



HAL
open science

Sensibilisation de cellules de mélanome à la chimiothérapie par des flavonoïdes et caroténoïdes extraits de plantes du Brésil, de Nouvelle-Calédonie et de microalgues marines

Raimundo Gonçalves De Oliveira Junior

► **To cite this version:**

Raimundo Gonçalves De Oliveira Junior. Sensibilisation de cellules de mélanome à la chimiothérapie par des flavonoïdes et caroténoïdes extraits de plantes du Brésil, de Nouvelle-Calédonie et de microalgues marines. Biologie cellulaire. Université de La Rochelle, 2020. Français. NNT : 2020LAROS007 . tel-03235112

HAL Id: tel-03235112

<https://theses.hal.science/tel-03235112>

Submitted on 25 May 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.



LA ROCHELLE UNIVERSITE

ÉCOLE DOCTORALE EUCLIDE
Sciences et Technologie

Laboratoire Littoral Environnement et Sociétés (LIENSs) UMR 7266 CNRS
Equipe Biotechnologies et Chimie des Bioressources pour la Santé (BCBS)

THÈSE

Présentée par:

Raimundo GONÇALVES DE OLIVEIRA JUNIOR

Soutenue le 19 mai 2020
Pour l'obtention du grade de Docteur de La Rochelle Université
Discipline: Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie

Sensibilisation de cellules de mélanome à la chimiothérapie par des flavonoïdes et caroténoïdes extraits de plantes du Brésil, de Nouvelle-Calédonie et de microalgues marines

JURY :

Mme. BOURGOUGNON Nathalie
Mme. KRITSANIDA Marina
Mme. THIERY Valérie
M. SOL Vincent
M. FEUILLOLEY Marc
M. ALMEIDA Jackson

Professeure, Université Bretagne Sud, Rapportrice
Maître de conférences HDR, Université de Paris, Rapportrice
Professeure, La Rochelle Université, Examinatrice
Professeur, Université de Limoges, Examineur
Professeur, Normandie Université, Examineur
Professeur, Universidade Federal do Vale do São Francisco, Brésil, Membre invité

M. PICOT Laurent

Maître de conférences HDR, La Rochelle Université, Directeur de thèse

« Dans la vie, rien n'est à craindre, tout est à comprendre »

Marie Curie

REMERCIEMENTS

Je souhaite tout d'abord remercier le Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l'Innovation et La Rochelle Université pour avoir financé, encadré et soutenu cette thèse au sein du laboratoire LIENSs UMR 7266. Je remercie également le Comité 17 de la Ligue Nationale contre le Cancer et le projet Européen Interreg EnhanceMicroAlgae (EAPA_338/2016) pour leurs financements accordés au cours de ce travail.

Je souhaite remercier M. Olivier DE VIRON pour son accueil au sein du laboratoire LIENSs et Mme Ingrid FRUITIER-ARNAUDIN pour son accueil chaleureux au sein de l'équipe BCBS.

J'aimerais remercier Mme Nathalie BOURGOUGNON, Mme Marina KRITSANIDA, Mme Valérie THIERY, M. Vincent SOL, M. Marc FEUILLOLEY et M. Jackson ALMEIDA, membres du jury, d'avoir accepté d'évaluer mon travail. Je vous remercie pour les précieuses attentions que vous m'avez accordées.

Je voudrais exprimer ma plus sincère gratitude à mon directeur de thèse, M. Laurent PICOT, pour son soutien, sa rigueur scientifique, sa patience, sa disponibilité, mais surtout pour son amitié au cours de ces dernières années. Je vous remercie de m'avoir donné l'opportunité de réaliser cette thèse et pour tout ce que vous m'avez appris. J'espère avoir été à la hauteur de vos attentes et que nous pourrons continuer à travailler ensemble.

Je souhaiterais exprimer ma reconnaissance à mon ancien encadrant, M. Jackson ALMEIDA, pour son soutien tout au long de mon parcours scientifique, pour m'avoir guidé dans les bonnes directions et pour tout ce que vous m'avez appris, me permettant de développer cette thèse.

J'aimerais remercier M. Raphaël GROUGNET de m'avoir accueilli chaleureusement dans le laboratoire de Pharmacognosie à l'Université Paris Descartes. Je vous remercie pour toutes vos précieuses contributions à ce travail, pour votre soutien et votre amitié.

Je voudrais remercier Mme Elodie NICOLAU du laboratoire PBA (IFREMER, Nantes) pour son soutien, sa disponibilité et ses contributions à ce travail, toujours avec très bonne humeur.

Je souhaite remercier M. Edilson BESERRA de l'Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF, Brésil) pour ses contributions concernant les analyses de modélisation moléculaire.

Je souhaite remercier M. Nicolas JOGUET pour ses contributions concernant les analyses par microscopie électronique à balayage. Merci pour votre disponibilité.

Je remercie également tous les chercheurs, ingénieurs, techniciens et stagiaires du LIENSs qui ont participé à ce projet. Je pense en particulier à Antoine BONNET, Laureen BEAUGEARD et Grégoire PRUNIER, qui ont quitté La Rochelle, mais à qui je serai éternellement reconnaissant pour leur soutien et leurs contributions à ce travail. Merci également à Pierre-Edouard BODET pour son excellence scientifique et les contributions apportées à ce projet. Cette thèse n'aurait pas existé sans votre aide!

Je voudrais remercier le personnel administratif du LIENSs, en particulier Viviane BIOU, Laetitia DARRE et Marie CHIVAILLE, qui m'ont toujours aidé au cours de ces trois années, avec une très bonne humeur.

J'aimerais remercier tous mes collègues doctorants, Rémi COUSIN, Justine BODIN, Sabrina SALTAJI, Quentin HAGUET, Julia VINCENT, Claire TOUCHETEAU et Jérémy CARPENTIER, pour la bonne ambiance de ces trois années partagées.

Je remercie les Valérie du laboratoire, Valérie THIERY et Valérie SOPENA pour leur soutien, leur très bonne humeur et leur vitalité. L'équipe BCBS n'a pas la même puissance sans vous!

Je voudrais remercier tous mes camarades de bière(s) hebdomadaire(s), en particulier Judith RUMIN, Hugo GROULT, Antoine BONNET, Amandine ADRIEN, Pierre LOISON, Germain BOISSONNET, Béatrice COLIN, Romain FERRU-CLEMENT, Caroline TRAISNEL, Romain TRONCY, Livia CUPERTINO, Arthur GOUVEIA et Amanda CASTILHO. Merci pour tous les bons moments passés ensemble, vous allez tous me manquer!

Je remercie tous mes amis brésiliens qui ont partagé ces trois dernières années avec moi, Livia CUPERTINO, Carina SARTORI, Priscilla GOULARTE, Jana BRITO, Arthur GOUVEIA et Amanda CASTILHO. Sans vous, ça aurait été beaucoup plus dur!

Je remercie Christiane FERRAZ (bientôt Dr Christiane FERRAZ!) pour son soutien, son amour, sa patience, et pour avoir partagé toutes ces années à mes côtés, dans les bons moments mais aussi dans les moments difficiles.

Je remercie également mes parents Maria Socorro DOS SANTOS GONÇALVES et Raimundo GONÇALVES DE OLIVEIRA pour le soutien et pour m'avoir donné tous les moyens pour réussir dans ma vie professionnelle.

Finalement, je remercie toutes les forces de l'univers qui ont mis ces personnes merveilleuses sur ma route, qui m'ont donné la sagesse et le courage d'aller aussi loin et qui me font rêver chaque jour à la recherche d'un but plus grand.

SOMMAIRE

LISTE DES ABREVIATIONS	12
LISTE DES FIGURES	15
LISTE DES TABLEAUX	25
LISTE DES PRODUCTIONS SCIENTIFIQUES	28
1. INTRODUCTION	31
2. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	37
2.1. Oncogenèse et caractéristiques des cellules cancéreuses	39
2.1.1. <i>Autonomie de croissance</i>	41
2.1.2. <i>Insensibilité aux signaux antiprolifératifs</i>	42
2.1.3. <i>Instabilité génomique</i>	42
2.1.4. <i>Réplication illimitée</i>	43
2.1.5. <i>Echappement à l'apoptose</i>	43
2.1.6. <i>Echappement des cellules tumorales au système immunitaire</i>	46
2.1.7. <i>Microenvironnement tumoral et inflammation chronique</i>	47
2.1.8. <i>Invasivité tumorale et métastase</i>	48
2.1.9. <i>Néo-angiogenèse tumorale</i>	49
2.1.10. <i>Hypoxie et cellules tumorales</i>	49
2.2. Principales limitations des traitements anticancéreux actuels	50
2.3. Le mélanome, un modèle de tumeur particulièrement résistante aux traitements ...	52
2.3.1. <i>Définition</i>	52
2.3.2. <i>Epidémiologie</i>	54
2.3.3. <i>Progression et classification diagnostique</i>	55
2.3.4. <i>Mécanismes moléculaires impliqués dans le développement du mélanome</i>	59
2.3.4.1. <i>Dérégulation du cycle cellulaire</i>	59
2.3.4.2. <i>Altérations dans la voie RAS/RAF/MEK</i>	62
2.3.4.3. <i>Altérations dans la voie PI3K/AKT</i>	64
2.3.5. <i>Thérapies du mélanome</i>	67
2.3.5.1. <i>La chirurgie</i>	67
2.3.5.2. <i>La radiothérapie</i>	67
2.3.5.3. <i>La chimiothérapie conventionnelle</i>	67
2.3.5.4. <i>La bio-chimiothérapie</i>	68
2.3.5.5. <i>L'immunothérapie des tumeurs par blocage des récepteurs inhibiteurs des lymphocytes</i>	69
2.3.5.6. <i>La thérapie ciblée</i>	72
2.3.6. <i>Mécanismes de résistance à la chimiothérapie</i>	76
2.4. Les produits naturels comme source de nouvelles molécules pour le traitement du mélanome	82

2.4.1. <i>Produits naturels issus de plantes terrestres</i>	83
2.4.1.1. Les plantes médicinales du Brésil	87
2.4.1.2. Les plantes médicinales de la Nouvelle-Calédonie.....	95
2.4.1.3. Les pigments de plantes ayant un potentiel antimélanome: un focus sur les flavonoïdes et les caroténoïdes	99
2.4.2. <i>Produits naturels issus d'algues</i>	110
2.4.2.1. Les microalgues.....	112
2.4.2.2. Les pigments de microalgues ayant un potentiel antimélanome: un focus sur les chlorophylles et caroténoïdes	114
2.5. Sensibilisation tumorale: une nouvelle stratégie pour améliorer l'efficacité de la chimiothérapie et de la radiothérapie	124

3. PARTIE A: SENSIBILISATION DE CELLULES TUMORALES À LA CHIMIOTHÉRAPIE PAR DES PRODUITS NATURELS..... 127

CHAPITRE 1. SENSITIZATION OF TUMOR CELLS TO CHEMOTHERAPY BY NATURAL PRODUCTS: A SYSTEMATIC REVIEW OF PRECLINICAL DATA AND MOLECULAR MECHANISMS 131

1. Introduction	134
2. Materials and Methods	135
2.1. <i>Search strategy</i>	136
2.2. <i>Study selection</i>	136
2.3. <i>Data extraction</i>	136
2.4. <i>Methodological quality assessment</i>	136
3. Results	137
4. Discussion	163
4.1. <i>Curcumin</i>	165
4.2. <i>Resveratrol</i>	167
4.3. <i>Epigallocatechin-3-gallate</i>	171
5. Conclusion	172
References	173

4. PARTIE B: LES PLANTES DU BRÉSIL ET DE LA NOUVELLE-CALÉDONIE COMME SOURCE DE NOUVEAUX COMPOSÉS ACTIFS ET CHIMIOSENSIBILISANTS SUR LE MÉLANOME 189

CHAPITRE 2. POLYMETHOXYFLAVONES FROM *Gardenia oudiepe* (RUBIACEAE) INDUCE CYTOSKELETON DISRUPTION-MEDIATED APOPTOSIS AND SENSITIZE BRAF-MUTATED MELANOMA CELLS TO CHEMOTHERAPY 193

1. Introduction	196
2. Materials and Methods	197
2.1. <i>Plant material</i>	197
2.2. <i>Isolation of flavones 1–7 from G. oudiepe</i>	197
2.3. <i>Semi-synthesis of flavones 8-10 from kaempferol</i>	197

2.4. Cell line and culture conditions	198
2.5. Cell viability assay	198
2.6. Cell migration assay.....	198
2.7. Apoptosis analysis	199
2.7.1. Annexin-V/6-CFDA staining	199
2.7.2. Caspase-3 activity	199
2.8. Cell cycle analysis	199
2.9. Cytoskeleton analysis	200
2.9.1. Actin staining with phalloidin	200
2.9.2. Immunofluorescence assay for α -tubulin staining	200
2.10. Docking study.....	201
2.11. Chemosensitization of melanoma cells to chemotherapy.....	201
2.12. Statistical analysis.....	202
3. Results and Discussion	202
3.1. Structure-activity relationship.....	202
3.2. PMFs inhibit cell growth.....	205
3.3. PMFs induce apoptosis	205
3.4. PMFs induce cell cycle arrest	208
3.5. PMFs inhibit cell migration	208
3.6. PMFs promote cytoskeleton disruption.....	210
3.7. Molecular docking studies	213
3.8. Chemosensitizing effect	219
4. Conclusion.....	220
References	221

CHAPITRE 3. BIXIN, AN APOCAROTENOID ISOLATED FROM *Bixa orellana* L., SENSITIZES HUMAN MELANOMA CELLS TO DACARBAZINE-INDUCED APOPTOSIS THROUGH ROS-MEDIATED CYTOTOXICITY

1. Introduction	232
2. Materials and Methods	233
2.1. Plant material.....	233
2.2. Extraction	234
2.3. UPLC-DAD-MS/MS analysis	234
2.4. Isolation and characterization of bixin	235
2.5. Cell line and culture conditions	235
2.6. Cell viability assay	235
2.7. Cell migration assay.....	236
2.8. Apoptosis analysis	236
2.8.1. Annexin V-Cy3 and 6-CFDA detection assay	236
2.8.2. Caspase-3 colorimetric assay	236
2.9. Oxidative stress analysis	237
2.9.1. Determination of ROS levels	237
2.9.2. Determination of MDA levels.....	237
2.10. Cell cycle analysis	237

2.11. Statistical analysis.....	238
3. Results and Discussion	238
3.1. Chemical composition of bioactive <i>B. orellana</i> extracts.....	238
3.2. Purification and characterization of bixin.....	245
3.3. Exposure to bixin inhibits proliferation and migration of A2058 cells.....	247
3.4. Bixin potentiates antiproliferative and antimigratory activities of dacarbazine.....	247
3.5. Bixin enhances pro-apoptotic effect of dacarbazine.....	249
3.6. Bixin increases oxidative stress in combined treatment with dacarbazine.....	252
3.7. Cell cycle analysis.....	253
4. Conclusion	254
References	255

5. PARTIE C: LES MICROALGUES MARINES COMME SOURCE DE NOUVEAUX COMPOSÉS ACTIFS ET CHIMIOSENSIBILISANTS SUR LE MÉLANOME..... 261

CHAPITRE 4. CAROTENOIDS FROM <i>Rhodomonas salina</i> INDUCE APOPTOSIS AND SENSITIZE A2058 MELANOMA CELLS TO CHEMOTHERAPY	265
1. Introduction	268
2. Materials and Methods	269
2.1. Microalgae culture, harvest and freeze-drying.....	269
2.2. Sonication-assisted extraction of <i>R. salina</i> pigments.....	270
2.3. Scanning electron microscopy (SEM).....	270
2.4. UPLC-DAD-MS/MS analysis.....	270
2.5. Purification of alloxanthin and crocoxanthin.....	271
2.6. Cell viability assay.....	272
2.7. Cell migration assay.....	272
2.8. Annexin V-Cy3 / 6-CFDA analysis.....	272
2.9. Nuclear fragmentation.....	273
2.10. Caspase-3 activity.....	273
2.11. Cell cycle analysis.....	273
2.12. Sensitization of A2058 cells to vemurafenib and dacarbazine.....	273
2.13. Statistical analysis.....	274
3. Results and Discussion	274
3.1. Sonication-assisted extraction of <i>R. salina</i> pigments.....	274
3.2. Pigment profile of <i>R. salina</i> extract (<i>Rs-EtOH</i>).....	275
3.3. Antiproliferative activity of <i>Rs-EtOH</i>	279
3.4. Purification and characterization of alloxanthin and crocoxanthin.....	280
3.5. Alloxanthin and crocoxanthin inhibit proliferation of A2058 cells.....	282
3.6. Alloxanthin inhibits cell migration.....	283
3.7. Pro-apoptotic effect of alloxanthin and crocoxanthin.....	284
3.8. Alloxanthin and crocoxanthin induce accumulation of sub-G1 cells.....	287
3.9. Alloxanthin sensitizes A2058 cells to chemotherapy.....	288
4. Conclusion	291
References	291

CHAPITRE 5. UPDATED UPLC-DAD-MS/MS PIGMENT COMPOSITION OF <i>Tisochrysis lutea</i> AND PURIFICATION OF FUcoxANTHIN USING CENTRIFUGAL PARTITION CHROMATOGRAPHY FOR THE CHEMOSENSITIZATION OF MELANOMA CELLS	297
1. Introduction	300
2. Materials and Methods	301
2.1. <i>Microalgae culture, harvest and freeze-drying</i>	301
2.2. <i>Sonication-assisted extraction of <i>T. lutea</i> pigments</i>	302
2.3. <i>Scanning electron microscopy (SEM)</i>	302
2.4. <i>UPLC-DAD-MS/MS analysis</i>	303
2.5. <i>CPC biphasic solvent system</i>	304
2.6. <i>CPC pigments separation</i>	304
2.7. <i>Flash chromatography purification</i>	305
2.8. <i>Antimelanoma activity of fucoxanthin purified from <i>T. lutea</i></i>	305
2.8.1. <i>Antiproliferative activity</i>	305
2.8.2. <i>Chemosensitizing effect</i>	306
2.9. <i>Statistical analysis</i>	306
3. Results and Discussion	306
3.1. <i>Sonication-assisted extraction of <i>T. lutea</i> pigments</i>	306
3.2. <i>Pigment composition of <i>T. lutea</i></i>	308
3.3. <i>Physiological and chemotaxonomic relevance of <i>T. lutea</i> pigments composition</i>	313
3.4. <i>Fucoxanthin purification by CPC coupled to flash chromatography</i>	316
3.5. <i>Chemosensitizing activity of <i>T. lutea</i> purified fucoxanthin in melanoma cells</i>	321
4. Conclusion	324
References	325
6. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	331
RÉFÉRENCES	337

LISTE DES ABREVIATIONS

6-CFDA	<i>6-carboxyfluorescein diacetate</i>
ABC	<i>ATP-binding cassette</i>
Ac-DEVD-pNA	<i>Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp p-nitroanilide</i>
AcOEt	Acétate d'éthyle
ADH	Aldéhyde déshydrogénase
AGPI	Acides gras polyinsaturés
Allo	Alloxanthine
ATF-2	<i>Activating transcription factor 2</i>
CDK	Kinases dépendantes des cyclines
CDKN2A	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A</i>
CH ₂ Cl ₂	Dichlorométhane
CHCl ₃	Chloroforme
Chl	Chlorophylle
CI	<i>Combination index</i>
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CMT	Carboxyméthyltransférase
CPC	Chromatographie de partage centrifuge
Croco	Crocoxanthine
CSC	Cellules souches cancéreuses
CTLA-4	<i>Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4</i>
Daca	Dacarbazine
DHA	Acide docosahexaénoïque
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethyl sulfoxyde
EGCG	Epigallocatechine-3-gallate
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
EMBRAPA	<i>Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária</i>
EPA	Acide eicosapentaénoïque
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
ESI	<i>Electrospray ionization</i>
EtOH	Ethanol
FBS	<i>Fetal bovine serum</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FPP	Farnésyle diphosphate
Fuco	Fucoxanthine
GDP	Guanosine diphosphate
GGPP	Géranylgéranyle diphosphate
GPP	Géranyle diphosphate
GTP	Guanosine triphosphate
Hex	Hexane
HPLC	Chromatographie liquide de haute performance

iBRAF	Inhibiteurs BRAF
IC ₅₀	Concentration inhibant 50% de la croissance cellulaire
IL-2	Interleukine 2
iMEK	Inhibiteurs MEK
INF- α	Interféron alpha
iNOS	Oxyde nitrique synthase inductible
JAK	<i>Janus-kinase</i>
LCD	Lycopène dioxygénase
LDH	Lactate déshydrogénase
LT4	Lymphocytes T4
<i>m/z</i>	Rapport masse sur charge
MAPK	<i>Mitogen activated protein kinase</i>
MDA	Malondialdéhyde
MDM2	<i>Mouse double minute 2 homolog</i>
MDR	<i>Multidrug resistance</i>
MeOH	Méthanol
Mg	Magnésium
MMP	Métalloprotéases matricielles
MS	Spectrométrie de masse
MTT	Bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tetrazolium
NF-1	Neurofibromine-1
NF- κ B	<i>Nuclear factor κB</i>
NK	Cellules <i>natural-killer</i>
NO	Oxyde nitrique
OMS	Organisation mondiale de la santé
PCR	Phase de croissance radiale
PCV	Phase de croissance verticale
PD-1	<i>Programmed-cell-death protein 1</i>
PDA	Détecteur à photodiode
P-gp	Glycoprotéine P
PI3K	<i>Phosphoinositide 3-kinases</i>
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate
PIP ₃	Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate
PMF	Polyméthoxyflavone
pNA	<i>p-nitroanilide</i>
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homolog</i>
Rb1	<i>Retinoblastoma protein 1</i>
RMN	Résonance magnétique nucléaire
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
RTK	Récepteurs transmembranaires à activité tyrosine-kinase
SCF	<i>Stem cell factor</i>
STAT	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>
TAA	<i>Tumor-associated antigen</i>
TNM	<i>Tumor-node-metastasis</i>

UPLC	Chromatographie liquide d'ultra performance
UV	Rayons ultraviolets
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
Vemu	Vemurafenib
Zn	Zinc

LISTE DES FIGURES

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

- Figure 1.** Étapes impliquées dans le processus d'oncogenèse (initiation, promotion et progression)..... 40
- Figure 2.** Principales caractéristiques des cellules tumorales (*hallmarks of cancer cells*) (D'après Hanahan et Robert, 2017)..... 41
- Figure 3.** (A) Voies d'induction de l'apoptose: voie intrinsèque (liée à la libération du cytochrome c suite à l'activation de protéines pro-apoptotiques, p. ex. Bad, Bax et Bid) et voie extrinsèque (liée à l'activation de récepteurs de mort, entraînant l'activation des caspases effectrices, p. ex. caspase-3). (B) Mécanismes classiques d'évasion de l'apoptose dans les cellules tumorales. Les altérations les plus courantes sont indiquées en rouge et comprennent: inhibition des signaux pro-apoptotiques au détriment de l'activation des protéines anti-apoptotiques (p. ex. Bcl-2), sous-expression des caspases, expression défectueuse des récepteurs de mort et perte de sensibilité aux signaux antiprolifératifs 45
- Figure 4.** Mécanismes de chimiorésistance dans les cellules cancéreuses. Le développement de la chimiorésistance s'explique principalement par l'expression de pompes d'efflux ABC, l'inactivation de médicaments par des enzymes de détoxification et l'activation de voies de survie (expression de facteurs de survie, activation de mécanismes de réparation de l'ADN, surexpression de protéines anti-apoptotiques et inhibition de l'apoptose) 52
- Figure 5.** Les différentes couches de la peau (A) et de l'épiderme (B). La peau est constituée essentiellement de trois couches: l'épiderme, le derme et l'hypoderme. L'épiderme est composé de trois couches principales (cornée, épineuse et basale), formées par deux principaux types cellulaires: les mélanocytes (situés à la couche basale) et les kératinocytes. Images d'après INCa (2010) 53
- Figure 6.** Etapes d'initiation et de progression du mélanome cutané et principales mutations associées. La prolifération de mélanocytes normaux en réponse à l'exposition aux rayons UV entraîne la formation de naevi bénins ou dysplasiques. Le mélanome en phase de croissance radiale (PCR) présente la capacité de croître par voie intra-épidermique et envahit le derme en phase de croissance verticale (PCV), ce qui peut aboutir à la formation de métastases. D'après Zaidir, Day et Merlino (2008) 56
- Figure 7.** Stades de progression du mélanome proposés par Clark, en fonction du niveau d'invasion tumorale (image adapté d'après www.medicalindependent.ie/)..... 57
- Figure 8.** Principales voies de signalisations impliquées dans la régulation du cycle cellulaire et leurs respectives altérations dans les cellules de mélanome. Le gène *CDKN2A* est souvent muté dans les cellules de mélanome, provoquant une expression diminuée des protéines

régulatrices du cycle cellulaire (p14 et p16). Ces protéines peuvent également être mutées, ainsi que les cyclines et les CDKs, conduisant à la progression du cycle cellulaire 61

Figure 9. Signalisation RAS/RAF/MEK dans les mélanocytes, permettant le contrôle du cycle cellulaire et des voies de prolifération et survie cellulaire dans des conditions normales. Dans les cellules de mélanome, les mutations des protéines RAS, BRAF, CDKN2A, p16, p14, p53 et PTEN provoquent une activation constitutive de cette voie, entraînant une signalisation proliférative excessive..... 63

Figure 10. Fréquence des mutations des gènes codant pour les protéines de la voie de signalisation RAS/RAF/MEK, d'après Cheng, Zhang, et Li (2013) 64

Figure 11. Signalisation PI3K/AKT et ses effets sur la libération de la β -caténine et, par conséquent, sur la prolifération cellulaire. Dans les cellules de mélanome, le principal facteur régulateur de cette voie (PTEN) peut être muté, favorisant une signalisation cellulaire proliférative excessive..... 66

Figure 12. Mode d'action des inhibiteurs de PD-1 (pembrolizumab et nivolumab) utilisés en immunothérapie pour le traitement du mélanome métastatique 70

Figure 13. Mécanisme d'action du médicament ipilimumab, utilisé en immunothérapie du mélanome. L'ipilimumab bloque le récepteur CTLA-4 inhibiteur de l'activité lymphocytaire par interaction avec le facteur B7 71

Figure 14. Structure chimique des inhibiteurs BRAF utilisés pour traiter le mélanome métastatique..... 73

Figure 15. Structure chimique des inhibiteurs MEK1 et MEK2 utilisés pour traiter le mélanome métastatique..... 74

Figure 16. Principaux mécanismes visés dans la thérapie ciblée du mélanome métastatique. 76

Figure 17. Aberrations dans la voie de signalisation MAPK (RAS/RAF/ERK) conduisant à la chimiorésistance. Le BRAF^{V600E} est inhibé par les iBRAFs, provoquant l'inactivation de la voie MAPK. L'amplification ou l'épissage alternatif du BRAF^{V600E} (BRAF^{mut}) réactive la voie MAPK dans les tumeurs résistantes aux iBRAFs. De plus, la voie MAPK peut être réactivée par des mutations affectant les protéines NF1, NRAS ou MEK dans les tumeurs résistantes aux iBRAFs..... 79

Figure 18. Mécanismes de résistance indépendants de la réactivation MAPK. L'activation de RTK, des mutations dans PI3K ou AKT, ou des mutations de perte de fonction dans PTEN, peuvent médier la résistance à la chimiothérapie par la réactivation de la voie PI3K/AKT.... 81

Figure 19. Structure chimique des vinca-alcaloïdes (vincristine et vinblastine) et du paclitaxel, principaux représentants de la chimiodiversité des plantes terrestres, utilisés pour le traitement du mélanome cutané..... 85

Figure 20. Exemples de la diversité de molécules extraites de plantes terrestres présentant un potentiel antimélanome (photos: <i>global biodiversity information facility</i> , GBIF).....	87
Figure 21. Répartition géographique des différents biomes du territoire brésilien, d'après l'EMBRAPA (EMBRAPA, 2010)	88
Figure 22. Exemples de plantes médicinales à haute valeur ajoutée provenant de la forêt amazonienne (photos: EMBRAPA et www.toptropicals.com).....	89
Figure 23. Exemples de plantes médicinales à haute valeur ajoutée provenant du Cerrado (photos: EMBRAPA)	90
Figure 24. Exemples de plantes médicinales à haute valeur ajoutée provenant du Pantanal (photos: GBIF, www.gbif.org)	91
Figure 25. Exemples de plantes médicinales à haute valeur ajoutée provenant de la Caatinga (photos: EMBRAPA)	92
Figure 26. Exemples de plantes médicinales à haute valeur ajoutée provenant de la forêt atlantique (photos: EMBRAPA)	93
Figure 27. Exemple de plante médicinale à haute valeur ajoutée provenant de la Pampa (photo: www.floradobrasil.jbrj.gov.br).....	94
Figure 28. Répartition géographique des différents biomes du territoire Calédonien, d'après la Maison de la Nouvelle Calédonie (Viratelle, 2016).....	96
Figure 29. Diversité structurale de composés bioactifs isolés de plantes médicinales de la Nouvelle-Calédonie.....	97
Figure 30. Flavonoïdes bioactifs isolés et/ou préparés à partir de <i>G. oudiepe</i> et/ou <i>G. urvillei</i> , endémiques de la Nouvelle-Calédonie (photos: www.endemia.nc)	99
Figure 31. Diversité structurale des flavonoïdes	100
Figure 32. Voie de biosynthèse des flavonoïdes simplifiée d'après Falcone Ferreyra, Rius, et Casati, 2012.....	101
Figure 33. Principaux flavonoïdes présentant une activité anticancéreuse sur des modèles de mélanome murin et/ou humain.....	103
Figure 34. Illustration de la diversité structurale des caroténoïdes. Groupements terminaux possibles par cyclisation et modifications structurales identifiées dans les caroténoïdes naturels. D'après http://carotenoiddb.jp/	106
Figure 35. Voie de biosynthèse des caroténoïdes simplifiée, d'après Britton (1993).....	108

