takashima et al., 2019). Ces résultats suggèrent que grâce à leurs propriétés antioxydantes, les pigments marins protègent les cellules de

l'hippocampe de souris contre plusieurs types de mort cellulaire dont principalement la ferroptose. De façon intéressante, bien que l'astaxanthine soit déjà connue dans la littérature pour sa propriété antioxydante très active (Focsan et al., 2017; Young and Lowe, 2018), elle n'a montré aucun effet protecteur vis-à-vis de la mort des cellules HT-22 (**Figure 29** et **Figure 32**). Ceci peut s'expliquer par la transformation des caroténoïdes antioxydants en caroténoïdes pro-oxydants dans certaines conditions chimiques et physiques, telles qu'une haute concentration en composés bioactifs, en caroténoïdes ou en oxygène (El-Agamey et al., 2004; Song et al., 2003). Lors du traitement avec le glutamate ou avec l'érastine, la réaction entre un radical caroténoïde et l'oxygène moléculaire, qui se produit, peut former un radical caroténoïde-peroxyde. Ce radical agit comme un pro-oxydant favorisant les processus d'oxydation des lipides non saturés, un des mécanismes principaux de la mort neuronale des cellules HT-22. L'effet dose- et temps-dépendant des caroténoïdes devrait être évalué pour trouver une condition optimale pouvant être appliquée *in vitro* et *in vivo*. Les preuves de l'effet protecteur des caroténoïdes et la caractérisation de ce phénotype de mort seront à mettre en évidence dans le cadre de projets développés dans le but d'élaborer des traitements efficaces contre la neurodégénérescence pathologique (Cho et al., 2018).

Bien que nous n'ayons pas étudié plus en profondeur l'effet anticancéreux des pigments marins, il serait intéressant de poursuivre et de développer cette thématique (Cadoret JP, 2013; El-Baz et al., 2019; Pasquet et al., 2011; Picot, 2014). Il est possible d'envisager une sélection de pigments marins actifs, en s'appuyant sur les bases de données de leurs propriétés bioactives, afin d'effectuer un criblage cellulaire de leur activité anti-tumorale (seuls ou en combinaison avec d'autres agents anticancéreux). En utilisant une diversité de techniques telles que la microscopie, la vidéo-microscopie, la cytométrie en flux et l'immunofluorescence, nous pourrions caractériser la mort cellulaire induite par ces pigments actifs. Les molécules à effets potentiellement anti-tumoraux pourraient alors être proposées dans des traitements adjuvants contre le cancer. Il est à noter que le mécanisme d'action de la mort cellulaire dépend de plusieurs facteurs tels que les propriétés propres à la molécule, le type de cellules cancéreuses ciblé et les conditions expérimentales (ou l'état du patient en clinique). L'étude du mode d'action des pigments marins permettrait d'évaluer leurs avantages et leurs inconvénients dans un contexte thérapeutique.

Discussion générale, perspectives et conclusion

Une approche chémobiologique pour l'étude des voies de mort cellulaire programmée

Ces travaux de thèse ont été axés sur l'étude du contrôle de la mort cellulaire programmée en utilisant des molécules naturelles marines ou des produits de synthèse, appelés "modulateurs". Ces modulateurs ont été sélectionnés car ils peuvent : soit induire soit inhiber la mort cellulaire. La connaissance moléculaire approfondie de ces voies de mort peut contribuer à corriger les dysfonctionnements pathologiques de la PCD, observés dans de multiples pathologies, comme les cancers ou les maladies neurodégénératives. Dans le cadre de cette thèse, nous avons utilisé deux modèles cellulaires différents : (i) les cellules humaines d'ostéosarcome U-2 OS pour étudier les propriétés anticancéreuses du produit naturel marin P3 et (ii) les cellules HT-22 d'hippocampe de souris pour étudier les propriétés neuroprotectrices de certains pigments marins. Grâce à ces deux modèles, nous avons pu mettre en évidence des effets d'induction et d'inhibition de la PCD, médiées par les molécules testées. Ces études ouvrent des perspectives d'usage de nouvelles molécules marines en thérapie humaine et posent nouvelles questions fondamentales sur le contrôle moléculaire de ces voies. Il a également été observé *in vitro* que des molécules marines peuvent moduler la voie pro-inflammatoire NF-κB. Cette dernière propriété d'intérêt a un lien indéniable avec la PCD (Douanne et al., 2019) et ne peut être déconnectée de la modulation de la PCD. En effet, la voie NF-κB est notamment induite suite à la liaison de la cytokine TNF-α à son récepteur (TNFR), tout comme l'apoptose RIPK1-dépendante et également la nécroptose. La modulation de cet "aiguillage" moléculaire a été particulièrement étudiée pour son implication physio-pathologique majeure (Conrad et al., 2016; Sedger and McDermott, 2014). Les molécules marines ont une longue histoire de recherche en induction de la mort cellulaire, pour des applications en traitement anticancéreux (BERGMANN and BURKE, 1955; Newman and Cragg, 2016; Song et al., 2018). Nous souhaitons souligner, au travers de ce travail de thèse, que les molécules marines doivent également être observées comme de potentiels protecteurs de la mort cellulaire ou encore comme immuno-modulateurs.

Nouveaux inhibiteurs des protéines kinases

Dans la première partie des résultats, nous avons montré que plusieurs extraits d'organismes marins étaient actifs sur les protéines kinases. Ce taux très élevé de réponses positives, 13 extraits sur 30 (43%), est indicateur d'une très grande richesse en métabolites secondaires de type alcaloïde des organismes étudiés, majoritairement des éponges et des

ascidies. Ce taux de hits se monte à 46 % pour les éponges et explique la forte présence d'inhibiteurs de kinases provenant de ces organismes dans la littérature (Bharate et al., 2013; Skropeta et al., 2011). Ces résultats ouvrent de vastes possibilités de recherches sur ces organismes : *Crambe tailliezi, Hexadella* sp., *Ircinia oros, Pseudaxinyssa* sp., *Sarcotragus foetidus* et *Sarcotragus spinosulus* afin d'exploiter leurs métabolites secondaires, inhibiteurs des protéines kinases et potentiellement « druggables ».

Nous avons étudié l'un de ces organismes, l'éponge de Méditerranée *Crambe tailliezi*, et nous avons décrit la bioactivité d'un produit de haut poids moléculaire qui en est issu : la molécule naturelle marine P3. Nous avons montré que la molécule P3 est un nouvel inhibiteur des protéines kinases Aurora A et B. En absence de détermination de la structure de P3, il est difficile d'expliquer l'interaction entre cette molécule et la kinase. L'induction de la PCD par P3 met probablement en jeu d'autres cibles cellulaires (d'autres kinases) impliquées à l'interconnexion de voies de mort cellulaire telles que la catastrophe mitotique, l'apoptose caspase-indépendante, l'apoptose intrinsèque et le stress oxydatif. A la fin de cette thèse, nous avons effectué un criblage supplémentaire avec P3 sur un autre panel de protéines kinases. Comme on s'y attendait, nous avons observé l'inhibition par P3 d'autres cibles kinases (**Tableau supplémentaire).** P3 inhibe CDK-5/p25 et CLK-1 de façon plus efficace par rapport à Aurora B. L'inhibition des protéines kinases CLK a déjà été observée dans la littérature, pour son action sur la suppression de la croissance cellulaire et son induction de l'apoptose en modulant l'épissage des pré-ARNm (Araki et al., 2015; Iwai et al., 2018). Ces résultats suggèrent que l'induction de l'apoptose par P3 sur les cellules ostéosarcomes U-2 OS, pourrait être liée à l'inhibition de CLKs via l'épissage des pré-ARNm. Pour confirmer cette hypothèse, il faudrait effectuer des analyses complémentaires approfondies. Le rôle de CDK-5/p25, comme un pro- (Kuo, 2009; Lin et al., 2004) ou anti-apoptotique (Li et al., 2002; Zheng et al., 2016), dans ce type de mort cellulaire pourrait également être évalué.

Tableau supplémentaire. Inhibition de l'activité de protéines kinases par la molécule P3 isolée de l'éponge *Crambe tailliezi*. Les donnés sont exprimées en % d'activité résiduelle à 50 µg/ml.

Hs_CDK2/ CyclinA	Hs_CDK5/ p25	Hs_CDK9/ CyclinT	Hs_HASPIN	Hs_PIM1	Mm_CLK1	Rn_DYRK1A	Hs_CK1ε
82	8	39	77	20	9	30	20
Hs_GSK3α	Hs_GSK3β	Hs_Jak3	Hs_RIPK3	Hs_AuroraB	Hs_AuroraA	Hs_Nek7	Pf_GSK3
15	19	40	111	14	37	107	47

Ce travail nécessiterait d'être poursuivi par la détermination de la structure de P3 et de son mode de liaison aux kinases, par une étude élargie à d'autre cibles moléculaires susceptibles d'être impliquées et par la mise en œuvre d'autres méthodes d'analyse pour confirmer le mode d'induction de la PCD par P3. Nous espérons obtenir un profil complet de P3, aux niveaux chimique et biologique, afin de pouvoir poursuivre la caractérisation de son intérêt en thérapie humaine. De plus, l'effet antiprolifératif de P3 a été observé sur une variété de lignées de cellules malignes, notamment le cancer du sein, le cancer colorectal, le cancer du foie, le cancer des os, le cancer du pancréas, le glioblastome et la leucémie. Les projets futurs seront donc focalisés sur des cellules altérées au niveau des protéines kinases Aurora (Xie et al., 2017) afin d' étudier la possibilité d'améliorer le niveau d'activité antiprolifératif de P3. L'objectif étant de proposer à terme un traitement anticancéreux issu de cette molécule marine, dans un contexte de médecine personnalisée.

Protéines kinases Aurora en tant que cibles thérapeutiques anticancéreuses

Les résultats obtenus ci-dessus nous permettent d'envisager le développement de l'étude de la molécule P3 en dérivés potentiellement actifs sur la modulation de la mort cellulaire, via l'inhibition des protéines kinases Aurora et l'induction de la catastrophe mitotique. La famille Aurora se compose de protéines sérine/thréonine kinases qui sont impliquées dans toutes les étapes de la mitose telles que la séparation des chromosomes, la division cellulaire ainsi que l'établissement du fuseau mitotique (Kallio et al., 2002). Aurora A est localisée au centrosome tandis que Aurora B est liée aux chromosomes, concentrée aux centromères en première partie de mitose, et aux microtubules au niveau de la '*midzone*' et au '*midbody*' en deuxième partie de mitose (Joukov and Nicolo, 2018) (**Figure 34**). Elles sont essentielles à la progression mitotique. De nombreuses études ont montré que les kinases Aurora sont surexprimées dans divers cancers humains tels que le cancer du sein, des ovaires, du foie, du pancréas et du colon (Gritsko et al., 2003; Li et al., 2003; Lin et al., 2010; Siggelkow et al., 2012; Takeshita et al., 2013). Aurora B fait également partie d'un complexe qui comprend trois autres protéines (la Survivine, la Boréaline et INCENP). La survivine possède une double fonction, elle est essentielle à la mitose et c'est aussi une protéine anti-apoptotique qui est retrouvée surexprimée dans de nombreuses cellules cancéreuses leur donnant un avantage prolifératif (Altieri, 2003; Xu et al., 2004). Une forte expression de la Survivine est un facteur de mauvais pronostic (Sah et al., 2006). Ces fonctions sont à la base du développement des inhibiteurs de kinases Aurora B (Tang et al., 2017; Tischer and Gergely, 2019; Yeung et al., 2008).

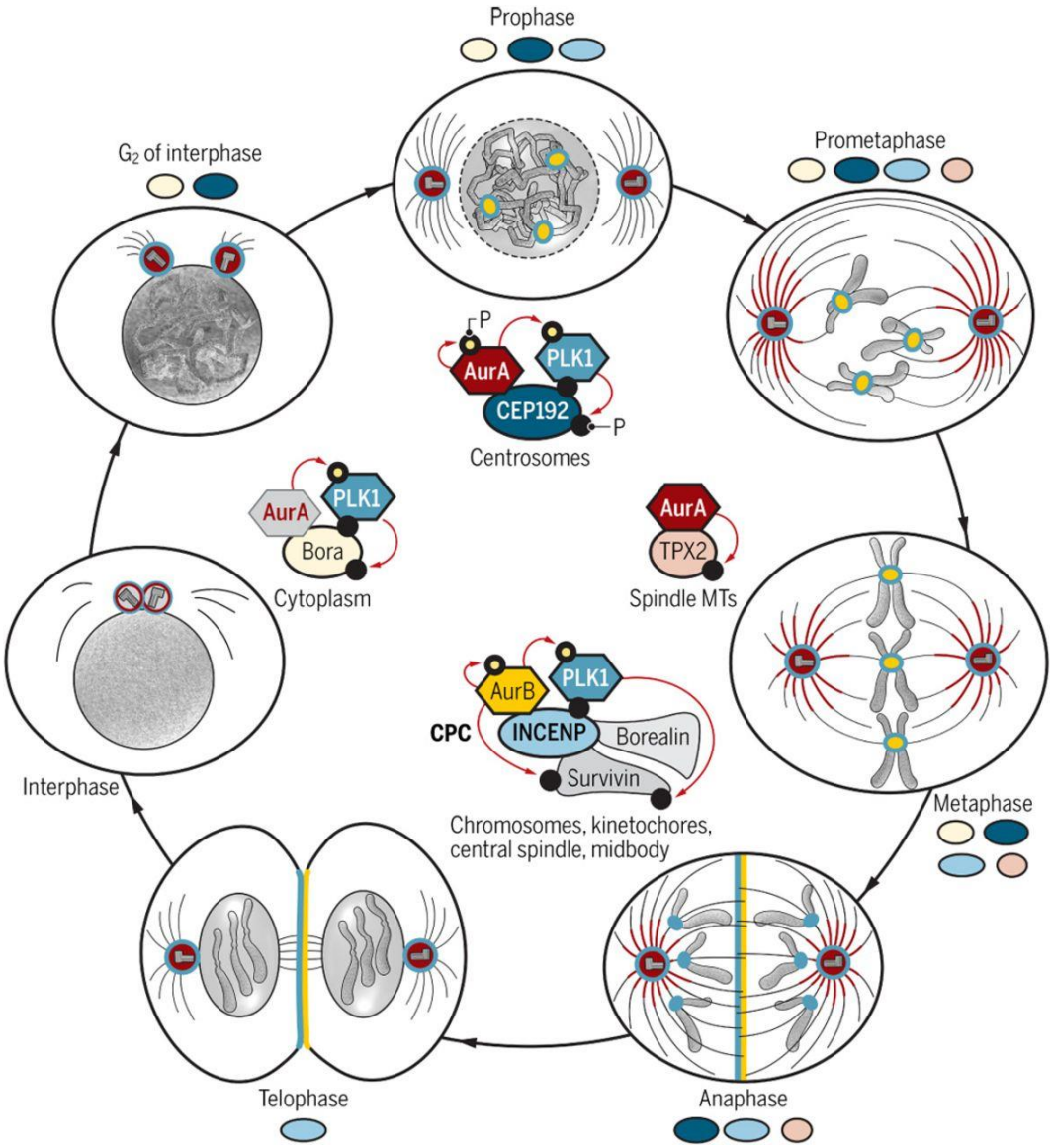


Figure 34 : Régulation de la mitose et de la cytokinèse par les quatre complexes moléculaires organisés par les cofacteurs d'Aurora. La localisation sub-cellulaire de chaque complexe et leur implication au cours de la progression mitotique, sont illustrées (Joukov and Nicolo, 2018).

En relation avec des stratégies thérapeutiques contre les cancers résistants

L'étude de la résistance des cellules cancéreuses vis à vis des médicaments sera également un point crucial à traiter dans les prochains projets de chimiothérapie. La recherche est effectuée dans deux directions : 1) rechercher et caractériser des nouvelles méthodes thérapeutiques anticancéreuses associées à l'induction de la PCD ; 2) combiner différentes méthodes afin de créer un effet synergique, par exemple utiliser des agents adjuvants afin de

sensibiliser les cellules cancéreuses, qui possèdent des défauts spécifiques. Les scientifiques ont montré que l'ajout de l'acide docosahexaénoïque (DHA), un des composants de l'huile de poisson qui peut être absorbé régulièrement par l'alimentation, améliore également l'efficacité de médicaments anticancéreux comme la vincristine, le paclitaxel ou le 5-FU (Bougnoux et al., 2009; Siddiqui et al., 2011). L'utilisation de la curcumine et de l'EGCG ont donné un effet synergique similaire (Saha et al., 2010). Récemment, il a été rapporté que l'extrait aqueux de fruits de mûrier améliore, de manière synergique, l'effet cytotoxique du paclitaxel et celui du rayonnement ionisant, en favorisant une catastrophe mitotique pour induire l'apoptose dans les cellules cancéreuses de la vessie TSGH 8301, HT1367 et HT1197. Une suppression de la croissance tumorale et une inhibition d'Aurora B dans les tissus tumoraux par ces co-traitements ont été démontrées (Chen et al., 2016; Su et al., 2019). Ces données offrent une nouvelle approche thérapeutique efficace, en créant une synergie dans l'efficacité anticancéreuse de traitements canoniques (chirurgie, radiothérapie, chimiothérapie) via la supplémentation avec des produits alimentaires naturels.

Nouveaux agents neuroprotecteurs venant de la mer

Dans la deuxième partie des résultats, en utilisant le modèle de mort HT-22-glutamate, nous avons souligné la complexité de l'induction de la PCD. Le glutamate, un neurotransmetteur important dans l'apprentissage et dans la mémorisation, peut induire lorsqu'il est utilisé à forte dose (mM), sur les cellules neuronales murines HT-22, plusieurs voies de PCD telles que : l'autophagie, la nécroptose, la ferroptose et le stress oxydatif. Ces voies de mort cellulaire ont été inhibées, de façon efficace, par un prétraitement avec des inhibiteurs de mort (Nec-1, 3-MA, Fer-1, NAC). Selon la littérature, le glutamate peut également induire l'apoptose dans les cellules HT-22 (Fukui et al., 2009). Cependant, dans le cadre de cette étude, nous n'avons pas pu observer cette voie de mort. Nous pensons que la forte dose de glutamate (10 mM) a peut-être induit d'autres voies de PCD alternatives de l'apoptose, pour répondre rapidement à l'excitotoxicité du glutamate. Dans les études à venir, en modifiant les conditions de traitement (dose, temps), il faudra tenter de caractériser plus finement cette voie en essayant par exemple de comprendre qu'elles sont les cibles, autres que RIPK1, impliquées dans l'inhibition de la mort cellulaire par la necrostatin-1. A partir de ces futurs résultats, nous espérons que seront développées de nouvelles séries de molécules ciblant de nouveaux acteurs, et que la puissance des molécules d'intérêt, pour le traitement de pathologies, sera ainsi renforcée.

Par ailleurs, nous avons étudié le rôle neuroprotecteur des pigments marins dans les maladies neurodégénératives. Nous avons ainsi protégé les cellules HT-22 contre la mort induite par le glutamate en utilisant les pigments marins, notamment la diadinoxanthine, la lutéine ou encore la zéaxanthine. Ces pigments sont présents dans des plantes terrestres (Sommerburg et al., 1998), sauf la diadinoxanthine (Kuczynska and Jemiola-Rzeminska, 2017), et également dans des espèces marines (Lin et al., 2015; Sajilata et al., 2008). Les effets pharmacologiques de la lutéine et de la zéaxanthine sur les maladies de la cognition ont été démontrés précédemment (Jia et al., 2017). Les résultats obtenus au cours de cette thèse peuvent renforcer ces observations et orienter les prochains projets vers l'exploitation du potentiel de ces caroténoïdes, en particulier d'origine marine, en thérapie humaine notamment en nutraceutiques. L'enjeu sera de définir de nouveaux aliments dit fonctionnels, appelés également en utilisant un néologisme, "alicaments" marins.

Ressources marines pour l'industrie pharmaceutique

Dans cette étude, nous avons cité plusieurs applications des molécules naturelles marines, dans l'industrie pharmaceutique, nutraceutique et cosmétique. Nous nous sommes concentrés sur l'utilisation thérapeutique de ces molécules en tant qu'agents anticancéreux et neuroprotecteurs. Ces molécules sont capables de moduler la PCD selon différents mécanismes. Cette grande variété de mécanismes d'action permet de surmonter les résistances des cellules cancéreuses aux traitements actuels. Cependant, l'utilisation des molécules marines, pour un traitement principal ou supplémentaire, est encore limitée à cause de leur toxicité indésirable ou d'un manque d'indications de leur mécanisme d'action. En parallèle de la recherche de nouveaux agents thérapeutiques d'origine marine, il s'avère nécessaire d'effectuer des modifications chimiques de ces molécules, afin d'améliorer leur efficacité mais également de diminuer leurs effets secondaires. Les produits marins, et leurs dérivés synthétiques, constituent donc une source importante d'actifs pour l'industrie pharmaceutique.

Cette étude nous a également menés vers une des plus grandes sources de substances bioactives de la mer : les éponges marines (Becerro, 2012). En effet, ce groupe est connu pour la production de métabolites secondaires très actifs : des alcaloïdes, des terpénoïdes ou encore des macrolides, issus de la symbiose spongiaire-microorganisme marin. Cette symbiose change selon les conditions environnementales (géographie, profondeur, température, pH) et engendre donc une diversité structurale et bioactive. Des techniques moléculaire et de microscopie ont permis de caractériser la communauté microbienne associée aux éponges (Dupont et al., 2013).

A partir de ces études, il est possible d'effectuer une modulation de communautés associées aux éponges (Padiglia et al., 2018), en présence d'un stress abiotique (par exemple une diminution du pH de l'eau) afin de produire des nouveaux composés bioactifs.

Complexité de la modulation de la mort cellulaire programmée mais cible probable de futurs médicaments

L'ensemble des résultats issus de ces travaux nous a montré la complexité des voies de mort cellulaire programmée qui est notamment induite par le dynamisme moléculaire engendrant la sélection d'une voie par rapport à une autre ou le déclenchement simultané de plusieurs mécanismes. Cette complexité rend ardue l'interprétation de la modulation chimique *in vitro* et *in vivo* de la mort cellulaire programmée. Lors du développement de thérapies impliquant des modulateurs de la mort cellulaire, cette complexité doit être évaluée, par des études pharmacologiques, biochimiques et génétiques. La connaissance exhaustive des mécanismes moléculaires, impliqués dans la modulation de la mort cellulaire programmée, est donc un enjeu important pour permettre de sélectionner des méthodes efficaces et spécifiques en thérapie humaine. Cette connaisance améliorera très probablement les thérapies humaines existantes et permettra d'en créer de nouvelles qui cibleront notamment l'inflammation et la mort cellulaire programmée, dans le cas des cancers résistants aux chimiothérapies ou encore des maladies neurodégénératives. Les nouvelles structures d'origines marines auront leur rôle à jouer dans cette future quête, si bien sûr nous réussissons collectivement à préserver nos ressources naturelles de la dégradation programmée de notre environnement.

Bibliographie

Abadines, I.B., Le, K., Newman, D.J., Glaser, K.B., and Mayer, A.M. (2019). The Marine Pharmacology and Pharmaceuticals Pipeline in 2018. The FASEB Journal *33*, 504.1-504.1.

Altieri, D.C. (2003). Survivin, versatile modulation of cell division and apoptosis in cancer. Oncogene *22*, 8581–8589.

Amaravadi, R.K., and Thompson, C.B. (2007). The roles of therapy-induced autophagy and necrosis in cancer treatment. Clin. Cancer Res. *13*, 7271–7279.

Angeli, J.P.F., Shah, R., Pratt, D.A., and Conrad, M. (2017). Ferroptosis Inhibition: Mechanisms and Opportunities. Trends Pharmacol. Sci. *38*, 489–498.

Anjum, K., Abbas, S.Q., Shah, S.A.A., Akhter, N., Batool, S., and Hassan, S.S.U. (2016). Marine Sponges as a Drug Treasure. Biomol Ther (Seoul) *24*, 347–362.

Araki, S., Dairiki, R., Nakayama, Y., Murai, A., Miyashita, R., Iwatani, M., Nomura, T., and Nakanishi, O. (2015). Inhibitors of CLK Protein Kinases Suppress Cell Growth and Induce Apoptosis by Modulating Pre-mRNA Splicing. PLoS One *10*.

Baehrecke, E.H. (2002). How death shapes life during development. Nat Rev Mol Cell Biol *3*, 779–787.

Baguley, B.C. (2010). Multiple Drug Resistance Mechanisms in Cancer. Mol Biotechnol *46*, 308–316.

Bar-Yosef, T., Damri, O., and Agam, G. (2019). Dual Role of Autophagy in Diseases of the Central Nervous System. Front. Cell. Neurosci. *13*.

Becerro, M.A. (2012). Advances in Sponge Science: Physiology, Chemical and Microbial Diversity, Biotechnology (Academic Press).

Beitz, J.M. (2014). Parkinson's disease: a review. Front Biosci (Schol Ed) *6*, 65–74.

Berghe, T.V., Vanlangenakker, N., Parthoens, E., Deckers, W., Devos, M., Festjens, N., Guerin, C.J., Brunk, U.T., Declercq, W., and Vandenabeele, P. (2010). Necroptosis, necrosis and secondary necrosis converge on similar cellular disintegration features. Cell Death and Differentiation *17*, 922–930.

Berghe, T.V., Linkermann, A., Jouan-Lanhouet, S., Walczak, H., and Vandenabeele, P. (2014). Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways. Nat Rev Mol Cell Biol *15*, 135–147.

Bergmann, Werner., and Burke, d.c. (1955). Contributions to the study of marine products. Xxxix. The nucleosides of sponges. III.1 Spongothymidine and spongouridine2. J. Org. Chem. *20*, 1501–1507.

Berlinck, R.G.S., Braekman, J.C., Daloze, D., Hallenga, K., Ottinger, R., Bruno, I., and Riccio, R. (1990). Two new guanidine alkaloids from the mediterranean sponge crambe crambe. Tetrahedron Letters *31*, 6531–6534.

Berlinck, R.G.S., Braekman, J.C., Daloze, D., Bruno, I., Riccio, R., Rogeau, D., and Amade, P. (1992). Crambines C1 and C2: Two Further Ichthyotoxic Guanidine Alkaloids from the Sponge Crambe crambe. J. Nat. Prod. *55*, 528–532.

Berlinck, R.G.S., Braekman, J.C., Daloze, D., Bruno, I., Riccio, R., Ferri, S., Spampinato, S., and Speroni, E. (1993). Polycyclic Guanidine Alkaloids from the Marine Sponge Crambe crambe and Ca^{++} Channel Blocker Activity of Crambescidin 816. Journal of Natural Products *56*, 1007–1015.

Berrué, F., McCulloch, M.W.B., Boland, P., Hart, S., Harper, M.K., Johnston, J., and Kerr, R. (2012). Isolation of Steroidal Glycosides from the Caribbean Sponge *Pandaros acanthifolium*. Journal of Natural Products *75*, 2094–2100.

Bharate, S.B., Sawant, S.D., Singh, P.P., and Vishwakarma, R.A. (2013). Kinase Inhibitors of Marine Origin. Chem. Rev. *113*, 6761–6815.

Bhullar, K.S., Lagarón, N.O., McGowan, E.M., Parmar, I., Jha, A., Hubbard, B.P., and Rupasinghe, H.P.V. (2018). Kinase-targeted cancer therapies: progress, challenges and future directions. Molecular Cancer *17*, 48.

Bilsland, J., Roy, S., Xanthoudakis, S., Nicholson, D.W., Han, Y., Grimm, E., Hefti, F., and Harper, S.J. (2002). Caspase Inhibitors Attenuate 1-Methyl-4-Phenylpyridinium Toxicity in Primary Cultures of Mesencephalic Dopaminergic Neurons. J. Neurosci. *22*, 2637–2649.

Bishop, E., and Bradshaw, T.D. (2018). Autophagy modulation: a prudent approach in cancer treatment? Cancer Chemother Pharmacol *82*, 913–922.

Blennow, K., de Leon, M.J., and Zetterberg, H. (2006). Alzheimer's disease. Lancet *368*, 387–403.

Blunt, J.W., Copp, B.R., Keyzers, R.A., Munro, M.H.G., and Prinsep, M.R. (2016). Marine natural products. Nat. Prod. Rep. *33*, 382–431.

Blunt, J.W., Copp, B.R., Keyzers, R.A., Munro, M.H.G., and Prinsep, M.R. (2017). Marine natural products. Nat. Prod. Rep. *34*, 235–294.

Blunt, J.W., Carroll, A.R., Copp, B.R., Davis, R.A., Keyzers, R.A., and Prinsep, M.R. (2018). Marine natural products. Nat. Prod. Rep. *35*, 8–53.

Boland, B., Kumar, A., Lee, S., Platt, F.M., Wegiel, J., Yu, W.H., and Nixon, R.A. (2008). Autophagy Induction and Autophagosome Clearance in Neurons: Relationship to Autophagic Pathology in Alzheimer's Disease. J Neurosci *28*, 6926–6937.

Bondu, S., Genta-Jouve, G., Leirós, M., Vale, C., Guigonis, J.-M., M. Botana, L., and P. Thomas, O. (2012). Additional bioactive guanidine alkaloids from the Mediterranean sponge Crambe crambe. RSC Advances *2*, 2828–2835.

Bougnoux, P., Hajjaji, N., Ferrasson, M.N., Giraudeau, B., Couet, C., and Le Floch, O. (2009). Improving outcome of chemotherapy of metastatic breast cancer by docosahexaenoic acid: a phase II trial. British Journal of Cancer *101*, 1978–1985.

Bravo-San Pedro José Manuel, Kroemer Guido, and Galluzzi Lorenzo (2017). Autophagy and Mitophagy in Cardiovascular Disease. Circulation Research *120*, 1812–1824.

Bredesen, D.E., Rao, R.V., and Mehlen, P. (2006). Cell death in the nervous system. Nature *443*, 796–802.

Brenner, D., and Mak, T.W. (2009). Mitochondrial cell death effectors. Current Opinion in Cell Biology *21*, 871–877.

Bushue, N., and Wan, Y.-J.Y. (2010). Retinoid pathway and cancer therapeutics. Advanced Drug Delivery Reviews *62*, 1285–1298.