Figure 36. Voie de biosynthèse de la bixine proposée par Bouvier, Dogbo, et Camara (2003), l'apocaroténoïde majoritaire de la plante <i>Bixa orellana</i> (photos: www.floradobrasil.jbrj.gov.br)	109
Figure 37. Diagramme montrant l'évolution de la diversité taxonomique algale par endosymbiose en série (A, B et C représentent respectivement les endosymbioses primaire, secondaire et tertiaire). Les microalgues sont réparties dans différentes divisions taxonomiques en fonction de leurs caractéristiques cellulaires, de leur composition pigmentaire et de leurs polysaccharides de réserve. D'après Delwiche (1999)	111
Figure 38. Diversité de molécules produites par les microalgues: caroténoïdes (ex. péricoumarine et alloxanthine), chlorophylles (ex. chlorophylle c2), phycobiliprotéines (ex. phycoérythrine), stéroïdes (ex. brassicastérol), etc.....	114
Figure 39. Diversité structurale des chlorophylles	116
Figure 40. Voie de biosynthèse des chlorophylles d'après Roy et al. (2011)	117
Figure 41. Principaux produits de dégradation de la chlorophylle <i>a</i>	118
Figure 42. Diversité structurale et principales voies de biosynthèse de caroténoïdes retrouvés chez les microalgues. <i>1a, b, c</i> : LCYB/CrtL-b, CruA et CruP (lycopène β -cyclase); <i>2a, b, c</i> : CrtR, CHYB/CrtZ, CYP97A (carotène β -hydroxylase); <i>3a, b</i> : BKT/CrtW, CrtO (carotène β -kétolase); <i>4</i> : ZEP (zéaxanthine époxydase); <i>5</i> : VDE (violaxanthine dé-époxydase); <i>6</i> : NSY (néoxanthine synthase); <i>?</i> : voie métabolique inconnue ou pas complètement élucidée. D'après Roy et al. (2011).....	120
Figure 43. Exemples de caroténoïdes de microalgues présentant une activité anticancéreuse sur des modèles de mélanome murin et/ou humain	123

CHAPITRE 1

Figure 1. General drug resistance mechanisms implicated in cancer therapy and possibilities of intervention of natural products (NP) as chemosensitizer agents	135
Figure 2. Flowchart detailing literature search according to PRISMA statement	138
Figure 3. Distribution of the selected studies by country (A), year of publication (B), type of cancer studied (C) and chemical class of natural product evaluated as chemosensitizer (D).152	
Figure 4. Chemical structure of the major natural compounds evaluated as chemosensitizer agents (<i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> evidences)	162
Figure 5. Methodological quality assessment of included <i>in vivo</i> studies. <i>Light bars</i> indicate the proportion of articles that met each criterion; <i>dark bars</i> indicate the proportion of studies	

that did not and *white gray bars* indicate the proportion of studies with unclear or insufficient answers 163

Figure 6. Molecular mechanisms of curcumin-mediated chemosensitization. Curcumin modulates signaling pathways involved in apoptosis, cell proliferation, invasion, metastasis and angiogenesis 167

Figure 7. Molecular mechanisms of resveratrol-mediated chemosensitization. Resveratrol interferes in the expression of adhesion molecules and in the stability of the cell cycle (A), and modulates signaling pathways involved in apoptosis, cell proliferation, invasion, metastasis and angiogenesis (B)..... 170

Figure 8. Molecular mechanisms of epigallocatechin-3-gallate (EGCG)-mediated chemosensitization. EGCG modulates signaling pathways involved in apoptosis, cell proliferation, invasion, metastasis and angiogenesis 172

CHAPITRE 2

Figure 1. Effect of PMFs **2** and **3** on A2058 melanoma cells viability. Cells were cultured in the presence of increasing concentrations of molecules (1 – 20 μ M) for 72h and then cell viability was determined by the MTT assay. Results are expressed as mean \pm SEM of at least three independent measurements 205

Figure 2. Pro-apoptotic effect of PMFs **2** (4 μ M, \sim IC₅₀) and **3** (8 μ M, \sim IC₅₀) on A2058 melanoma cells. (A) Photomicrographs were obtained after 72h of treatment using Annexin-V/6-CFDA double staining + DAPI for DNA staining of permeable cells. (B) Caspase-3 activity was determined by colorimetric assay. Staurosporine (2 μ M, 4h) was used as positive control. Data are expressed as mean \pm SEM, * p < 0.05 (vs. control group), according to ANOVA one-way followed by Tukey's post-test (n=3). 207

Figure 3. Effects of PMFs **2** (4 μ M, \sim IC₅₀) and **3** (8 μ M, \sim IC₅₀) on cell cycle progression after 72h of treatment. After incubation, melanoma cells were stained with propidium iodide and measured by flow cytometry, as shown in the quantitative distribution of cells in different phases of cell cycle (A) and in the representative histograms (B). Data are expressed as mean \pm SEM, * p <0.05 (vs. control group) according to ANOVA one-way followed by Tukey's post-test, from at least three independent measurements (n=3) 208

Figure 4. Effect of compounds **2** (2 μ M, \sim 1/2IC₅₀) and **3** (4 μ M, \sim 1/2IC₅₀) on cell mobility after 24h (A) and 48h (B) of treatment. Photomicrographs illustrate cell migration into the zone free of cells according to the treatment (C). Data are expressed as mean \pm SEM, * p <0.05 (ANOVA one-way followed by Tukey's post-test), from at least three independent measurements 210

Figure 5. Effect of PMFs **2** (4 μ M, IC₅₀) and **3** (8 μ M, IC₅₀) on actin filaments of A2058 cells. After 24h of treatment, cells were fixed, permeabilized and actin filaments were stained with

TRITC-conjugated phalloidin. DAPI was used for DNA staining. Photomicrographs were obtained under fluorescence microscope. Note the stress fiber formation in control cells and the decreasing of actin filaments and perinuclear accumulation of F-actin in PMF **2** and **3**-treated cells..... 211

Figure 6. Effect of PMF **2** (4 μ M, IC₅₀) and **3** (8 μ M, IC₅₀), nocodazole (50 nM) and paclitaxel (50 nM) on microtubules organization of A2058 cells. After 24h of treatment, melanoma cells were fixed, permeabilized and α -tubulin was stained with a FITC-conjugated anti- α -tubulin monoclonal antibody. Photomicrographs were obtained under fluorescence microscope. Note intact microtubule network in control cells, while PMFs **2** and **3**-treated cells showed tubulin depolymerization (rounding morphology and perinuclear accumulation of tubulin), similar to nocodazole-treated cells 213

Figure 7. Binding sites of nocodazole (left) and colchicine (right) in tubulin. Both ligands are in magenta 214

Figure 8. A1 and A2: Native (orange) and post-redocking (blue) conformations of colchicine and nocodazole in 3D view; B1 and B2: post-redocking complexes in 2D visualization, showing the interactions with specific amino acids (in green, hydrophobic *aa*; in cyan, polar *aa*; in blue, positively charged *aa*; in red, acid *aa*). 215

Figure 9. A1: Most stable pose of **2**; A2: Best poses of **2** (in cyan the most stable); A3: Best pose of **2** in 2D visualization; B1: Most stable pose of **3**; B2: Best poses of **3** (in cyan the most stable); B3: Best pose of **3** in 2D visualization.. 217

Figure 10. Superimposed structures of native colchicine (orange) and best poses of **2** (cyan) and **3** (green). In the protein 3D images, the A domain is in red and B domain in blue..... 218

Figure 11. Chemosensitizing effect of PMFs **2** and **3** on A2058 cells. (A): antiproliferative effect of vemurafenib (Vemu, 1–100 μ M) alone or in the presence of compounds **2** and **3** ($\sim \frac{1}{2}$ IC₅₀). (B): antiproliferative effect of dacarbazine (Daca, 1–100 μ M) alone or in the presence of compounds **2** and **3** ($\sim \frac{1}{2}$ IC₅₀). (C): combination index for the association of dacarbazine with PMF **2**. (D) photomicrographs show reduction of cell density promoted by combined therapy, compared to monotherapies and control group. Results are expressed as mean \pm SEM, * p <0.05 according to unpaired Student's *t* test, from at least three independent measurements.. 220

CHAPITRE 3

Figure 1. UPLC-DAD chromatograms of Hex-Bo (A), CHCl₃-Bo (B) and EtOAc-Bo (C) at 460 nm. Figure inset was processed at 320 nm. Peak characterization is given in table 2 240

Figure 2. Total ion chromatograms (TICs) of Hex-Bo (A), CHCl₃-Bo (B) and EtOAc-Bo (C), in positive mode ionization. Peak characterization is given in table 2 241

Figure 3. Chemical structure of compounds identified in <i>B. orellana</i> extracts. Compound number is in accordance with peak number presented in Figures 1 and 2, and Table 1	242
Figure 4. Fragmentation study of compounds 2 (A) and 5 (B)	245
Figure 5. UPLC-DAD chromatogram (A), UV spectrum (B), MS ² -ESI spectrum in positive mode ionization (C), ¹ H NMR (D) and ¹ H- ¹ H COSY (E) spectra of 9'-Z-bixin (bixin) purified from <i>B. orellana</i>	246
Figure 6. Effect of bixin (0.1-100 μM) on cell viability (A) and cell migration (B). Photomicrographs represent the reduction of cell population (A) and cell migration into the zone free of cells (B) according to the treatment. Data are expressed as mean ± SEM, * <i>p</i> <0.05 (ANOVA one-way followed by Tukey's post-test)	247
Figure 7. Antiproliferative activity of bixin combined to vemurafenib (vemu) (A) and dacarbazine (daca) (B) in the MTT assay. Photomicrographs show reduction of cell population and cell shrinkage promoted by dacarbazine and bixin + dacarbazine treatments (C). Data are expressed as mean ± SEM, * <i>p</i> <0.05 according to unpaired Student's <i>t</i>	248
Figure 8. Bixin enhances antimigratory effect of dacarbazine (A). Photomicrographs represent cell migration into the zone free of cells according to the treatment (B). Data are expressed as mean ± SEM, * <i>p</i> <0.05 (<i>vs</i> control group) and # <i>p</i> <0.05 (<i>vs</i> . dacarbazine), according to ANOVA one-way followed by Tukey's post-test	249
Figure 9. Bixin improves pro-apoptotic effect of dacarbazine. Fluorescent micrographs represent A2058 cells after Annexin V (red), 6-CFDA (green) and DAPI (blue) staining (A). Caspase-3 activity was evaluated after 72h of treatment (B). Cells were treated with bixin 50 μM, dacarbazine 50 μM (daca) or combined therapy (bixin + daca). Data are expressed as mean ± SEM, * <i>p</i> <0.05 (<i>vs</i> . control group) and # <i>p</i> <0.05 (<i>vs</i> . dacarbazine), according to ANOVA one-way followed by Tukey's post-test	251
Figure 10. Effect of bixin 50 μM, dacarbazine 50 μM (daca), and combined therapy (bixin + daca) on qualitative (A) and quantitative (B) ROS generation and MDA production (C) in A2058 cells. Data are expressed as mean ± SEM, * <i>p</i> <0.05 (<i>vs</i> . control group) and # <i>p</i> <0.05 (<i>vs</i> . bixin and dacarbazine groups), according to ANOVA one-way followed by Tukey's post-test	253
Figure 11. Effect of bixin 50 μM, dacarbazine 50 μM (daca) and combined therapy (daca + bixin) on different phases of cell cycle. A2058 cells were treated for 72h, stained with propidium iodide and measured by flow cytometry, as shown in the representative histograms (A) and quantitative distribution of cells in different phases of cell cycle (B). Data are expressed as mean ± SEM, * <i>p</i> <0.05 (<i>vs</i> . control group) according to ANOVA one-way followed by Tukey's post-test.	254

CHAPITRE 4

- Figure 1.** *Rhodomonas salina* strain CCAP 978/27. ©IFREMER, Nantes, France 270
- Figure 2.** Scanning electron microscopy observation of freeze-dried *R. salina* cells before (A, B) and after sonication-assisted extraction (C, D). Magnification $\times 3000$ (A, C), $\times 12000$ (B, D) 275
- Figure 3.** UPLC-DAD (300-800 nm, full scan) (A) and UPLC-ESI-MS(+) (B) chromatograms of Rs-EtOH. Peak characterization is given in Table 1 276
- Figure 4.** Chemical structures of the main identified pigments in *R. salina* extract (Rs-EtOH) 279
- Figure 5.** Antiproliferative activity of Rs-EtOH ($1-100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) against A2058 cells (A). Microphotographs of melanoma cells after a 72 h exposition to a control cell culture medium, or to a medium containing 50 and $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ Rs-EtOH (B). Results are expressed as mean \pm Standard Error of the Mean (SEM), from at least three independent measurements ($n=3$)... 280
- Figure 6.** Flash liquid chromatography of Rs-EtOH. Chromatogram of 450 nm-monitored elution with definition of fractions (F1-F10) collected for UPLC-DAD-MS/MS characterization and pharmacological assays (A). Fractions (F1-F10) obtained after elution (B). F5 and F8 represent alloxanthin and crocoxanthin, respectively 281
- Figure 7.** Growth inhibition of A2058 cells after exposure to increasing concentrations ($1-100 \mu\text{M}$, 72h) of alloxanthin and crocoxanthin (A). Treatments with alloxanthin and crocoxanthin evoked reduction in cell density, cell shrinkage and rounding (black arrows) (B and C). Results are expressed as mean \pm SEM, from at least three independent measurements ($n=3$) 283
- Figure 8.** Antimigratory activity of alloxanthin ($14.5 \mu\text{M}$, $\frac{1}{2}\text{IC}_{50}$) and crocoxanthin ($25 \mu\text{M}$, $\frac{1}{2}\text{IC}_{50}$) after 24h (A) and 48h (B) of exposure. Photomicrographs represent cell migration into the zone free of cells according to the treatment (C). Data are expressed as mean \pm SEM, $*p<0.05$ (ANOVA one-way followed by Tukey's post-test), from at least three independent measurements ($n=3$) 284
- Figure 9.** Alloxanthin ($29 \mu\text{M}$, IC_{50}) and crocoxanthin ($50 \mu\text{M}$, IC_{50}) induce apoptosis in A2058 cells, after 72h of treatment. Annexin V (red) and 6-CFDA (green) double staining was observed by fluorescence microscopy. Melanoma cells in early apoptosis show both red and green stains, while cells in late apoptosis show only red stain, and untreated cells (control) are stained green only. Treated cells also presented cell shrinkage and rounding, cell clumps and apoptotic bodies formation 285
- Figure 10.** Nuclear fragmentation (A) and caspase-3 activation (B) in A2058 cells exposed to alloxanthin ($29 \mu\text{M}$, IC_{50}) and crocoxanthin ($50 \mu\text{M}$, IC_{50}) during 72h of treatment. Arrows point Blebbing, DNA condensation and fragmentation after DAPI staining (A). Enzymatic

activity ($\mu\text{mol pNA}/\text{min}/\text{ml}$) is expressed as mean \pm SEM (B), with $*p < 0.05$ (vs. control group), according to ANOVA one-way followed by Tukey's post-test ($n=3$)..... 287

Figure 11. Effect of alloxanthin (29 μM , IC_{50}) and crocoxanthin (50 μM , IC_{50}) on different phases of cell cycle (Sub-G1, G1/G0, S, G2/M). A2058 cells were treated for 72h, stained with propidium iodide and measured by flow cytometry, as shown in the quantitative distribution of cells in different phases of cell cycle (A) and in the representative histograms (B). Data are expressed as mean \pm SEM, $*p < 0.05$ (vs. control group) according to ANOVA one-way followed by Tukey's post-test, from at least three independent measurements ($n=3$)..... 288

Figure 12. Antiproliferative activity of alloxanthin (allo, 14.5 μM) and crocoxanthin (croco, 25 μM) combined to vemurafenib (vemu) (A) and dacarbazine (daca) (B) in the MTT assay. A2058 cells were grown for 72h with increasing concentrations of the anticancer drugs (1-100 μM) in the presence or absence of the carotenoids ($1/2\text{IC}_{50}$). (C) Photomicrographs show reduction of cell density promoted by combined therapies, compared to monotherapies and control groups. Data are expressed as mean \pm SEM, $*p < 0.05$ according to unpaired Student's t test, from at least three independent measurements ($n=3$). 289

Figure 13. Combination index (CI) for the association of alloxanthin (14.5 μM , $1/2\text{IC}_{50}$) with vemurafenib (1-100 μM) (A) or dacarbazine (1-100 μM) (B) in the MTT assay (72h of treatment), calculated according to data shown in Table 3. $\text{CI} = 1$ indicates additive effect, $\text{CI} < 1$ indicates synergism, and $\text{CI} > 1$ indicates antagonism, according to Chou-Talalay method 291

CHAPITRE 5

Figure 1. *Tisochrysis lutea* (T-Iso CCAP 927/14). ©IFREMER, Nantes, France 302

Figure 2. Scanning electron microscopy analysis of freeze-dried *T. lutea* cells before (A and B) and after sonication-assisted extraction (C and D). Magnification $\times 6000$ (A and C) and $\times 12000$ (B and D)..... 307

Figure 3. UPLC-DAD chromatogram (full scan, 300-800 nm) of Tl-EtOH. Peak characterization is shown in Table 2 308

Figure 4. UV, MS (ESI^+) and MS/MS (ESI^+) spectra (A, B and C, respectively) of fucoxanthin identified in Tl-EtOH (peak 1, Fig. 3)..... 309

Figure 5. Chemical structures of the main pigments found in Tl-EtOH..... 313

Figure 6. Flowchart of the separation and purification of fucoxanthin from *T. lutea* ethanol extract (Tl-EtOH) using CPC. 750 mg Tl-EtOH were injected into CPC and separated in fractions collected during elution and extrusion. Fractions containing similar composition after TLC monitoring were pooled and dried. Pooled fractions containing fucoxanthin were analysed

by UPLC-DAD to determine the fucoxanthin concentration. A final purification step was performed by flash chromatography to obtain highly purified fucoxanthin 317

Figure 7. (A) UPLC-DAD chromatograms at 450 nm of fucoxanthin-enriched fractions (F1 to F5) obtained after CPC separation. (B) Fucoxanthin content (% w/w) was calculated after normalization of data vs a calibration curve obtained with standard fucoxanthin (purity>99%, Sigma-Aldrich®). All measurements were performed in triplicate 318

Figure 8. Flash chromatography of fucoxanthin-enriched fractions (F1 to F5). Purification was monitored at 450 nm and the peak corresponding to fucoxanthin (highlighted in orange) was collected for further analysis by UPLC-DAD 319

Figure 9. (A) UPLC-DAD chromatograms at 450 nm of fucoxanthin-enriched fractions (F1 to F5) obtained after final flash chromatography of CPC pooled fractions. (B) Fucoxanthin purity (% w/w) was calculated after normalization of data vs a calibration curve obtained with standard fucoxanthin (purity>99%, Sigma-Aldrich®). All measurements were performed in triplicate..... 319

Figure 10. Antiproliferative activity of fucoxanthin (A), dacarbazine (Daca), vemurafenib (Vemu) and the respective combined treatments (B and C) in the MTT assay. A2058 cells were grown for 72h with increasing concentrations of the antimelanoma drugs (1–100 μM) in the absence or presence of fucoxanthin (1/2IC₅₀, 7.5 μM). Photomicrographs (D) show reduction of cell density promoted by combined therapies compared to monotherapies and control untreated cells. Data are presented as mean ± SEM, **p*<0.05 according to unpaired Student's *t* test, from at least three measurements 322

Figure 11. Combination index (CI) calculated for the association of fucoxanthin (Fuco) with dacarbazine (Daca, A) and vemurafenib (Vemu, B) in the MTT assay. CI = 1 indicates additive effect, CI < 1 indicates synergistic effect, while CI > 1 indicates antagonistic effect according to Chou-Talalay method 324

LISTE DES TABLEAUX

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Tableau 1. Classification TNM (Tumor-Node-Metastasis) des stades évolutifs du mélanome (Balch et al., 2009)	57
Tableau 2. Les quatre stades évolutifs principaux du mélanome (I, II, III et IV) selon les critères proposés par la classification TNM (Balch et al., 2009)	59
Tableau 3. Principales associations d'inhibiteurs BRAF et MEK utilisées dans le traitement du mélanome métastatique (stade III et IV) (Schadendorf, van Akkooi, et al., 2018).....	75
Tableau 4. Principaux mécanismes de résistance au traitement ciblé du mélanome (Chen et Davies, 2014)	77
Tableau 5. Récapitulatif des principaux effets de flavonoïdes extraits de plantes sur des cellules de mélanome	104
Tableau 6. Principales espèces de microalgues étudiées et leurs différents domaines d'application (Mobin et Alam, 2017; Mobin, Chowdhury, et Alam, 2019; Rumin et al., 2020)	113
Tableau 7. Récapitulatif des effets des principaux caroténoïdes extraits de microalgues testés sur des cellules de mélanome	121

CHAPITRE 1

Table 1. General characteristics of included studies (<i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> reports)	139
Table 2. <i>In vivo</i> studies involving natural compounds as chemosensitizer agents.....	154

CHAPITRE 2

Table 1. Chemical structures and antiproliferative activity of compounds 1-10	204
Table 2. Binding energies and RMSD values for the docked compounds (PMFs 2 and 3 , colchicine and nocodazole)	215
Table 3. Effect of monotreatments (vemurafenib or dacarbazine) and combined treatments (vemurafenib or dacarbazine + PMFs 2 or 3) on A2058 melanoma cells. Data are presented as IC ₅₀ values and 95% confidence intervals.....	219

CHAPITRE 3

Table 1. Chemical structures and antiproliferative activity of compounds 1-10	239
Table 2. Binding energies and RMSD values for the docked compounds (PMFs 2 and 3 , colchicine and nocodazole)	243
Table 3. Effect of monotreatments (vemurafenib or dacarbazine) and combined treatments (vemurafenib or dacarbazine + PMFs 2 or 3) on A2058 melanoma cells. Data are presented as IC ₅₀ values and 95% confidence intervals.....	248

CHAPITRE 4

Table 1. Identified pigments in Rs-EtOH by UPLC-DAD-MS/MS analysis. Peak number according to Figure 3.....	277
Table 2. UPLC-DAD-MS/MS characterization of F5 (alloxanthin) and F8 (crocoxanthin), purified according to chromatogram presented in Figure 6	282
Table 3. Antiproliferative activity of monotherapies and combined therapies against A2058 cells. Data are presented as IC ₅₀ values and 95% confidence interval. For combined therapy, increasing concentrations of vemurafenib and dacarbazine (1-100 µM) were associated to ½IC ₅₀ of alloxanthin (14.5 µM) and crocoxanthin (25 µM)	290

CHAPITRE 5

Table 1. Determination of <i>K</i> values for fucoxanthin (Fuco) in different solvent systems, as [Fuco] _{upper} / [Fuco] _{lower}	304
Table 2. Pigments identified in TI-EtOH by UPLC-DAD-MS/MS analysis. Peak number according to Figure 3.....	310
Table 3. Taxonomic analysis of pigments identified in TI-EtOH. HAPTO-3: taxonomic group of haptophytes according to [42] and [7]	315
Table 4. Fucoxanthin content (mass and massic percentage) in CPC pooled fractions and after final purification by flash chromatography. Fucoxanthin dosage was performed in triplicate by UPLC-DAD analysis at 450 nm, using commercial fucoxanthin (purity >99%, Sigma-Aldrich®) as standard ($R^2=0.9994$)	320
Table 5. Comparison of fucoxanthin extraction yields and purities obtained using various extraction and purification methods starting from seaweeds and microalgae	320

Table 6. Antiproliferative activity of fucoxanthin (Fuco), vemurafenib (Vemu), dacarbazine (Daca) and combined treatments (Vemu + Fuco and Daca + Fuco). Data are expressed as IC₅₀ values and 95% confidence interval, from at least three measurements (n=3). For combined treatments, increasing concentrations of vemurafenib or dacarbazine (1–100 μM) were associated to ½IC₅₀ of fucoxanthin (7.5 μM)..... 323

LISTE DES PRODUCTIONS SCIENTIFIQUES

PUBLICATIONS DE LA THESE

1. Oliveira-Júnior R.G., Ferraz C.A.A., Almeida, J.R.G.S., Grougnet R., Thiéry V., Picot L. Sensitization of tumor cells to chemotherapy by natural products: A systematic review of preclinical data and molecular mechanisms. *Fitoterapia*, 129: 383-400, 2018.
2. Oliveira-Júnior R.G., Bonnet A., Braconnier E., Groult H., Prunier G., Beugeard L., Grougnet R., Almeida J.R.G.S., Ferraz C.A.A., Picot L. 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, 2019.
3. Oliveira-Júnior R.G., Nicolau E., Bonnet A., Prunier G., Beugeard L., Joguet N., Thiéry V., Picot L. Carotenoids from *Rhodomonas salina* induce apoptosis and sensitize A2058 melanoma cells to chemotherapy. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* (sous presse).
4. Oliveira-Júnior R.G., Marcoult-Fréville N., Prunier G., Beugeard L., Alencar-Filho E.B., Mourão E.D.S., Michel S., Quintans-Júnior L.J., Almeida J.R.G.S., Grougnet R., Picot L. Polymethoxyflavones from *Gardenia oudiepe* (Rubiaceae) induce cytoskeleton disruption-mediated apoptosis and sensitize BRAF-mutated melanoma cells to chemotherapy. *Chemico-Biological Interactions* (soumise).
5. Oliveira-Júnior R.G., Grougnet R., Bodet P.E., Bonnet A., Nicolau E., Jebali A., Rumin J., Picot L. Updated UPLC-DAD-MS/MS pigment composition of *Tisochrysis lutea* and purification of fucoxanthin using centrifugal partition chromatography for the chemosensitization of melanoma cells. *Algal Research* (soumise).

PUBLICATIONS PARALLELES A LA THESE

1. Oliveira-Júnior R.G., Silva M.G., Ferraz C.A.A., Alencar-Filho E.B., Mendes S.Y.E., Bouzidi C.B., Dumontet V., Almeida J.R.G.S., Picot L., Grougnet R. Polymethoxyflavones from *Gardenia oudiepe* (Rubiaceae) and semisynthetic kaempferol derivatives: *in vivo* antinociceptive activity and molecular docking analyses. *Bioorganic Chemistry* (soumise).
2. Ferraz C.A.A., Oliveira-Júnior R.G., Oliveira A.P., Groult H., Beugeard L., Picot L., Alencar-Filho E.B., Almeida J.R.G.S., Nunes X.P. Complexation with β -cyclodextrin enhances apoptosis-mediated cytotoxic effect of harman in chemoresistant BRAF-mutated melanoma cells. *Bioorganic Chemistry* (soumise).

3. Rumin J., Nicolau E., Oliveira-Júnior R.G., Fuentes-Grünewald C., Flynn K.J., Picot L. A bibliometric analysis of microalgae research and markets in the world, Europe and the European Atlantic Area. *Marine Drugs*, 18(79): 1-33, 2020.

COMMUNICATIONS ORALES

1. Oliveira-Júnior R.G., Oliveira A.P., Bonnet A., Almeida J.R.G.S., Thiéry V., Grougnet R., Picot L. Extraction, purification et caractérisation de la 9'-*cis*-bixine, un apocaroténoïde présent dans les graines de roucou (*Bixa orellana* L.). *Journées de la Section Régionale Centre-Ouest, Société Chimique de France*, du 07 au 09 février 2018, La Rochelle (France). **Prix de la meilleure communication orale.**

2. Oliveira-Júnior R.G., Picot L. Sensibilisation de cellules de mélanome humain par des flavonoïdes et caroténoïdes purifiés à partir de plantes terrestres et de microalgues marines. *Colloque des Doctorants de 2^{ème} année 2019 de l'Ecole Doctorale Euclide*, La Rochelle Université, 06 juin 2019, La Rochelle (France). **Prix de la meilleure communication orale.**

3. Oliveira-Júnior R.G., Prunier G., Beugeard L., Alencar-Filho E.B., Almeida J.R.G.S., Loge C., Grougnet R., Picot L. Polymethoxyflavones from *Gardenia oudiepe* induce apoptosis and cytoskeleton disruption in BRAF-mutated melanoma cells. *1st France-Brazil Meeting on Natural Products & VII Simpósio de Plantas Mediciniais do Vale do São Francisco*, du 04 au 07 septembre 2019, Petrolina-PE (Brésil). **Prix de la meilleure communication orale.**

COMMUNICATIONS PAR POSTERS

1. Oliveira-Júnior R.G., Bonnet A., Almeida J.R.G.S., Grougnet R., Thiéry V., Picot L. UPLC-DAD-MS2 pigment profile of *Bixa orellana* extracts: identification of new apocarotenoids and antiproliferative activity against chemoresistant human melanoma cells (A2058). *7th International Congress on Medicinal and Aromatic (7th CIPAM)*, du 25 au 28 juin 2018, Toulouse (France). **Prix du meilleur poster.**

CONFERENCES EN COLLOQUES ET CONGRES INTERNATIONAUX

1. Oliveira-Júnior R.G., Bonnet A., Nicolau E., Groult H., Bérard J.B., Carrier G., Joguet N., Almeida J.R.G.S., Thiéry V., Picot L. Sensibilisation de cellules tumorales par des produits naturels issus de plantes et microalgues marines: approches chimiques et pharmacologiques. *14^{ème} Colloque du Réseau Produits de la Mer en Cancérologie & 5^{ème} Colloque du Réseau Canaux Ioniques et Cancer du Cancéropôle Grand-Ouest*, du 24 au 25 mai 2018, Massigné (France).

2. Oliveira-Júnior R.G., Picot L. Sensibilisation des cellules de mélanome humain à la chimiothérapie par la Bixine, un apocaroténoïde purifié à partir de *Bixa orellana* L. *6^{ème} Edition de l'Ecole Internationale de Recherche*, du 19 au 21 avril 2018, Agadir (Maroc).
3. Oliveira-Júnior R.G., Bonnet A., Groult H., Prunier G., Beaugeard L., Braconier E., Grougnet R., Almeida J.R.G.S., Ferraz C.A.A., Picot L. Bixin sensitizes human melanoma cells to dacarbazine through ROS-mediated apoptosis. *7^{ème} Edition de l'Ecole Internationale de Recherche*, du 25 au 27 avril 2019, Agadir (Maroc).

INTRODUCTION

1. INTRODUCTION

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), les cancers de la peau touchent de 2 à 3 millions de personnes dans le monde et le nombre de nouveaux cas ne cesse d'augmenter (WHO, 2020). Parmi ces cancers, le mélanome cutané est le moins fréquent, mais en même temps considéré comme le plus agressif, étant responsable de la plupart des décès par cancer de la peau (MacKie, Hauschild, et Eggermont, 2009). En plus des facteurs phénotypiques (p. ex. couleur de la peau, des cheveux et des yeux), l'exposition aux rayons ultraviolets, la présence de naevi et les antécédents familiaux constituent les principaux facteurs de risque liés à l'apparition du mélanome (Arisi et al., 2018).