Cabon, L., Martinez-Torres, A.-C., and Susin, S.A. (2013). La mort cellulaire programmée ne manque pas de vocabulaire. médecine/sciences *29*, 1117–1124.

Cadoret JP, P.L. (2013). Towards the Clinical Use of Phytoplankton Carotenoid Pigments to Cure Cancer. Oceanography: Open Access *01*.

Candi, E., Schmidt, R., and Melino, G. (2005). The cornified envelope: a model of cell death in the skin. Nature Reviews Molecular Cell Biology *6*, 328.

Cao, J.Y., and Dixon, S.J. (2016). Mechanisms of ferroptosis. Cell. Mol. Life Sci. *73*, 2195–2209.

Carles, F., Bourg, S., Meyer, C., and Bonnet, P. (2018). PKIDB: A Curated, Annotated and Updated Database of Protein Kinase Inhibitors in Clinical Trials. Molecules *23*, 908.

Carroll, W.M. (2019). The global burden of neurological disorders. The Lancet Neurology *18*, 418–419.

Castagna, M., Takai, Y., Kaibuchi, K., Sano, K., Kikkawa, U., and Nishizuka, Y. (1982). Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters. J. Biol. Chem. *257*, 7847–7851.

Castedo, M., Perfettini, J.-L., Roumier, T., and Kroemer, G. (2002). Cyclin-dependent kinase-1: linking apoptosis to cell cycle and mitotic catastrophe. Cell Death & Differentiation *9*, 1287–1293.

Castedo, M., Perfettini, J.-L., Roumier, T., Andreau, K., Medema, R., and Kroemer, G. (2004). Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. Oncogene *23*, 2825–2837.

Chen, L., Ye, H.-L., Zhang, G., Yao, W.-M., Chen, X.-Z., Zhang, F.-C., and Liang, G. (2014). Autophagy inhibition contributes to the synergistic interaction between EGCG and doxorubicin to kill the hepatoma Hep3B cells. PloS One *9*, e85771.

Chen, L., Hambright, W.S., Na, R., and Ran, Q. (2015). Ablation of the Ferroptosis Inhibitor Glutathione Peroxidase 4 in Neurons Results in Rapid Motor Neuron Degeneration and Paralysis. J Biol Chem *290*, 28097–28106.

Chen, N.-C., Chyau, C.-C., Lee, Y.-J., Tseng, H.-C., and Chou, F.-P. (2016). Promotion of mitotic catastrophe via activation of PTEN by paclitaxel with supplement of mulberry water extract in bladder cancer cells. Scientific Reports *6*, 20417.

Cheung, Z.H., and Ip, N.Y. (2011). Autophagy deregulation in neurodegenerative diseases – recent advances and future perspectives. Journal of Neurochemistry *118*, 317–325.

Chi, H., Chang, H.-Y., and Sang, T.-K. (2018). Neuronal Cell Death Mechanisms in Major Neurodegenerative Diseases. Int J Mol Sci *19*.

Cho, K.S., Shin, M., Kim, S., and Lee, S.B. (2018). Recent Advances in Studies on the Therapeutic Potential of Dietary Carotenoids in Neurodegenerative Diseases.

Choi, A.M.K., Ryter, S.W., and Levine, B. (2013). Autophagy in Human Health and Disease. New England Journal of Medicine *368*, 651–662.

Chun, Y., and Kim, J. (2018). Autophagy: An Essential Degradation Program for Cellular Homeostasis and Life. Cells *7*.

Clark, W.H. (1995). The Nature of Cancer: Morphogenesis and Progressive (Self)-Disorganization in Neoplastic Development and Progression. Acta Oncologica *34*, 3–21.

Clarke, P.G.H., and Clarke, S. (2012). Nineteenth century research on cell death. Experimental Oncology *34*, 139–145.

Cohen, P. (2002). Protein kinases—the major drug targets of the twenty-first century? Nature Reviews Drug Discovery *1*, 309–315.

Collett, M.S., and Erikson, R.L. (1978). Protein kinase activity associated with the avian sarcoma virus src gene product. Proc Natl Acad Sci U S A *75*, 2021–2024.

Cong, L., Dong, X., Wang, Y., Deng, Y., Li, B., and Dai, R. (2019). On the role of synthesized hydroxylated chalcones as dual functional amyloid-β aggregation and ferroptosis inhibitors for potential treatment of Alzheimer's disease. European Journal of Medicinal Chemistry *166*, 11–21.

Conrad, M., Angeli, J.P.F., Vandenabeele, P., and Stockwell, B.R. (2016). Regulated necrosis: disease relevance and therapeutic opportunities. Nat Rev Drug Discov *15*, 348–366.

Conradt, B. (2009). Genetic Control of Programmed Cell Death During Animal Development. Annual Review of Genetics *43*, 493–523.

Conservation, C. for M. (1993). Global Marine Biological Diversity: A Strategy For Building Conservation Into Decision Making (Island Press).

Cookson, B.T., and Brennan, M.A. (2001). Pro-inflammatory programmed cell death. Trends in Microbiology *9*, 113–114.

Cordani, M., Butera, G., Pacchiana, R., and Donadelli, M. (2017). Molecular interplay between mutant p53 proteins and autophagy in cancer cells. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer *1867*, 19–28.

Croce, K.R., and Yamamoto, A. (2019). A role for autophagy in Huntington's disease. Neurobiology of Disease *122*, 16–22.

Dai, J., Dan, W., Schneider, U., and Wang, J. (2018). β-Carboline alkaloid monomers and dimers: Occurrence, structural diversity, and biological activities. European Journal of Medicinal Chemistry *157*, 622–656.

Das, B.C., Thapa, P., Karki, R., Das, S., Mahapatra, S., Liu, T.-C., Torregroza, I., Wallace, D.P., Kambhampati, S., Van Veldhuizen, P., et al. (2014). Retinoic acid signaling pathways in development and diseases. Bioorganic & Medicinal Chemistry *22*, 673–683.

Dauer, W., and Przedborski, S. (2003). Parkinson's Disease: Mechanisms and Models. Neuron *39*, 889–909.

De, O., and Chatterji, B.P. (2017). Marine Derived Anticancer Drugs Targeting Microtubule. Recent Pat Anticancer Drug Discov *12*, 102–127.

Degterev, A., Huang, Z., Boyce, M., Li, Y., Jagtap, P., Mizushima, N., Cuny, G.D., Mitchison, T.J., Moskowitz, M.A., and Yuan, J. (2005). Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. Nature Chemical Biology *1*, 112.

Deigner, H.-P., Haberkorn, U., and Kinscherf, R. (2000). Apoptosis modulators in the therapy of neurodegenerative diseases. Expert Opinion on Investigational Drugs *9*, 747–764.

Delehouzé, C., Leverrier-Penna, S., Cann, F.L., Comte, A., Jacquard-Fevai, M., Delalande, O., Desban, N., Baratte, B., Gallais, I., Faurez, F., et al. (2017). 6E11, a highly selective inhibitor of Receptor-Interacting Protein Kinase 1, protects cells against cold hypoxia-reoxygenation injury. Scientific Reports *7*, 12931.

Dixon, S.J., Lemberg, K.M., Lamprecht, M.R., Skouta, R., Zaitsev, E.M., Gleason, C.E., Patel, D.N., Bauer, A.J., Cantley, A.M., Yang, W.S., et al. (2012). Ferroptosis: An Iron-Dependent Form of Nonapoptotic Cell Death. Cell *149*, 1060–1072.

Dolma, S., Lessnick, S.L., Hahn, W.C., and Stockwell, B.R. (2003). Identification of genotype-selective antitumor agents using synthetic lethal chemical screening in engineered human tumor cells. Cancer Cell *3*, 285–296.

Dominguez-Brauer, C., Thu, K.L., Mason, J.M., Blaser, H., Bray, M.R., and Mak, T.W. (2015). Targeting Mitosis in Cancer: Emerging Strategies. Molecular Cell *60*, 524–536.

Dong, T., Liao, D., Liu, X., and Lei, X. (2015). Using Small Molecules to Dissect Non-apoptotic Programmed Cell Death: Necroptosis, Ferroptosis, and Pyroptosis. Chembiochem *16*, 2557–2561.

Douanne, T., André-Grégoire, G., Trillet, K., Thys, A., Papin, A., Feyeux, M., Hulin, P., Chiron, D., Gavard, J., and Bidère, N. (2019). Pannexin-1 limits the production of proinflammatory cytokines during necroptosis. EMBO Reports *0*, e47840.

Dragunow, M., Faull, R.L.M., Lawlor, P., Beilharz, E.J., Singleton, K., Walker, E.B., and Mee, E. (1995). In situevidence for DNA fragmentation in Huntington's disease striatum and Alzheimer's disease temporal lobes. NeuroReport *6*, 1053.

Du, J., Wang, T., Li, Y., Zhou, Y., Wang, X., Yu, X., Ren, X., An, Y., Wu, Y., Sun, W., et al. (2019). DHA inhibits proliferation and induces ferroptosis of leukemia cells through autophagy dependent degradation of ferritin. Free Radical Biology and Medicine *131*, 356–369.

Dumontet, C., and Jordan, M.A. (2010). Microtubule-binding agents: a dynamic field of cancer therapeutics. Nature Reviews Drug Discovery *9*, 790–803.

Dupont, S., Corre, E., Li, Y., Vacelet, J., and Bourguet-Kondracki, M.-L. (2013). First insights into the microbiome of a carnivorous sponge. FEMS Microbiol. Ecol. *86*, 520–531.

Edinger, A.L., and Thompson, C.B. (2004). Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. Current Opinion in Cell Biology *16*, 663–669.

El-Agamey, A., Lowe, G.M., McGarvey, D.J., Mortensen, A., Phillip, D.M., Truscott, T.G., and Young, A.J. (2004). Carotenoid radical chemistry and antioxidant/pro-oxidant properties. Arch. Biochem. Biophys. *430*, 37–48.

El-Baz, F.K., Hussein, R.A., Saleh, D.O., and Abdel Jaleel, G.A.R. (2019). Zeaxanthin Isolated from Dunaliella salina Microalgae Ameliorates Age Associated Cardiac Dysfunction in Rats through Stimulation of Retinoid Receptors. Marine Drugs *17*, 290.

Ellis, H.M., and Horvitz, H.R. (1986). Genetic control of programmed cell death in the nematode C. elegans. Cell *44*, 817–829.

Elmore, S. (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. Toxicol Pathol *35*, 495–516.

Ercolano, G., De Cicco, P., and Ianaro, A. (2019). New Drugs from the Sea: Pro-Apoptotic Activity of Sponges and Algae Derived Compounds. Mar Drugs *17*.

Evans, H.M., Emerson, O.H., and Emerson, G.A. (1936). The isolation from wheat germ oil of an alcohol, α-tocopherol, having the properties of vitamin e. J. Biol. Chem. *113*, 319–332.

Feizbakhsh, O., Place, M., Fant, X., Buron, F., Routier, S., and Ruchaud, S. (2017). The Mitotic Protein Kinase Haspin and Its Inhibitors.

Focsan, A.L., Polyakov, N.E., and Kispert, L.D. (2017). Photo Protection of Haematococcus pluvialis Algae by Astaxanthin: Unique Properties of Astaxanthin Deduced by EPR, Optical and Electrochemical Studies. Antioxidants (Basel) *6*.

Forman, M.S., Trojanowski, J.Q., and Lee, V.M.-Y. (2004). Neurodegenerative diseases: a decade of discoveries paves the way for therapeutic breakthroughs. Nature Medicine *10*, 1055.

Frankel, E.N., Waterhouse, A.L., and Kinsella, J.E. (1993). Inhibition of human LDL oxidation by resveratrol. The Lancet *341*, 1103–1104.

Fricker, M., Tolkovsky, A.M., Borutaite, V., Coleman, M., and Brown, G.C. (2018). Neuronal Cell Death. Physiol. Rev. *98*, 813–880.

Fuchs, Y., and Steller, H. (2011). Programmed cell death in animal development and disease. Cell *147*, 742–758.

Fujikake, N., Shin, M., and Shimizu, S. (2018). Association Between Autophagy and Neurodegenerative Diseases. Front. Neurosci. *12*.

Fukui, M., Song, J.-H., Choi, J., Choi, H.J., and Zhu, B.T. (2009). Mechanism of glutamate-induced neurotoxicity in HT22 mouse hippocampal cells. European Journal of Pharmacology *617*, 1–11.

Fulda, S. (2017). Autophagy in Cancer Therapy. Front Oncol *7*.

Galasso, C., Corinaldesi, C., and Sansone, C. (2017). Carotenoids from Marine Organisms: Biological Functions and Industrial Applications. Antioxidants (Basel) *6*.

Galluzzi, L., Vitale, I., Vacchelli, E., and Kroemer, G. (2011). Cell Death Signaling and Anticancer Therapy. Front Oncol *1*.

Galluzzi, L., Vitale, I., Aaronson, S.A., Abrams, J.M., Adam, D., Agostinis, P., Alnemri, E.S., Altucci, L., Amelio, I., Andrews, D.W., et al. (2018). Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. Cell Death & Differentiation *25*, 486.

van der Geer, P., Hunter, T., and Lindberg, R.A. (1994). Receptor Protein-Tyrosine Kinases and Their Signal Transduction Pathways. Annual Review of Cell Biology *10*, 251–337.

Ghavami, S., Shojaei, S., Yeganeh, B., Ande, S.R., Jangamreddy, J.R., Mehrpour, M., Christoffersson, J., Chaabane, W., Moghadam, A.R., Kashani, H.H., et al. (2014). Autophagy and apoptosis dysfunction in neurodegenerative disorders. Progress in Neurobiology *112*, 24–49.

Giordano, D., Coppola, D., Russo, R., Denaro, R., Giuliano, L., Lauro, F.M., di Prisco, G., and Verde, C. (2015). Marine Microbial Secondary Metabolites: Pathways, Evolution and Physiological Roles. Adv. Microb. Physiol. *66*, 357–428.

Gong, M., and Bassi, A. (2016). Carotenoids from microalgae: A review of recent developments. Biotechnology Advances *34*, 1396–1412.

Gong, Y., Fan, Z., Luo, G., Yang, C., Huang, Q., Fan, K., Cheng, H., Jin, K., Ni, Q., Yu, X., et al. (2019). The role of necroptosis in cancer biology and therapy. Molecular Cancer *18*, 100.

Gorman, A.M. (2008). Neuronal cell death in neurodegenerative diseases: recurring themes around protein handling. J. Cell. Mol. Med. *12*, 2263–2280.

Greenberg, J.T. (1996). Programmed cell death: a way of life for plants. PNAS *93*, 12094–12097.

Grether, M.E., Abrams, J.M., Agapite, J., White, K., and Steller, H. (1995). The head involution defective gene of Drosophila melanogaster functions in programmed cell death. Genes Dev. *9*, 1694–1708.

Gritsko, T.M., Coppola, D., Paciga, J.E., Yang, L., Sun, M., Shelley, S.A., Fiorica, J.V., Nicosia, S.V., and Cheng, J.Q. (2003). Activation and Overexpression of Centrosome Kinase BTAK/Aurora-A in Human Ovarian Cancer. Clin Cancer Res *9*, 1420–1426.