Le caractère agressif du mélanome est principalement dû à des altérations génomiques et leurs conséquences post-transcriptionnelles. Les cellules de mélanome expriment des voies de signalisation prolifératives souvent activées même en absence de facteurs de croissance (p. ex. la voie RAS/RAF/MEK) (Platz et al., 2008), développent très facilement des mécanismes d'évasion à l'apoptose, stimulent la néo-angiogenèse, induisent l'expression de facteurs immunosuppresseurs et inhibent les principaux points de contrôle du système immunitaire (*immune checkpoints*) (Umansky et Sevko, 2012). Dans ce cadre, une bonne partie de la thérapie antimélanome est consacrée à l'utilisation de cytokines (p. ex. l'IL-2 et l'IFN- α), ainsi que d'anticorps monoclonaux (p. ex. les inhibiteurs des récepteurs CTLA-4 et PD-1/2) qui réactivent les points de contrôle du système immunitaire, renforçant la réponse lymphocytaire antitumorale (Lugowska, Teterycz, et Rutkowski, 2018; Niezgodna, Niezgodna, et Czajkowski, 2015). Une autre partie du traitement antimélanome est basée sur l'utilisation de molécules cytotoxiques ciblant les principales voies de signalisations mutées. Les inhibiteurs BRAF (p. ex. le vemurafenib, le dabrafenib et l'encorafenib) et MEK (p. ex. le cobimetinib, le trametinib et le binimetinib) sont les principaux représentants de la thérapie dite ciblée et offrent une meilleure réponse antitumorale par rapport aux médicaments anticancéreux conventionnels tels que les agents alkylants, les agents antimitotiques et d'autres inducteurs d'apoptose (Dummer et al., 2017; Robert et al., 2015).

Dans un premier temps, ces médicaments ralentissent le développement de la tumeur et prolongent la durée de vie des patients. Cependant, le retour de la progression tumorale est observé en moyenne un an après le début du traitement. Ce phénomène s'explique par la capacité des cellules de mélanome à résister aux traitements actuellement disponibles. Les voies de résistance aux médicaments utilisées pour le traitement du mélanome métastatique (stades III et IV) se produisent spontanément dans les cellules tumorales ou peuvent être acquises au cours du traitement dans le cadre de la réponse adaptative. Les voies des MAP kinases

(RAS/RAF/MEK) et PI3K/AKT sont parmi les plus affectées et directement liées aux mécanismes d'évasion de l'apoptose, d'invasion tissulaire, de perte du contrôle du cycle cellulaire et de signalisation cellulaire proliférative (Van Allen et al., 2014; Nathanson et al., 2013; Poulikakos et al., 2011; Wagle et al., 2011).

L'inefficacité de la plupart des molécules cytotoxiques a conduit les chercheurs et les médecins à mettre en œuvre de nouvelles approches thérapeutiques. Parmi celles-ci, la polychimiothérapie associant des médicaments qui agissent sur des cibles indépendantes (p. ex., les inhibiteurs BRAF + les inhibiteurs MEK) a été largement utilisée. Le principal inconvénient de cette stratégie thérapeutique réside dans le fait que les mécanismes de résistance peuvent être retardés mais pas éradiqués. De plus, les doses thérapeutiques élevées des différents médicaments associés entraînent des effets toxiques graves, principalement au niveau des fonctions hépatiques, pulmonaires et rénales (Heinzerling et al., 2019). Dans ce contexte, une deuxième stratégie a été récemment mise en évidence: la sensibilisation tumorale à la chimiothérapie par des molécules naturelles peu ou non toxiques.

Les études réalisées en culture cellulaire ont montré qu'il était possible de réverser la chimiorésistance de cellules de mélanome en les exposant à des molécules naturelles à de faibles concentrations avant de les traiter par chimiothérapie. Ces agents souvent cytostatiques inhibent la prolifération et la mobilité cellulaire sans induire une forte cytotoxicité, et restaurent la sensibilité des cellules métastatiques aux molécules cytotoxiques en réactivant des voies de signalisation qui conduisent à la mort cellulaire (Juin et al., 2018; Krajnović et al., 2016; Talib et Abukhader, 2013). Ainsi, ils permettent de diminuer les doses efficaces d'agents cytotoxiques et donc de limiter la toxicité sur les tissus non tumoraux.

Des travaux récents en pharmacognosie ont permis d'identifier des pigments naturels issus de plantes et d'algues ayant un potentiel chimiosensibilisant, notamment les flavonoïdes et les caroténoïdes (Buhrmann et al., 2015; Juin et al., 2018; Santos et al., 2016). Ces composés exercent non seulement un effet antiprolifératif direct sur les cellules tumorales mais potentialisent également l'effet d'agents anticancéreux couramment utilisés en clinique. De plus, ils limitent les mécanismes de résistance et sont généralement moins toxiques que les composés synthétiques. Bien que les effets anticancéreux des flavonoïdes et des caroténoïdes soient déjà décrits sur plusieurs lignées cellulaires, beaucoup de ces substances sont encore très peu explorées en termes de sensibilisation tumorale, surtout dans des modèles de mélanome.

Ce travail de thèse s'est donné pour objectif d'extraire, purifier, identifier et évaluer l'effet de caroténoïdes et de flavonoïdes issus de plantes terrestres et de microalgues marines sur un modèle cellulaire de mélanome métastatique chimiorésistant. Les molécules ont été

obtenues à partir de plantes du Brésil et de la Nouvelle-Calédonie, ainsi que de microalgues d'intérêt industriel fournies par le laboratoire de Physiologie et Biotechnologies des Algues (PBA) de l'Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer (IFREMER, Nantes). Les extraits et/ou molécules de plantes ont été fournis par les collaborateurs du Centre d'Etudes et de la Recherche sur les Plantes Médicinales de l'*Universidade Federal do Vale do São Francisco* (Petrolina, Brésil) et de la Faculté de Pharmacie de l'Université Paris Descartes (Paris, France), dans le cadre du Réseau Franco-Brazilien sur les Produits Naturels (*Franco-Brazilian network on Natural Products – FB₂NP*), qui a été créée au cours de ce projet de thèse.

La valorisation des produits naturels du milieu marin et de la flore du Brésil et de la Nouvelle-Calédonie constitue également l'un des principaux objectifs des travaux de thèse, qui s'articulent en trois grandes parties:

- La partie A consiste en un premier chapitre présentant une revue systématique approfondie de la littérature sur les produits naturels utilisés en tant que chimiosensibilisants dans des essais pré-cliniques. Dans ce chapitre, nous décrivons les tests *in vitro* et *in vivo* réalisés avec des molécules naturelles associées à la chimiothérapie. Les mécanismes moléculaires justifiant les effets chimiosensibilisants sont décrits en détail, ainsi que la qualité méthodologique des modèles animaux utilisés.
- La partie B concerne l'évaluation du potentiel antiprolifératif et chimiosensibilisant de molécules purifiées à partir d'extraits de plantes du Brésil et de la Nouvelle-Calédonie. Celle-ci est divisée en deux chapitres:
 - Le deuxième chapitre présente l'étude de la composition chimique et le potentiel chimiosensibilisant de l'apocaroténoïde majoritaire (bixine) des graines de *Bixa orellana* L., une plante médicinale du Brésil. Dans ce chapitre, nous avons pu identifier deux apocaroténoïdes décrits pour la première fois dans la littérature.
 - Le troisième chapitre concerne l'étude pharmacologique d'une série de flavonoïdes semi-synthétisés ou directement isolés de l'exsudat de *Gardenia oudiepe*, une Rubiacée de la Nouvelle-Calédonie. Nous avons déterminé le mode d'action des molécules les plus actives par différentes techniques en biologie cellulaire et par une étude de modélisation moléculaire.
- La partie C concerne la détermination de la composition pigmentaire et du potentiel chimiosensibilisant de caroténoïdes purifiés à partir d'extraits de microalgues. Celle-ci est aussi divisée en deux chapitres:

- Le quatrième chapitre décrit la composition pigmentaire de l'extrait de *Rhodomonas salina*, ainsi que la purification et l'évaluation du potentiel antimélanome et chimiosensibilisant de deux caroténoïdes principaux (alloxanthine et crocoxanthine).
- Le cinquième chapitre est dédié à la mise au point d'un procédé d'extraction de la fucoxanthine, le caroténoïde majoritaire de l'extrait de *Tisochrysis lutea*, par chromatographie de partage centrifuge (CPC), et à l'évaluation de son potentiel chimiosensibilisant. Ce chapitre présente également le profil pigmentaire complet de la microalgue, y compris une chlorophylle décrite pour la première fois chez cette espèce.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

2. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

2.1. Oncogenèse et caractéristiques des cellules cancéreuses

L'apparition de cellules cancéreuses et de tumeurs dans un organisme humain est le résultat de l'accumulation progressive de modifications génétiques et épigénétiques dans des cellules saines, conduisant à une dérégulation de la croissance et du métabolisme cellulaire. Ces phénomènes contribuent à sélectionner des clones de cellules présentant une capacité accrue à proliférer et à envahir les tissus environnants et distants. Ces cellules vont également développer une capacité à échapper au système immunitaire et une résistance aux traitements de chimiothérapie et de radiothérapie. De manière simplifiée, il est possible de distinguer trois étapes principales lors de l'oncogenèse, l'initiation, la promotion et la progression (Foster, 2010).

L'initiation est l'étape oncogénique primordiale qui correspond à l'apparition d'une instabilité génétique dans la cellule, conduisant à une transformation cellulaire provoquant une activation mitogénique. L'évènement initiateur est généralement la combinaison de multiples modifications mineures, telles que des mutations ou des modifications épigénétiques induites par des agents physiques, chimiques ou biologiques (virus) dans des gènes clés régulant la prolifération cellulaire. Ces gènes sont souvent des proto-oncogènes (Grizzi et al., 2006) spécifiant des facteurs de croissance, des récepteurs de facteurs de croissance, des protéines G régulant les voies de signalisation mitogénique, des facteurs de transcription ou des protéines impliquées dans les mécanismes de réparation de l'ADN (Kulesz-Martin, Gallegos, et Liu, 2010). La dérégulation de la prolifération cellulaire favorise l'accumulation de lésions de l'ADN, qui déclenche l'expression de gènes onco-suppresseurs comme *p53*, dont la fonction est de provoquer un arrêt transitoire du cycle cellulaire permettant l'activation des mécanismes de réparation de l'ADN, et éventuellement le déclenchement de l'apoptose. Cette pression de sélection va favoriser l'émergence de clones cellulaires résistants à l'activation de l'apoptose et présentant des mutations inactivatrices de *p53*, capables de surmonter le point de contrôle du cycle cellulaire et de proliférer en accumulant des mutations et des altérations génétiques (Albagli, 2015).

La seconde étape, la promotion tumorale, est la phase au cours de laquelle les clones cellulaires transformés vont proliférer et former une tumeur primaire qui va se vasculariser en réponse à la sécrétion tumorale de facteurs de croissance pro-angiogéniques tels que le VEGF (Figure 1) (Conti, 2010). L'activation constitutive des récepteurs aux facteurs de croissance et de leurs voies de signalisation ou la sécrétion par la tumeur de facteurs de croissance

mitogéniques va favoriser la prolifération incontrôlée des cellules cancéreuses au cours de cette étape.

Enfin, la phase de progression tumorale va se caractériser par une prolifération exponentielle des cellules tumorales, l'accumulation de mutations conduisant à l'émergence de clones de cellules tumorales présentant des hétérogénéités génétiques, la réactivation éventuelle de l'expression de gènes embryonnaires conduisant à la dédifférenciation en cellules souches cancéreuses et l'acquisition de phénotypes invasifs et métastatiques pour certaines cellules. La tumeur va également être infiltrée par des cellules immunitaires, qui vont générer une inflammation chronique et une pression de sélection conduisant à l'émergence de cellules immunosubversives (Foster, 2010; Park, Wakefield, et Mamura, 2009).

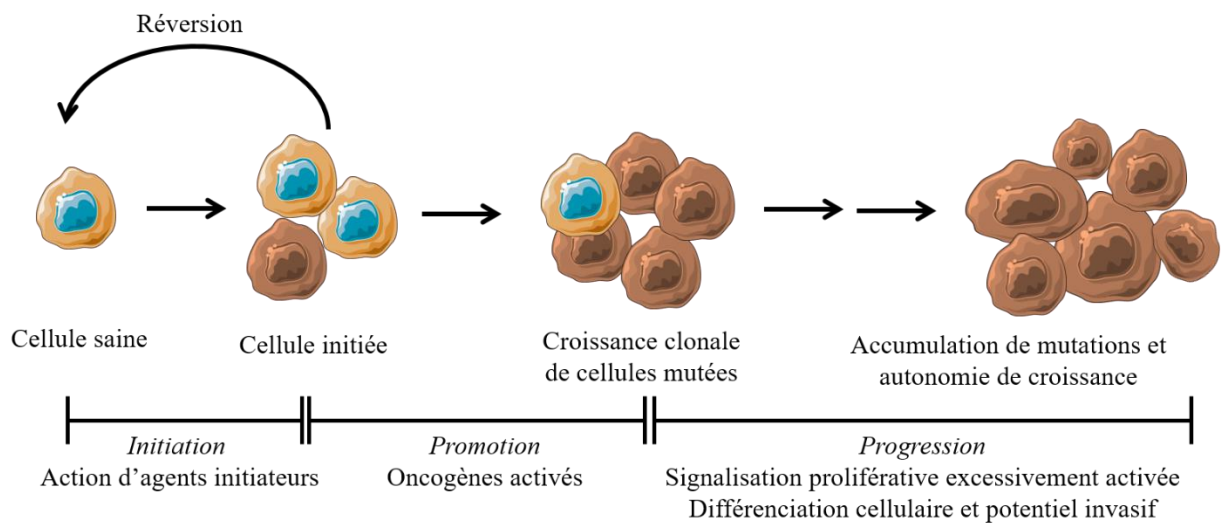


Figure 1. Étapes impliquées dans le processus d'oncogenèse (initiation, promotion et progression).

L'étude approfondie de la biologie des cellules cancéreuses et des tumeurs a permis d'identifier 10 caractéristiques associées au phénomène d'oncogenèse: une autonomie de croissance des cellules liée à l'activation constitutive des voies de signalisation proliférative, une insensibilité aux signaux antiprolifératifs, un échappement à la réponse immunitaire, une activation de l'immortalité répliquative, une promotion de l'inflammation dans le microenvironnement tumoral, une activation du processus d'invasion et de métastase, une néo-angiogenèse tumorale, une instabilité génomique, une résistance à l'induction de l'apoptose par les molécules pro-apoptotiques et une dérégulation du métabolisme cellulaire (Figure 2) (Fouad et Aanei, 2017; Hanahan et Weinberg, 2011). La compréhension approfondie de chacune de

ces caractéristiques permet aujourd’hui de développer des stratégies thérapeutiques et des médicaments ciblés, qui peuvent être combinés pour limiter et retarder la croissance tumorale (Samadani et al., 2018).

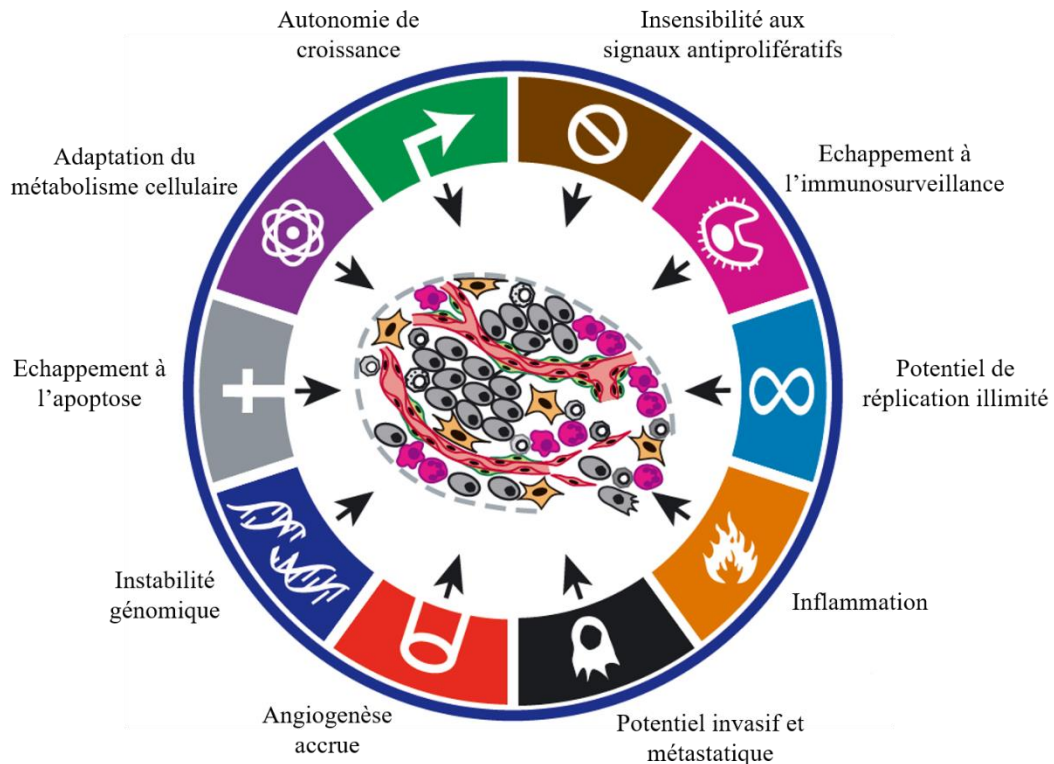


Figure 2. Principales caractéristiques des cellules tumorales (*hallmarks of cancer cells*) (D'après Hanahan et Robert, 2017).

2.1.1. Autonomie de croissance

La signalisation proliférative est un phénomène hautement régulé dans les cellules saines. La dérégulation de ces mécanismes dans les cellules cancéreuses peut s'expliquer par différents phénomènes non exclusifs tels que :

- La surexpression de facteurs de croissance oncogéniques par les cellules cancéreuses ou les cellules du microenvironnement tumoral, qui vont avoir un effet prolifératif autocrine;
- La surexpression de récepteurs aux facteurs de croissance;
- L'activation constitutive de récepteurs aux facteurs de croissance par mutation ou altération épigénétique;
- L'activation constitutive des voies de signalisation des facteurs de croissance (Chigira, Noda, et Watanabe, 1990; Sporn et Roberts, 1985).

Parmi les récepteurs des facteurs de croissance et leurs voies de signalisation, le récepteur de l'EGF, les petites GTPases de la famille RAS, RAF et ERK, la PI3 Kinase (PI3K) et PTEN (Dhillon et al., 2007) sont les plus étudiés, afin de développer des médicaments ou des anticorps inhibiteurs de la prolifération cellulaire. Cependant, les taux de réponse à ces inhibiteurs restent relativement limités dans le temps, principalement en raison de l'induction de chimiorésistances liées à des mutations (Shi et al., 2014; Wagle et al., 2011).

2.1.2. Insensibilité aux signaux antiprolifératifs

Les cellules cancéreuses présentent une insensibilité aux signaux antiprolifératifs (Hanahan et Robert, 2017). Dans les cellules normales, l'équilibre entre les signaux prolifératifs et les signaux antiprolifératifs permet une coordination du cycle cellulaire avec les mécanismes de réparation de l'ADN. La prolifération cellulaire peut notamment être bloquée par l'entrée de la cellule en phase G0 et l'induction d'un stade post-mitotique favorisant la différenciation de la cellule. Deux suppresseurs de tumeurs assurent cette fonction majeure de blocage transitoire du cycle cellulaire, les protéines Rb et p53. Rb est capable de bloquer la cellule au point de restriction G1 pour lui laisser le temps de corriger ses lésions dans l'ADN, et les cellules cancéreuses présentant une mutation dans *Rb* vont surmonter ce point de contrôle. La protéine p53 joue quant à elle un rôle central de régulateur de l'apoptose, en bloquant le cycle cellulaire dans les cellules présentant des lésions de l'ADN et en permettant le déclenchement d'une apoptose si la réparation des lésions est impossible ou prend trop de temps (Sherr et McCormick, 2002). Comme pour *Rb*, la mutation de *p53* permet la poursuite du cycle cellulaire dans les cellules cancéreuses et favorise le maintien et la transmission d'altérations génomiques (Sherr, 2004).

2.1.3. Instabilité génomique

Les lésions de l'ADN sont à l'origine de l'instabilité génomique des cellules cancéreuses, qui s'exprime par l'acquisition progressive d'une sensibilité accrue aux agents mutagènes et par une perte de fonction des mécanismes de réparation des altérations génomiques (Yixin et Wei, 2014). Cette fragilité génomique favorise la poursuite du cycle cellulaire en dépit d'altérations de l'ADN et génère l'accumulation croissante de mutations affectant en particulier les gènes des kinases, ce qui provoque leur activation constitutive (Kalimutho et al., 2019). Le kinome humain regroupe 518 protéines pouvant devenir oncogéniques en cas de mutation, dérégulation d'expression, phosphorylation aberrante, ou

modification épigénétique. Parmi celles-ci, les kinases dépendantes des cyclines (CDK), les récepteurs à activité tyrosine kinase, les MAP kinases, les kinases Aurora, mTOR et la tyrosine kinase Src sont les plus étudiées pour développer des inhibiteurs présentant des activités anticancéreuses (Germann et al., 2017; Vijayaraghavan et al., 2018; Zhang et Yu, 2012). Bien que l'inhibition des kinases soit identifiée comme une stratégie pertinente pour surmonter la chimiorésistance des cellules cancéreuses, des phénomènes d'adaptation et de chimiorésistance à ces inhibiteurs peuvent cependant apparaître (McCartney et al., 2019).

2.1.4. Réplication illimitée

L'activation de l'immortalité répliquative dans les cellules cancéreuses s'explique essentiellement par l'expression de la télomérase, une enzyme dont l'expression est normalement restreinte aux cellules souches et aux cellules germinales. Dans les cellules somatiques, cette enzyme n'est pas exprimée si bien qu'après un nombre limité de répliquations, la cellule entre en phase de sénescence répliquative et meurt par apoptose (Vasianovich et Wellinger, 2017). L'expression de la télomérase dans les cellules cancéreuses permet d'inhiber la sénescence répliquative en évitant le raccourcissement des télomères à chaque mitose. L'utilisation d'inhibiteurs de la télomérase vise donc à restaurer l'entrée en sénescence et en apoptose des cellules tumorales (Low et Tergaonkar, 2013; Wang et Feigon, 2017). Il a par ailleurs été montré que ces molécules peuvent augmenter la radio- et la chimiosensibilité dans certains modèles de cellules tumorales (Wesbuer et al., 2010).

2.1.5. Echappement à l'apoptose

Les cellules cancéreuses échappent également à l'apoptose en régulant l'expression des protéines pro- et anti-apoptotiques impliquées dans le déclenchement des voies intrinsèque et extrinsèque de l'apoptose. Une dérégulation du fonctionnement de la voie intrinsèque joue un rôle central dans l'échappement des cellules cancéreuses à la mort cellulaire programmée, car son activation est la conséquence immédiate de signaux de stress intracellulaires (lésions de l'ADN, privation de facteurs de croissance, modifications cellulaires induites par des agents cytotoxiques ou des cytokines) (Jan et Chaudhry, 2019; Letai, 2017). Ainsi, les cellules cancéreuses présentent souvent une surexpression des protéines anti-apoptotiques mitochondriales de la famille Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1, etc.) et une sous-expression des protéines pro-apoptotiques (Bak, Bax, Bad, caspases, etc.). De plus, un découplage des signaux de stress cellulaire (par exemple les lésions de l'ADN) de l'activation de la voie intrinsèque de l'apoptose peut s'expliquer par la mutation des senseurs de stress cellulaires (p53). Concernant

l'activation de la voie extrinsèque de l'apoptose, elle peut être fortement limitée dans les cellules cancéreuses par la sous-expression des récepteurs à domaines de mort (Fas, TNFR1, TRAIL-R1 et R2, DR3) (Figure 3) et par le faible accès au microenvironnement tumoral des cellules immunitaires cytotoxiques (lymphocytes T8, cellules NK), qui induisent l'apoptose par des contacts membranaires (Hassan et al., 2014; Pfeffer et Singh, 2018).

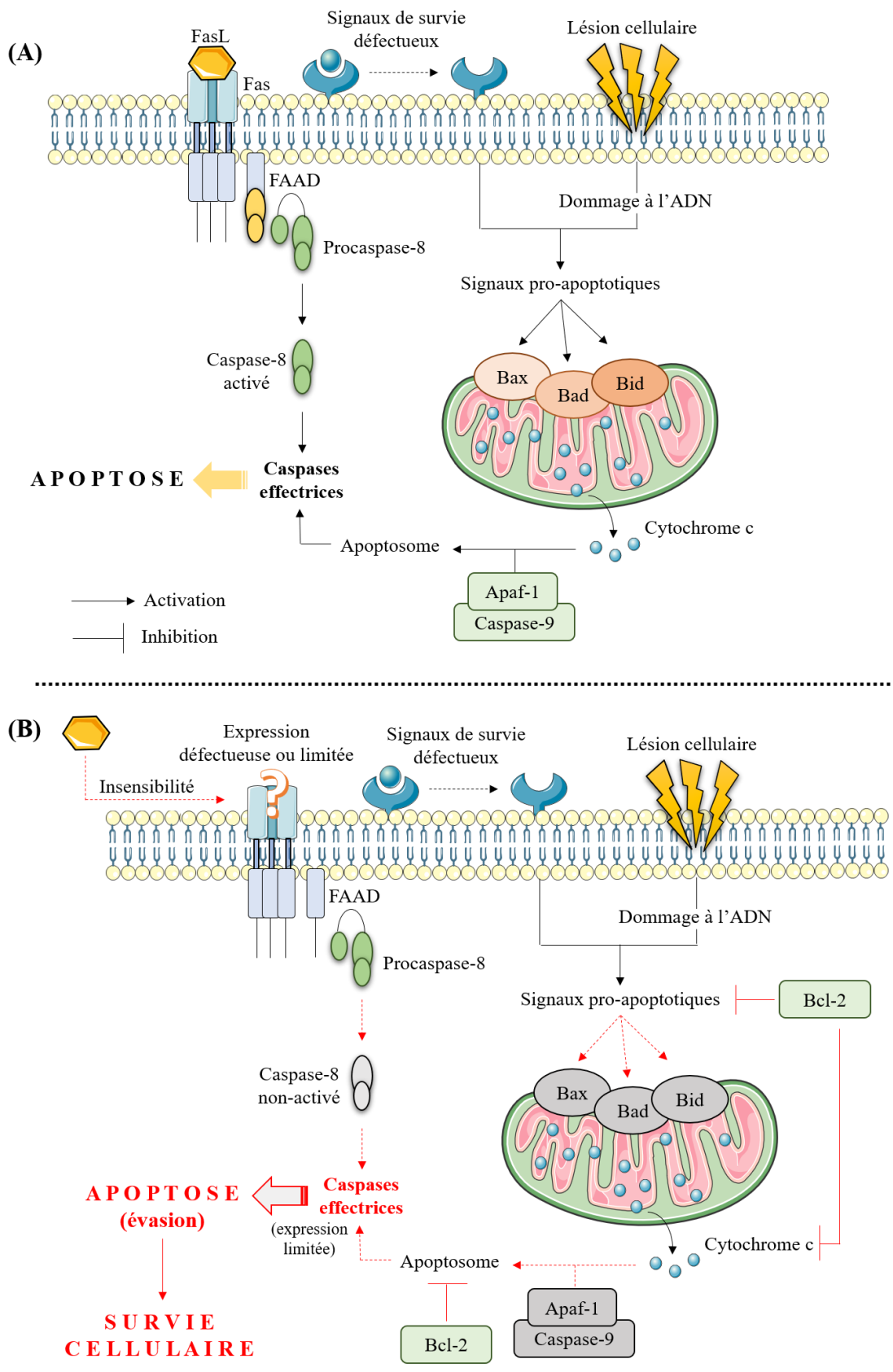


Figure 3. (A) Voies d'induction de l'apoptose: voie intrinsèque (liée à la libération du cytochrome *c* suite à l'activation de protéines pro-apoptotiques de la membrane mitochondriale, p. ex. Bad, Bax et Bid) et voie extrinsèque (liée à l'activation de récepteurs de mort, entraînant

l'activation des caspases effectrices, p. ex. caspase-3). (B) Mécanismes d'échappement à l'apoptose dans les cellules tumorales. Les altérations les plus courantes sont indiquées en rouge et comprennent la sous-expression des protéines pro-apoptotiques au détriment de la surexpression des protéines anti-apoptotiques (p. ex. Bcl-2), la sous-expression des caspases, la sous-expression des récepteurs de mort et la perte de sensibilité aux signaux antiprolifératifs.

2.1.6. Echappement des cellules tumorales au système immunitaire

L'échappement des cellules cancéreuses au système immunitaire implique divers mécanismes cellulaires et moléculaires, tels que la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires (IL-10, TGF- β), la sous-expression du CMH de classe I et des antigènes associés aux tumeurs (TAA), la modulation antigénique, la sous-expression des co-récepteurs stimulateurs indispensables à l'activation des lymphocytes T cytotoxiques (B7-1 et B7-2) et l'hydrolyse de la matrice extracellulaire tumorale limitant l'accès des cellules immunocompétentes (Zitvogel, Tesniere, et Kroemer, 2006). L'échappement au système immunitaire peut être apprécié en deux étapes au cours du développement tumoral : l'immunosélection et l'immunosubversion (Ghiringhelli, 2013).

L'immunosélection consiste en des modifications adaptatives des cellules tumorales qui empêchent leur reconnaissance par le système immunitaire. Les cellules tumorales acquièrent des défauts dans les voies de présentation des antigènes, en particulier dans l'expression du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH-1) et des antigènes associés à la tumeur (*tumor-associated antigens*, TAAs ou AATs) (Vinay et al., 2015). Cette étape est également marquée par la perte de sensibilité des cellules cancéreuses à l'IFN γ , ce qui affecte directement l'expression du CMH-1. De plus, l'absence d'expression des récepteurs co-stimulateurs indispensables pour activer les lymphocytes T8 induit une tolérance immunitaire. Enfin, le remodelage de la matrice extracellulaire tumorale limite l'accès et l'action des cellules immunocompétentes (Menter et Tzankov, 2018), telles que les NK dont la fonction est de détruire les cellules sous-exprimant le CMH de classe I.

L'étape d'immunosubversion implique quant à elle des phénomènes d'inhibition des fonctions des cellules immunitaires antitumorales. Des facteurs dérivés des cellules tumorales, notamment les cytokines et dérivés lipidiques anti-inflammatoires inhibent la fonction de présentation d'antigènes tumoraux par les cellules dendritiques (Gonzalez, Hagerling, et Werb, 2018). Les cytokines produites par la tumeur (p. ex. TGF β) attirent également des lymphocytes T régulateurs (T Reg) dans le microenvironnement tumoral où ils vont calmer les réponses immunitaires antitumorales par la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires (Park, Wakefield,

et Mamura, 2009; Tian, Neil, et Schiemann, 2011). Les cellules cancéreuses présentant ces capacités d'immunosubversion échappent à la destruction par les cellules immunitaires et seront donc sélectionnées du fait de leur immunorésistance (Ghiringhelli, 2013).