Guzmán, E.A. (2019). Regulated Cell Death Signaling Pathways and Marine Natural Products That Target Them. Marine Drugs *17*, 76.

Guzmán, E.A., Pitts, T.P., Diaz, M.C., and Wright, A.E. (2019). The marine natural product Scalarin inhibits the receptor for advanced glycation end products (RAGE) and autophagy in the PANC-1 and MIA PaCa-2 pancreatic cancer cell lines. Invest New Drugs *37*, 262–270.

Han, B., Wang, Q., Cui, G., Shen, X., and Zhu, Z. (2011). Post-treatment of Bax-inhibiting peptide reduces neuronal death and behavioral deficits following global cerebral ischemia. Neurochemistry International *58*, 224–233.

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000). The Hallmarks of Cancer. Cell *100*, 57–70.

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. Cell *144*, 646–674.

Haque, S., Lan, X., Wen, H., Lederman, R., Chawla, A., Attia, M., Bongu, R.P., Husain, M., Mikulak, J., Saleem, M.A., et al. (2016). HIV Promotes NLRP3 Inflammasome Complex Activation in Murine HIV-Associated Nephropathy. The American Journal of Pathology *186*, 347–358.

Hassan, M., Watari, H., AbuAlmaaty, A., Ohba, Y., and Sakuragi, N. (2014). Apoptosis and Molecular Targeting Therapy in Cancer. BioMed Research International *2014*, 1–23.

He, M., Liu, J., Cheng, S., Xing, Y., and Suo, W.Z. (2013). Differentiation renders susceptibility to excitotoxicity in HT22 neurons. Neural Regen Res *8*, 1297–1306.

Hetz, C., Vitte, P.-A., Bombrun, A., Rostovtseva, T.K., Montessuit, S., Hiver, A., Schwarz, M.K., Church, D.J., Korsmeyer, S.J., Martinou, J.-C., et al. (2005). Bax Channel Inhibitors Prevent Mitochondrion-mediated Apoptosis and Protect Neurons in a Model of Global Brain Ischemia. J. Biol. Chem. *280*, 42960–42970.

Hidaka, H., Inagaki, M., Kawamoto, S., and Sasaki, Y. (1984). Isoquinolinesulfonamides, novel and potent inhibitors of cyclic nucleotide dependent protein kinase and protein kinase C. Biochemistry *23*, 5036–5041.

Hopkin, M.D., Baxendale, I.R., and Ley, S.V. (2010). A flow-based synthesis of Imatinib: the API of Gleevec. Chem. Commun. *46*, 2450–2452.

Hu, X., Han, W., and Li, L. (2007). Targeting the weak point of cancer by induction of necroptosis. Autophagy *3*, 490–492.

Hugon, J., Vallat, J.M., and Dumas, M. (1996). [Role of glutamate and excitotoxicity in neurologic diseases]. Rev. Neurol. (Paris) *152*, 239–248.

Hurley, J.H., and Young, L.N. (2017). Mechanisms of Autophagy Initiation. Annu. Rev. Biochem. *86*, 225–244.

Hussain, M., Fizazi, K., Saad, F., Rathenborg, P., Shore, N., Ferreira, U., Ivashchenko, P., Demirhan, E., Modelska, K., Phung, D., et al. (2018). Enzalutamide in Men with Nonmetastatic, Castration-Resistant Prostate Cancer. N. Engl. J. Med. *378*, 2465–2474.

Huszar, D., Theoclitou, M.-E., Skolnik, J., and Herbst, R. (2009). Kinesin motor proteins as targets for cancer therapy. Cancer Metastasis Rev *28*, 197–208.

Iannielli, A., Bido, S., Folladori, L., Segnali, A., Cancellieri, C., Maresca, A., Massimino, L., Rubio, A., Morabito, G., Caporali, L., et al. (2018). Pharmacological Inhibition of Necroptosis Protects from Dopaminergic Neuronal Cell Death in Parkinson's Disease Models. Cell Reports *22*, 2066–2079.

Imai, H., Matsuoka, M., Kumagai, T., Sakamoto, T., and Koumura, T. (2016). Lipid Peroxidation-Dependent Cell Death Regulated by GPx4 and Ferroptosis.

Iwai, K., Yaguchi, M., Nishimura, K., Yamamoto, Y., Tamura, T., Nakata, D., Dairiki, R., Kawakita, Y., Mizojiri, R., Ito, Y., et al. (2018). Anti-tumor efficacy of a novel CLK inhibitor via targeting RNA splicing and MYC-dependent vulnerability. EMBO Mol Med *10*.

Jares-Erijman, E.A., Sakai, R., and Rinehart, K.L. (1991). Crambescidins: new antiviral and cytotoxic compounds from the sponge Crambe crambe. The Journal of Organic Chemistry *56*, 5712–5715.

Jellinger, K.A. (2009). Recent advances in our understanding of neurodegeneration. J Neural Transm *116*, 1111–1162.

Jellinger, K.A. (2010). Basic mechanisms of neurodegeneration: a critical update. Journal of Cellular and Molecular Medicine *14*, 457–487.

Jia, Y.-P., Sun, L., Yu, H.-S., Liang, L.-P., Li, W., Ding, H., Song, X.-B., and Zhang, L.-J. (2017). The Pharmacological Effects of Lutein and Zeaxanthin on Visual Disorders and Cognition Diseases. Molecules *22*.

Jiang, X., Li, L., Ying, Z., Pan, C., Huang, S., Li, L., Dai, M., Yan, B., Li, M., Jiang, H., et al. (2016). A Small Molecule That Protects the Integrity of the Electron Transfer Chain Blocks the Mitochondrial Apoptotic Pathway. Molecular Cell *63*, 229–239.

Joukov, V., and Nicolo, A.D. (2018). Aurora-PLK1 cascades as key signaling modules in the regulation of mitosis. Sci. Signal. *11*, eaar4195.

Joza, N., Kroemer, G., and Penninger, J.M. (2002). Genetic analysis of the mammalian cell death machinery. Trends in Genetics *18*, 142–149.

Kallifatidis, G., Hoepfner, D., Jaeg, T., Guzmán, E.A., and Wright, A.E. (2013). The Marine Natural Product Manzamine A Targets Vacuolar ATPases and Inhibits Autophagy in Pancreatic Cancer Cells. Marine Drugs *11*, 3500–3516.

Kallio, M.J., McCleland, M.L., Stukenberg, P.T., and Gorbsky, G.J. (2002). Inhibition of aurora B kinase blocks chromosome segregation, overrides the spindle checkpoint, and perturbs microtubule dynamics in mitosis. Curr. Biol. *12*, 900–905.

Kang, Y., Tiziani, S., Park, G., Kaul, M., and Paternostro, G. (2014). Cellular protection using Flt3 and PI3Kα inhibitors demonstrates multiple mechanisms of oxidative glutamate toxicity. Nature Communications *5*.

Kantono, M., and Guo, B. (2017). Inflammasomes and Cancer: The Dynamic Role of the Inflammasome in Tumor Development. Front. Immunol. *8*.

Karabiyik, C., Lee, M.J., and Rubinsztein, D.C. (2017). Autophagy impairment in Parkinson's disease. Essays In Biochemistry *61*, 711–720.

Kearney, C.J., and Martin, S.J. (2017). An Inflammatory Perspective on Necroptosis. Molecular Cell *65*, 965–973.

Kenific, C.M., Thorburn, A., and Debnath, J. (2010). Autophagy and metastasis: another double-edged sword. Current Opinion in Cell Biology *22*, 241–245.

Kerr, J.F.R., Wyllie, A.H., and Currie, A.R. (1972). Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wide-ranging Implications in Tissue Kinetics. Br J Cancer *26*, 239–257.

Kim, E.S. (2017). Midostaurin: First Global Approval. Drugs *77*, 1251–1259.

Kim, H., Choi, J., Ryu, J., Park, S.G., Cho, S., Park, B.C., and Lee, D.H. (2009). Activation of autophagy during glutamate-induced HT22 cell death. Biochemical and Biophysical Research Communications *388*, 339–344.

Kiokias, S., Proestos, C., and Varzakas, T. (2016). A Review of the Structure, Biosynthesis, Absorption of Carotenoids-Analysis and Properties of their Common Natural Extracts. Current Research in Nutrition and Food Science Journal *4*, 25–37.

Knighton, D.R., Zheng, J.H., Eyck, L.T., Ashford, V.A., Xuong, N.H., Taylor, S.S., and Sowadski, J.M. (1991). Crystal structure of the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase. Science *253*, 407–414.

Koo, G.-B., Morgan, M.J., Lee, D.-G., Kim, W.-J., Yoon, J.-H., Koo, J.S., Kim, S.I., Kim, S.J., Son, M.K., Hong, S.S., et al. (2015). Methylation-dependent loss of RIP3 expression in cancer represses programmed necrosis in response to chemotherapeutics. Cell Research *25*, 707–725.

Kritis, A.A., Stamoula, E.G., Paniskaki, K.A., and Vavilis, T.D. (2015). Researching glutamate - induced cytotoxicity in different cell lines: a comparative/collective analysis/study. Front Cell Neurosci *9*, 91.

Kroemer, G., and Levine, B. (2008). Autophagic cell death: the story of a misnomer. Nature Reviews Molecular Cell Biology *9*, 1004–1010.

Kroemer, G., El-Deiry, W.S., Golstein, P., Peter, M.E., Vaux, D., Vandenabeele, P., Zhivotovsky, B., Blagosklonny, M.V., Malorni, W., Knight, R.A., et al. (2005). Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. Cell Death Differ. *12 Suppl 2*, 1463–1467.

Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E., Baehrecke, E., Blagosklonny, M., El-Deiry, W., Golstein, P., Green, D., et al. (2009). Classification of cell death. Cell Death Differ *16*, 3–11.

Kuczynska, P., and Jemiola-Rzeminska, M. (2017). Isolation and purification of all-trans diadinoxanthin and all-trans diatoxanthin from diatom Phaeodactylum tricornutum. J Appl Phycol *29*, 79–87.

Kuo, H.-S. (2009). The Role of Cdk5 in Retinoic Acid-Induced Apoptosis of Cervical Cancer Cell Line. The Chinese Journal of Physiology *52*, 23–30.

Labi, V., and Erlacher, M. (2015). How cell death shapes cancer. Cell Death Dis *6*, e1675.

Laille, M., Gerald, F., and Debitus, C. (1998). In vitro antiviral activity on dengue virus of marine natural products. Cell. Mol. Life Sci. *54*, 167–170.

Le Cann, F., Delehouzé, C., Leverrier-Penna, S., Filliol, A., Comte, A., Delalande, O., Desban, N., Baratte, B., Gallais, I., Piquet-Pellorce, C., et al. (2017). Sibiriline, a new small chemical inhibitor of receptor-interacting protein kinase 1, prevents immune-dependent hepatitis. The FEBS Journal *284*, 3050–3068.

Lei, P., Bai, T., and Sun, Y. (2019). Mechanisms of Ferroptosis and Relations With Regulated Cell Death: A Review. Front. Physiol. *10*.

Letai, A. (2017). Apoptosis and Cancer. Annual Review of Cancer Biology *1*, 275–294.

Levine, B., and Klionsky, D.J. (2004). Development by Self-Digestion: Molecular Mechanisms and Biological Functions of Autophagy. Developmental Cell *6*, 463–477.

Levine, B., and Kroemer, G. (2008). Autophagy in the Pathogenesis of Disease. Cell *132*, 27–42.

Lewerenz, J., Hewett, S.J., Huang, Y., Lambros, M., Gout, P.W., Kalivas, P.W., Massie, A., Smolders, I., Methner, A., Pergande, M., et al. (2013). The Cystine/Glutamate Antiporter System xc− in Health and Disease: From Molecular Mechanisms to Novel Therapeutic Opportunities. Antioxid Redox Signal *18*, 522–555.

Lewerenz, J., Ates, G., Methner, A., Conrad, M., and Maher, P. (2018). Oxytosis/Ferroptosis—(Re-) Emerging Roles for Oxidative Stress-Dependent Non-apoptotic Cell Death in Diseases of the Central Nervous System. Front Neurosci *12*.

Lewis, K. (2000). Programmed death in bacteria. Microbiol. Mol. Biol. Rev. *64*, 503–514.

Li, B.-S., Zhang, L., Takahashi, S., Ma, W., Jaffe, H., Kulkarni, A.B., and Pant, H.C. (2002). Cyclin-dependent kinase 5 prevents neuronal apoptosis by negative regulation of c-Jun N-terminal kinase 3. EMBO J *21*, 324–333.

Li, D., Zhu, J., Firozi, P.F., Abbruzzese, J.L., Evans, D.B., Cleary, K., Friess, H., and Sen, S. (2003). Overexpression of Oncogenic STK15/BTAK/Aurora A Kinase in Human Pancreatic Cancer. Clin Cancer Res *9*, 991–997.

Li, Q., Liu, Y., and Sun, M. (2017). Autophagy and Alzheimer's Disease. Cell Mol Neurobiol *37*, 377–388.

Liao, J., Zhou, B., Zhuang, X., Zhuang, P., Zhang, D., and Chen, W. (2018). Cancer-associated fibroblasts confer cisplatin resistance of tongue cancer via autophagy activation. Biomedicine & Pharmacotherapy *97*, 1341–1348.

Lin, L., and Baehrecke, E.H. (2015). Autophagy, cell death, and cancer. Mol Cell Oncol *2*.

Lin, H., Juang, J.-L., and Wang, P.S. (2004). Involvement of Cdk5/p25 in Digoxin-triggered Prostate Cancer Cell Apoptosis. J. Biol. Chem. *279*, 29302–29307.

Lin, J.-H., Lee, D.-J., and Chang, J.-S. (2015). Lutein production from biomass: marigold flowers versus microalgae. Bioresour. Technol. *184*, 421–428.

Lin, Z.-Z., Jeng, Y.-M., Hu, F.-C., Pan, H.-W., Tsao, H.-W., Lai, P.-L., Lee, P.-H., Cheng, A.-L., and Hsu, H.-C. (2010). Significance of Aurora B overexpression in hepatocellular carcinoma. Aurora B Overexpression in HCC. BMC Cancer *10*, 461.

Linkermann, A., and Green, D.R. (2014). Necroptosis. N Engl J Med *370*, 455–465.

Liu, X. (2015). Targeting Polo-Like Kinases: A Promising Therapeutic Approach for Cancer Treatment. Transl Oncol *8*, 185–195.

Liu, T., Zhang, L., Joo, D., and Sun, S.-C. (2017). NF-κB signaling in inflammation. Signal Transduct Target Ther *2*, 17023.

Liu, Y., Wang, W., Li, Y., Xiao, Y., Cheng, J., and Jia, J. (2015). The 5-lipoxygenase inhibitor zileuton confers neuroprotection against glutamate oxidative damage by inhibiting ferroptosis. Biological and Pharmaceutical Bulletin *38*, 1234–1239.

Liu, Z., Xu, P., Wu, T., and Zeng, W. (2014). Microtubule-targeting anticancer agents from marine natural substance. Anticancer Agents Med Chem *14*, 409–417.

Lockshin, R.A. (1969). Programmed cell death. Activation of lysis by a mechanism involving the synthesis of protein. Journal of Insect Physiology *15*, 1505–1516.

Lockshin, R.A., and Williams, C.M. (1964). Programmed cell death—II. Endocrine potentiation of the breakdown of the intersegmental muscles of silkmoths. Journal of Insect Physiology *10*, 643–649.

Lohr, M. (2009). Chapter 21 - Carotenoids. In The Chlamydomonas Sourcebook (Second Edition), E.H. Harris, D.B. Stern, and G.B. Witman, eds. (London: Academic Press), pp. 799–817.

Lowe, S.W., and Lin, A.W. (2000). Apoptosis in cancer. Carcinogenesis *21*, 485–495.

Lynch-Day, M.A., Mao, K., Wang, K., Zhao, M., and Klionsky, D.J. (2012). The Role of Autophagy in Parkinson’s Disease. Cold Spring Harb Perspect Med *2*.

Ma, S., Wang, Y., Chen, Y., and Cao, F. (2015). The role of the autophagy in myocardial ischemia/reperfusion injury. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease *1852*, 271–276.

Magtanong, L., and Dixon, S.J. (2019). Ferroptosis and Brain Injury. DNE 1–14.

Mandal, P., Berger, S.B., Pillay, S., Moriwaki, K., Huang, C., Guo, H., Lich, J.D., Finger, J., Kasparcova, V., Votta, B., et al. (2014). RIP3 Induces Apoptosis Independent of Pronecrotic Kinase Activity. Molecular Cell *56*, 481–495.

Manning, G., Whyte, D.B., Martinez, R., Hunter, T., and Sudarsanam, S. (2002). The Protein Kinase Complement of the Human Genome. Science *298*, 1912–1934.

Morimoto, B.H., and Koshland, D.E. (1990). Induction and expression of long- and short-term neurosecretory potentiation in a neural cell line. Neuron *5*, 875–880.

Marinković, M., Šprung, M., Buljubašić, M., and Novak, I. (2018). Autophagy Modulation in Cancer: Current Knowledge on Action and Therapy.

Martin, D.D.O., Ladha, S., Ehrnhoefer, D.E., and Hayden, M.R. (2015). Autophagy in Huntington disease and huntingtin in autophagy. Trends in Neurosciences *38*, 26–35.

Masaldan, S., Bush, A.I., Devos, D., Rolland, A.S., and Moreau, C. (2019). Striking while the iron is hot: Iron metabolism and ferroptosis in neurodegeneration. Free Radical Biology and Medicine *133*, 221–233.

Mawatwal, S., Behura, A., Ghosh, A., Kidwai, S., Mishra, A., Deep, A., Agarwal, S., Saha, S., Singh, R., and Dhiman, R. (2017). Calcimycin mediates mycobacterial killing by inducing intracellular calcium-regulated autophagy in a P2RX7 dependent manner. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects *1861*, 3190–3200.

Mayer, A.M., Nguyen, M., Kalwajtys, P., Kerns, H., Newman, D.J., and Glaser, K.B. (2017a). The Marine Pharmacology and Pharmaceuticals Pipeline in 2016. The FASEB Journal *31*, 818.1-818.1.

Mayer, A.M.S., Glaser, K.B., Cuevas, C., Jacobs, R.S., Kem, W., Little, R.D., McIntosh, J.M., Newman, D.J., Potts, B.C., and Shuster, D.E. (2010). The odyssey of marine pharmaceuticals: a current pipeline perspective. Trends in Pharmacological Sciences *31*, 255–265.

Mayer, A.M.S., Rodríguez, A.D., Taglialatela-Scafati, O., and Fusetani, N. (2017b). Marine Pharmacology in 2012–2013: Marine Compounds with Antibacterial, Antidiabetic, Antifungal, Anti-Inflammatory, Antiprotozoal, Antituberculosis, and Antiviral Activities; Affecting the Immune and Nervous Systems, and Other Miscellaneous Mechanisms of Action. Marine Drugs *15*, 273.

Mc Gee, M.M. (2015). Targeting the Mitotic Catastrophe Signaling Pathway in Cancer. Mediators Inflamm *2015*.

McColgan, P., and Tabrizi, S.J. (2018). Huntington's disease: a clinical review. Eur. J. Neurol. *25*, 24–34.

Meng, M.-B., Wang, H.-H., Cui, Y.-L., Wu, Z.-Q., Shi, Y.-Y., Zaorsky, N.G., Deng, L., Yuan, Z.-Y., Lu, Y., and Wang, P. (2016). Necroptosis in tumorigenesis, activation of anti-tumor immunity, and cancer therapy. Oncotarget *7*, 57391–57413.

Miller, J.H., Field, J.J., Kanakkanthara, A., Owen, J.G., Singh, A.J., and Northcote, P.T. (2018). Marine Invertebrate Natural Products that Target Microtubules. J. Nat. Prod. *81*, 691–702.

Mizushima, N. (2007). Autophagy: process and function. Genes Dev. *21*, 2861–2873.

Modi, V., and Dunbrack, R.L. (2019). Defining a new nomenclature for the structures of active and inactive kinases. PNAS *116*, 6818–6827.

Mohammad, R.M., Muqbil, I., Lowe, L., Yedjou, C., Hsu, H.-Y., Lin, L.-T., Siegelin, M.D., Fimognari, C., Kumar, N.B., Dou, Q.P., et al. (2015). Broad targeting of resistance to apoptosis in cancer. Seminars in Cancer Biology *35*, S78–S103.

Moloudizargari, M., Asghari, M.H., Ghobadi, E., Fallah, M., Rasouli, S., and Abdollahi, M. (2017). Autophagy, its mechanisms and regulation: Implications in neurodegenerative diseases. Ageing Research Reviews *40*, 64–74.

Motoyama, N., Wang, F., Roth, K.A., Sawa, H., Nakayama, K., Nakayama, K., Negishi, I., Senju, S., Zhang, Q., Fujii, S., et al. (1995). Massive cell death of immature hematopoietic cells and neurons in Bcl-x-deficient mice. Science *267*, 1506–1510.

Mou, Y., Wang, J., Wu, J., He, D., Zhang, C., Duan, C., and Li, B. (2019). Ferroptosis, a new form of cell death: opportunities and challenges in cancer. Journal of Hematology & Oncology *12*, 34.

Mulcahy Levy, J.M., Towers, C.G., and Thorburn, A. (2017). Targeting Autophagy in Cancer. Nat Rev Cancer *17*, 528–542.

Munro, M.H.G., Blunt, J.W., Dumdei, E.J., Hickford, S.J.H., Lill, R.E., Li, S., Battershill, C.N., and Duckworth, A.R. (1999). The discovery and development of marine compounds with pharmaceutical potential. Journal of Biotechnology *70*, 15–25.

Nah, J., Yuan, J., and Jung, and Y.-K. (2015). Autophagy in Neurodegenerative Diseases: From Mechanism to Therapeutic Approach. Molecules and Cells *38*, 381–389.

Nailwal, H., and Chan, F.K.-M. (2019). Necroptosis in anti-viral inflammation. Cell Death & Differentiation *26*, 4.

Najafov, A., Chen, H., and Yuan, J. (2017). Necroptosis and Cancer. Trends Cancer *3*, 294–301.

Nakahira, K., Pabon Porras, M.A., and Choi, A.M.K. (2016). Autophagy in Pulmonary Diseases. Am J Respir Crit Care Med *194*, 1196–1207.

Newell, M., Baker, K., Postovit, L.M., and Field, C.J. (2017). A Critical Review on the Effect of Docosahexaenoic Acid (DHA) on Cancer Cell Cycle Progression. International Journal of Molecular Sciences *18*, 1784.

Newman, D.J., and Cragg, G.M. (2016). Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. Journal of Natural Products *79*, 629–661.

Nicholson, D.W. (1999). Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. Cell Death and Differentiation *6*, 1028–1042.

Ning, C., Wang, H.-M.D., Gao, R., Chang, Y.-C., Hu, F., Meng, X., and Huang, S.-Y. (2018). Marine-derived protein kinase inhibitors for neuroinflammatory diseases. Biomed Eng Online *17*.

Niu, X.-Y., Huang, H.-J., Zhang, J.-B., Zhang, C., Chen, W.-G., Sun, C.-Y., Ding, Y.-Q., and Liao, M. (2016). Deletion of autophagy-related gene 7 in dopaminergic neurons prevents their loss induced by MPTP. Neuroscience *339*, 22–31.

Nixon, R.A., Wegiel, J., Kumar, A., Yu, W.H., Peterhoff, C., Cataldo, A., and Cuervo, A.M. (2005). Extensive involvement of autophagy in Alzheimer disease: an immuno-electron microscopy study. J. Neuropathol. Exp. Neurol. *64*, 113–122.

Nunes, A.S., Barros, A.S., Costa, E.C., Moreira, A.F., and Correia, I.J. (2019). 3D tumor spheroids as in vitro models to mimic in vivo human solid tumors resistance to therapeutic drugs. Biotechnology and Bioengineering *116*, 206–226.

Ogawa, O., Zhu, X., Lee, H.-G., Raina, A., Obrenovich, M.E., Bowser, R., Ghanbari, H.A., Castellani, R.J., Perry, G., and Smith, M.A. (2003). Ectopic localization of phosphorylated histone H3 in Alzheimer's disease: a mitotic catastrophe? Acta Neuropathol *105*, 524–528.

Okada, H., and Mak, T.W. (2004). Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. Nature Reviews Cancer *4*, 592–603.

de Oliveira Júnior, R.G., Bonnet, A., Braconnier, E., Groult, H., Prunier, G., Beaugeard, L., Grougnet, R., da Silva Almeida, J.R.G., Ferraz, C.A.A., and Picot, L. (2019). Bixin, an apocarotenoid isolated from Bixa orellana L., sensitizes human melanoma cells to dacarbazine-induced apoptosis through ROS-mediated cytotoxicity. Food and Chemical Toxicology *125*, 549–561.

Omura, S., Iwai, Y., Hirano, A., Nakagawa, A., Awaya, J., Tsuchiya, H., Takahashi, Y., and Asuma, R. (1977). A new alkaloid AM-2282 OF Streptomyces origin. Taxonomy, fermentation, isolation and preliminary characterization. J. Antibiot. *30*, 275–282.

Ostapchenko, V.G., Snir, J., Suchy, M., Fan, J., Cobb, M.R., Chronik, B.A., Kovacs, M., Prado, V.F., Hudson, R.H.E., Pasternak, S.H., et al. (2019). Detection of Active Caspase-3 in Mouse Models of Stroke and Alzheimer's Disease with a Novel Dual Positron Emission Tomography/Fluorescent Tracer [68Ga]Ga-TC3-OGDOTA.

Padiglia, A., Ledda, F.D., Padedda, B.M., Pronzato, R., and Manconi, R. (2018). Long-term experimental in situ farming of Crambe crambe (Demospongiae: Poecilosclerida). PeerJ *6*.

Pan, T., Wu, S., He, X., Luo, H., Zhang, Y., Fan, M., Geng, G., Ruiz, V.C., Zhang, J., Mills, L., et al. (2014). Necroptosis Takes Place in Human Immunodeficiency Virus Type-1 (HIV-1)-Infected CD4+ T Lymphocytes. PLOS ONE *9*, e93944.

Park, M., and Kim, H. (2017). Anti-cancer Mechanism of Docosahexaenoic Acid in Pancreatic Carcinogenesis: A Mini-review. Journal of Cancer Prevention *22*, 1–5.

Pasquet, V., Morisset, P., Ihammouine, S., Chepied, A., Aumailley, L., Berard, J.-B., Serive, B., Kaas, R., Lanneluc, I., Thiery, V., et al. (2011). Antiproliferative Activity of Violaxanthin Isolated from Bioguided Fractionation of Dunaliella tertiolecta Extracts. Marine Drugs *9*, 819–831.

Peyressatre, M., Prével, C., Pellerano, M., and Morris, M.C. (2015). Targeting Cyclin-Dependent Kinases in Human Cancers: From Small Molecules to Peptide Inhibitors. Cancers (Basel) *7*, 179–237.

Picot, L. (2014). Lutter contre les cancers grâce aux pigments de microalgues. Biofutur.

Pietra, F. (2002). Biodiversity and Natural Product Diversity (Elsevier).

Puyal, J., Ginet, V., Grishchuk, Y., Truttmann, A.C., and Clarke, P.G.H. (2012). Neuronal Autophagy as a Mediator of Life and Death: Contrasting Roles in Chronic Neurodegenerative and Acute Neural Disorders. Neuroscientist *18*, 224–236.

Qin, X., Ma, D., Tan, Y.-X., Wang, H.-Y., and Cai, Z. (2019). The role of necroptosis in cancer: A double-edged sword? Biochim Biophys Acta Rev Cancer *1871*, 259–266.

Qinli, Z., Meiqing, L., Xia, J., Li, X., Weili, G., Xiuliang, J., Junwei, J., Hailan, Y., Ce, Z., and Qiao, N. (2013). Necrostatin-1 inhibits the degeneration of neural cells induced by aluminum exposure. Restor. Neurol. Neurosci. *31*, 543–555.

Qiu, Z., Oleinick, N.L., and Zhang, J. (2018). ATR/CHK1 inhibitors and cancer therapy. Radiother Oncol *126*, 450–464.

Qu, X., Yu, J., Bhagat, G., Furuya, N., Hibshoosh, H., Troxel, A., Rosen, J., Eskelinen, E.-L., Mizushima, N., Ohsumi, Y., et al. (2003). Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene. J. Clin. Invest. *112*, 1809–1820.

Rao, A.V., and Rao, L.G. (2007). Carotenoids and human health. Pharmacol. Res. *55*, 207–216.

Raoul, C., Henderson, C.E., and Pettmann, B. (1999). Programmed Cell Death of Embryonic Motoneurons Triggered through the FAS Death Receptor. The Journal of Cell Biology *147*, 1049–1062.

Ratovitski, E.A. (2016). Tumor Protein (TP)-p53 Members as Regulators of Autophagy in Tumor Cells upon Marine Drug Exposure. Marine Drugs *14*, 154.

Rinehart, K.L. (1992). Secondary metabolites from marine organisms. Ciba Found. Symp. *171*, 236–249; discussion 249-254.

Ritchie, H., and Roser, M. (2018). Causes of Death. Our World in Data.

Robinson, N., McComb, S., Mulligan, R., Dudani, R., Krishnan, L., and Sad, S. (2012). Type I interferon induces necroptosis in macrophages during infection with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Nature Immunology *13*, 954–962.

Roca, F.J., and Ramakrishnan, L. (2013). TNF Dually Mediates Resistance and Susceptibility to Mycobacteria via Mitochondrial Reactive Oxygen Species. Cell *153*, 521–534.

Rohn, T.T., Head, E., Nesse, W.H., Cotman, C.W., and Cribbs, D.H. (2001). Activation of Caspase-8 in the Alzheimer's Disease Brain. Neurobiology of Disease *8*, 1006–1016.

Roskoski, R. (2016). Classification of small molecule protein kinase inhibitors based upon the structures of their drug-enzyme complexes. Pharmacological Research *103*, 26–48.

Roskoski, R. (2019). Properties of FDA-approved small molecule protein kinase inhibitors. Pharmacological Research.