L'immunité antitumorale peut être stimulée en utilisant diverses stratégies telles que l'inhibition des co-récepteurs inhibiteurs des lymphocytes T (p. ex. à l'aide d'anticorps anti-CTLA-4), la vaccination avec des antigènes tumoraux, ou encore la transformation génétique de cellules tumorales pour leur faire exprimer le CMH de classe II ou des cytokines stimulant la présentation des antigènes et l'activation immunitaire (p. ex GM-CSF, IL-2, IFN- γ). (Schepisi et al., 2019; Topalian, Drake, et Pardoll, 2015). En 2020, une des stratégies les plus efficaces et prometteuses pour l'immunothérapie des tumeurs consiste à isoler des lymphocytes T et à leur faire exprimer par transformation génétique un récepteur chimérique de l'antigène (CAR pour Chimeric Antigen Receptor) capable de reconnaître spécifiquement un AAT et d'activer une réponse cytotoxique ciblant spécifiquement les cellules cancéreuses exprimant l'AAT. Le CAR contient à la fois un TCR reconnaissant spécifiquement un AAT (généralement constitué par les domaines variables d'un anticorps monoclonal), le co-récepteur CD28 nécessaire à la co-activation du lymphocyte T cytotoxique et CD3, et le module de signalisation intracellulaire associé au TCR (Kalos et al., 2011). Enfin, de nombreux travaux de recherche visent également à identifier des molécules naturelles ou synthétiques présentant une forte activité immunostimulatrice. A titre d'exemple, il a été montré que l' α -galactosylcéramide, un glycolipide initialement identifié à partir d'une éponge marine pour ses propriétés anti-métastatiques, est un puissant immunostimulant capable d'activer les cellules iNKT après avoir été présenté par la molécule CD1d exprimée par les cellules présentatrices d'antigènes (notamment les cellules dendritiques) (Kitamura et al., 1999). L'activation des iNKT conduit à la sécrétion de cytokines immunostimulatrices telle que l'IFN- γ , qui à leur tour induisent la transactivation de nombreuses cellules impliquées dans l'immunité antitumorale (Zhang et al., 2019).

2.1.7. Microenvironnement tumoral et inflammation chronique

L'inflammation chronique est également une caractéristique du microenvironnement tumoral. Elle s'explique par l'infiltration dans le microenvironnement tumoral de cellules immunitaires qui libèrent des cytokines et des médiateurs pro-inflammatoires (Ognjanovic et Hainaut, 2010). En agissant sur les cellules tumorales, ces facteurs pro-inflammatoires induisent l'activation de voies de signalisation de stress et d'inflammation (ex : NF- κ B), qui

favorisent l'expression de facteurs de croissance, de facteurs de survie, de facteurs pro-angiogéniques et d'enzymes de dégradation de la matrice extracellulaire impliquées dans l'invasivité et la métastase tumorale. Certains travaux montrent ainsi que des inhibiteurs de la voie NF- κ B peuvent présenter une activité anticancéreuse importante (Erstad et Cusack, 2013). Il existe en fait un lien subtil entre inflammation et cancer, en fonction du contexte physiologique. Chez les personnes en bonne santé, la consommation de nutriments anti-inflammatoires (par exemple des antioxydants tels que des vitamines, polyphénols, caroténoïdes) limite les risques de lésion génomique des cellules saines et l'inflammation pro-tumorale. A l'inverse, l'inflammation chronique est un facteur clé augmentant le risque de cancer (par exemple l'inflammation pulmonaire induite par le tabac chez les fumeurs) (Bottazzi, Riboli, et Mantovani, 2018). L'intérêt de consommer des antioxydants ou des médicaments anti-inflammatoires pour prévenir ou traiter le cancer doit cependant être examiné attentivement, en fonction de l'état physiologique global de chaque individu. Par exemple, des traitements anti-inflammatoires chez des patients greffés peuvent favoriser la croissance de cellules tumorales qui seraient naturellement détruites par les cellules immunitaires (Sprangers et al., 2018). Dans un contexte d'inflammation chronique (par exemple chez les fumeurs), la consommation d'antioxydants dans le but de prévenir le risque de tumorigénèse peut au contraire augmenter l'incidence des cancers du fait de la génération de métabolites pro-tumoraux par oxydation d'antioxydants (Andrisic et al., 2018). De plus, chez les patients subissant une chimiothérapie ou une radiothérapie, la consommation d'antioxydants et de médicaments anti-inflammatoires peut limiter l'efficacité du traitement car la plupart des médicaments pro-apoptotiques et des radiations tuent les cellules cancéreuses par cytotoxicité oxydative. En revanche, la consommation de nutriments qui peuvent être transformés en dérivés pro-oxydants cytotoxiques (par exemple les acides gras polyinsaturés (AGPIs)) peut être intéressante pour sensibiliser les cellules tumorales à la chimiothérapie par des agents cytotoxiques oxydants ou à la radiothérapie (Barrera, 2012; Helfinger et Schröder, 2018). Il a également été montré que la consommation d'un antioxydant peut limiter l'efficacité de la chimiothérapie, de la radiothérapie ou de la chimio- ou radio-sensibilisation (par exemple, la vitamine E bloque la transformation chimio-induite des AGPIs en dérivés lipopéroxydes cytotoxiques) (Ells et al., 1996).

2.1.8. Invasivité tumorale et métastase

Plusieurs mécanismes cellulaires et moléculaires expliquent l'activation d'un comportement invasif et métastatique des cellules tumorales. La sécrétion de métalloprotéases

matricielles (MMP) induit l'hydrolyse des protéines et des protéoglycanes de la matrice extracellulaire, des jonctions intercellulaires et des jonctions cellules/matrice. La transition épithélio-mésenchymateuse confère également aux cellules cancéreuses des capacités accrues de motilité et d'invasivité. Enfin, une sur-activation des récepteurs des facteurs de croissance (par exemple c-Met) a pu être associée à l'acquisition d'un phénotype invasif (Birchmeier et al., 2003). Certains travaux ont également démontré que l'invasivité et la métastase des cellules tumorales pouvaient être stimulées par les cellules immunitaires infiltrées dans le micro-environnement tumoral (par exemple les macrophages) qui sécrètent des facteurs favorisant l'intravasation cellulaire tels que l'EGF et les cytokines pro-inflammatoires (Franco et al., 2019; Rani, Dasgupta, et Murphy, 2019).

2.1.9. Néo-angiogenèse tumorale

La sécrétion de facteurs de croissance pro-angiogéniques par les cellules tumorales dans des conditions d'hypoxie et l'activation constitutive des récepteurs des facteurs de croissance pro-angiogéniques contribuent à la néo-angiogenèse tumorale (Pavlova et Thompson, 2016). Cette néo-angiogenèse est critique pour garantir un apport suffisant en nutriments et oxygène, indispensable à la croissance et à la métastase tumorale. Le VEGF sécrété par les cellules cancéreuses joue un rôle majeur d'« interrupteur angiogénique » et certains travaux suggèrent également une participation des phagocytes (macrophages et polynucléaires neutrophiles) dans l'initiation de ce phénomène (Barbera-Guillem et al., 2002; Leung et al., 1989). Divers inhibiteurs de l'angiogenèse tumorale, tels que des petites molécules et des anticorps ciblés contre les facteurs de croissance et leurs récepteurs, ont été décrits. Il a cependant été noté que l'utilisation prolongée de composés anti-angiogéniques pouvait stimuler l'adaptation des cellules cancéreuses à l'hypoxie, phénomène associé à une augmentation de l'agressivité tumorale (Lupo et al., 2017; Shibuya, 2011).

2.1.10. Hypoxie et cellules tumorales

L'hypoxie joue en effet un rôle clé dans le déclenchement de la dérégulation du métabolisme énergétique des cellules cancéreuses. Ces modifications incluent notamment l'activation de la glycolyse et de la fermentation lactique en condition aérobie (effet Warburg) et la surproduction de NADH dans le cytosol par l'aldéhyde déshydrogénase. Les inhibiteurs de la glycolyse aérobie ou de l'aldéhyde déshydrogénase présentent ainsi un intérêt élevé pour limiter la croissance des cellules cancéreuses adaptées à l'hypoxie (Abbaszadeh, Çeşmeli, et Biray-Avcı, 2019). L'hypoxie favorise également les changements génomiques mis en jeu dans

la transition épithélio-mésenchymateuse, l'expression de facteurs d'invasivité et la chimio- ou radio-résistance des cellules métastatiques, en plus de stimuler la néo-angiogénèse (Kim et Lee, 2017; Thakur et Chen, 2019).

2.2. Principales limitations des traitements anticancéreux actuels

La thérapie anticancéreuse repose sur la résection chirurgicale des tumeurs solides, la radiothérapie, la chimiothérapie, la photothérapie des tumeurs et l'immunothérapie. Le choix du traitement dépend à la fois du type de cancer diagnostiqué, de son stade évolutif et des conditions cliniques du patient. Dans la plupart des cas, le traitement anticancéreux est réalisé en alternant ou en combinant plusieurs approches dans le but de potentialiser leur efficacité (Mokhtari et al., 2017). Malgré des traitements toujours plus performants et des médicaments toujours plus ciblés, deux problèmes restent cependant critiques dans la prise en charge thérapeutique du cancer: l'absence de sélectivité des traitements de chimiothérapie, qui génère de nombreux effets secondaires induits par la cytotoxicité dans les tissus non tumoraux et l'acquisition de mécanismes de résistance à la chimiothérapie et la radiothérapie par les cellules tumorales (Zugazagoitia et al., 2016).

Les médicaments classiquement utilisés en chimiothérapie anticancéreuse comprennent: a) des agents induisant l'apoptose, responsables de la modulation positive de l'expression et/ou de l'activation de protéines pro-apoptotiques (Hassan et al., 2014; Pfeffer et Singh, 2018); b) des agents antimitotiques capables d'empêcher la progression du cycle cellulaire (p. ex. les inhibiteurs de CDKs, inhibiteurs des microtubules, inhibiteurs des topoisomérases, etc.) (Chan, Koh, et Li, 2012); c) des agents antimétabolites (p. ex. les analogues de l'acide folique, analogues de la purine, agents alkylants de l'ADN, etc.) (Ralhan et Kaur, 2007); d) des régulateurs du métabolisme cellulaire (p. ex. les inhibiteurs de la glycolyse) (Abdel-Wahab, Mahmoud, et Al-Harizy, 2019); et e) des agents anti-angiogéniques (p. ex. les antagonistes du VEGF) (Lupo et al., 2017). Tous ces traitements agissent de manière non sélective, dans des cibles présentes à la fois dans les cellules tumorales et saines, ce qui explique leur toxicité, notamment sur les systèmes hématopoïétique, immunitaire, hépatique et rénal (Nurgali, Jagoe, et Abalo, 2018; Palumbo et al., 2013).

Afin de rendre les traitements plus sélectifs pour les cellules tumorales, diverses stratégies de vectorisation ont été envisagées et des molécules sélectivement actives dans les cellules présentant une cible pharmacologique mutée sont développées dans une logique de *thérapie ciblée*. Ces médicaments ciblent en effet des voies de signalisation particulièrement surexprimées ou modifiées dans les cellules tumorales (Li et al., 2012). Malgré des résultats

encourageants à court terme pour plusieurs molécules, ces traitements se soldent également par des échecs thérapeutiques du fait de l'apparition de mécanismes de résistance (Tentori, Lacal, et Graziani, 2013). Ces mécanismes d'échappement s'expliquent par la surexpression de transporteurs d'efflux, des altérations du métabolisme du médicament (inhibition et/ou dégradation du médicament), la sélection de cellules présentant des mécanismes d'échappement à l'apoptose et des mutations des cibles thérapeutiques. La combinaison de ces phénomènes peut finalement aboutir à des phénotypes de multirésistance ou résistance multidrogue (*multidrug resistance*, MDR), qui conduisent à des impasses thérapeutiques (Mansoori et al., 2017; Nikolaou et al., 2018). Au sein d'une même tumeur, une résistance sous-clonale préexistante ou acquise aux médicaments cytotoxiques et la présence de cellules souches cancéreuses (CSC) résistantes aux composés cytotoxiques peuvent expliquer une hétérogénéité des cellules qui conduit à la sélection de clones présentant un phénotype MDR.

Les médicaments pro-apoptotiques sont parmi les plus affectés par les mécanismes de chimiorésistance adaptative. La résistance à ces molécules est liée à la surexpression des transporteurs d'efflux de type *ATP-binding cassette* (ABC), qui comprennent la glycoprotéine P (P-gp/ABCB1), la protéine 2 associée à la MDR (MRP2/ABCC2) et la protéine de résistance du cancer du sein (BCRP/ABCG2) (Housman et al., 2014). La surexpression de ces transporteurs conduit à un phénotype MDR, caractérisé par une diminution de l'absorption du médicament, un efflux accru et un temps de contact limité entre le médicament et sa cible pharmacologique (Nikolaou et al., 2018). L'hypoxie dans le microenvironnement tumoral peut également favoriser la chimiorésistance, en plus d'induire des changements métaboliques et génomiques stimulant le caractère invasif et métastatique (Kim et Lee, 2017).

Les principaux mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la chimiorésistance des cellules cancéreuses sont illustrés dans la figure 4.

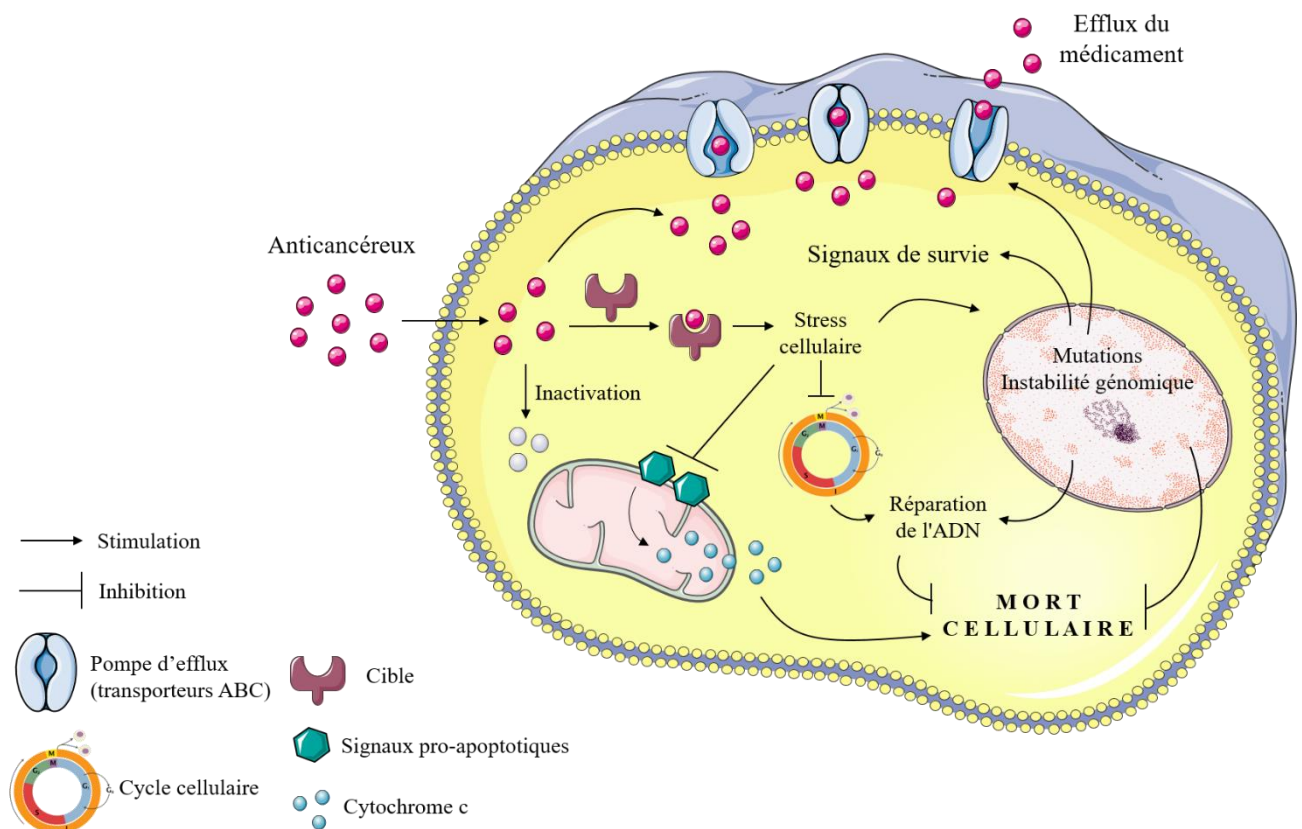


Figure 4. Mécanismes de chimiorésistance dans les cellules cancéreuses. Le développement de la chimiorésistance s'explique principalement par l'expression de pompes d'efflux ABC, l'inactivation de médicaments par des enzymes de détoxification et l'activation de voies de survie (expression de facteurs de survie, activation de mécanismes de réparation de l'ADN, surexpression de protéines anti-apoptotiques et inhibition de l'apoptose).

2.3. Le mélanome, un modèle de tumeur particulièrement résistante aux traitements

2.3.1. Définition

Le mélanome est une tumeur cutanée maligne dérivée des mélanocytes, qui apparaît au niveau de la peau, mais qui peut également avoir pour origine des mélanocytes des muqueuses (siège buccal, nasal, vaginal, anal, œsophage, tractus digestif) et l'uvéa. Dans la peau, les mélanocytes sont localisés au niveau de la couche basale de l'épiderme (Figure 5). Ces cellules sont spécialisées dans la production de mélanine, un pigment qui s'accumule dans des organites spécialisés, les mélanosomes, et qui assure une protection de la peau contre les rayons ultraviolets (UV) (Arisi et al., 2018). Les UV de longueurs d'onde comprises entre 280 et 320 nm sont dits UVB, et les UV de longueurs d'onde comprises entre 320 et 400 nm UVA. Les UVB ont un pouvoir mutagène très élevé et cent fois supérieur à celui des UVA, en induisant

la formation de dimères de pyrimidines dans l'ADN. Les UVA sont quant à eux responsables de la production d'espèces réactives de l'oxygène, qui vont générer des altérations de l'ADN présentant un risque oncogène si elles ne sont pas réparées (Ikehata et Ono, 2011).

Lorsque la peau est exposée aux rayons UV, les mélanocytes augmentent la production de mélanine et prolifèrent plus rapidement. Une fréquence élevée d'exposition au soleil et des coups de soleil dans l'enfance sont deux facteurs de risque majeurs qui vont stimuler directement la transformation des nævi pigmentaires (grains de beauté) en cellules cancéreuses conduisant au développement du mélanome cutané. Par ailleurs, les individus présentant une faible pigmentation (peau claire, cheveux blonds ou roux et iris clair) présentent un risque accru de développer un mélanome s'ils s'exposent aux UV (Arisi et al., 2018).

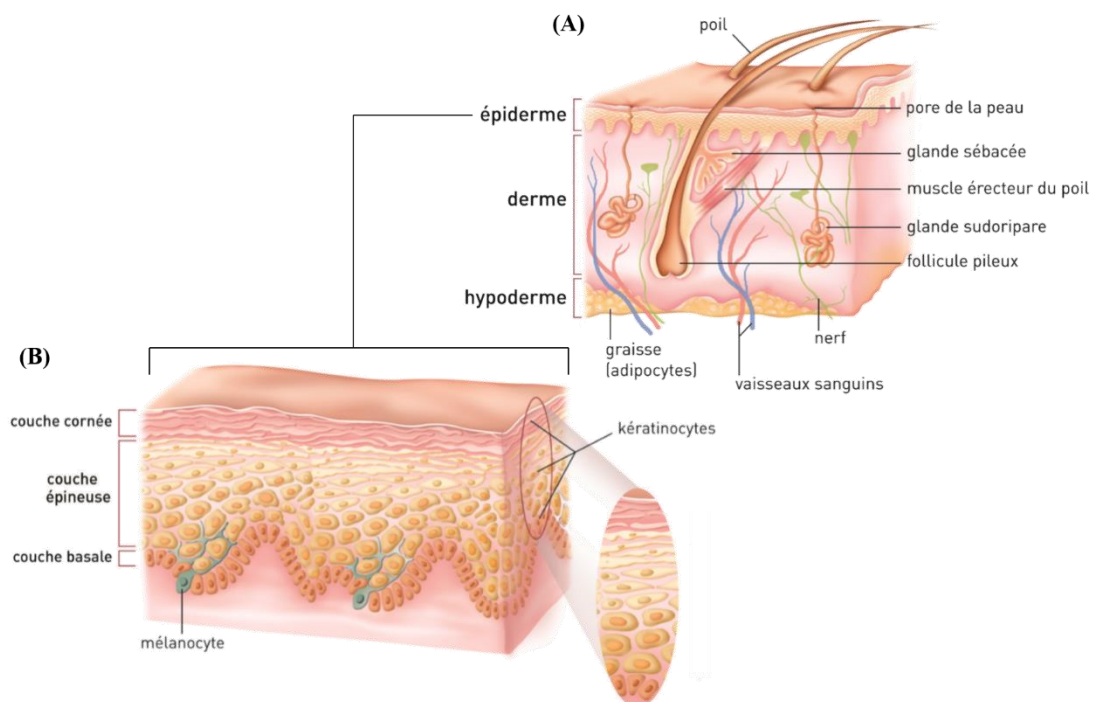


Figure 5. Les différentes couches de la peau (A) et de l'épiderme (B). La peau est constituée essentiellement de trois couches: l'épiderme, le derme et l'hypoderme. L'épiderme est composé de trois couches principales (cornée, épineuse et basale), formées par deux principaux types cellulaires: les mélanocytes (situés à la couche basale) et les kératinocytes. Images d'après INCa (2010).

Il est possible de classer les mélanomes en différents sous-types selon leur origine tissulaire, leur morphologie tumorale, leur comportement de propagation et d'infiltration et leur

potentiel métastatique (critères cliniques et histologiques) (Clark et al., 1975; Weyers et al., 1999). Ainsi, il est possible de distinguer:

- Le mélanome superficiel extensif: le plus fréquent, il est d'abord plat, et peut ensuite devenir nodulaire;
- Le mélanome nodulaire: il se développe rapidement en profondeur, en présentant un risque élevé de métastase;
- Le mélanome de Dubreuilh (*lentigo malignant melanoma*): il se manifeste surtout chez les personnes âgées, essentiellement en surface et est souvent lié aux expositions solaires répétées;
- Le mélanome acrolentigineux: communément localisé au niveau des extrémités (la paume des mains et la plante des pieds, ou autour des ongles);
- Le mélanome amélanotique: il présente une faible coloration, éventuellement rose ou rouge, ou une coloration brun clair sur les bords.

2.3.2. Epidémiologie

Depuis 2005, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a identifié le mélanome cutané comme un problème de santé publique majeur et prioritaire. Bien qu'il représente moins de 2% de l'ensemble des cancers de la peau, c'est la forme la plus agressive de cancer de la peau responsable de 90% des décès par cancer cutané (MacKie, Hauschild, et Eggermont, 2009). Environ 232.000 nouveaux cas (soit 1,7% de toutes les tumeurs malignes) et 55.500 décès (0,7% de la mortalité totale par cancer) sont enregistrés chaque année dans le monde, portant l'incidence mondiale moyenne à 10 cas pour 100 000 habitants (et jusqu'à 50 à 60 cas pour 100 000 habitants en Australie). En Europe, plus de 20.000 personnes meurent du mélanome chaque année et le mélanome est la tumeur la plus fréquente chez les jeunes adultes âgés de 25 à 35 ans (Schadendorf, Akkooi, et al., 2018).

En France, 15404 nouveaux cas de mélanome ont été recensés en 2017 (8061 hommes et 7343 femmes) et 1783 décès enregistrés (1036 hommes et 747 femmes). Le mélanome représente donc dans ce pays près de 4% de tous les cancers et est responsable de 1,7% du total des décès par cancer. De plus, son incidence a augmenté régulièrement au cours des 50 dernières années, jusqu'à atteindre la première place en terme d'augmentation de fréquence. Le mélanome a un bon pronostic lorsqu'il est diagnostiqué précocement, avec un taux de survie relative à 5 ans qui peut atteindre plus de 80% aux premiers stades du développement tumoral (mélanome localisé). A l'inverse, il s'agit d'un cancer redoutable s'il est diagnostiqué tardivement, car le

taux de survie à 5 ans du mélanome métastatique n'est que de 18% (INCa, 2019). Les stratégies thérapeutiques varient considérablement en fonction du stade évolutif et pour cette raison, il est extrêmement important de définir précisément les étapes de sa progression ainsi que ses critères de classification diagnostique.

2.3.3. Progression et classification diagnostique

Dans la plupart des cas, l'étiologie du mélanome est multifactorielle. Toutefois, l'exposition solaire et la susceptibilité génétique (mutations, altération des mécanismes de réparation de l'ADN, etc.) constituent les principaux facteurs environnementaux et génétiques associés au risque d'initiation et de promotion du mélanome (Arisi et al., 2018). Les lésions précurseurs, en particulier les naevi dysplasiques/atypiques, peuvent également prédisposer au développement de la tumeur maligne (Tracey et Vij, 2019).

Le développement du mélanome est considéré comme un processus multi-étapes impliquant des facteurs génétiques et épigénétiques. D'un point de vue histopathologique, les étapes successives suivantes peuvent être distinguées: (a) présence d'un naevus commun acquis (bénin) et apparition d'un naevus dysplasique; (b) mélanome au stade de croissance radiale, dans lequel les mélanocytes subissent des changements qui leur permettent de survivre et de proliférer; (c) mélanome au stade de croissance verticale, dans lequel les cellules cancéreuses envahissent le derme et l'hypoderme; (d) mélanome malin métastatique, dans lequel les cellules envahissent l'endothélium et migrent vers les tissus éloignés (Figure 6). Entre chaque stade évolutif, de nombreuses mutations (spontanées ou induites) sont acquises, dotant le nouveau sous-clone de cellules tumorales de capacités accrues de survie (Arrangoiz, 2016; Zaidi, Day, et Merlino, 2008).

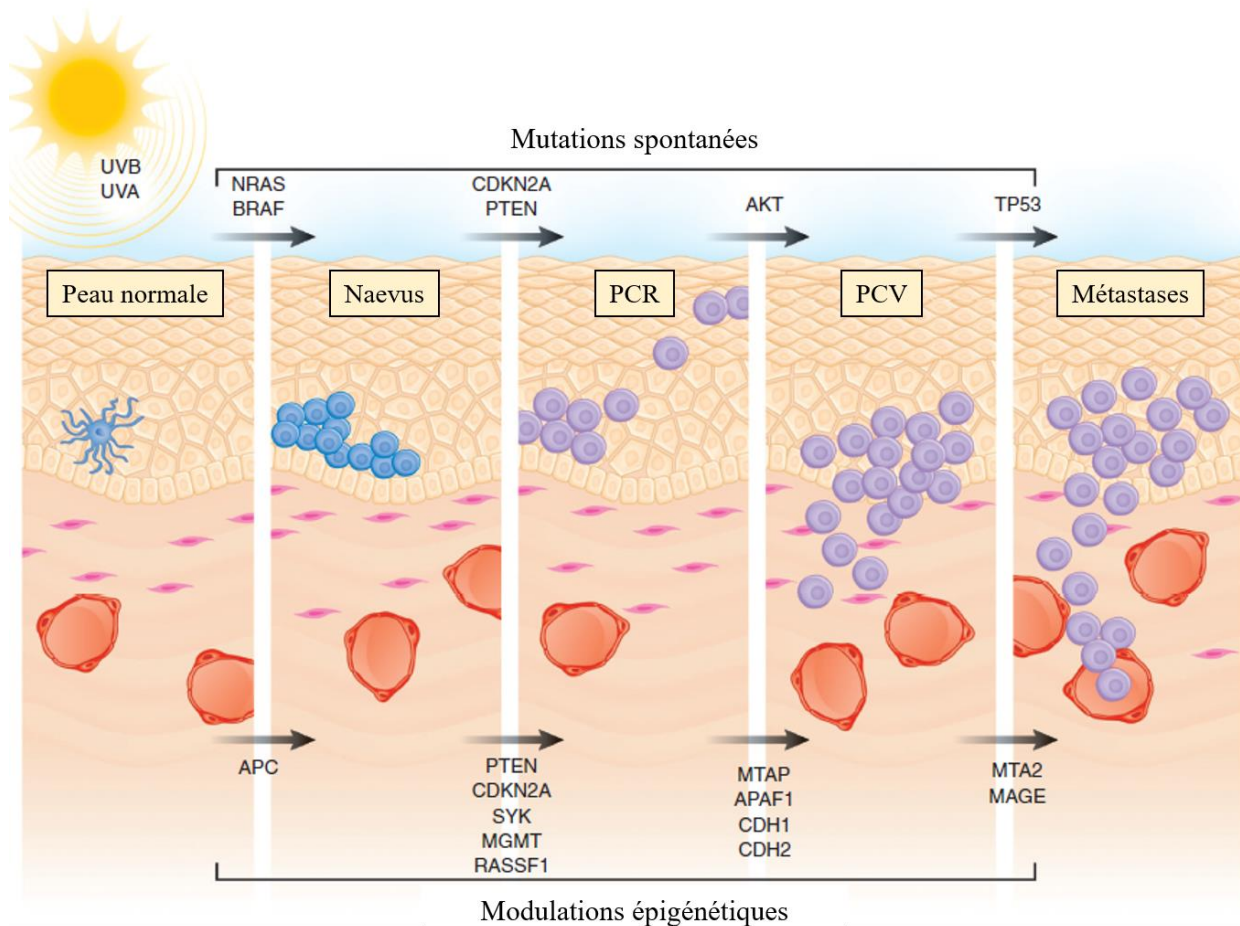


Figure 6. Etapes d'initiation et de progression du mélanome cutané et principales mutations associées. La prolifération de mélanocytes normaux en réponse à l'exposition aux rayons UV entraîne la formation de naevi bénins ou dysplasiques. Le mélanome en phase de croissance radiale (PCR) présente la capacité de croître par voie intra-épidermique et envahit le derme en phase de croissance verticale (PCV), ce qui peut aboutir à la formation de métastases. D'après Zaidi, Day, et Merlino (2008).

Ce modèle de développement pathologique du mélanome a été proposé et détaillé par Wallace Clark (Figure 7), qui a classé les stades de progression du mélanome sur cinq en fonction de la profondeur de la lésion (Clark et al., 1975; Clark et al., 1984):

- Stade I: le mélanome est retrouvé exclusivement dans l'épiderme;
- Stade II: le mélanome pénètre la couche superficielle du derme (derme papillaire);
- Stade III: le mélanome pénètre jusqu'à la jonction du derme papillaire avec le derme réticulaire;
- Stade IV: le mélanome pénètre le derme réticulaire (ganglions lymphatiques potentiellement affectés);

- Stade V: le mélanome pénètre le tissu sous-cutané (risque élevé de métastases).