Rubinsztein, D.C. (2006). The roles of intracellular protein-degradation pathways in neurodegeneration. Nature *443*, 780.

Rubiolo, J.A., López-Alonso, H., Martínez, P., Millán, A., Cagide, E., Vieytes, M.R., Vega, F.V., and Botana, L.M. (2014). Yessotoxin induces ER-stress followed by autophagic cell death in glioma cells mediated by mTOR and BNIP3. Cellular Signalling *26*, 419–432.

Russell, P., and Nurse, P. (1986). cdc25+ functions as an inducer in the mitotic control of fission yeast. Cell *45*, 145–153.

Sagara, Y., and Schubert, D. (1998). The Activation of Metabotropic Glutamate Receptors Protects Nerve Cells from Oxidative Stress. J. Neurosci. *18*, 6662–6671.

Sah, N.K., Khan, Z., Khan, G.J., and Bisen, P.S. (2006). Structural, functional and therapeutic biology of survivin. Cancer Lett. *244*, 164–171.

Saha, A., Kuzuhara, T., Echigo, N., Suganuma, M., and Fujiki, H. (2010). New Role of (−)-Epicatechin in Enhancing the Induction of Growth Inhibition and Apoptosis in Human Lung Cancer Cells by Curcumin. Cancer Prev Res *3*, 953–962.

Saha, S., Panigrahi, D.P., Patil, S., and Bhutia, S.K. (2018). Autophagy in health and disease: A comprehensive review. Biomedicine & Pharmacotherapy *104*, 485–495.

Sahab, U., Md, and Shah, A., Md (2018). Handbook of Research on Critical Examinations of Neurodegenerative Disorders (IGI Global).

Sajilata, M.G., Singhal, R.S., and Kamat, M.Y. (2008). The Carotenoid Pigment Zeaxanthin—A Review. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety *7*, 29–49.

Sato, S., Uchihara, T., Fukuda, T., Noda, S., Kondo, H., Saiki, S., Komatsu, M., Uchiyama, Y., Tanaka, K., and Hattori, N. (2018). Loss of autophagy in dopaminergic neurons causes Lewy pathology and motor dysfunction in aged mice. Scientific Reports *8*, 2813.

Schlenk, R.F., and Kayser, S. (2018). Midostaurin: A Multiple Tyrosine Kinases Inhibitor in Acute Myeloid Leukemia and Systemic Mastocytosis. In Small Molecules in Hematology, U.M. Martens, ed. (Cham: Springer International Publishing), pp. 199–214.

Schupp, P., Eder, C., Proksch, P., Wray, V., Schneider, B., Herderich, M., and Paul, V. (1999). Staurosporine Derivatives from the Ascidian Eudistoma toealensis and Its Predatory Flatworm Pseudoceros sp. J. Nat. Prod. *62*, 959–962.

Schupp, P., Steube, K., Meyer, C., and Proksch, P. (2001). Anti-proliferative effects of new staurosporine derivatives isolated from a marine ascidian and its predatory flatworm. Cancer Letters *174*, 165–172.

Schupp, P., Proksch, P., and Wray, V. (2002). Further New Staurosporine Derivatives from the Ascidian Eudistoma toealensis and Its Predatory Flatworm Pseudoceros sp. J. Nat. Prod. *65*, 295–298.

von Schwarzenberg, K., and Vollmar, A.M. (2013). Targeting apoptosis pathways by natural compounds in cancer: Marine compounds as lead structures and chemical tools for cancer therapy. Cancer Letters *332*, 295–303.

Sedger, L.M., and McDermott, M.F. (2014). TNF and TNF-receptors: From mediators of cell death and inflammation to therapeutic giants – past, present and future. Cytokine & Growth Factor Reviews *25*, 453–472.

Seglen, P.O., and Gordon, P.B. (1982). 3-Methyladenine: Specific inhibitor of autophagic/lysosomal protein degradation in isolated rat hepatocytes. Proc Natl Acad Sci U S A *79*, 1889–1892.

Serive, B., and Bach, S. (2018). Marine Pigment Diversity: Applications and Potential. In Blue Biotechnology, (John Wiley & Sons, Ltd), pp. 643–681.

Shan, B., Pan, H., Najafov, A., and Yuan, J. (2018). Necroptosis in development and diseases. Genes Dev. *32*, 327–340.

Shang, J., Hu, B., Wang, J., Zhu, F., Kang, Y., Li, D., Sun, H., Kong, D.-X., and Hou, T. (2018). Cheminformatic Insight into the Differences between Terrestrial and Marine Originated Natural Products. J. Chem. Inf. Model. *58*, 1182–1193.

Shen, H.-M., and Vandenabeele, P. (2014). Necrotic Cell Death (Springer Science & Business Media).

Siddiqui, R.A., Harvey, K.A., Xu, Z., Bammerlin, E.M., Walker, C., and Altenburg, J.D. (2011). Docosahexaenoic acid: a natural powerful adjuvant that improves efficacy for anticancer treatment with no adverse effects. Biofactors *37*, 399–412.

Siggelkow, W., Boehm, D., Gebhard, S., Battista, M., Sicking, I., Lebrecht, A., Solbach, C., Hellwig, B., Rahnenführer, J., Koelbl, H., et al. (2012). Expression of aurora kinase A is associated with metastasis-free survival in node-negative breast cancer patients. BMC Cancer *12*, 562.

Simmons, T.L., Andrianasolo, E., McPhail, K., Flatt, P., and Gerwick, W.H. (2005). Marine natural products as anticancer drugs. Mol Cancer Ther 11.

Singh, N. (2007). Apoptosis in health and disease and modulation of apoptosis for therapy: An overview. Indian J Clin Biochem *22*, 6–16.

Singh, R., Letai, A., and Sarosiek, K. (2019). Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins. Nature Reviews Molecular Cell Biology *20*, 175.

Skouta, R., Dixon, S.J., Wang, J., Dunn, D.E., Orman, M., Shimada, K., Rosenberg, P.A., Lo, D.C., Weinberg, J.M., Linkermann, A., et al. (2014). Ferrostatins Inhibit Oxidative Lipid Damage and Cell Death in Diverse Disease Models. J Am Chem Soc *136*, 4551–4556.

Skropeta, D., Pastro, N., and Zivanovic, A. (2011). Kinase Inhibitors from Marine Sponges. Marine Drugs *9*, 2131–2154.

Snyder, A.G., Hubbard, N.W., Messmer, M.N., Kofman, S.B., Hagan, C.E., Orozco, S.L., Chiang, K., Daniels, B.P., Baker, D., and Oberst, A. (2019). Intratumoral activation of the necroptotic pathway components RIPK1 and RIPK3 potentiates antitumor immunity. Science Immunology *4*, eaaw2004.

Sommerburg, O., Keunen, J.E.E., Bird, A.C., and Kuijk, F.J.G.M. van (1998). Fruits and vegetables that are sources for lutein and zeaxanthin: the macular pigment in human eyes. British Journal of Ophthalmology *82*, 907–910.

Son, J.H., Shim, J.H., Kim, K.-H., Ha, J.-Y., and Han, J.Y. (2012). Neuronal autophagy and neurodegenerative diseases. Exp Mol Med *44*, 89–98.

Song, X., Xiong, Y., Qi, X., Tang, W., Dai, J., Gu, Q., and Li, J. (2018). Molecular Targets of Active Anticancer Compounds Derived from Marine Sources. Mar Drugs *16*.

Song, Y., Lu, C., and Chen, J. (2003). [Factors of antioxidant and prooxidant activities of carotenoids]. Wei Sheng Yan Jiu *32*, 417–419.

Spencer, B., Potkar, R., Trejo, M., Rockenstein, E., Patrick, C., Gindi, R., Adame, A., Wyss-Coray, T., and Masliah, E. (2009). Beclin 1 gene transfer activates autophagy and ameliorates the neurodegenerative pathology in alpha-synuclein models of Parkinson's and Lewy body diseases. J. Neurosci. *29*, 13578–13588.

Steeg, P.S., and Theodorescu, D. (2008). Metastasis: a therapeutic target for cancer. Nat Clin Pract Oncol *5*, 206–219.

Strilic, B., Yang, L., Albarrán-Juárez, J., Wachsmuth, L., Han, K., Müller, U.C., Pasparakis, M., and Offermanns, S. (2016). Tumour-cell-induced endothelial cell necroptosis via death receptor 6 promotes metastasis. Nature *536*, 215–218.

Su, C.-C., Chen, N.-C., Chyau, C.-C., Tseng, H.-C., and Chou, F.-P. (2019). Induction of Mitotic Catastrophe via Inhibition of Aurora B by Ionizing Radiation With Additive of Mulberry Water Extract in Human Bladder Cancer Cells. Integr Cancer Ther *18*, 1534735418808586.

Su, Z., Yang, Z., Xu, Y., Chen, Y., and Yu, Q. (2015). Apoptosis, autophagy, necroptosis, and cancer metastasis. Mol Cancer *14*.

Su, Z., Yang, Z., Xie, L., DeWitt, J.P., and Chen, Y. (2016). Cancer therapy in the necroptosis era. Cell Death & Differentiation.

Sutherland, R.M., Inch, W.R., McCredie, J.A., and Kruuv, J. (1970). A multi-component radiation survival curve using an in vitro tumour model. Int. J. Radiat. Biol. Relat. Stud. Phys. Chem. Med. *18*, 491–495.

Sutherland, R.M., McCredie, J.A., and Inch, W.R. (1971). Growth of multicell spheroids in tissue culture as a model of nodular carcinomas. J. Natl. Cancer Inst. *46*, 113–120.

Takashima, M., Ichihara, K., and Hirata, Y. (2019). Neuroprotective effects of Brazilian green propolis on oxytosis/ferroptosis in mouse hippocampal HT22 cells. Food and Chemical Toxicology *132*, 110669.

Takeshita, M., Koga, T., Takayama, K., Ijichi, K., Yano, T., Maehara, Y., Nakanishi, Y., and Sueishi, K. (2013). Aurora-B overexpression is correlated with aneuploidy and poor prognosis in non-small cell lung cancer. Lung Cancer *80*, 85–90.

Tallóczy, Z., Jiang, W., Virgin, H.W., Leib, D.A., Scheuner, D., Kaufman, R.J., Eskelinen, E.-L., and Levine, B. (2002). Regulation of starvation- and virus-induced autophagy by the eIF2α kinase signaling pathway. PNAS *99*, 190–195.

Tamura, Y., Chiba, Y., Tanioka, T., Shimizu, N., Shinozaki, S., Yamada, M., Kaneki, K., Mori, S., Araki, A., Ito, H., et al. (2011). NO donor induces Nec-1-inhibitable, but RIP1-independent, necrotic cell death in pancreatic β-cells. FEBS Letters *585*, 3058–3064.

Tan, M.-S., Tan, L., Jiang, T., Zhu, X.-C., Wang, H.-F., Jia, C.-D., and Yu, J.-T. (2014). Amyloid-*β* induces NLRP1-dependent neuronal pyroptosis in models of Alzheimer's disease. Cell Death & Disease *5*, e1382.

Tang, A., Gao, K., Chu, L., Zhang, R., Yang, J., and Zheng, J. (2017). Aurora kinases: novel therapy targets in cancers. Oncotarget *8*, 23937–23954.

Tasdemir, E., Galluzzi, L., Maiuri, M.C., Criollo, A., Vitale, I., Hangen, E., Modjtahedi, N., and Kroemer, G. (2008). Methods for Assessing Autophagy and Autophagic Cell Death. In Autophagosome and Phagosome, V. Deretic, ed. (Totowa, NJ: Humana Press), pp. 29–76.

Teng, X., Degterev, A., Jagtap, P., Xing, X., Choi, S., Denu, R., Yuan, J., and Cuny, G.D. (2005). Structure–activity relationship study of novel necroptosis inhibitors. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters *15*, 5039–5044.

Thorburn, A., Thamm, D.H., and Gustafson, D.L. (2014). Autophagy and Cancer Therapy. Mol Pharmacol *85*, 830–838.

Tischer, J., and Gergely, F. (2019). Anti-mitotic therapies in cancer. The Journal of Cell Biology *218*, 10–11.

Ubersax, J.A., and Ferrell Jr, J.E. (2007). Mechanisms of specificity in protein phosphorylation. Nature Reviews Molecular Cell Biology *8*, 530–541.

Ulep, M.G., Saraon, S.K., and McLea, S. (2018). Alzheimer Disease. The Journal for Nurse Practitioners *14*, 129–135.

Upton, J.W., Kaiser, W.J., and Mocarski, E.S. (2010). Virus Inhibition of RIP3-Dependent Necrosis. Cell Host & Microbe *7*, 302–313.

Vakifahmetoglu, H., Olsson, M., and Zhivotovsky, B. (2008). Death through a tragedy: mitotic catastrophe. Cell Death and Differentiation *15*, 1153–1162.

Vandenabeele, P., Galluzzi, L., Vanden Berghe, T., and Kroemer, G. (2010). Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. Nature Reviews Molecular Cell Biology *11*, 700–714.

Vandenabeele, P., Grootjans, S., Callewaert, N., and Takahashi, N. (2013). Necrostatin-1 blocks both RIPK1 and IDO: consequences for the study of cell death in experimental disease models. Cell Death Differ *20*, 185–187.

Vaughan, V.C., Hassing, M.R., and Lewandowski, P.A. (2013). Marine polyunsaturated fatty acids and cancer therapy. British Journal of Cancer *108*, 486–492.

Vercammen, D., Beyaert, R., Denecker, G., Goossens, V., Loo, G.V., Declercq, W., Grooten, J., Fiers, W., and Vandenabeele, P. (1998). Inhibition of Caspases Increases the Sensitivity of L929 Cells to Necrosis Mediated by Tumor Necrosis Factor. Journal of Experimental Medicine *187*, 1477–1485.

Vila, M., and Przedborski, S. (2003). Targeting programmed cell death in neurodegenerative diseases. Nature Reviews Neuroscience *4*, 365.

Vílchez, C., Forján, E., Cuaresma, M., Bédmar, F., Garbayo, I., and Vega, J.M. (2011). Marine Carotenoids: Biological Functions and Commercial Applications. Mar Drugs *9*, 319–333.

Vitale, I., Galluzzi, L., Castedo, M., and Kroemer, G. (2011). Mitotic catastrophe: a mechanism for avoiding genomic instability. Nature Reviews Molecular Cell Biology *12*, 385–392.

Vogt, K.C. (1842). Untersuchungen über die Entwicklungsgeschichte der Geburtshelferkrte (Alytes obstetricans) (Solothurn : Jent & Gassmann).

Wan, X., Serrill, J.D., Humphreys, I.R., Tan, M., McPhail, K.L., Ganley, I.G., and Ishmael, J.E. (2018). ATG5 Promotes Death Signaling in Response to the Cyclic Depsipeptides Coibamide A and Apratoxin A. Marine Drugs *16*, 77.

Wang, A.Y., and Liu, H. (2019). The past, present, and future of CRM1/XPO1 inhibitors. Stem Cell Investig *6*.

Wang, K., Chen, Y., Zhang, P., Lin, P., Xie, N., and Wu, M. (2019). Protective Features of Autophagy in Pulmonary Infection and Inflammatory Diseases. Cells *8*, 123.

Wang, T., Jin, Y., Yang, W., Zhang, L., Jin, X., Liu, X., He, Y., and Li, X. (2017). Necroptosis in cancer: An angel or a demon? Tumour Biol. *39*, 1010428317711539.

Wang, Y., Martinez-Vicente, M., Krüger, U., Kaushik, S., Wong, E., Mandelkow, E.-M., Cuervo, A.M., and Mandelkow, E. (2009). Tau fragmentation, aggregation and clearance: the dual role of lysosomal processing. Hum. Mol. Genet. *18*, 4153–4170.

Wang, Y., Wang, J., Wang, H., Feng, X., Tao, Y., Yang, J., and Cai, J. (2018). Necrosulfonamide Attenuates Spinal Cord Injury via Necroptosis Inhibition. World Neurosurgery *114*, e1186–e1191.

Ward, N.E., and O'Brian, C.A. (1992). Kinetic analysis of protein kinase C inhibition by staurosporine: evidence that inhibition entails inhibitor binding at a conserved region of the catalytic domain but not competition with substrates. Mol Pharmacol *41*, 387–392.

Weiland, A., Wang, Y., Wu, W., Lan, X., Han, X., Li, Q., and Wang, J. (2019). Ferroptosis and Its Role in Diverse Brain Diseases. Mol Neurobiol *56*, 4880–4893.

Weinlich, R., Oberst, A., Beere, H.M., and Green, D.R. (2017). Necroptosis in development, inflammation and disease. Nature Reviews Molecular Cell Biology *18*, 127–136.

Welch, D.R., and Hurst, D.R. (2019). Defining the Hallmarks of Metastasis. Cancer Res.

Wong, R.S. (2011). Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. J Exp Clin Cancer Res *30*, 87.

Wu, J., Wang, J., Zhou, S., Yang, L., Yin, J., Cao, J., and Cheng, Y. (2015). Necrostatin-1 protection of dopaminergic neurons. Neural Regen Res *10*, 1120–1124.

Xiao, M., and Li, W. (2015). Recent Advances on Small-Molecule Survivin Inhibitors. Curr Med Chem *22*, 1136–1146.

Xie, Z., and Klionsky, D.J. (2007). Autophagosome formation: core machinery and adaptations. Nature Cell Biology *9*, 1102–1109.

Xie, Y., Zhu, S., Zhong, M., Yang, M., Sun, X., Liu, J., Kroemer, G., Lotze, M., Zeh, H.J., Kang, R., et al. (2017). Inhibition of Aurora Kinase A Induces Necroptosis in Pancreatic Carcinoma. Gastroenterology.

Xing, S., Zhang, Y., Li, J., Zhang, J., Li, Y., Dang, C., Li, C., Fan, Y., Yu, J., Pei, Z., et al. (2012). Beclin 1 knockdown inhibits autophagic activation and prevents the secondary neurodegenerative damage in the ipsilateral thalamus following focal cerebral infarction. Autophagy *8*, 63–76.

Xu, X., Chua, C.C., Kong, J., Kostrzewa, R.M., Kumaraguru, U., Hamdy, R.C., and Chua, B.H.L. (2007). Necrostatin-1 protects against glutamate-induced glutathione depletion and caspase-independent cell death in HT-22 cells. Journal of Neurochemistry *103*, 2004–2014.

Xu, Y., Fang, F., Ludewig, G., Jones, G., and Jones, D. (2004). A mutation found in the promoter region of the human survivin gene is correlated to overexpression of survivin in cancer cells. DNA Cell Biol. *23*, 527–537.

Yang, W.S., and Stockwell, B.R. (2016). Ferroptosis: death by lipid peroxidation. Trends Cell Biol *26*, 165–176.

Yang, J., Pi, C., and Wang, G. (2018). Inhibition of PI3K/Akt/mTOR pathway by apigenin induces apoptosis and autophagy in hepatocellular carcinoma cells. Biomedicine & Pharmacotherapy *103*, 699–707.

Yang, S., Lee, D.K., Shin, J., Lee, S., Baek, S., Kim, J., Jung, H., Hah, J., and Kim, Y. (2017). Nec-1 alleviates cognitive impairment with reduction of Aβ and tau abnormalities in APP/PS1 mice. EMBO Mol Med *9*, 61–77.

Yang, W.S., SriRamaratnam, R., Welsch, M.E., Shimada, K., Skouta, R., Viswanathan, V.S., Cheah, J.H., Clemons, P.A., Shamji, A.F., Clish, C.B., et al. (2014). Regulation of Ferroptotic Cancer Cell Death by GPX4. Cell *156*, 317–331.

Yang, Z.J., Chee, C.E., Huang, S., and Sinicrope, F.A. (2011). The Role of Autophagy in Cancer: Therapeutic Implications. Mol Cancer Ther *10*, 1533–1541.

Yeung, S.-C.J., Gully, C., and Lee, M.-H. (2008). Aurora-B kinase inhibitors for cancer chemotherapy. Mini Rev Med Chem *8*, 1514–1525.

Young, A.J., and Lowe, G.L. (2018). Carotenoids—Antioxidant Properties. Antioxidants (Basel) *7*.

Yu, H., Guo, P., Xie, X., Wang, Y., and Chen, G. (2017). Ferroptosis, a new form of cell death, and its relationships with tumourous diseases. Journal of Cellular and Molecular Medicine *21*, 648–657.

Yu, W.H., Cuervo, A.M., Kumar, A., Peterhoff, C.M., Schmidt, S.D., Lee, J.-H., Mohan, P.S., Mercken, M., Farmery, M.R., Tjernberg, L.O., et al. (2005). Macroautophagy—a novel β-amyloid peptide-generating pathway activated in Alzheimer's disease. J Cell Biol *171*, 87–98.

Zafarullah, M., Li, W.Q., Sylvester, J., and Ahmad, M. (2003). Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions. Cell. Mol. Life Sci. *60*, 6–20.

Zakeri, Z., and Lockshin, R.A. (2008). Cell Death: History and Future. In Programmed Cell Death in Cancer Progression and Therapy, R. Khosravi-Far, and E. White, eds. (Dordrecht: Springer Netherlands), pp. 1–11.

Zhang, N., Scorsone, K., Ge, G., Kaffes, C.C., Dobrolecki, L.E., Mukherjee, M., Lewis, M.T., Berg, S., Stephan, C.C., and Pati, D. (2014). Identification and Characterization of Separase Inhibitors (Sepins) for Cancer Therapy. J Biomol Screen *19*, 878–889.

Zhang, S., Tang, M., Luo, H., Shi, C., and Xu, Y. (2017). Necroptosis in neurodegenerative diseases: a potential therapeutic target. Cell Death & Disease *8*, e2905.

Zhang, Y.-L., Li, B.-Y., Yang, R., Xia, L.-Y., Fan, A.-L., Chu, Y.-C., Wang, L.-J., Wang, Z.-C., Jiang, A.-Q., and Zhu, H.-L. (2019). A class of novel tubulin polymerization inhibitors exert effective anti-tumor activity via mitotic catastrophe. European Journal of Medicinal Chemistry *163*, 896–910.

Zhao, Z., Lu, R., Zhang, B., Shen, J., Yang, L., Xiao, S., Liu, J., and Suo, W.Z. (2012). Differentiation of HT22 neurons induces expression of NMDA receptor that mediates homocysteine cytotoxicity. Neurological Research *34*, 38–43.

Zheng, J., Knighton, D.R., Xuong, N.H., Taylor, S.S., Sowadski, J.M., and Ten Eyck, L.F. (1993). Crystal structures of the myristylated catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase reveal open and closed conformations. Protein Sci *2*, 1559–1573.

Zheng, S., Clabough, E.B.D., Sarkar, S., Futter, M., Rubinsztein, D.C., and Zeitlin, S.O. (2010). Deletion of the Huntingtin Polyglutamine Stretch Enhances Neuronal Autophagy and Longevity in Mice. PLOS Genetics *6*, e1000838.

Zheng, Y.-L., Zhang, X., Fu, H.-X., Guo, M., Shukla, V., Amin, N.D., E, J., Bao, L., Luo, H.-Y., Li, B., et al. (2016). Knockdown of Expression of Cdk5 or p35 (a Cdk5 Activator) Results in Podocyte Apoptosis. PLOS ONE *11*, e0160252.

Zhou, W., and Yuan, J. (2014). Necroptosis in health and diseases. Seminars in Cell & Developmental Biology *35*, 14–23.

Zhu, H., Fearnhead, H.O., and Cohen, G.M. (1995). An ICE-like protease is a common mediator of apoptosis induced by diverse stimuli in human monocytic THP.1 cells. FEBS Letters *374*, 303–308.

Zhu, S., Zhang, Y., Bai, G., and Li, H. (2011). Necrostatin-1 ameliorates symptoms in R6/2 transgenic mouse model of Huntington's disease. Cell Death Dis *2*, e115.

Zörnig, M., Hueber, A., Baum, W., and Evan, G. (2001). Apoptosis regulators and their role in tumorigenesis. Biochim. Biophys. Acta *1551*, F1-37.

Zuccotto, F., Ardini, E., Casale, E., and Angiolini, M. (2010). Through the “Gatekeeper Door”: Exploiting the Active Kinase Conformation. J. Med. Chem. *53*, 2681–2694.

(2004). Apoptosis methods and protocols. Methods in Molecular Biology *282* (Totowa, NJ: Humana Press).

Crambe crambe (Schmidt, 1862). Available online: https://inpn.mnhn.fr/espece/cd_nom/71340 (accessed on Jan 14, 2019).

Liste des tableaux

Tableau 1 : Définition des voies de mort cellulaire programmée. 8

Tableau 2 : Caractéristiques des principaux phénotypes de mort cellulaire programmée. 10

Tableau 3 : Agents chimio-thérapeutiques anticancéreux qui déclenchent la PCD en essais clinique et préclinique. 36

Tableau 4 : Inhibiteurs de la PCD en cours de développement clinique et préclinique. 39

Tableau 5 : Listes des PKIs approuvés par la FDA, leurs cibles et leurs indications thérapeutiques (mise à jour en août 2019). 51

Tableau 6 : Liste des molécules approuvées pour un usage médicamenteux et en phase d'essais cliniques (mise à jour en juillet 2019). 62

Tableau 7 : Inhibiteurs de protéines kinases d'origine marine en développement clinique. .. 65

Tableau 8 : Certains groupes de modulateurs de la PCD, d'origine marine. 66

Tableau 9 : Inhibiteurs de la mort cellulaire. 132

Tableau supplémentaire. Inhibition de l'activité de protéines kinases par la molécule P3 isolée de l'éponge *Crambe tailliezi*. 146

Liste des figures

Figure 1 : Principaux sous-programmes de mort cellulaire. 7
Figure 2 : Illustration des voies intrinsèque et extrinsèque de l'apoptose. 12
Figure 3 : L'autophagie et la régulation de cette voie de mort cellulaire. 13
Figure 4 : Déroulement de la nécroptose, une nécrose régulée..... 15
Figure 5 : Vue intégrée des nouveaux modes de nécrose régulée..... 16
Figure 6 : La voie de mort ferroptotique et ses régulateurs. 18
Figure 7 : Conséquences de l'échec de la mitose et la mort cellulaire suivant une catastrophe mitotique..... 20
Figure 8 : Mort cellulaire programmée dans le développement. 21
Figure 9 : Implication de la nécroptose dans des pathologies humaines. 23
Figure 10 : Mécanismes contribuant à la dérégulation de l'apoptose et à la cancérogenèse... 26
Figure 11 : Interaction entre différents types de PCD et la métastase cancéreuse..... 28
Figure 12 : Représentation schématique de principaux mécanismes impliqués dans la mort neuronale. 33
Figure 13 : La relation entre nécrose, autophagie et apoptose. 41
Figure 14 : Mécanisme de la mort cellulaire programmé induite par le TNF et ses modulateurs. 42
Figure 15 : Le cycle catalytique de base de la phosphorylation d'un substrat par une protéine kinase..... 44
Figure 16 : Organisation tridimensionnelle classique d'un domaine kinase (INSR kinase, PDB ID code : 1GAG). 46
Figure 17 : Schéma du site de liaison à l'ATP. 46
Figure 18 : L'arbre du kinome humain. 48
Figure 19 : Chronologie du développement des inhibiteurs de protéines kinases approuvés par la FDA. 50
Figure 20 : Classification des inhibiteurs de protéines kinases à partir de la structure de leur complexe médicament-enzyme. 54
Figure 21 : Arbre du kinome humain présentant la répartition des inhibiteurs de protéines kinases selon le groupe ciblé. 56
Figure 22 : Répartition des produits naturels marins identifiés au cours de la période 1971-2015 par phylum..... 59

Figure 23 : Photo de *Crambe tailliezi* (Vacelet & Boury-Esnault, 1982) et *Crambe crambe* (Schmidt, 1862). 73
Figure 24 : Cinétique de formation d'un sphéroïde au cours de 72 h. 112
Figure 25 : Mécanismes de la mort des cellules HT-22, activés suite à un traitement par glutamate. 131
Figure 26 : Structure générale d'un caroténoïde : une chaîne centrale de doubles liaisons conjuguées avec ou sans groupements terminaux cycliques. 133
Figure 27 : Effet dose-dépendant du glutamate sur la viabilité cellulaire des cellules HT-22. 134
Figure 28 : Evaluation de l'effet de modulateurs de mort sur la viabilité de cellules HT-22 (A) et de leur effet protecteur contre la mort cellulaire induite par le glutamate (B). 135
Figure 29 : Effet du traitement par des pigments marins sur la viabilité cellulaire (A) et sur la protection contre la mort cellulaire induite par le glutamate (B). 136
Figure 30 : Effet protecteur dose-dépendant des pigments marins sur la mort cellulaire des cellules HT-22 induite par le glutamate. 137
Figure 31 : Effet dose-dépendant de l'érastine sur la viabilité cellulaire des cellules HT-22. 138
Figure 32 : Evaluation de la cytotoxicité des pigments marins (A) et leur effet protecteur contre la mort cellulaire de cellules HT-22 induite par l'érastine (B). 138
Figure 33 : Cytotoxicité de pigments marins sur diverses lignées de cellules cancéreuses. . 139
Figure 34. Régulation de la mitose et de la cytokinèse par les quatre complexes moléculaires organisés par les cofacteurs d'Aurora. 148

Liste des abréviations

3-AB	3-Aminobenzamide
3D	Three-dimensional
3-MA	3-Méthyladénine
5-AD	Décitabine
5-FU	5-Fluorouracile
6-OHDA	6-Hydroxydopamine
A3	Human acute T-cell leukemia cell line (Jurkat cell)
Aβ	Amyloïde bêta
ABL	Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1 protein
ActD	Actinomycin D
ADC	Antibody-Drug Conjugate
ADCD	Autophagy-Dependent Cell Death
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADP	Adenosine diphosphate
AGC	Kinase Group AGC (PKA, PKG, PKC)
AIF	Apoptosis-Inducing Factor
Akt	Protein kinase B (PKB)
Al	Aluminium
ALK	Anaplastic Lymphoma Kinase
AMP	Adenosine monophosphate
AMPK	AMP-activated protein kinase (AMP: adenosine monophosphate)
AOA	Aminooxyacetate
Apf-1	Apoptotic protease-activating factor 1
APP	Amyloid Precursor Protein
Ara-A	9-β-D-Arabinofuranosyladenine (Vidarabine)
Ara-C	Cytosine Arabinoside (Cytarabine)
AsPC-1	Human pancreas adenocarcinoma cell line
Atg	Autophagy-related protein
ATP	Adenosine triphosphate
ATRA	Tretinoin
AURKs	Aurora kinases
Bak	Bcl-2 antagonist/killer