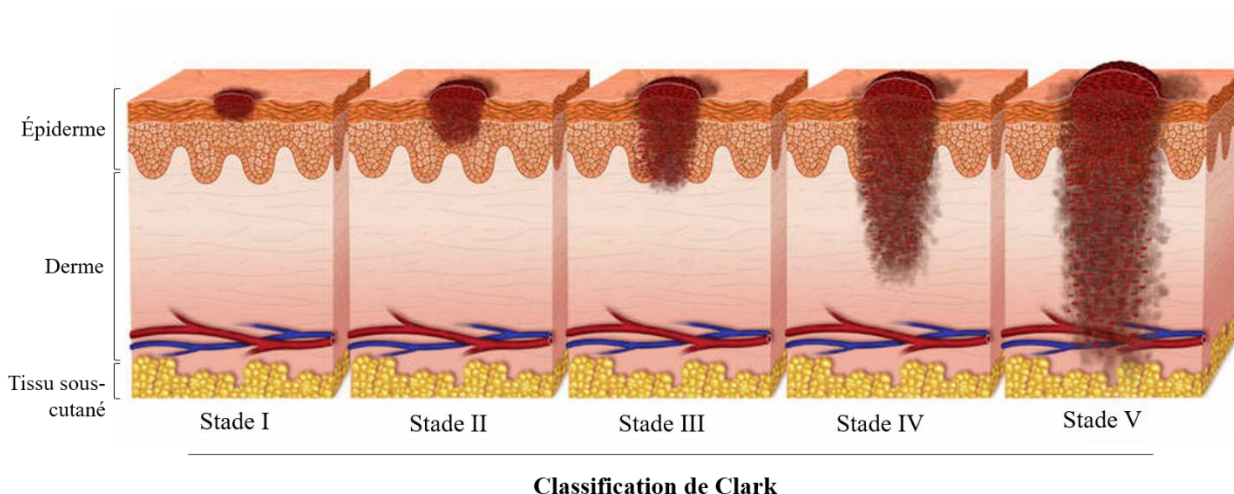


Figure 7. Stades de progression du mélanome proposés par Clark, en fonction du niveau d'invasion tumorale (image adaptée d'après www.medicalindependent.ie/).

Cette première classification a par la suite été complétée en ajoutant d'autres facteurs cliniques importants, tels que le volume tumoral, le nombre de ganglions lymphatiques contenant des cellules tumorales métastatiques et l'étendue des métastases. Actuellement, la classification TNM (*Tumor-Node-Metastasis*) proposée par l'*American Joint Committee on Cancer* (AJCC) (Balch et al., 2001) est la plus utilisée et la plus communément acceptée par la communauté académique et médicale. Cette classification est basée sur l'épaisseur de la tumeur primaire (T, également connu sous le nom d'indice de Breslow), la présence de cellules métastatiques dans les ganglions lymphatiques voisins (N) et la localisation des métastases dans l'organisme (M) (Tableau 1) (Balch et al., 2009).

Tableau 1. Classification TNM (*Tumor-Node-Metastasis*) des stades évolutifs du mélanome (Balch et al., 2009).

Classification		Caractéristiques tumorales	
		Épaisseur tumorale	Ulcération/Mitose
T	T1	≤ 1,0 mm	a) sans ulcération et mitose < 1/mm ² b) avec ulcération ou mitose ≥ 1/mm ²
	T2	1,01 – 2,0 mm	a) sans ulcération b) avec ulcération
	T3	2,01 – 4,0 mm	a) sans ulcération

	T4	> 4,0 mm	b) avec ulcération a) sans ulcération b) avec ulcération
		Nombre de ganglions affectés	Taille des ganglions affectés
N	N0	0	-
	N1	1	a) micro-métastase b) macro-métastase
			a) micro-métastase b) macro-métastase c) en transit sans nodule métastasé
	N2	2 – 3	a) micro-métastase b) macro-métastase c) en transit sans nodule métastasé
			-
N3	> 4	-	
		Site (localisation)	LDH sérique
M	M0	0	-
	M1a	Métastases cutanées, sous-cutanées ou ganglionnaires distantes	Normale
			Normale
	M1b	Métastases pulmonaires	Normale
	M1c	Métastases viscérales	Normale
Sites métastatiques distants		Elevée	

LDH: lactate déshydrogénase.

Le critère T est subdivisé en 4 catégories (T1 à T4) selon l'épaisseur de la tumeur. Chaque catégorie se compose de 2 sous-groupes, qui correspondent à la présence (a) ou l'absence (b) d'une ulcération tumorale primaire. Le critère N évalue le nombre de ganglions lymphatiques voisins contenant des cellules de mélanome métastatique, tandis que le critère M évalue l'emplacement des métastases dans le corps ainsi que l'augmentation de la concentration sérique de la lactate déshydrogénase (LDH) (Balch et al., 2009). Selon les paramètres observés pour cette classification, quatre stades évolutifs principaux du mélanome sont proposés (I, II, III et IV) (Tableau 2).

Tableau 2. Les quatre stades évolutifs principaux du mélanome (I, II, III et IV) selon les critères proposés par la classification TNM (Balch et al., 2009).

Stade		T	N	M
I	Ia	T1a	N0	M0
	Ib	T1b, T2a	N0	M0
II	IIa	T2b, T3a	N0	M0
	IIb	T3b, T4a	N0	M0
	IIc	T4b	N0	M0
III	IIIa	T1 – T4b	N1a, N2a	M0
	IIIb	T1 – T4b	N1b, N2b, N2c	M0
	IIIc	T1 – T4b	N3	M0
IV	-	T1 – T4b	N1 – N3	M1

Aux stades III et IV de la classification TNM, les options de traitement en chimiothérapie sont limitées et le taux de succès thérapeutique varie de 4 à 26% (Matthews et al., 2017; Prado, Svoboda, et Rigel, 2019; Tracey et Vij, 2019). Les principaux mécanismes moléculaires impliqués dans le développement du mélanome ainsi que les stratégies thérapeutiques sont discutés en détail dans les sections suivantes.

2. 3. 4. Mécanismes moléculaires impliqués dans le développement du mélanome

Le mélanome est l'un des cancers présentant le plus d'hétérogénéité génétique et clinique en raison des mécanismes moléculaires complexes impliqués dans ses étapes de progression. La dérégulation du contrôle du cycle cellulaire, les altérations des voies RAS/RAF/MEK et AKT/PI3K, ainsi que l'échappement à la réponse immunitaire sont cependant des caractéristiques de tous les mélanomes métastatiques (Curtin et al., 2005; Schadendorf, van Akkooi, et al., 2018).

2.3.4.1. Dérégulation du cycle cellulaire

La dérégulation du cycle cellulaire dans les cellules de mélanome est responsable de la prolifération cellulaire incontrôlée. La mutation du gène *CDKN2A* (*Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A*), présente dans 25 à 50% des cas familiaux de mélanome, a été associée à un risque élevé de mélanome. Ce gène code pour deux protéines distinctes, p16^{INK4A} et p14^{ARF}, qui agissent comme suppresseurs de tumeurs par la régulation négative des voies impliquant les

protéines Rb1 (*retinoblastoma protein 1*) et p53, respectivement (Chakraborty, Wieland, et Comfere, 2013).

Sous sa forme non phosphorylée, Rb1 séquestre le facteur de transcription E2F dans le cytoplasme, bloquant ainsi l'expression des gènes essentiels à la progression du cycle cellulaire de la phase G1 à la phase S. La phosphorylation de Rb1 entraîne la libération du facteur E2F et l'expression des gènes responsables de la progression dans le cycle cellulaire. Cette phosphorylation est assurée par un complexe catalytique composé de la cycline D1 et de CDK4 ou CDK6, dont l'activité dépend des niveaux de p16^{INK4A}. Le complexe cycline D1-CDK4/6 est inhibé en présence de p16^{INK4A} ce qui réduit la phosphorylation de Rb1 et induit l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1/S (Figure 8). Dans les cellules de mélanome, les mutations génétiques affectant le locus *CDKN2A* provoquent une suppression de p16^{INK4A}, entraînant une progression incontrôlée du cycle cellulaire. Des mutations dans le gène *CDK4* peuvent également se produire, conduisant à sa surexpression et donc à l'activation constitutive du complexe cycline D1-CDK4 (Potrony et al., 2015; Soura et al., 2016).

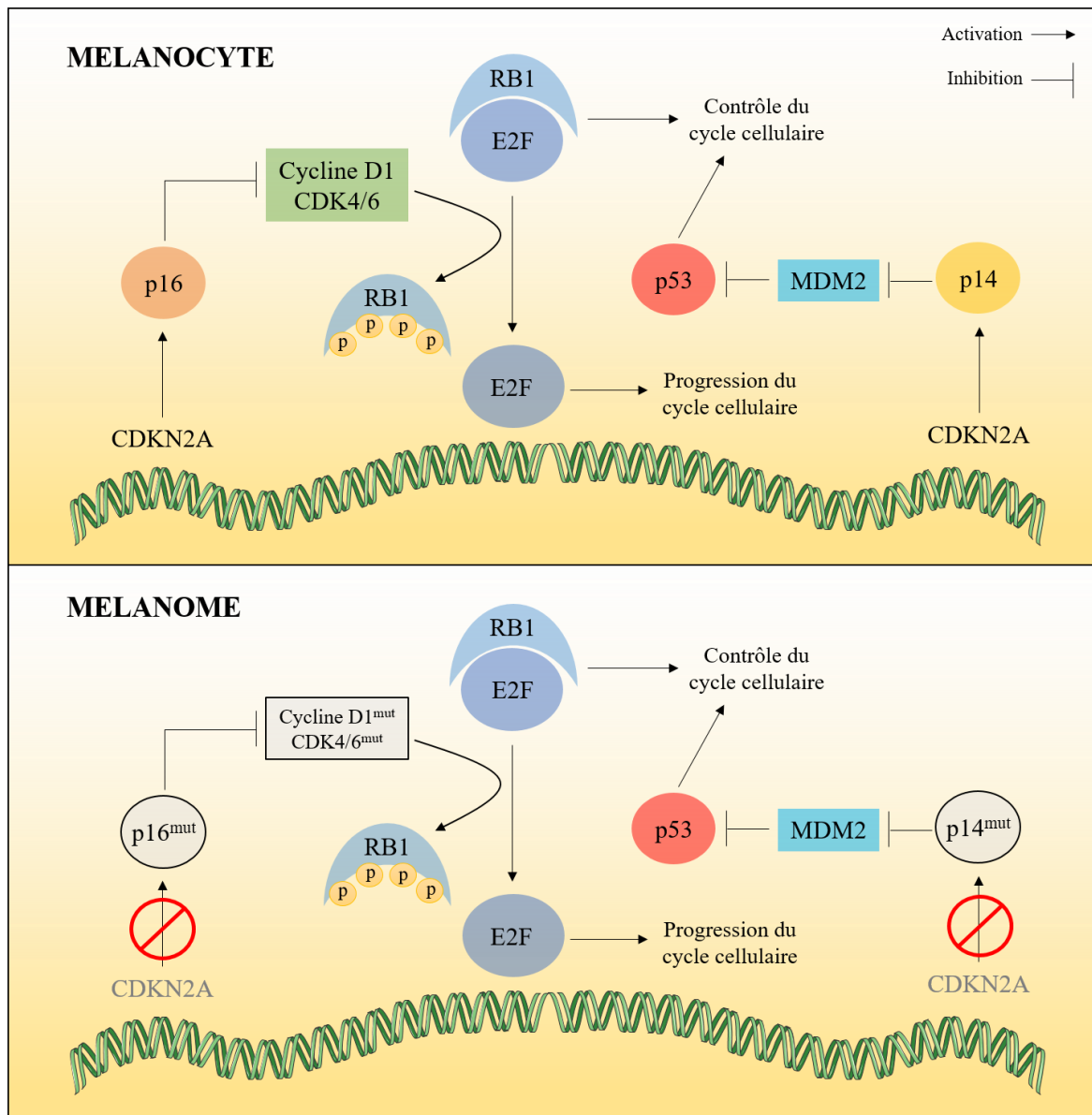


Figure 8. Principales voies de signalisations impliquées dans la régulation du cycle cellulaire et leurs respectives altérations dans les cellules de mélanome. Le gène *CDKN2A* est souvent muté dans les cellules de mélanome, provoquant une expression diminuée des protéines régulatrices du cycle cellulaire (p14 et p16). Ces protéines peuvent également être mutées, ainsi que les cyclines et les CDKs, conduisant à la progression du cycle cellulaire.

L'inhibition de la protéine p53 joue également un rôle majeur dans le développement du mélanome. L'activité de p53 est contrôlée par le facteur MDM2 (*Mouse Double Minute 2 homolog*), qui est lui-même régulé par p14^{ARF}. En se liant à p14^{ARF}, MDM2 est inhibé et par conséquent la protéine p53 est active. p53 contrôle l'expression de plusieurs gènes responsables de l'arrêt du cycle cellulaire, de la sénescence, de la réparation de l'ADN et de la mort cellulaire. Les mutations dans le locus *CDKN2A* entraînent une disparition de p14^{ARF}, induisant la

restauration de l'activité de MDM2 et par conséquent l'inactivation de p53 (Figure 8). La cellule peut donc poursuivre sa progression dans le cycle cellulaire, sans point de contrôle en cas d'anomalie génétique (Chakraborty, Wieland, et Comfere, 2013; Nag et al., 2013).

2.3.4.2. Altérations dans la voie RAS/RAF/MEK

La dérégulation de la voie des MAP kinases (*Mitogen-Activated Protein Kinase*, MAPK), aussi connue comme voie RAS/RAF/MEK, est observée dans de nombreux cancers, et en particulier dans le mélanome (Curtin et al., 2005) (Figure 9). Dans les mélanocytes sains, l'activation de cette voie commence par l'interaction des facteurs de croissance extracellulaires avec les récepteurs transmembranaires à activité tyrosine-kinase (RTK). Cette interaction entraîne l'activation de RAS, une protéine G présentant trois isoformes (HRAS, KRAS et NRAS) responsables du déclenchement d'une cascade de réactions qui aboutissent à la prolifération et à la survie cellulaire. Une fois stimulée, RAS forme un complexe avec l'une des isoformes de RAF (ARAF, BRAF ou CRAF). La formation de ce complexe conduit à l'activation de RAF, qui à son tour phosphoryle et active la protéine MEK (isoformes MEK1 et MEK2). Cette dernière active les isoformes de MAPK (ERK1 et ERK2), qui stimulent l'expression de protéines favorisant la prolifération cellulaire (cyclines, CDKs, etc.) et protègent la cellule de l'apoptose en modulant l'expression des protéines pro- et anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 (Cheng, Zhang, et Li, 2013; Lopez-Bergami, Fitchman, et Ronai, 2008).

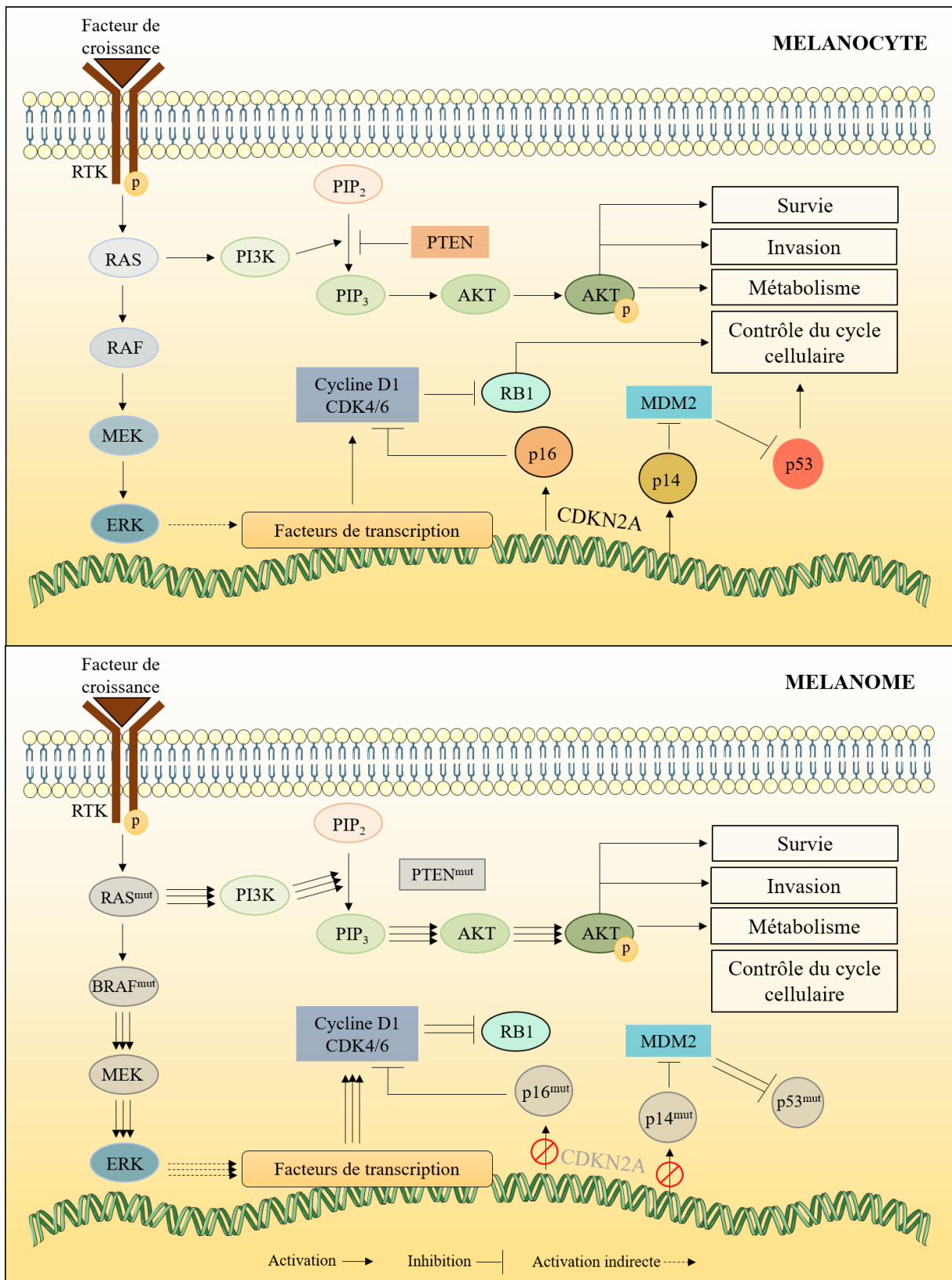


Figure 9. Signalisation RAS/RAF/MEK dans les mélanocytes, permettant le contrôle du cycle cellulaire et des voies de prolifération et survie cellulaire dans des conditions normales. Dans les cellules de mélanome, les mutations des protéines RAS, BRAF, CDKN2A, p16, p14, p53

et PTNEN provoquent une activation constitutive de cette voie, entraînant une signalisation proliférative excessive.

Une sur-activation de la voie RAS-RAF-MEK par mutation est observée dans environ 90% des mélanomes et la mutation prédominante affecte le gène *BRAF* dans 50 à 70% des cas. 80% des mutations *BRAF* conduisent au remplacement d'une valine par un glutamate en position 600 de la protéine (mutation *BRAF* V600E ou *BRAF*^{V600E}). Cette mutation rend la protéine constitutivement active, ce qui génère une stimulation proliférative même en l'absence de facteurs de croissance (Platz et al., 2008). Les isoformes *NRAS*, *HRAS* et *KRAS* sont pour leur part mutées dans 15-20%, 2% et 2% des mélanomes respectivement (Figure 10). La mutation *NRAS* la plus courante (>80% des cas) consiste en un remplacement d'une glutamine par la leucine et l'arginine en position 61 (*NRAS*^{Q61L/R}) (Chakraborty, Wieland, et Comfere, 2013; Cheng, Zhang, et Li, 2013). De la même façon que pour *BRAF*, la mutation de *RAS* conduit à l'activation constitutive de son activité GTPasique (Figure 9).

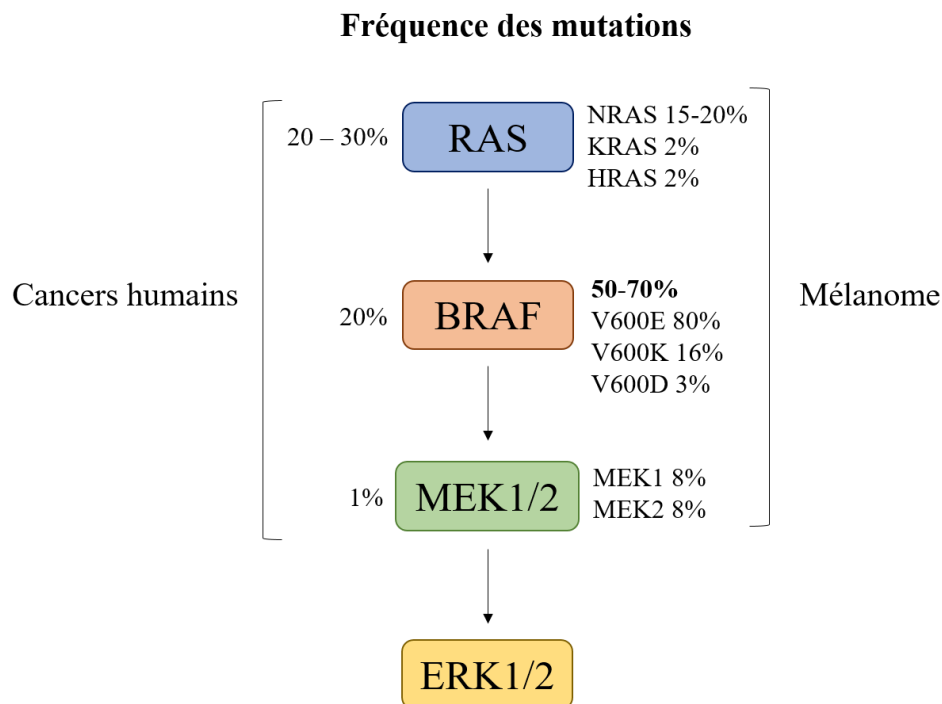


Figure 10. Fréquence des mutations des gènes codant pour les protéines de la voie de signalisation RAS/RAF/MEK, d'après Cheng, Zhang, et Li (2013).

2.3.4.3. Altérations dans la voie PI3K/AKT

L'activation constitutive de RAS déclenche non seulement la sur-activation de la voie RAF/MEK/ERK, mais aussi de la voie PI3K/AKT, les deux contribuant au maintien des signaux prolifératifs (Figure 9). PI3K (*phosphatidylinositol-3 kinase*) fait partie du groupe des lipides kinases, et sa fonction principale est la transformation du phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP₂) en phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate (PIP₃). Ce dernier active la protéine kinase phosphoinositide-3-dépendante (PDK1), responsable de la phosphorylation de la protéine AKT (p-AKT) et, par conséquent, de son activation (Fruman et Rommel, 2014). La p-AKT active est capable de phosphoryler plusieurs protéines cibles. L'un de ces substrats est la GSK3 β , qui est inhibée lorsqu'elle est phosphorylée par p-AKT. En raison de cette inhibition, la β -caténine libre est capable de s'accumuler dans le cytoplasme cellulaire et de se déplacer vers le noyau, où elle peut induire la surexpression d'oncogènes, tels que le c-MYC et la cycline D1 (Figure 11). p-AKT empêche donc la cellule tumorale d'entrer en apoptose et favorise la progression du cancer (Paluncic et al., 2016).

Dans les mélanocytes, la voie PI3K/AKT est contrôlée par PTEN (*Phosphatase and Tensin homolog*), qui agit comme un inhibiteur de cette voie, capable de catalyser la réaction de déphosphorylation de PIP₃ en PIP₂. L'activité de PTEN se traduit donc par des niveaux réduits de p-AKT, inhibant les événements cellulaires prolifératifs induits par la voie PI3K/AKT (Curtin et al., 2005). Cependant, le gène codant pour PTEN est souvent altéré dans les cellules de mélanome. C'est le cas dans 7.3% des cellules de mélanome primaire, 15.2% des cellules de mélanome métastatique et 27.6% des lignées cellulaires de mélanome (Aguissatouré et Li, 2012). Cette mutation réduit considérablement l'expression de PTEN, permettant une activation constitutive de la voie PI3K/AKT.

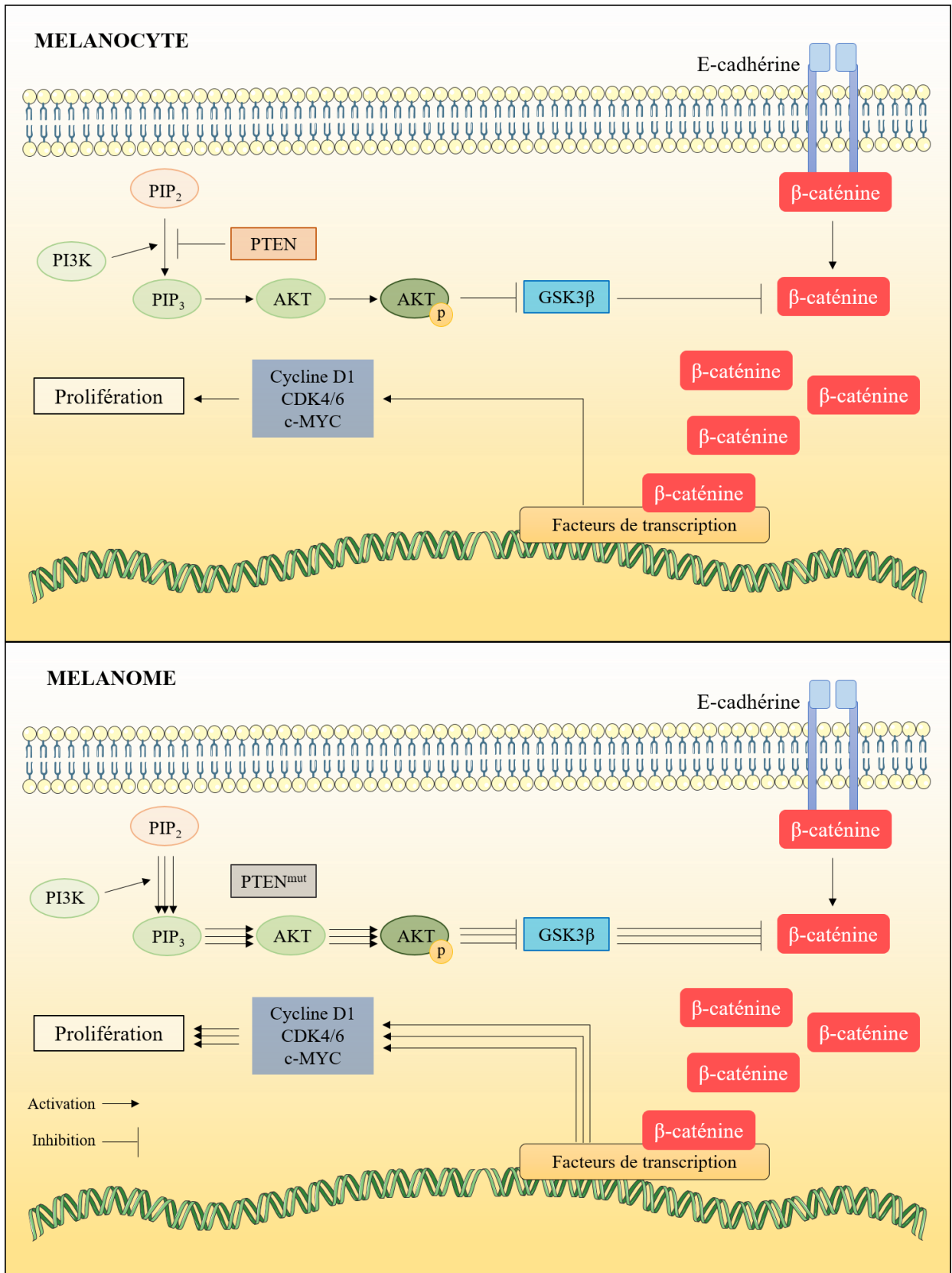


Figure 11. Signalisation PI3K/AKT et ses effets sur la libération de la β-caténine et, par conséquent, sur la prolifération cellulaire. Dans les cellules de mélanome, le principal facteur

régulateur de cette voie (PTEN) peut être muté, favorisant une signalisation cellulaire proliférative excessive.

2.3.5. *Thérapie du mélanome*

Plusieurs options sont envisageables pour le traitement du mélanome. Le choix des meilleures stratégies thérapeutiques dépend principalement de deux facteurs: le stade de développement de la maladie et les conditions cliniques du patient (p. ex. la tolérance au traitement, les fonctions hépatique, rénale, cardiaque, etc.) (Domingues et al., 2018).

2.3.5.1. La chirurgie

La chirurgie est le traitement de choix pour les stades non métastatiques du mélanome (I et II). Il est possible d'y associer éventuellement une chimiothérapie et/ou une radiothérapie limitant le risque de survie de cellules tumorales isolées et de récurrence. L'intervention chirurgicale consiste à réaliser une résection de la zone tumorale et éventuellement une lymphadenectomie élective des ganglions régionaux pour s'assurer que toutes les cellules cancéreuses sont éliminées (Tsao, Atkins, et Sober, 2004). Une meilleure compréhension des étapes de progression tumorale a permis d'affiner le geste chirurgical afin de garantir l'exérèse totale de la tumeur tout en limitant la taille de la cicatrice. Cette intervention permet généralement d'éliminer toutes les cellules tumorales, ce qui explique la très faible morbidité du mélanome à ses premiers stades (Moreira, Schmerling, et Buzaid, 2014).

2.3.5.2. La Radiothérapie

La radiothérapie est basée sur l'irradiation tumorale par des rayons de haute énergie (rayons γ , protons, hadrons). Elle est rarement utilisée en traitement de première intention du mélanome primaire mais peut être indiquée si la lésion ne peut pas être enlevée chirurgicalement ou lorsque les marges chirurgicales ne sont pas parfaitement établies, ce qui conduit à un risque élevé de métastase ganglionnaire ou de récurrence locale. La radiothérapie peut également être utilisée en complément d'une résection chirurgicale, pour assurer l'élimination de toutes les cellules cancéreuses pouvant rester au niveau du lit tumoral. Elle présente cependant de nombreux effets secondaires délétères pour les patients (p. ex. brûlures, nausées, fatigue, perte de cheveux et de poids, neutropénies, etc...) (McCourt, Dolan, et Gormley, 2014; Wainstein et Belfort, 2004).

2.3.5.3. La chimiothérapie conventionnelle

La chimiothérapie du mélanome est basée sur l'administration orale ou intraveineuse de médicaments cytotoxiques, utilisés dans les stades plus avancés du mélanome (III et IV), lorsqu'il a déjà acquis un potentiel invasif et métastatique. Les agents chimiothérapeutiques les plus classiquement utilisés comprennent les agents alkylants de l'ADN (p. ex. dacarbazine, témozolomide, carmustine, cisplatine, carboplatine, etc.) et les composés antimitotiques agissant sur la polymérisation des microtubules, comme les vinca-alcaloïdes (vincristine et vinblastine) et le paclitaxel (Domingues et al., 2018).

La dacarbazine (DTIC) est l'une des molécules les plus utilisées pour traiter les mélanomes. Il s'agit d'un agent alkylant de l'ADN qui donne des taux de réponse de 10 à 20% après quatre à six mois de traitement. Les études cliniques montrent cependant que seulement 2 % des patients recevant une chimiothérapie par DTIC seule sont encore en vie six ans après leur traitement, et l'association avec d'autres médicaments n'améliore pas significativement le taux de survie (Serrone et al., 2000).

Le témozolomide, une prodrogue qui subit une conversion rapide à pH physiologique en monométhyl triazénoïmidazole carboxamide (MTIC), un agent alkylant de l'ADN de structure proche de la DTIC, est indiqué pour les métastases cérébrales des mélanomes mais son efficacité n'est pas significativement meilleure que celle de la dacarbazine (Middleton et al., 2000). De la même façon, les vinca-alcaloïdes et le paclitaxel, respectivement inhibiteurs de la polymérisation et stabilisants des microtubules, donnent des taux de réponse compris entre 5 et 20% dans le traitement du mélanome métastatique (Buzaid, 2004).

La combinaison de ces agents cytotoxiques augmente le taux de réponse à 20 à 30% mais n'améliore pas le temps de survie moyen des patients. Au vu de ces faibles efficacités thérapeutiques, des combinaisons de cytotoxiques avec des cytokines dans des protocoles dits de « bio-chimiothérapie » ont été envisagées. En particulier, l'utilisation de l'interféron alpha (IFN- α) et de l'interleukine 2 (IL-2) en combinaison de cytotoxiques a été évaluée pour le traitement du mélanome métastatique (Moreira, Schmerling, et Buzaid, 2014; Schwartsman et al., 2019).

2.3.5.4. La bio-chimiothérapie

L'association de la dacarbazine avec l'IL-2 et l'IFN- α a été envisagée dès le début des années 1990. Il existe un certain nombre de combinaisons décrites, avec des doses et des schémas posologiques différents (Lugowska, Teterycz, et Rutkowski, 2018).

L'IL-2 est une cytokine naturelle, sécrétée par les lymphocytes T4 (LT4), dont le rôle est notamment de stimuler la prolifération et la maturation des lymphocytes T et des cellules

NK. Les interférons (IFN) sont sécrétés par les monocytes et les lymphocytes, en particulier les T4 Th1, et agissent en complément de l'IL-2 en augmentant l'activité phagocytaire des macrophages et l'activité cytotoxique des lymphocytes T8 et NK. La combinaison des deux cytokines permet d'induire une forte immunostimulation contre les cellules tumorales (Nicholas et Lesinski, 2011). La bio-chimiothérapie donne un taux de réponse supérieur à la chimiothérapie seule (entre 40 et 50% de réponse dans des études cliniques de phase II), mais plusieurs études concluent qu'elle ne génère pas une augmentation significative du taux de survie en cas de mélanome métastatique. Ce traitement présente par ailleurs deux inconvénients majeurs ; son coût important, qui réduit sa démocratisation et sa toxicité élevée, qui limite son usage au traitement des patients dont les fonctions cardiaque, pulmonaire et rénale sont préservées (Wainstein et Belfort, 2004).

Jusqu'en 2010, les alternatives pour le traitement du mélanome métastatique se limitaient principalement à l'utilisation de la dacarbazine seule ou en association, de l'IL-2 à forte dose et de la bio-chimiothérapie, malgré sa toxicité. Globalement, le mélanome métastatique était difficilement traité, et les taux de survie à 5 ans très limités. A partir de 2010, deux voies de traitement prometteuses ont été développées: une nouvelle modalité d'immunothérapie, basée sur l'utilisation d'inhibiteurs de points de contrôle immunologiques, et la thérapie ciblée (Lugowska, Teterycz, et Rutkowski, 2018). Parallèlement plusieurs travaux de recherche ont montré que la stratégie CAR-T présentée au paragraphe 2.1.6. pouvait s'avérer très efficace pour détruire les cellules de mélanome métastatique (Yvon et al., 2009).

2.3.5.5. L'immunothérapie des tumeurs par blocage des récepteurs inhibiteurs des lymphocytes

Une avancée majeure dans le traitement des tumeurs, récompensée par le prix Nobel de médecine 2018 décerné à James Allison et Tasuku Honjo, a été proposée dans les années 2000 (Freeman et al., 2000; Iwai, Terawaki, et Honjo, 2005; Leach, Krummel, et Allison, 1996). Il s'agit d'utiliser des anticorps inhibiteurs capables de bloquer spécifiquement deux récepteurs inhibiteurs de la réponse immunitaire antitumorale des lymphocytes T: PD-1 (*Programmed cell death 1*) et CTLA-4 (*Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated protein 4* ou antigène 4 du lymphocyte T cytotoxique). PD-1 est un récepteur exprimé à la surface des lymphocytes T capable de supprimer la réponse immunitaire lorsqu'il est activé (Figure 12). Les cellules de mélanome expriment le ligand de PD-1 (PD-L1) qui induit une tolérance du lymphocyte T aux antigènes tumoraux et une absence de réponse cytotoxique. L'inhibition de l'interaction PD-1/PD-L1 par des anticorps ou des petites molécules pharmaceutiques permet de restaurer une balance en faveur d'un signal de co-activation stimulateur qui déclenche la cytotoxicité des T8

sur les cellules tumorales. Parmi les anticorps monoclonaux inhibant le récepteur PD-1, on peut citer le pembrolizumab et le nivolumab (Robert et al., 2014; Weber et al., 2015). Ces médicaments inhibent l'interaction PD-1-PD-L1 et restaurent donc la cytotoxicité antitumorale des T8 (Figure 12) (Garcia-Diaz et al., 2017).

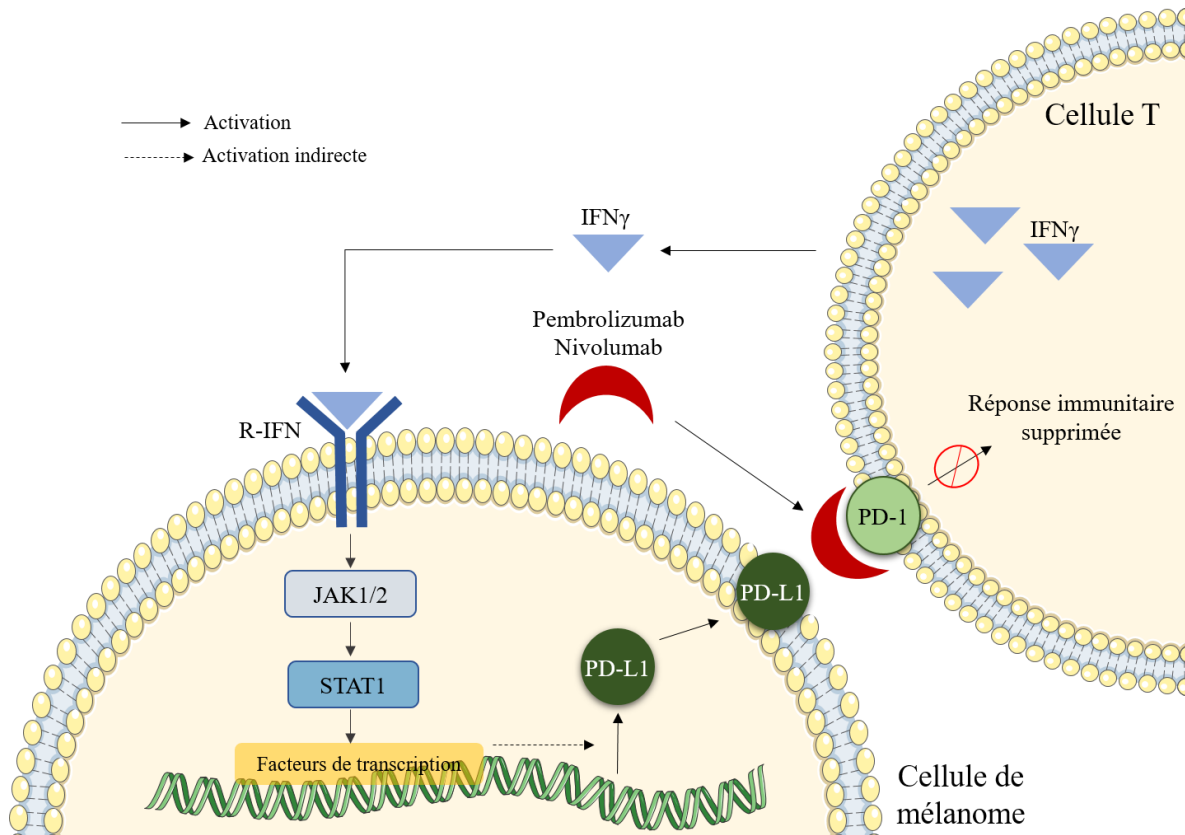


Figure 12. Mode d'action des inhibiteurs de PD-1 (pembrolizumab et nivolumab) utilisés en immunothérapie pour le traitement du mélanome métastatique.

D'autres anticorps monoclonaux humains (p. ex. l'ipilimumab) ont été développés pour cibler le récepteur CTLA-4, également exprimé à la surface des lymphocytes T (Robert et al., 2011). Au cours du processus de présentation antigénique, lors de l'interaction entre le CMH de classe II de la cellule dendritique et le TCR des lymphocytes T4, une seconde interaction membranaire entre le facteur B7 de la cellule dendritique et le récepteur CD28 du lymphocyte est indispensable pour l'activation du T4. Ce signal de co-activation lymphocytaire peut être bloqué par un récepteur inhibiteur spécifique, le CTLA-4 (*Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*). En raison de sa plus grande affinité pour B7, CTLA-4 s'ancre à ce facteur, l'empêchant d'interagir avec le récepteur CD28 du lymphocyte. Ainsi, un stimulus négatif est déclenché, entraînant l'anergie du lymphocyte T4 et sa tolérance à l'antigène tumoral (Menter et Tzankov, 2018).

En se liant au CTLA-4, l'ipilimumab bloque l'interaction CTLA-4/ B7 et libère ce dernier pour réactiver le lymphocyte via CD28 (Figure 13). Le résultat final de cette stimulation est une plus grande activité des lymphocytes T contre les cellules cancéreuses, mais au détriment d'un risque accru d'événements immunitaires dans d'autres tissus. Aujourd'hui, les inhibiteurs de CTLA-4 et PD-1 sont devenus les principaux anticorps utilisés dans le traitement du mélanome métastatique (stades III et IV), qu'ils soient ou non associés à des médicaments de thérapie ciblée développés encore plus récemment (Niezgoda, Niezgoda, et Czajkowski, 2015).

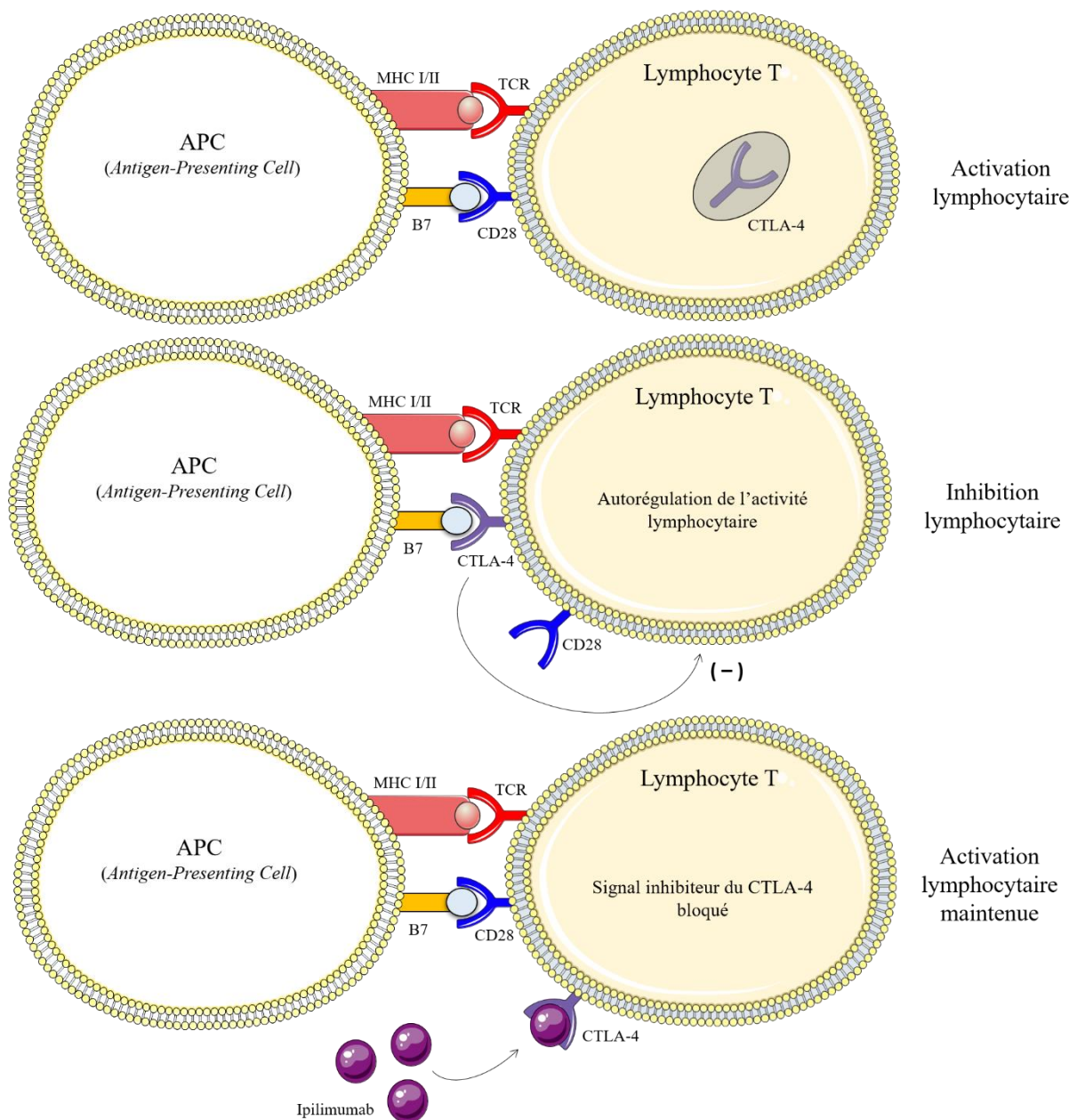


Figure 13. Mécanisme d'action du médicament ipilimumab, utilisé en immunothérapie du mélanome. L'ipilimumab bloque le récepteur CTLA-4 inhibiteur de l'activité lymphocytaire par interaction avec le facteur B7.

2.3.5.6. La thérapie ciblée

Une des avancées majeures des années 2000-2010 dans le traitement du cancer a consisté à cartographier les mutations génétiques des tumeurs afin d'identifier les altérations génétiques pouvant être ciblées spécifiquement et efficacement par des molécules pharmaceutiques. Cette approche permet non seulement d'identifier pour chaque type de cancer des cibles pharmacologiques pertinentes, mais également de réaliser un traitement à la carte adapté au profil génétique du patient et à l'évolution génétique de sa tumeur au cours de sa maladie.

Parmi les principaux agents chimiothérapeutiques ciblés pour le mélanome, on retrouve les inhibiteurs de la voie RAS-RAF-MEK, en particulier les inhibiteurs des protéines BRAF (BRAF^{V600E}) et MEK mutées (Mackiewicz et Mackiewicz, 2017). Comme décrit précédemment (Figures 9 et 10), ces protéines sont des cibles clés dans la signalisation cellulaire proliférative du mélanome.

En 2020, deux inhibiteurs BRAF (iBRAF) ciblant la mutation BRAF^{V600E} sont approuvés en Europe et aux États-Unis pour le traitement des patients atteints de mélanome avancé (stades III et IV): le vemurafenib et le dabrafenib (Chapman et al., 2011; Hauschild et al., 2012). Une troisième molécule, l'encorafenib sera probablement le prochain iBRAF à obtenir une AMM (Van Geel et al., 2017). Ces médicaments sont des petites molécules biodisponibles par voie orale (Figure 14) inhibitrices de la kinase BRAF. Elles se sont révélées plus efficaces dans le traitement du mélanome métastatique que la chimiothérapie et à la biochimiothérapie conventionnelles (Fujimura et al., 2019; Mackiewicz et Mackiewicz, 2017).

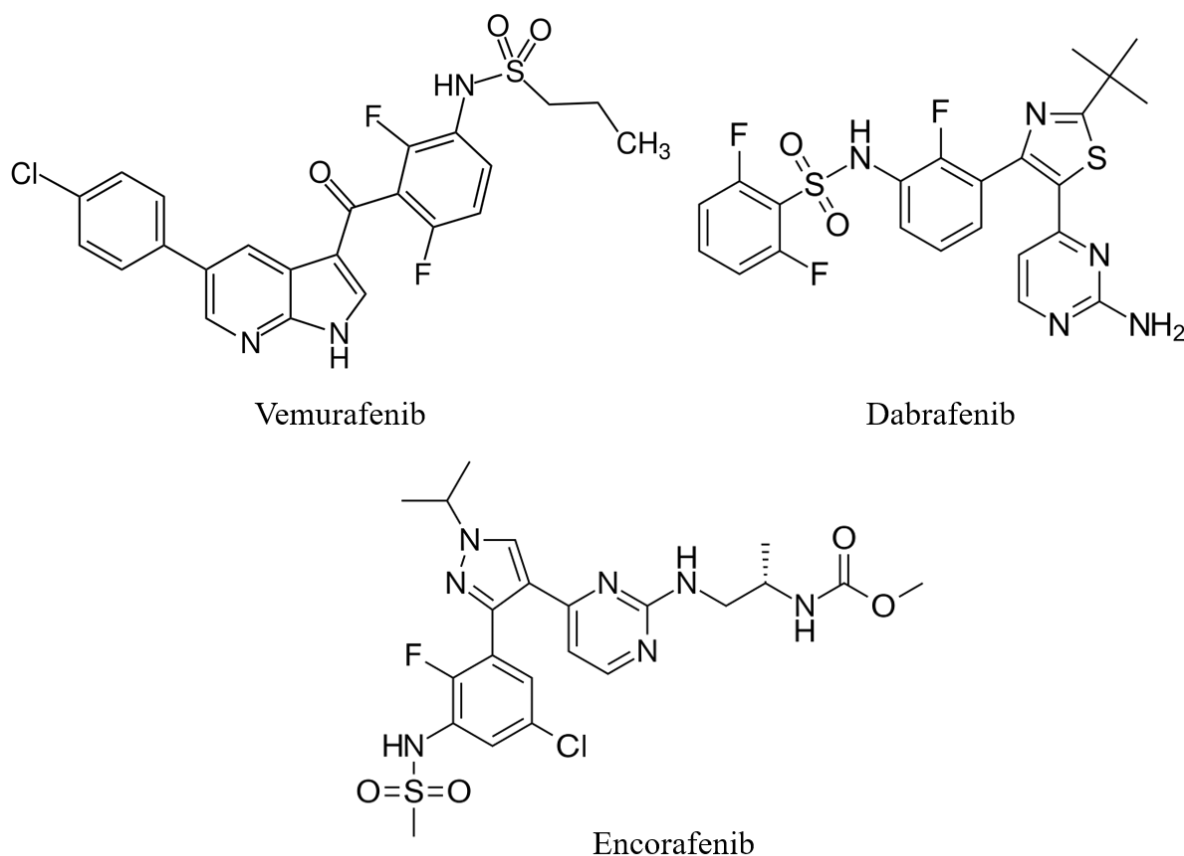


Figure 14. Structure chimique des inhibiteurs BRAF utilisés pour traiter le mélanome métastatique.

Des essais cliniques randomisés de phase III (BRIM-3 et BREAK-3) ont montré que les patients traités avec le vemurafenib ou le dabrafenib présentent une meilleure réponse au traitement en comparaison avec les patients traités par la dacarbazine seule (57% vs. 9% et 50% vs. 6%, respectivement). La survie médiane sans progression tumorale dans le groupe d'étude traité avec les iBRAFs était aussi significativement plus longue par rapport au traitement avec la dacarbazine (6.9 vs. 1.6 mois et 6.9 vs. 2.7 mois, respectivement) (Chapman et al., 2011; Hauschild et al., 2012; McArthur et al., 2014).

En plus des inhibiteurs BRAF, des inhibiteurs allostériques non-ATP dépendant des kinases MEK1 et MEK2 (iMEK) ont été développés et introduits dans le traitement ciblé du mélanome métastatique. Les principaux représentants de cette classe thérapeutique sont le cobimetinib (inhibiteur MEK1), le trametinib et le binimetinib (inhibiteurs MEK1 et MEK2) (Figure 15). Ces médicaments montrent une meilleure efficacité thérapeutique que le traitement par la dacarbazine dans les études cliniques de phase II et III menées auprès de patients atteints de la mutation BRAF, NRAS ou des deux (Ascierto et al., 2013; Dummer et al., 2017; Flaherty et al., 2012).

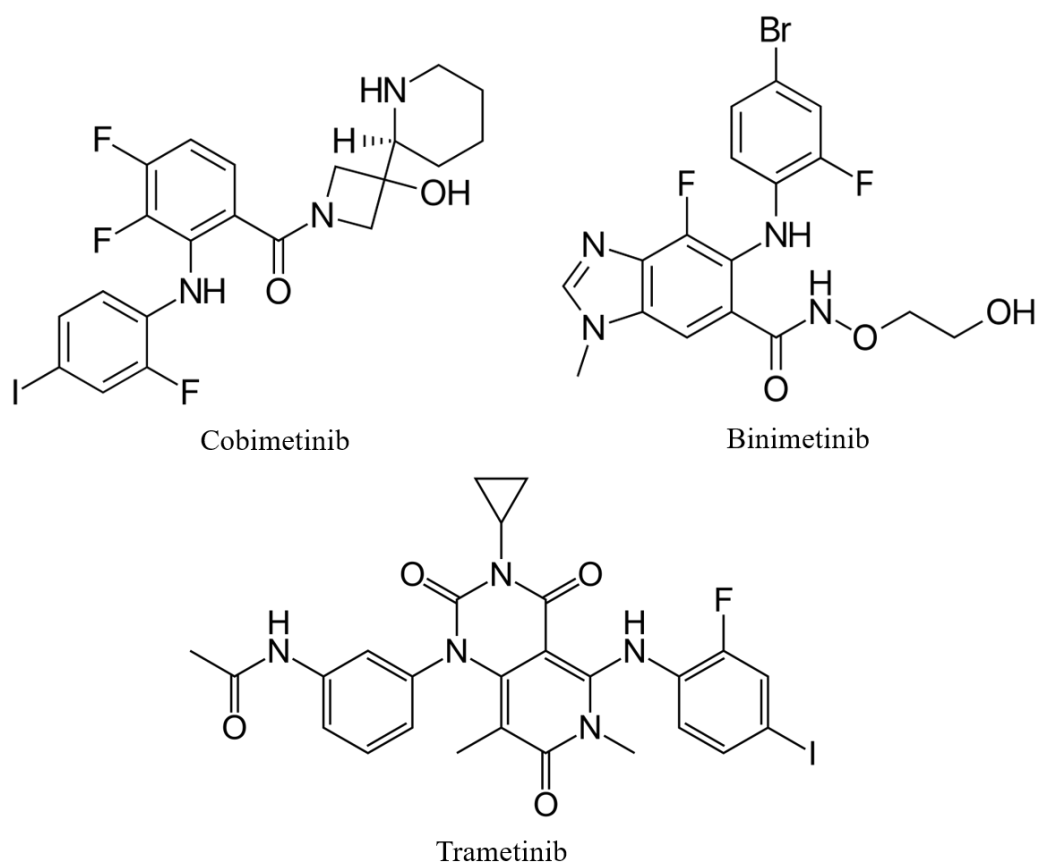


Figure 15. Structure chimique des inhibiteurs MEK1 et MEK2 utilisés pour traiter le mélanome métastatique.

Les inhibiteurs MEK et BRAF ont révolutionné la thérapie ciblée du mélanome, en apportant une solution à une impasse thérapeutique. Cependant, le traitement avec ces médicaments est souvent associé à court terme (quelques mois) à des mécanismes de résistance acquise. Environ 50% des patients développent une progression de la maladie après six mois de traitement (Mackiewicz et Mackiewicz, 2017; Villanueva et al., 2010). En revanche, des études précliniques et cliniques ont montré qu'une thérapie combinée (iBRAF + iMEK) peut limiter les phénomènes de résistance et améliorer l'efficacité du traitement (Robert et al., 2015). Plusieurs schémas posologiques impliquant l'utilisation simultanée d'inhibiteurs BRAF et MEK sont aujourd'hui appliqués dans le traitement des patients atteints du mélanome en stade III ou IV (Tableau 3).

Tableau 3. Principales associations d'inhibiteurs BRAF et MEK utilisées dans le traitement du mélanome métastatique (stade III et IV) (Schadendorf, van Akkooi, et al., 2018).

Thérapie combinée	Cible	Posologie
Drabafenib	BRAF	150 mg administrés par voie orale, deux fois par jour
Trametinib	MEK	2 mg administrés par voie orale, une fois par jour
Vemurafenib	BRAF	960 mg administrés par voie orale, deux fois par jour
Cobimetinib	MEK	60 mg administrés par voie orale, une fois par jour
Encorafenib	BRAF	450 mg administrés par voie orale, une fois par jour
Binimetinib	MEK	45 mg administrés par voie orale, deux fois par jour

La durée du traitement varie en fonction de l'état clinique du patient et du stade de progression de la maladie.

Parmi les autres médicaments développés dans le cadre de la thérapie ciblée, on retrouve des inhibiteurs de protéines clés impliquées dans la voie PI3K/AKT, notamment des inhibiteurs AKT (p. ex. MK2206), PI3K (p. ex. PI-103, BKM120, GSK2636771, INCB050465 et IPI-549) et mTOR (p. ex. everolimus et temsirolimus), ainsi que des inhibiteurs du c-KIT (un récepteur du facteur de croissance SCF, *stem cell factor*). Des inhibiteurs des récepteurs du VEGF (p. ex. le bevacizumab) ont également été décrits comme alternative possible pour contrôler la progression tumorale par inhibition du processus d'angiogenèse (Figure 16). Du fait de leur découverte récente, ces agents chimiothérapeutiques font encore l'objet de développement clinique (Domingues et al., 2018). Enfin, il faut également noter que la recherche d'inhibiteurs de kinases est très active dans les laboratoires de recherche; par exemple pour le mélanome métastatique, les inhibiteurs de CDK et des kinases PIM (sérines thréonine kinases) sont largement étudiés (Shannan et al., 2016).

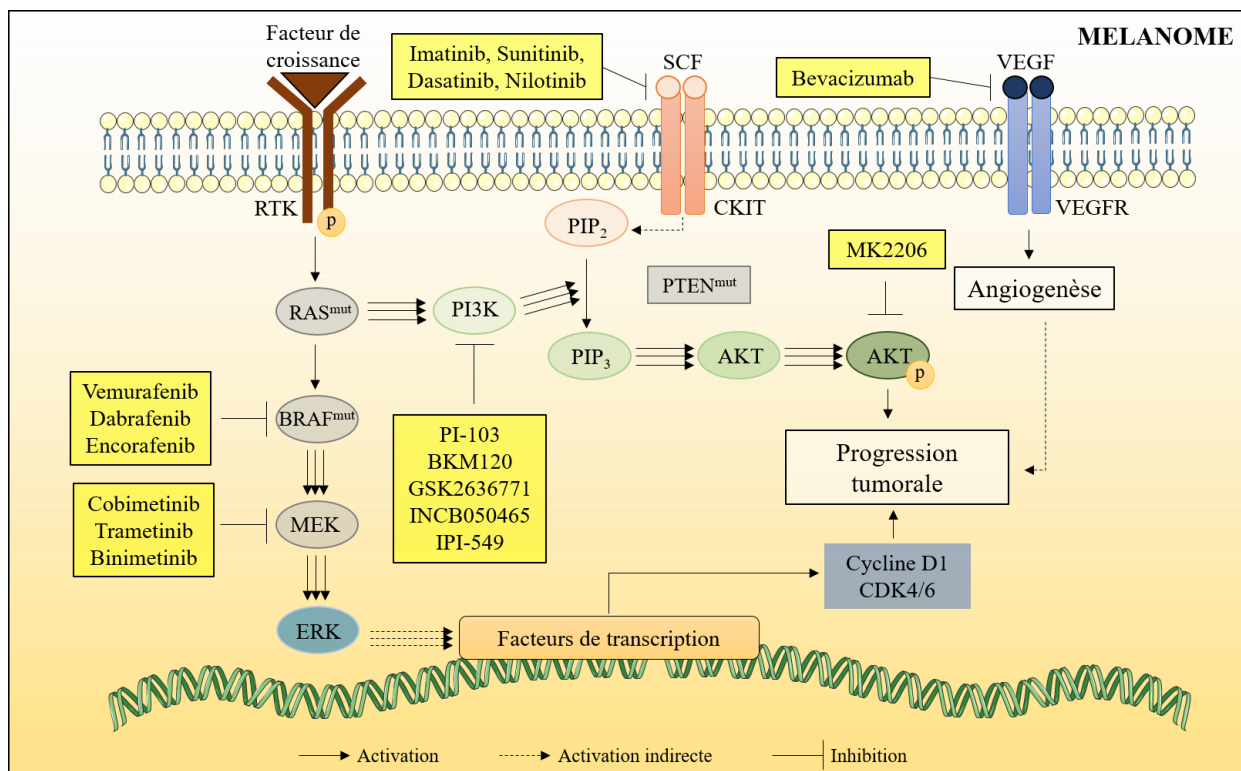


Figure 16. Principaux mécanismes visés dans la thérapie ciblée du mélanome métastatique.

Malgré les progrès apportés par la thérapie ciblée, ces médicaments présentent toujours une toxicité élevée, du fait de l'administration de doses élevées qui limitent la sélectivité d'action sur les cellules tumorales. De nombreux effets indésirables classiquement observés avec les anticancéreux sont enregistrés, tels que des effets cutanés, gastro-intestinaux, oculaires, cardiaques et musculo-squelettiques. D'autres effets indésirables sont spécifiquement associés à certaines molécules; par exemple le dabrafenib provoque de la fièvre et le vemurafenib induit une photosensibilité du patient. D'autres effets indésirables moins fréquents peuvent également être observés, comme l'anémie, la parésie faciale (encorafenib), la neutropénie (dabrafenib), les éruptions cutanées et l'induction des cytochromes hépatiques (vemurafenib) (Heinzerling et al., 2019). Au-delà de la toxicité, la réponse tumorale à la thérapie ciblée n'est pas maintenue à long terme en raison de l'acquisition de mécanismes de résistance au cours du traitement, ce qui nécessite l'utilisation de doses croissantes en cours du traitement (Tentori, Lacal, et Graziani, 2013).