Bax	Bcl-2–associated X protein
BCI	Inhibiteur de Bcl-2
Bcl-2	B-cell lymphoma
Bcl-xL	B-cell lymphoma-extra large
BCR	Breakpoint Cluster Region protein
BCR-ABL	BCR-ABL protein
BEL	Bromoenol Lactone
BH3	Bcl-2 homology
BHA	Butylated Hydroxyl Anisole
Bid	BH3 interacting-domain death agonist
BRAF	Proto-oncogene B-Raf
B-Raf	Serine/threonine-protein kinase B-Raf
BRAF V600E	Mutation du gène BRAF dans lequel la valine (V) est remplacée par l'acide glutamique (E) à l'acide aminé 600
BSO	Buthionine sulfoximine, an inhibitor of gamma-GCS synthetase
BTK	Bruton's Tyrosine Kinase
BUBR1	Sérine/thréonine-protéine kinase mitotique ‘checkpoint’
Ca2+	Calcium ion
CAMK	Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase
CD4	Cluster of Differentiation 4
CD95	Cluster of Differentiation 95
Cdc25	A dual-specificity phosphatase for "cell division cycle"
CDDO	2-cyano-3,12-dioxo-oleana-1,9(11)-dien-28-oic acid
CDK	Cyclin-Dependent Kinase
CENP-E	Centromere-associated protein E
cFLIP	cellular FLICE-inhibitory protein (FLICE: FADD-like IL-1β-converting enzyme)
CHFR	Checkpoint with FHA and RING finger domains
CHK1	Checkpoint Kinase 1
CHX	Cycloheximide
cIAP	cellular Inhibitor of Apoptosis
CK1	Caséine Kinase 1
CLK	Cdc2-Like Kinase
CMGC	Kinase Group CMGC (CDK, MAPK, GSK, CLK)
CMV	Cytomegalovirus M45

CoQ10	Coenzyme Q10 (ou ubiquinone)
Cpd27	Compound 27, an RIPK1 inhibitor
CPX	Ciclopirox
CQ	Chloroquine
CRM1/XPO1	Chromosomal region maintenance 1/ exportin 1
CsA	Cyclosporin A
CSFR1	Colony stimulating factor 1 receptor
CYLD	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase
Cys/Glu antiporter	System X_c^- cystine/glutamate antiporter
Cyt.C	Cytochrome C
DFG motif	Asp-Phe-Gly (DFG) motif
DFO	Deferoxamine
DHA	Docosahexaenoic acid
DICSC	Death-Inducing Signaling Complex
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DNAses	Deoxyribonuclease
DPI	Diphenylene Iodonium, an inhibitor of NADPH oxidase
Drp1	Dynamin related protein 1
EC50	Half maximal effective concentration
ECM	Extracellular Matrix
EGCG	Epigallocatechin gallate
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EMT	Epithelial–Mesenchymal Transition
ERBB2	Receptor tyrosine-protein kinase ErbB2
FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorting
FADD	FAS-associated protein with death domain
FAS	TNF-R superfamily member 6 (FAS), apoptosis antigen (APO-1, APT), cluster of differentiation 95 (CD95)
FAS-L	FAS ligand
FAS-R	FAS receptor
FDA	Food and Drug Administration
FER1 ou Fer-1	Ferrostatine-1
FGFR1	Fibroblast Growth Factor Receptor 1
FIN56	A glutathione peroxidase 4 (GPX4) inhibitor
FIP200	ULK1-associated protein FIP200

FKBP12	12-kDa FK506-binding protein (FK506: an immunosuppressant)
FLIPL	FLIP long isoform (FLIP: FLICE-inhibitory protein)
FLT3	FMS-like tyrosine kinase 3 (FMS: Feline McDonough Sarcoma)
fMLP	N-formylated methionyl-leucyl-Phe
GFP	Green Fluorescent Protein
GKT	GKT137831, an inhibitor of NADPH oxidase 1/4
Glu	Glutamic acid, glutamate
GPX4	Glutathione Peroxyidase 4
GSH	Glutathion
GSK3	Glycogen Synthase Kinase 3
GYC	Guanylate cyclase
HCQ	Hydroxychloroquine
HDAC	Histone desacetylase
HEK-293	Human embryonic kidney 293 cells
HepG-2	Human hepatocellular carcinoma cell line
HER2	Human Epidermal Growth Factor Receptor 2
HIP-1	Huntingtin-interacting protein 1
HIPPI	HIP1 Protein Interactor
HMG-CoA	3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-coenzyme A reductase
HsEg5	Spindle kinesin-like protein
HT-29	Human colorectal adenocarcinoma cell line
hTERT RPE-1	The hTERT-immortalized retinal pigment epithelial cell line (hTERRT: human telomerase reverse transcriptase)
Htt	Huntingtin protein
IAP	Inhibitor of Apoptosis
IC50	Half maximal inhibitory concentration
ICD	Immunogenic Cell Death
IFNAR	IFNα/β receptor
IGF	Insulin-Like Growth Factors
IKK	IκB kinase
IL3	Interleukin-3
InsP6K2	Inositol hexakisphosphate kinase-2
IRI	Ischaemia–Reperfusion Injury
JAK1	Janus kinase 1
JNK	c-Jun N-terminal kinase

KIT	Receptor tyrosine kinase
KSP	Kinesin spindle protein
LC3	Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3B (ou MAP1LC3B)
LCM	Lymphome à Cellules du Manteau
LDCD	Lysosome-Dependent Cell Death
LLA	Leucémie Lymphoblastique Aiguë
LLC	Leucémie Lymphoïde Chronique
LMA	Leucémie Myéloïde Aiguë
LMC	Leucémie Myéloïde Chronique
LMP	Lysosomal Membrane Permeabilization
LOX	Lipoxygénase
LPS	Lipopolysaccharide
LUBAC	Linear Ubiquitin chain Assembly Complex
LZM	Lymphomes dans la Zone Marginale
MA	Maladie d'Alzheimer
MAFP	Methyl-Arachidonyl Fluorophosphonate
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MCAK	Mitotic Centromere-Associated Kinesin
MCF-7	Human breast adenocarcinoma cell line
Mcl-1	Induced myeloid leukemia cell differentiation protein
MEK	Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase (MAPKK ou MAP2K)
MH	Maladie de Huntington
mHtt	mutant Huntingtin protein
MKLP-1	Mitotic Kinesin-Like Protein 1
MLKL	Mixed Lineage Kinase Domain Like Pseudokinase
MMAE	Monométhylauristatine E
MMAF	Monométhylauristatine F
MNNG	N-methyl-N′-nitro-N-nitrosoguanidine
MP	Maladie de Parkinson
MPT	Mitochondrial Permeability Transition
MPTP	1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine
MSP1	Merozoite surface protein 1
MTOC	Microtubule-organizing center
mTOR	mammalian Target Of Rapamycin

MTS	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium
Na+	Sodium ion
NAC	N-acétylcystéine
NAD	Nicotinamide Adenine Dinucleotide
NADPH	Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate
NCCD	Nomenclature Committee on Cell Death
Nec-1	Nécrostatine-1
NEC1s ou Nec-1-s	Nécrostatine-1-stable
NEMO	NF-kappa-B essential modulator
NETose	Nétose
NETs	Neutrophil Extracellular Traps
NF-κB	Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NLR	NOD-like receptor (NOD: nucleotide-binding oligomerization domain-like)
NMDA	N-methyl-D-aspartate
NSA	Necrosulfonamide
NSCLC	Non-Small Cell Lung Cancer
NTRK	Neurotrophic tyrosine kinase
NUPR1	Nuclear Protein 1
p53	Tumor supressor protein 53 (TP53)
PARK2	Parkin, a E3 Ubiquitin Protein Ligase
PARP	Poly (ADP-Ribose) Polymerase
PCD	Programmed Cell Death
PDGFR	Platelet-Derived Growth Factor Receptor
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase
PIKK	Phosphatidylinositol 3-kinase-related kinase
PINK1	PTEN-induced kinase 1 (PTEN: Phosphatase and Tensin Homolog deleted on chromosome 10)
PJ-34	An inhibitor of poly(ADP-ribose) polymerase
PKA	Protéine Kinase A
PKC	Protéine Kinase C
PKG	Protéine Kinase G
PKIDB	Protein Kinase Inhibitor Data Base
PKIs	Protein Kinase Inhibitors
PLK1	Polo-Like Kinase 1

PMA	Phorbol-12-myristate- 13-acetate
PN10	Ponatinib-Nec-1, a RIPK1 inhibitor
PolyI:C	Polyinosinic:polycytidylic acid
polyQ	Polyglutamine
PS1	Presenilin protein
PUFAs	Polyunsaturated fatty acids
Q-VD-OPh	Quinoline-Val-Asp-Difluorophenoxymethylketone
RCD	Regulated Cell Death
RET	RET kinase (RET: rearranged during transfection)
RIPK	Receptor-Interacting Protein Kinase
RLRs	RIG-I-like receptors (RIG-I: retinoic acid-inducible gene-I)
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
ROCK	Rho-associated protein kinase
ROS	Reactive Oxygen Species
ROS1	Proto-oncogene tyrosine-protein kinase
RSL3	A glutathione peroxidase 4 (GPX4) inhibitor
SD	Standard deviation
Se	Selenium
Ser	Serine
SfA	Sanglifehrin A
Sib	Sibiriline
siCARS	Small interfering cysteinyl-tRNA synthetase
SIDA	Syndrome d'Immuno Déficience Acquise
SINE	Selective Inhibitor of Nuclear Export
SMAC	Second Mitochondria-derived Activator of Caspases
Src	Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src (Src: sarcoma)
STE	Kinase Group STE
SYK	Spleen tyrosine kinase
System X_c^-	System X_c^- cystine/glutamate antiporter
TAB	TAK1/MAP3K7 Binding Protein 1
TAK1	TGF beta Activated Kinase (TGF: transforming growth factor)
Tau	Tubulin-associated unit
tBid	truncated p15 BID
TCA cycle	Tricarboxylic acid cycle, Krebs cycle
Thr	Threonine

TK	Tyrosine Kinase Group
TKL	Tyrosine Kinase-Like
TLR ou TL-R	Toll-like receptor
TMZ	Témozolomide
TNF-R	TNF receptor
TNF-α	Tumor Necrosis Factor – α
TRADD	TNFR1-associated death domain protein
TRAF2	TNF receptor-associated factor 2
TRAIL	TNF – related apoptosis inducing ligand
TRAIL-R	TRAIL receptor
TRK	Tropomyosin Receptor Kinase
TS pathway	Thymidylate Synthetase pathway
TYK2	Tyrosine kinase 2
Tyr	Tyrosine
U-2 OS	Human bone osteosarcoma epithelial cells
U-87	Human primary glioblastoma cell line
ULK1	UNC-51 like autophagy activating kinase 1 (UNC-51: serine/threonine kinase homologous to yeast Atg1)
US	United States
USA	The United States of America
UV	Ultraviolet Light
VAD	Valyl-alanyl-aspartyl
VEGFR	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor
VIH-1	Virus de l'Immunodéficience Humaine de type 1
vit.E	Vitamin E
VX-740	A Caspase 1 Inhibitor
Z-IETD-fmk	Z-Ile-Glu(O-ME)-Thr-Asp(O-Me) fluoromethyl ketone
Z-VAD-FMK	Carbobenzoxy-valyl-alanyl-aspartyl-[O-methyl]-fluoromethylketone, pan-caspase inhibitor
α-KG	α-ketoglutarate
α-syn	Alpha-synucléine

Résumé

La régulation de la mort cellulaire est cruciale pour les êtres vivants. La mort cellulaire programmée (PCD) peut être déclenchée par des signaux extra- ou intracellulaires dans des conditions physiologiques (cette programmation permet par exemple le maintien de l'homéostasie tissulaire et un développement optimal) ou pathologiques afin d'éliminer des cellules altérées ou en prolifération anarchique. Une dérégulation de la mort cellulaire programmée est impliquée dans diverses pathologies humaines telles que les cancers, les maladies neurodégénératives et les maladies inflammatoires. La découverte de modulateurs de la mort cellulaire ouvre sur des perspectives prometteuses notamment en thérapie anticancéreuse, mais également en recherche fondamentale, pour améliorer notre compréhension des régulations moléculaires mises en jeu. Dans le cadre de cette thèse, des molécules marines (pigments marins et métabolites purifiés à partir d'éponges, notamment *Crambe tailliezi* et *Crambe crambe*, issues de la Mer Méditerranée et de l'Océan Atlantique) ont été utilisées afin d'inhiber, ou de déclencher, des voies de mort cellulaire non canoniques. Ces travaux ont été notamment focalisés sur l'étude d'un métabolite de haut poids moléculaire purifié à partir de l'éponge *Crambe tailliezi*, appelé P3 (2200-2800 Da). Celui-ci est cytotoxique et induit une mort apoptotique des cellules d'ostéosarcome U-2 OS qui ne dépend pas des caspases mais qui est sensible à la molécule necrostatine-1. Ce métabolite induit également une inhibition spécifique des protéines kinases mitotiques Aurora A et B. Ces résultats, tout en soulignant l'importance d'étudier la chimiodiversité marine, ouvrent de nouvelles perspectives en recherche fondamentale et appliquée.

Mots clés : mort cellulaire régulée, mort apoptotique, inhibiteurs de kinases, produits naturels marins, pigments marins, chimiothérapie.

Study of the modulation of regulated cell death pathways by marine molecules

Abstract

The regulation of cell death is crucial for the life living beings. The programmed cell death (PCD) can be triggered by extra- or intracellular signals under physiological (PCD is essential for normal development and tissue homeostasis) or pathological conditions for eliminating impaired cells (notably with uncontrolled cell proliferation). The dysregulation of PCD contributes to a variety of human pathologies including cancer, neurodegenerative disorders and inflammatory diseases. The discovery of chemical modulators of PCD opens up promising prospects, particularly in anti-cancer therapy, but also in fundamental research, to improve our understanding of the molecular regulations involved. In the context of this thesis, various marine metabolites (pigments and purified metabolites from Mediterranean and Atlantic sponges, notably from the sponges *Crambe tailliezi* et *Crambe crambe*) were used to inhibit or activate non-canonical PCD. The cell death induced by the high molecular weight metabolite (2200-2800 Da), called P3, purified from the sponge *Crambe tailliezi*, was notably studied. P3 is a cytotoxic metabolite that induces a necrostatin-1 inhibitable caspase-independent apoptosis in human osteosarcoma cells (U-2 OS). P3 was also characterized as a new inhibitor of Aurora A and B mitotic kinases. Taken together, these results shed light on the huge potential of marine chemodiversity to open new perspectives for both applied and fundamental research.

Keywords: regulated cell death, apoptosis, kinase inhibitors, marine natural products, marine pigments, chemotherapy.