2.3.6. Mécanismes de résistance à la chimiothérapie

Un nombre important de patients présente en effet une progression tumorale significative dans les 12 mois suivant le début du traitement (Chen et Davies, 2014). Ces

mécanismes de chimiorésistance peuvent préexister dans les cellules tumorales (en particulier dans le cas des mélanomes, les mélanocytes eux-mêmes sont des cellules présentant une forte résistance aux agressions chimiques du fait de leur fonction de protection de la peau) ou apparaître en cours de traitement (chimiorésistance acquise). De nombreuses altérations dans les voies de signalisation permettent d'expliquer la chimiorésistance acquise du mélanome (Kalal, Upadhyya, et Pai, 2017) et les mutations les plus communément observées affectent les effecteurs des voies RAS-RAF-MEK (voie MAPK) et PI3K/AKT (Tableau 4) (Kozar et al., 2019).

Tableau 4. Principaux mécanismes de résistance au traitement ciblé du mélanome (Chen et Davies, 2014).

Voie	Type d'Altération	Modification	Type de résistance	Référence
MAPK	Génétique	↑ NRAS	Acquise	Van Allen et al., 2014; Shi et al., 2014; Trunzer et al., 2013
	Génétique	↑ KRAS	Acquise	Shi et al., 2014
	Génétique	↑ BRAF	Acquise	Van Allen et al., 2014; Shi et al., 2014; Shi et al., 2012
	Génétique	↑ MEK1	Acquise	Van Allen et al., 2014; Shi et al., 2014; Wagle et al., 2011
	Génétique	↑ MEK2	Acquise ou spontanée	Van Allen et al., 2014; Villanueva et al., 2013
	Génétique	↓ NF1	Acquise ou spontanée	Van Allen et al., 2014; Maertens et al., 2013; Whittaker et al., 2013
	Epigénétique	Epissage BRAF	Acquise	Poulikakos et al., 2011; Shi et al., 2014
PI3K/AKT	Génétique ou épigénétique	↓ PTEN	Acquise ou spontanée	Nathanson et al., 2013; Trunzer et al., 2013
	Génétique	↑ PI3KCA ou PI3KCG	Acquise	Van Allen et al., 2014; Shi et al., 2014
	Génétique	↓ PI3KR2	Acquise	Shi et al., 2014

	Génétique	↑ AKT1 ou AKT3	Acquise	Shi et al., 2014
D'autres	Epigénétique	↑ RTK	Acquise	Girotti et al., 2013
	Génétique	↓ CDKN2A	Acquise ou spontanée	Shi et al., 2014
	Génétique	↑ MITF	Acquise	Van Allen et al., 2014

Voie MAPK (RAS/RAF/MEK). ↑ représente des mutations d'activation, d'amplification ou de surexpression génique, tandis que ↓ représente des mutations d'inactivation, de délétion ou de sous-expression génique.

L'absence d'altération dans la voie RAS/RAF/MEK est cruciale pour l'efficacité clinique des iBRAFs. La réactivation de cette voie dans les cellules de mélanome est donc l'un des principaux phénomènes induisant une chimiorésistance acquise aux iBRAF. Des mutations somatiques dans le gène NRAS qui affectent les résidus G12, G13 ou Q61 maintiennent la protéine à l'état actif, liée au GTP, ce qui entraîne une activation constitutive de la voie. Les mutations NRAS sont détectées dans environ 20% des mélanomes traités, en particulier ceux traités avec les iBRAFs (Van Allen et al., 2014; Shi et al., 2014; Trunzer et al., 2013). La résistance aux iBRAFs peut également être médiée par une amplification (\cong 18%) ou un épissage atypique (\cong 14%) du BRAF^{V600E} (Shi et al., 2014). L'épissage alternatif entraîne l'expression de protéines BRAF^{V600} tronquées qui ne contiennent pas le domaine de liaison RAS N-terminal mais qui conservent le domaine kinase. Les protéines BRAF^{V600} raccourcies forment des homodimères résistants aux iBRAFs (Poulikakos et al., 2011) (Figure 17).

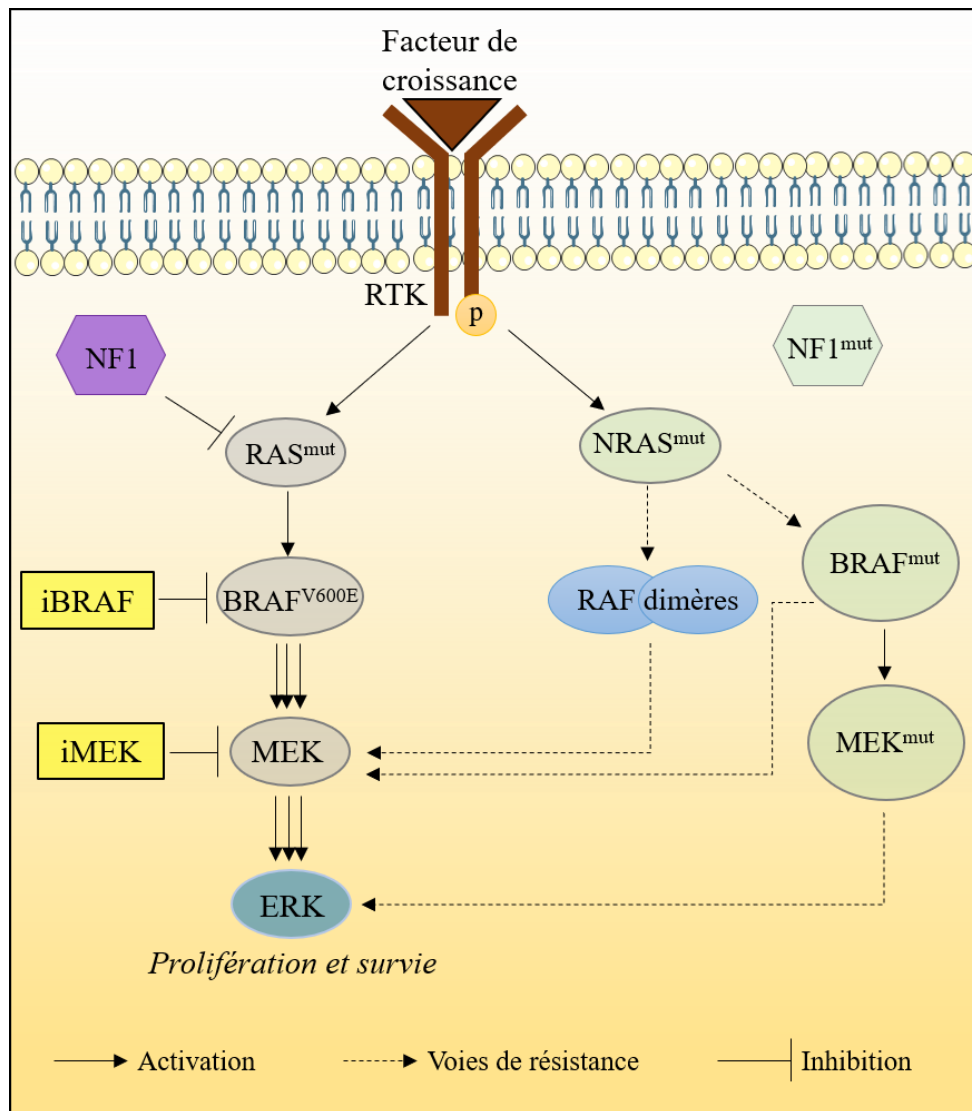


Figure 17. Aberrations dans la voie de signalisation MAPK (RAS/RAF/ERK) conduisant à la chimiorésistance. Le BRAF^{V600E} est inhibé par les iBRAFs, provoquant l'inactivation de la voie MAPK. L'amplification ou l'épissage alternatif du BRAF^{V600E} (BRAF^{mut}) réactive la voie MAPK dans les tumeurs résistantes aux iBRAFs. De plus, la voie MAPK peut être réactivée par des mutations affectant les protéines NF1, NRAS ou MEK dans les tumeurs résistantes aux iBRAFs.

Des mutations de gain de fonction ont également été observées dans des gènes qui codent pour les kinases MEK1 et MEK2, rendant les cellules tumorales résistantes aux iMEKs. Les principales mutations associées à la chimiorésistance sont MEK1^{K57N}, MEK1^{Q56P}, MEK1^{V60E}, MEK1^{C121S}, MEK1^{G128V}, MEK1^{E203K}, MEK2^{V35M}, MEK2^{L46F}, MEK2^{C125S} et MEK2^{N126D} (Van Allen et al., 2014; Wagle et al., 2011). L'incidence de ces mutations dans les

tumeurs présentant une résistance acquise varie de 7 à 16% (Van Allen et al., 2014; Shi et al., 2014).

Des mutations impliquant des points de contrôle des MAPK ont également été rapportées dans des cas de mélanome chimiorésistants. Elles concernent notamment la neurofibromine-1 (NF1), une protéine régulant négativement l'activité de la RAS en favorisant l'hydrolyse du GTP en GDP. En plus des mutations entraînant une perte de fonction, l'activité de NF1 peut être diminuée en raison d'une dégradation protéasomique excessive (Maertens et al., 2013). L'inactivation de NF1 augmente les activités de HRAS, KRAS et CRAF dans les cellules de mélanome mutées (BRAF^{V600E}), ce qui permet de rétablir la réactivation de ERK même en présence d'un iBRAF (Whittaker et al., 2013) (Figure 17).

Comme pour la voie RAS/RAF/MEK, des altérations dans les protéines clés de la voie PI3K/AKT peuvent se produire en fonction du traitement, entraînant une résistance acquise. Des mutations dans les protéines PI3K (PI3KR2, PI3KCA et PI3KCG) ont été identifiées dans les mélanomes qui ont progressé après le traitement par iBRAFs. Les mutations PI3K augmentent la phosphorylation de l'AKT et diminuent la sensibilité au vemurafenib *in vitro*, suggérant que ces mutations peuvent entraîner une résistance aux iBRAFs dans les tumeurs réfractaires. De plus, ce phénomène de résistance peut être expliqué par des mutations activatrices de l'AKT1 (AKT1^{Q79K}) et de l'AKT3 (AKT3^{E17K}) (Shi et al., 2014), ainsi que par la délétion de la principale protéine régulatrice de cette voie (PTEN) en cours de traitement (Nathanson et al., 2013) (Figure 18).

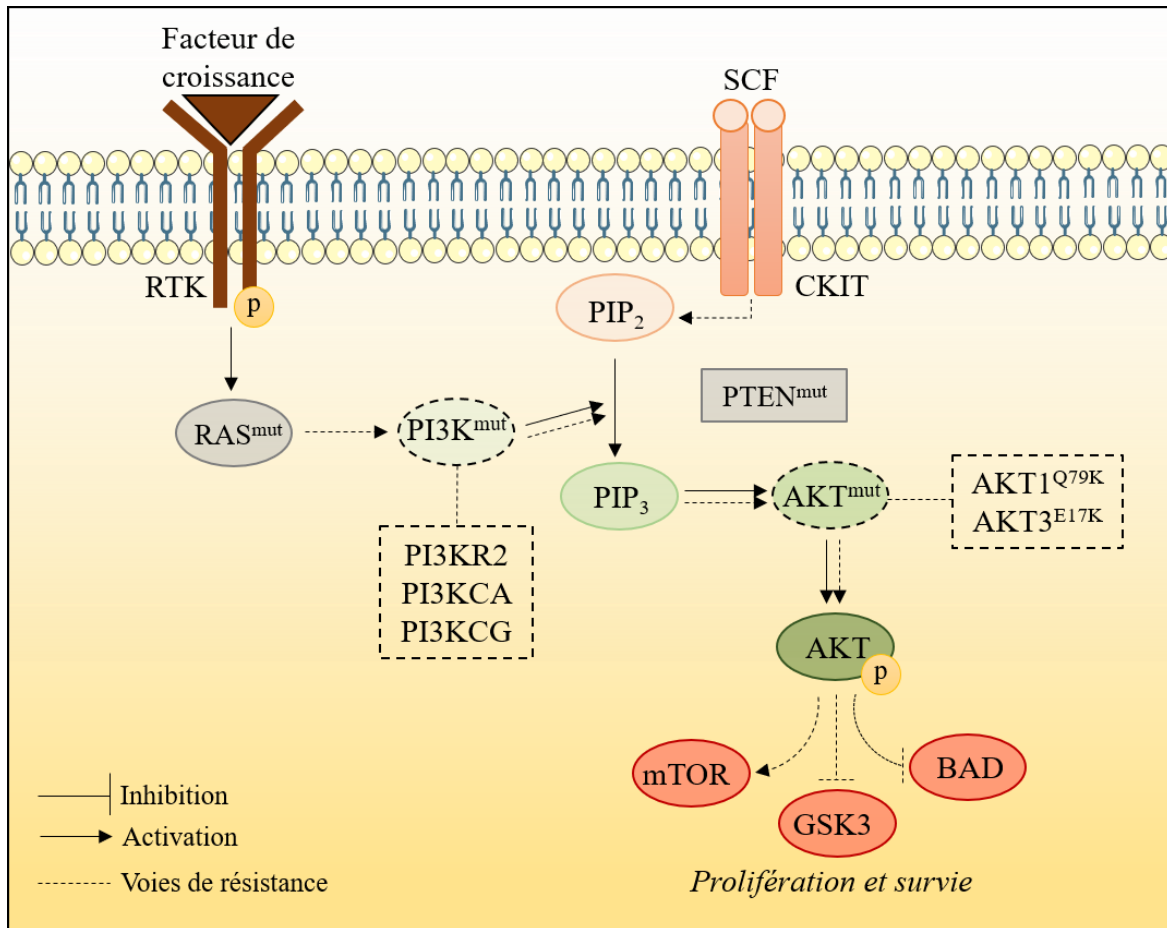


Figure 18. Mécanismes de résistance indépendants de la réactivation MAPK. L'activation de RTK, des mutations dans PI3K ou AKT, ou des mutations de perte de fonction dans PTEN, peuvent médier la résistance à la chimiothérapie par la réactivation de la voie PI3K/AKT.

En raison de leur impact sur les taux de survie des patients atteints de mélanome métastatique, les mécanismes de résistance à la chimiothérapie sont de plus en plus étudiés (Tentori, Lacal, et Graziani, 2013). Toute molécule capable de réverser la chimiorésistance ou de sensibiliser les cellules tumorales à l'effet de la chimiothérapie ou de la radiothérapie peut en effet présenter un intérêt majeur pour la cancérologie clinique. Plusieurs groupes de recherche se consacrent à l'étude de nouvelles molécules cytotoxiques ou cytostatiques présentant des modes d'action innovants et au développement de nouvelles approches thérapeutiques utilisant des molécules bioactives déjà connues (Barreiro, 2019). L'objectif est à la fois d'améliorer la réponse antitumorale avec la plus faible dose possible de médicament cytotoxique, afin de limiter les effets toxiques dans les tissus sains et de retarder les mécanismes de résistance, et d'envisager des alternatives au traitement tout chimiothérapeutique, par exemple le développement d'interventions nutritionnelles permettant de chimiosensibiliser ou radiosensibiliser les tumeurs aux agents anticancéreux (Vinod, Maliekal, et Anto, 2013).

L'objectif est également aujourd'hui d'identifier des molécules présentant des modes d'action pharmacologiques originaux, limitant les mécanismes de chimiorésistance par rapport aux agents cytotoxiques pro-apoptotiques conventionnels. Dans ce contexte, un regain d'intérêt pour les *produits naturels* est perceptible, du fait de leur chimiodiversité structurale suggérant la possibilité de découvrir des modes d'actions originaux, et d'identifier des molécules pas ou peu toxiques présentant un intérêt pour la chimiosensibilisation, la radiosensibilisation et/ou la réversion de la résistance multi-drogue.

2.4. Les produits naturels comme source de nouvelles molécules pour le traitement du mélanome

Un produit naturel est un composé chimique présent naturellement dans l'environnement, produit par un être vivant (végétal, animal ou micro-organismes) en réponse à un stimulus physiologique ou environnemental. Les produits naturels peuvent en particulier présenter une fonction de défense écologique contre des agresseurs (substances toxiques ou allélopathiques repoussant les prédateurs, compétiteurs, envahisseurs), et assurer ainsi la survie et le maintien de l'intégrité de l'organisme. Pour cette raison, ces composés ont généralement des activités pharmacologiques et peuvent être utilisés pour la conception de nouveaux produits pharmaceutiques. Historiquement, les produits naturels ont considérablement contribué à la découverte de nouveaux médicaments. En analysant les nouveaux médicaments approuvés par la *Food and Drug Administration* (FDA) aux États-Unis entre 1981 et 2010, Newman et Cragg (2012) ont constaté que 34% de ces médicaments ont été obtenus directement ou indirectement de substances naturelles (Newman et Cragg, 2012).

Dans le domaine du cancer, sur la période allant des années 1940 à la fin de 2014, sur les 175 petites molécules approuvées, 85 (soit 49%) sont des produits naturels ou des composés qui en dérivent directement (Newman et Cragg, 2016). Concernant le mélanome, les molécules d'origine végétale et marine sont de plus en plus étudiées. Certaines font même partie de la thérapie conventionnelle contre le mélanome, et d'autres sont en phase de développement préclinique et/ou clinique (AlQathamaa et Prieto, 2015). Considérant que les travaux de cette thèse visent à identifier des molécules anti-mélanome à partir de plantes et de microalgues, les paragraphes suivants détaillent la biodiversité de ces organismes et de leurs métabolites, ainsi que leurs applications en cancérologie.

2.4.1. *Produits naturels issus de plantes terrestres*

Les plantes constituent un groupe d'organismes autotrophes par photosynthèse oxygénique divisés en quatre groupes principaux selon leurs caractéristiques morphologiques, telles que la présence de vaisseaux conducteurs, de graines, de fleurs et de fruits (les bryophytes, les ptéridophytes, les gymnospermes et les angiospermes). On estime qu'environ 298.000 espèces de plantes existent dans les zones terrestres émergées, le plus grand nombre se localisant principalement dans les tropiques. Au-delà des caractéristiques génétiques de chaque espèce, les facteurs environnementaux peuvent également interférer dans leur métabolisme, tels que les conditions de température, l'humidité, l'exposition au soleil, la composition du sol et la présence de phytopathogènes (Mora et al., 2011).

Les facteurs biotiques et abiotiques peuvent interférer non seulement avec le métabolisme primaire, mais aussi avec la production de métabolites secondaires de la plante (Berini et al., 2018). Le premier correspond à l'ensemble des processus métaboliques qui jouent un rôle essentiel dans les plantes, comme la photosynthèse, la respiration et le transport des solutés. Les composés impliqués dans le métabolisme primaire ont une distribution universelle dans les plantes. C'est le cas des acides aminés, des nucléotides, des lipides, des glucides et des chlorophylles. Inversement, le métabolisme secondaire consiste en des voies de biosynthèse accessoires qui produisent des composés qui n'ont pas une distribution universelle parce qu'ils ne sont pas nécessaires à toutes les plantes. Ces substances sont souvent produites en réponse à une condition de stress, comme une limitation en eau, des changements dans la composition minérale du sol, une exposition élevée au soleil, la présence de micro-organismes pathogènes, la présence d'herbivores ou d'autres espèces végétales envahissantes. Ces composés ont généralement des activités biologiques qui peuvent être exploitées pour la santé humaine. C'est le cas des acides phénoliques, des flavonoïdes, des alcaloïdes, des terpénoïdes, des coumarines, des tanins, des lignanes et des saponines, entre autres (Aharoni et Galili, 2011).

En cancérologie, les métabolites secondaires d'origine végétale sont considérés comme une source prometteuse de nouveaux médicaments. Les plantes ont des voies métaboliques extrêmement évoluées, impliquant des enzymes de structure et fonction uniques, capables de générer des constituants chimiques présentant une grande diversité structurale. Les structures chimiques inhabituelles produites par les plantes sont souvent associées à la découverte de mécanismes d'action innovants et tout aussi variés, la chimiodiversité étant le support de la pharmacodiversité. Dans certains cas, une seule molécule peut agir sur deux ou plusieurs cibles différentes, contribuant à la régression tumorale en moins de temps et avec une incidence moindre d'effets indésirables (Barreiro, 2019).

Les premiers agents anticancéreux d'origine végétale à avoir été utilisés en clinique sont les alcaloïdes isolés de *Catharanthus roseus* (Apocynaceae), communément appelés « vinca-alcaloïdes » (Figure 19). Après des étapes successives de fractionnement de l'extrait végétal, la vincristine et la vinblastine ont été obtenues et utilisées pour traiter une variété de cancers, tels que les lymphomes, les leucémies, le cancer du sein, le cancer des testicules, le sarcome de Kaposi et le cancer du poumon (Cragg et Pezzuto, 2016). Ces alcaloïdes sont également utilisés depuis longtemps dans le traitement du mélanome cutané (Corina et al., 2017).

Les taxanes constituent également une famille de substances obtenues à partir d'espèces du genre *Taxus* avec une large application en thérapie antitumorale. Leur principal représentant est le paclitaxel (Figure 19), commercialisé sous le nom de Taxol[®]. Actuellement, ce composé est principalement utilisé pour traiter le cancer du sein, de l'ovaire et du poumon, mais il fait aussi partie du traitement conventionnel du mélanome cutané (Corina et al., 2017). Les vinca-alcaloïdes et le paclitaxel ont révolutionné la thérapie anticancéreuse au moment de leur découverte, car leur mode d'action était complètement original à l'époque. Le mécanisme d'action des vinca-alcaloïdes implique une interaction avec la tubuline de manière à perturber l'assemblage du fuseau mitotique, ce qui empêche la division cellulaire. Contrairement aux vinca-alcaloïdes, les taxanes agissent en stabilisant les microtubules au lieu de les déstabiliser, ce qui affecte la fonction cellulaire normale et entraîne la mort cellulaire (Barreiro, 2019; Cragg et Pezzuto, 2016).

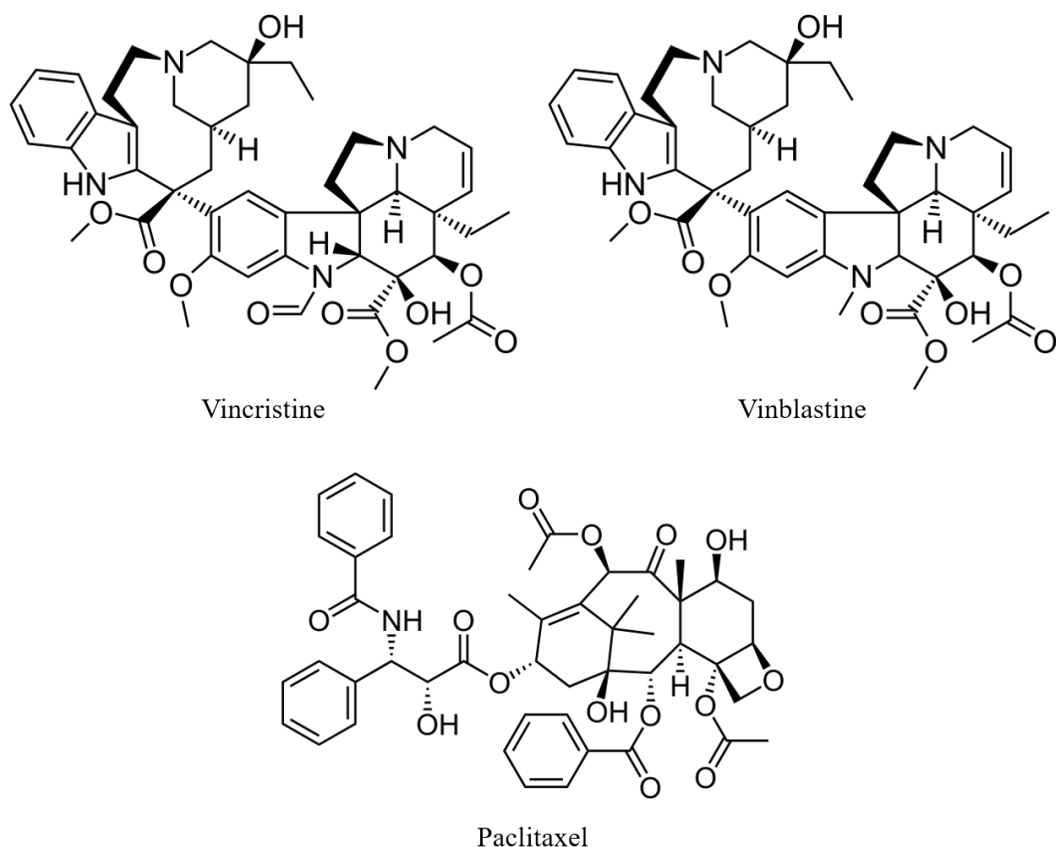


Figure 19. Structure chimique des vinca-alcaloïdes (vincristine et vinblastine) et du paclitaxel, principaux représentants de la chimiodiversité des plantes terrestres, utilisés pour le traitement du mélanome cutané.

Plus récemment, plusieurs classes de métabolites secondaires ont été évaluées pour leur potentiel antimélanome, en particulier des alcaloïdes, des terpénoïdes, des caroténoïdes et des composés phénoliques (AlQathamaa et Prieto, 2015). La berbérine, un alcaloïde isoquinoléique extrait du rhizome et des racines de plantes du genre *Berberis*, a réduit l'invasion des cellules de mélanome de manière concentration-dépendante. Son activité a été corrélée avec l'inhibition de la COX-2, l'expression des récepteurs de prostaglandines EP2 et EP4, et la réduction du niveau de PGE2 et de NF- κ B. Il est intéressant de noter que la berbérine est un générateur d'espèces réactives de l'oxygène, ce qui a entraîné une réduction de l'activité de ERK-1/2 et ATF-2 (*Activating Transcription Factor 2*). La berbérine a pu inhiber les métastases pulmonaires dans des modèles de souris C57BL/6 porteuses de mélanome, démontrant son potentiel anti-métastatique *in vivo* (Hamsa et Kuttan, 2012; Kim et al., 2012). Un effet similaire a également été observé pour l'harmine, un alcaloïde du type β -carboline extrait de l'espèce *Peganum harmala*. Ce composé a réduit la migration des cellules de mélanome en inhibant

l'expression de gènes pro-métastatiques tels que le MMP-9, l'ERK et le VEGF (Hamsa et Kuttan, 2011).

La curcumine, un pigment obtenu à partir du rhizome de *Curcuma longa* L., a montré des propriétés anti-invasives sur les cellules de mélanome par l'inhibition de l'expression des MMPs. L'effet inhibiteur *in vivo* de la curcumine a été démontré par la suppression des métastases pulmonaires induites par les cellules de mélanome B16-F10 chez les souris C57BL/6. En outre, il a été démontré que la curcumine inhibe la phosphorylation de la kinase Src et la voie STAT3 (Menon, Kuttan, et Kuttan, 1999; Wang et al., 2009).

La capsaïcine, principal composé actif du piment rouge (*Capsicum frutescens* L.), a inhibé la prolifération et la migration de cellules de mélanome dans des essais *in vitro*. Ces effets sont principalement liés à l'inhibition de la voie PI3K/AKT et à la diminution de l'expression du facteur VEGF (Shin et al., 2008). Le resvératrol et le ptérostilbène sont d'autres exemples de composés phénoliques ayant un potentiel antimélanome. Ce sont de polyphénols naturels existant en forte concentration dans les fruits rouges et les raisins tels que *Vitis vinifera* L. Leur mécanisme antimétastatique implique l'inhibition de l'expression de la molécule d'adhésion vasculaire 1, qui joue un rôle central dans le processus de migration, conduisant à une réduction du taux d'adhésion entre les cellules de mélanome et l'endothélium vasculaire (Bhattacharya, Darjatmoko, et Polans, 2011; Ferrer et al., 2005).

Les terpènes constituent également une classe de métabolites secondaires ayant des activités anticancéreuses importantes, y compris dans des modèles de mélanome. L'artémisinine est un agent antipaludique connu qui a aussi été étudié pour le traitement du mélanome. C'est un sesquiterpène dérivé de *Artemisia annua* L., utilisée en médecine traditionnelle chinoise comme antipyrétique. Il a été démontré que l'artémisinine cible la capacité d'adhésion des cellules de mélanome via la réduction de l'expression de l'intégrine $\alpha 5\beta 3$, ainsi que la réduction de la production de MMP-2, ce qui suggère un effet chimiothérapeutique potentiel de l'artémisinine dans le traitement du mélanome métastatique (Buommino et al., 2009).

Tous ces composés ne sont que quelques exemples de produits naturels issus de plantes médicinales qui présentent des effets importants dans des essais *in vitro* et/ou *in vivo*, et qui ont inspiré le développement de nouveaux modèles structuraux pour optimiser leur potentiel antimélanome (Figure 20).

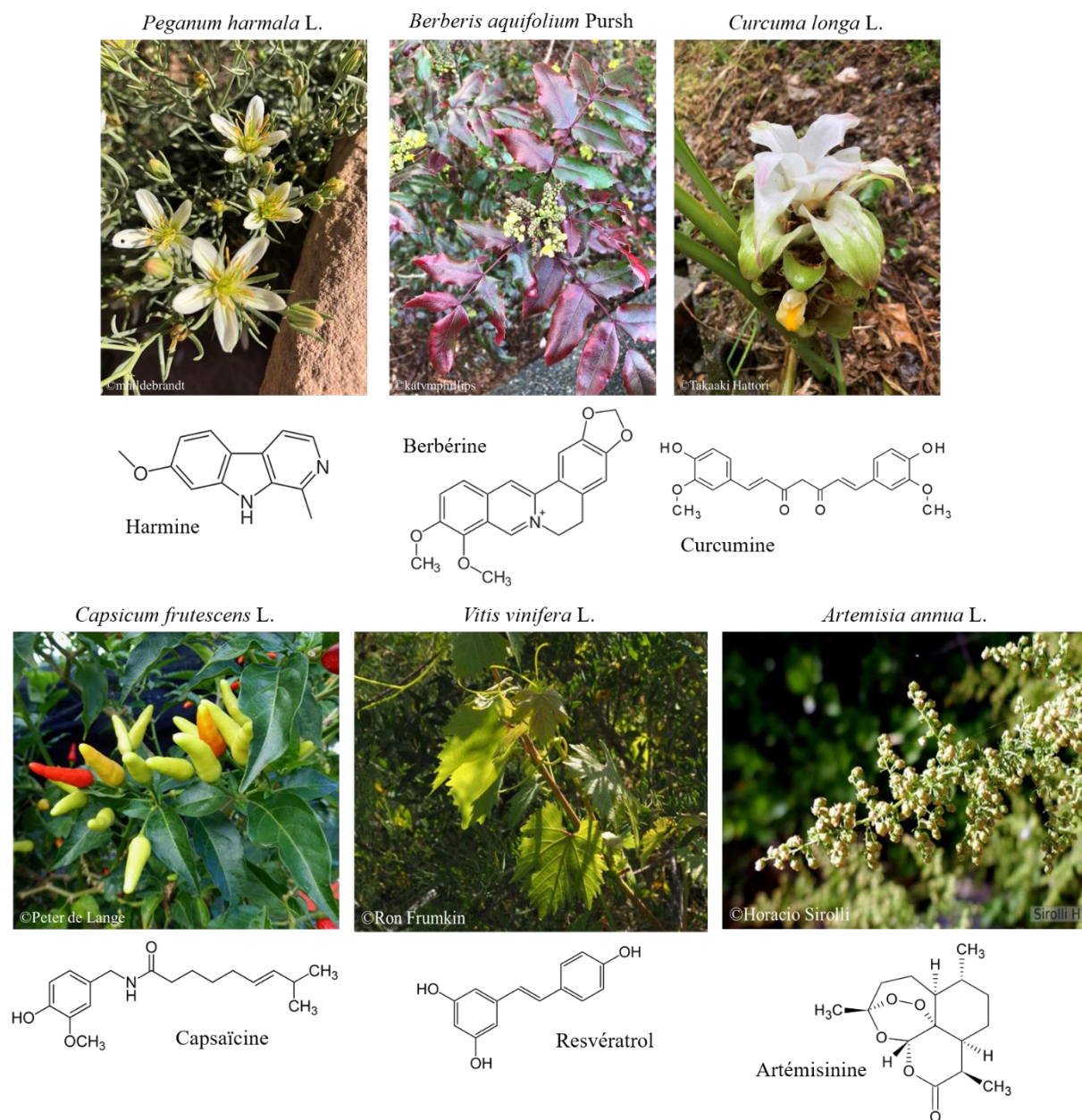


Figure 20. Exemples de la diversité de molécules extraites de plantes terrestres présentant un potentiel antimélanome (photos: *global biodiversity information facility*, GBIF).

2.4.1.1. Les plantes médicinales du Brésil

Le Brésil est l'un des pays les plus riches en biodiversité du monde. Avec une superficie territoriale de 8.511.996 km² et une côte atlantique de 7.491 km, le Brésil contient 10 à 20 % des espèces vivantes connues dans le monde et on estime qu'un nombre important reste à découvrir (Bolzani et al., 2012; Valli et al., 2013). Le Brésil contient environ 2 millions d'espèces de plantes, d'animaux et de microorganismes, répartis dans six biomes: la forêt pluviale amazonienne au Nord, la forêt tropicale atlantique littorale, la zone de savane au centre du pays (appelée *Cerrado*), la zone semi-aride au Nord-Est (appelée *Caatinga*), les zones

humides au Centre-Ouest connues sous le nom de *Pantanal* et les champs de la Pampa au Sud (Valli et al., 2012) (Figure 21).



Figure 21. Répartition géographique des différents biomes du territoire brésilien, d'après l'EMBRAPA (EMBRAPA, 2010).

Après sept ans de recherche, un groupe de 575 botanistes du Brésil et de 14 autres pays a conclu la version la plus récente d'un vaste répertoire sur la diversité des plantes, des algues et des champignons au Brésil, aujourd'hui estimée à 46.097 espèces. Près de la moitié, soit 43%, est exclusive (endémique) au territoire national. Le nombre total place le Brésil comme le pays le plus riche en plantes au monde. En moyenne, les botanistes découvrent environ 250 nouvelles espèces par an (Forzza, 2016). La liste contenant toutes les espèces cataloguées est disponible sur le site *Flora do Brasil 2020* (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora>), constamment mise à jour avec de nouvelles espèces. Beaucoup de ces espèces sont traditionnellement utilisées à des fins médicinales et peuvent présenter des caractéristiques morphologiques, un métabolisme et une composition chimique extrêmement variables selon le biome dans lequel elles vivent:

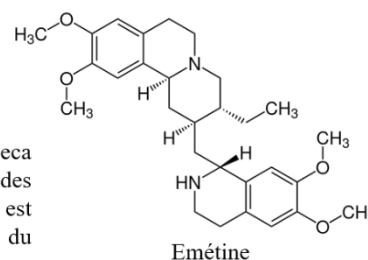
La forêt amazonienne: c'est une région au climat humide et chaud, composée d'une végétation dense avec de grands arbres, couvrant environ 40% du territoire brésilien. Ce biome est très fragile et sa productivité et sa stabilité dépendent du recyclage des nutriments, dont l'efficacité est directement liée à sa diversité biologique et à la structure complexe de la forêt. Il y a environ 800 espèces à potentiel économique et social en Amazonie et des centaines d'espèces utilisées comme médicinales et aromatiques, selon l'*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária* (EMBRAPA). Des exemples de plantes médicinales de l'Amazonie sont présentés dans la figure 22.



© TopTropicals.com

Psychotria ipecacuanha (Brot.) Stokes
Famille: Rubiaceae
Nom vulgaire: Ipeca

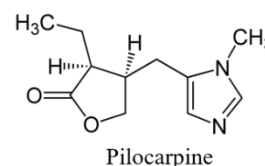
Contient de l'émétine comme ingrédient actif. L'Ipeca est un émétique puissant, utilisé pour traiter des maladies gastro-intestinales et la diarrhée. Il est également utilisé pour le traitement des maladies du système respiratoire.



©EMBRAPA

Pilocarpus microphyllus Stapf.
Famille: Rutaceae
Nom vulgaire: Jaborandi

Contient de la pilocarpine dans ses feuilles, un constituant chimique utilisé pour le traitement de glaucomes primaires.



©EMBRAPA

Arrabidaea chica (H&B) Verlot.
Famille: Bignoniaceae
Nom vulgaire: Crajinir

Les feuilles sont utilisées comme agent anti-inflammatoire et astringent et peuvent être appliquées topiquement pour le traitement des ulcères cutanés. Les feuilles fournissent un colorant rouge foncé riche en anthocyanines.

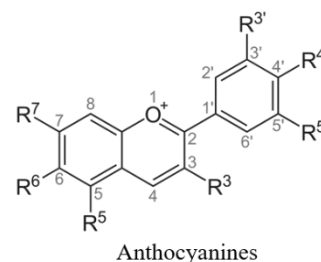


Figure 22. Exemples de plantes médicinales à haute valeur ajoutée provenant de la forêt amazonienne (photos: EMBRAPA et www.toptropicals.com).

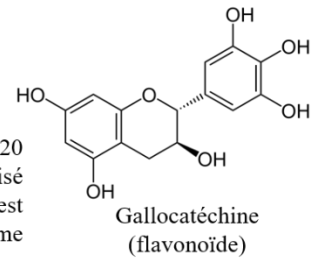
Le Cerrado: c'est le deuxième plus grand domaine écologique brésilien, avec des densités d'espèces d'arbres variables. Sa végétation est en grande partie similaire à celle de la savane, composée d'herbes, d'arbustes et d'arbres clairsemés. Les arbres ont des tiges tordues et de longues racines, qui permettent l'absorption de l'eau (disponible dans les sols du Cerrado en dessous de 2 mètres de profondeur). Selon l'EMBRAPA, le Cerrado couvre environ 23% du

territoire brésilien et environ 700 espèces de ce biome sont signalées en usage dans la médecine traditionnelle (EMBRAPA, 2010) (Figure 23).



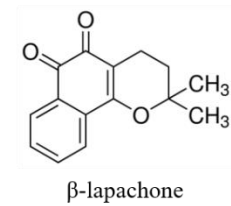
Stryphnodendron adstringens (Vell) Mart.
Famille: Fabaceae
Nom vulgaire: Barbatimão

Contient principalement des substances tanniques (20 à 30%) et des flavonoïdes. Le thé en écorce est utilisé pour traiter des troubles intestinaux. Cette espèce est également utilisée par voie topique comme cicatrisant et anti-inflammatoire.



Tabebuia avellanedae Lor. ex. Griseb
Famille: Bignoniaceae
Nom vulgaire: Ipê Roxo, Pau D'arco

Contient du lapachol et de la β -lapachone comme principaux composés actifs. Ces substances ont des propriétés antitumorales dans plusieurs modèles expérimentaux. Cependant, elles sont toxiques à fortes doses.



Achyrocline satureioides (Lam.) DC.
Famille: Asteraceae
Nom vulgaire: Marcela

Contient des flavonoïdes comme la quercétine, la lutéoline, la galangine, entre autres. L'huile essentielle est riche en monoterpènes, présentant des activités antispasmodique, anti-inflammatoire et antimicrobienne.

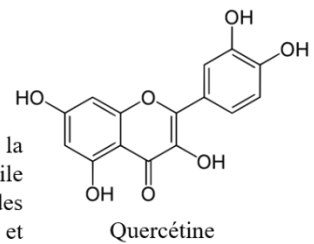


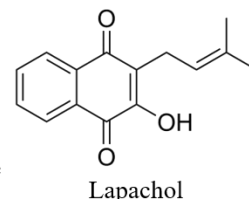
Figure 23. Exemples de plantes médicinales à haute valeur ajoutée provenant du Cerrado (photos: EMBRAPA).

Le Pantanal: il s'agit d'une zone géologiquement basse remplie de sédiments, située dans le bassin du fleuve Paraguay. La flore du Pantanal est formée par des espèces de végétation du Cerrado et du bassin amazonien. Plus de 200 espèces de cette flore sont utilisées pour la consommation humaine et animale, et plusieurs ont été signalées dans des applications industrielles (EMBRAPA, 2010) (Figure 24).



Tabebuia aurea (Silva Manso) Benth. & Hook.f.
ex S.Moore
Famille: Bignoniaceae
Nom vulgaire: Ipê amarelo, caraibeira

Trouvée dans les zones de Caatinga, Cerrado, forêt amazonienne et de Pantanal, cette espèce contient des substances ayant des propriétés anti-inflammatoire, antimicrobienne et antitumorale (p. ex. le lapachol).



Spondias lutea L.
Famille: Anacardiaceae
Nom vulgaire: Cajá

Il s'agit d'un fruit comestible, à l'arôme et à la saveur acidulée très prononcés. Ses propriétés antioxydantes sont liées à la présence de composés phénoliques et caroténoïdes, tels que le β -carotène, la lutéine, la zéinoxanthine et la β -cryptoxanthine.

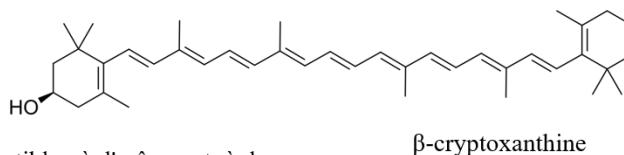


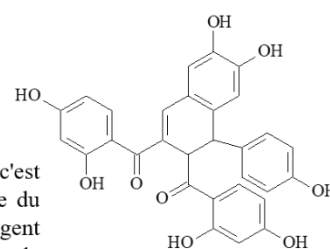
Figure 24. Exemples de plantes médicinales à haute valeur ajoutée provenant du Pantanal (photos: GBIF, www.gbif.org).

La Caatinga: ce biome englobe des régions des États du Nord-Est du Brésil et se caractérise par une végétation typique de climat semi-aride. Les sols sont fertiles en raison de la nature des matériaux de leur origine et ce biome se caractérise par un faible niveau de précipitations, passant par de longues périodes de sécheresse. La végétation de la Caatinga est généralement très sèche, avec des épines et très peu de feuilles. Cependant, lorsque les pluies se produisent, elle change rapidement, gagnant un aspect différencié, avec des arbres feuillus et de petites plantes tapissant le sol. Une grande variété d'espèces fruitières et de plantes médicinales ont leur origine dans cette région où la pratique de la médecine traditionnelle est encore très fréquente (EMBRAPA, 2010). Plusieurs espèces médicinales et aromatiques sont signalées dans cette région, telles que *Myracrodruon urundeuva* et *Lippia sidoides* (Figure 25).



Myracrodruon urundeuva Allemão
Famille: Anacardiaceae
Nom vulgaire: Aroeira

Typiquement présente dans les zones de Caatinga, c'est l'une des principales plantes médicinales de la flore du Nord-Est du Brésil. Son écorce est utilisée comme agent anti-inflammatoire et cicatrisant, indiqué pour le traitement des ulcères gastriques, des vaginites et des hémorroïdes.

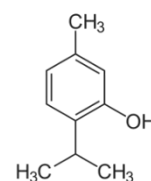


Urundeuvine A



Lippia sidoides Cham.
Famille: Verbenaceae
Nom vulgaire: Alecrim-pimenta

Une des principales plantes médicinales du Nord-Est du Brésil. Ses feuilles contiennent environ 6% d'huile essentielle, dont les principaux constituants sont le thymol (50-60%) et le carvacrol (5-8%). Le thymol est un antiseptique naturel utilisé dans la préparation d'antiseptiques oraux et comme anesthésique. Il est également utilisé pour la synthèse du menthol.



Thymol

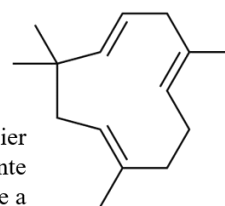
Figure 25. Exemples de plantes médicinales à haute valeur ajoutée provenant de la Caatinga (photos: EMBRAPA).

La forêt atlantique (mata atlantica): cette forêt s'étend sur toute la côte brésilienne et constitue l'un des biomes les plus menacés au monde, avec moins de 10% de la végétation originale préservée (EMBRAPA, 2010). Le climat prédominant est chaud et tropical, avec des précipitations variant entre 1000 et 1750 mm. Le terrain est composé de zones plates sur la côte, accompagnées de chaînes de montagnes. Plusieurs espèces sont utilisées dans cette région en médecine traditionnelle, telles que *Mikania glomerata*, *Cordia verbenaceae* et *Maytenus ilicifolia* (Figure 26).



Cordia verbenaceae DC.
Famille: Boraginaceae
Nom vulgaire: Erva Baleeira

Constitue la matière brute d'Acheflan®, le premier médicament anti-inflammatoire basé sur une plante native du Brésil. Le constituant actif de cette espèce a été découvert en 2001 et est appelé α -humulène, étant efficace pour le traitement de douleurs musculaires.

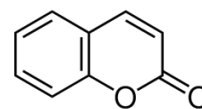


α -humulène



Mikania glomerata Spreng.
Famille: Asteraceae
Nom vulgaire: Guaco

Originaire du Sud et du Sud-Est du Brésil, ses feuilles sont utilisées comme expectorant, bronchodilatateur et dans la préparation de sirops. Elle contient principalement des coumarines, auxquelles sont attribuées leurs propriétés thérapeutiques.

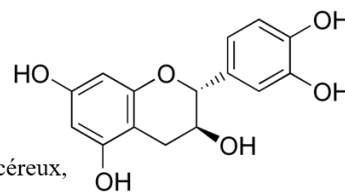


Coumarine



Maytenus ilicifolia Martius ex. Reiss
Famille: Celastraceae
Nom vulgaire: Espinheira Santa

Plante médicinale ayant des effets antiulcéreux, contenant plusieurs substances connues, telles que des tanins, des terpènes (maitensine, maitomprine, maitambutine et maitolidine) et des flavonoïdes.



Catéchine

Figure 26. Exemples de plantes médicinales à haute valeur ajoutée provenant de la forêt atlantique (photos: EMBRAPA).

La Pampa: situé dans le sud du Brésil, la principale caractéristique du biome de la Pampa est sa végétation, qui présente une composition herbacée, formée essentiellement d'herbes et de petites espèces végétales, ne dépassant pas 50 cm de hauteur (Figure 27). Le climat de la Pampa est subtropical avec les quatre saisons bien définies. En dépit d'être le plus petit biome brésilien n'occupant que 2% du territoire brésilien (EMBRAPA, 2017), il dispose d'une grande variété de plantes médicinales.

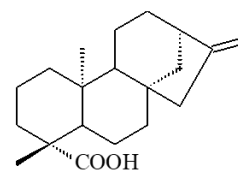


Sphagneticola trilobata (L.) Pruski

Famille: Asteraceae

Nom vulgaire: insulina, arnica

Les extraits contiennent des flavonoïdes, des acides kaurénoïques et de la lutéoline, responsables des activités hypoglycémique et analgésique attribuées à la plante.



Acide kaurénoïque

Figure 27. Exemple de plante médicinale à haute valeur ajoutée provenant de la Pampa (photo: www.floradobrasil.jbrj.gov.br).

En termes de bioéconomie, certains produits à base d'extraits végétaux ou de molécules obtenues à partir de plantes brésiliennes ont été introduits sur le marché au cours des dernières décennies. Un exemple classique de produit naturel brésilien utilisé comme médicament ou modèle pour la conception de nouveaux médicaments est la tubocurarine, un alcaloïde du type *bis*-benzyltétrahydroisoquinoline obtenu à partir de *Chondrodendron tomentosum*, une plante neurotoxique de l'Amazonie. La principale application médicale de la tubocurarine est la relaxation des muscles abdominaux pendant la période préopératoire, ce qui permet d'utiliser des niveaux inférieurs d'anesthésie générale. La découverte de cette molécule a motivé le développement de nouveaux analogues anesthésiques, tels que le décaméthonium, le suxaméthonium et l'atracurium (Figure 29) (Valli et al., 2012).

L'alcaloïde pilocarpine isolé de *Pilocarpus microphyllus* (Rutaceae) est un autre exemple de développement réussi de médicaments à partir de la biodiversité brésilienne (Figure 24). Des études pharmacologiques ont montré que la pilocarpine est un agoniste cholinergique agissant sur les récepteurs muscariniques. Salagen® (*Novartis*) a été lancé comme médicament pour soulager la xérostomie due à l'anomalie des glandes salivaires qui sont affectées par la radiation chez les patients atteints de cancer pendant le traitement par radiothérapie (Horiot et al., 2000).

Certaines plantes brésiliennes sont également commercialisées sous forme d'extraits chimiquement standardisés. L'Acheflan®, commercialisé depuis 2005, a été lancé par le laboratoire pharmaceutique *Aché*. C'est un anti-inflammatoire topique à base de sesquiterpènes isolés de l'huile essentielle de *Cordia verbenacea* (Figure 27). Avec un investissement estimé à environ 15 millions de reais (environ 3.5 millions d'euros), ce médicament a été entièrement développé au Brésil pour le traitement de douleurs musculaires chroniques. Les ventes de ce médicament sont comparables à celles du cataflan®, un produit synthétique de référence sur le marché des anti-inflammatoires topiques (Joly et al., 2011). Le groupe *Aché* a également lancé

le médicament anxiolytique Sintocalmy®, préparée avec l'extrait standardisé de *Passiflora incarnata* (Passifloraceae) contenant le flavonoïde vitexine (apigénine-8-C-glucoside) comme l'un des composés actifs (Valli, Russo, et Bolzani, 2018).

Malgré le fait que le Brésil assume un rôle central en termes de diversité des espèces végétales, le nombre de produits développés avec des ingrédients natifs de la flore brésilienne est encore très insatisfaisant face à la grandeur de sa biodiversité. En outre, certains des biomes mentionnés précédemment ont été très dévastés ces dernières années, en particulier les forêts atlantique et amazonienne (Bolzani et al., 2012). Ainsi, de nombreuses espèces endémiques de ces régions sont menacées d'extinction avant même que leurs propriétés médicinales et leurs principes actifs ne soient étudiés en détail. La conception de nouvelles formes d'exploitation bioéconomique durable de ces écosystèmes devrait être largement discutée dans les années à venir pour assurer l'étude des espèces originales et la valorisation de leurs produits bioactifs.

2.4.1.2. Les plantes médicinales de la Nouvelle-Calédonie

La Nouvelle-Calédonie est un territoire français couvrant des dizaines d'îles et d'archipels du sud de l'Océan Pacifique. Avec une superficie de 18.575 km², la Nouvelle-Calédonie est connue pour sa flore et sa faune extrêmement diversifiées, abritant de nombreuses espèces endémiques. Malgré une superficie 20 fois moindre que la France, la Nouvelle-Calédonie abrite presque autant d'espèces végétales terrestres. Selon un ouvrage publié par la Maison de la Nouvelle-Calédonie en partenariat avec l'IRD (Institut de Recherche pour le Développement), 3.261 espèces de végétaux vasculaires sont présentes sur ce territoire, dont 76% d'espèces endémiques, ce qui le classe au troisième rang mondial de l'endémisme après Hawaï avec 89% et la Nouvelle-Zélande avec 82% (Viratelle, 2016). Aujourd'hui, 4.661 espèces végétales sont répertoriées selon le site *Endemia - Faune et Flore de Nouvelle-Calédonie* (www.endemia.nc), dont 2.739 sont endémiques et 1.922 natives de la région (ENDEMIA, 2020). Ces plantes sont réparties dans cinq écosystèmes principaux (Figure 28):

- *La mangrove*, couvrant 79% du littoral à l'Ouest, contre 14% à l'Est;
- *La forêt humide*, qui occupe environ 20% (4.000 km²) du territoire, avec plus de 80% d'espèces endémiques, abritant une multitude d'animaux et de plantes uniques au monde;
- *La forêt sèche*, constituant l'un des écosystèmes terrestres les plus menacés de la planète. Bien qu'elle n'occupe plus aujourd'hui que 1% (soit 45 km²) de sa superficie initiale en Nouvelle-Calédonie, la forêt sèche renferme encore 252 espèces endémiques, sur les 456 inventoriées. Elle représente la transition entre la forêt humide et la mangrove;

- *Le maquis minier*, composé par l'ensemble des formations végétales n'appartenant pas à la forêt et situées sur roches ultramafiques, restes de la croûte océanique. La grande majorité de ces maquis provient de la destruction des forêts par le passage répété des feux. Dans cette zone, près de 90% des espèces végétales sont endémiques, sur un total d'environ 1.140 espèces de plantes vasculaires identifiées;
- *La savane à niaoulis*, un écosystème pauvre en biodiversité, résultant de la disparition des végétations d'origine en fonction des activités d'exploitation humaine (défrichage, élevage bovin, activité agricole, feux, etc.) (Viratelle, 2016).



Figure 28. Répartition géographique des différents biomes du territoire Calédonien, d'après la Maison de la Nouvelle Calédonie (Viratelle, 2016).

Malgré une grande diversité de plantes, les espèces endémiques de la Nouvelle-Calédonie sont encore peu étudiées en ce qui concerne leurs propriétés médicinales. La recherche sur les plantes médicinales de la région a commencé dans les années 1970 à partir de la récolte d'espèces productrices d'alcaloïdes bioactifs (Guéritte et al., 2010), en particulier les plantes du genre *Ochrosia* (Apocynaceae) riches en ellipticine et des analogues ayant des activités antitumorales (Kansal et Potier, 1986). *Alangium vitiense* riche en tubulosines (Potier et al., 1978) et les *Sarcomelicope* riches en acronycine et dérivés (Costes et al., 2000) sont d'autres exemples de plantes médicinales de la Nouvelle-Calédonie présentant des activités anticancéreuses. Des plantes agissant sur le système nerveux central (*Psychotria* et *Calycodendron*, riches en alcaloïdes polyindoliniques, tels que la psycholéine et la quadrigémine C) (Guéritte-Voegelein et al., 1992) et sur la dépigmentation de la peau (*Garnieria spathulifolia* Brongn. & Gris, riche en arbutoside et dérivés) (Pilleux et al., 1992) font également partie des premières espèces endémiques étudiées. La Figure 29 illustre la diversité structurale de composés purifiés pendant la période 1970-2000.

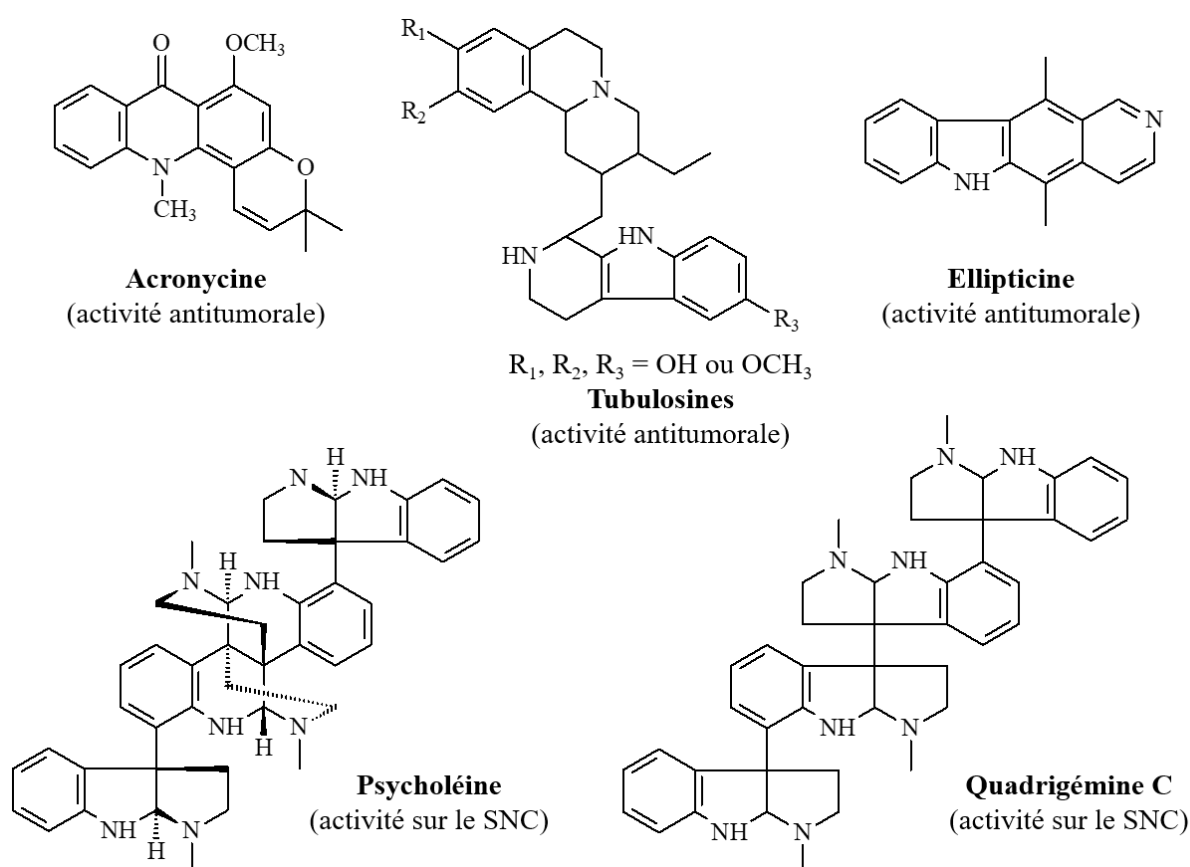


Figure 29. Diversité structurale de composés bioactifs isolés de plantes médicinales de la Nouvelle-Calédonie.

Depuis le début du XXI^e siècle, les espèces médicinales de Nouvelle-Calédonie ont été largement bioprospectées. Plusieurs plantes endémiques de la région ont démontré des activités antiparasitaires contre *Leishmania donovani*, *Leishmania amazonensis*, *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei brucei*, *Trichomonas vaginalis* et *Caenorhabditis elegans*, telles que *Scaevola balansae*, *Premna serratifolia* L., *Myristica fatua* (Desrivot et al., 2007), *Pagiantha cerifera*, *Garcinia pedicillata* et *Amborella trichopoda* (Billo, Fournet, et al., 2005). Certaines espèces (p. ex. *Amborella trichopoda*, *Codiaeum peltatum*, *Myristica fatua* et *Myoporum crassifolium*) ont également montré une activité sur des souches de *Mycobacterium* sp., l'espèce *tuberculosis* étant le pathogène bactérien responsable de la tuberculose (Billo, Cabalion, et al., 2005).

Plus récemment, une série de 16 flavonoïdes, dont la plupart sont des flavones polyméthoxylés d'occurrence rare, a été isolée et préparée à partir de l'exsudat de bourgeons de *Gardenia urvillei* Montrouz et de *Gardenia oudiepe* Vieill, endémiques en Nouvelle-Calédonie (Figure 30). Certains de ces composés ont montré une activité importante contre *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Plasmodium falciparum* et *Trypanosoma brucei gambiense* à faible concentration (Mai et al., 2015). Ces mêmes molécules se sont avérées de puissants inhibiteurs des enzymes tyrosinase et xanthine oxydase, démontrant un potentiel pour le traitement des troubles d'hyperpigmentation et de maladies inflammatoires articulaires tels que la goutte (Santi et al., 2019; Santi et al., 2018). Les flavonoïdes identifiés, en particulier ceux qui présentent un haut degré de méthylation, sont souvent associés à des activités anticancéreuses et, pour cette raison, constituent l'un des objets d'étude de cette thèse.



Gardenia oudiepe



Gardenia urvillei

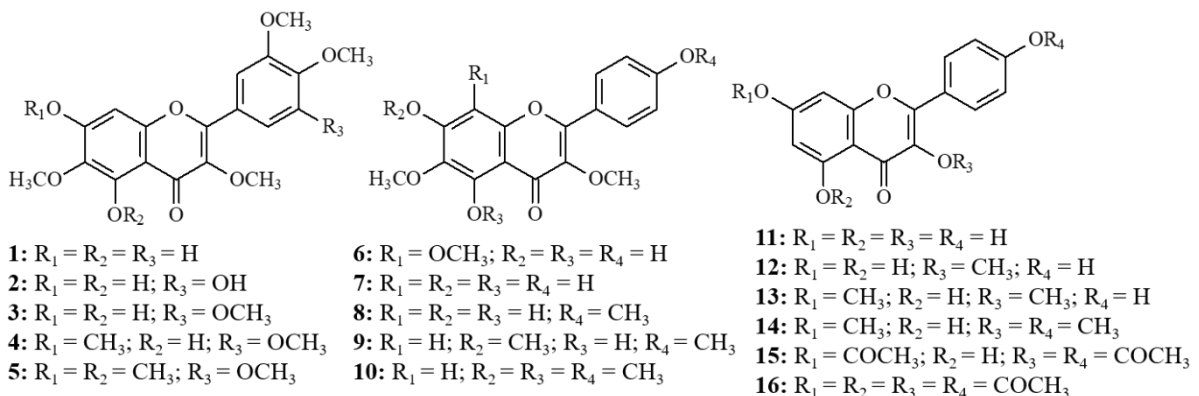


Figure 30. Flavonoïdes bioactifs isolés et/ou préparés à partir de *G. oudiepe* et/ou *G. urvillei*, endémiques de la Nouvelle-Calédonie (photos: www.endemia.nc).

2.4.1.3. Les pigments de plantes ayant un potentiel antimélanome: focus sur les flavonoïdes et les caroténoïdes

Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des métabolites secondaires présents dans une variété de fruits, de légumes et de plantes médicinales, pouvant présenter une très grande diversité de structures chimiques et, par conséquent, différentes activités pharmacologiques. D'un point de vue chimique, les flavonoïdes sont des composés de nature phénolique, qui contiennent le noyau de base du type phénylbenzopyrone (C6-C3-C6), et qui peuvent présenter différents modèles de

substitution (Panche, Diwan, et Chandra, 2016). Selon les substitutions des anneaux A, B et C de leur squelette de base, les flavonoïdes peuvent être classés en chalcones, aurones, flavonols, flavanols, flavones, flavanones, flavanonols, isoflavones, entre autres (Figure 31).

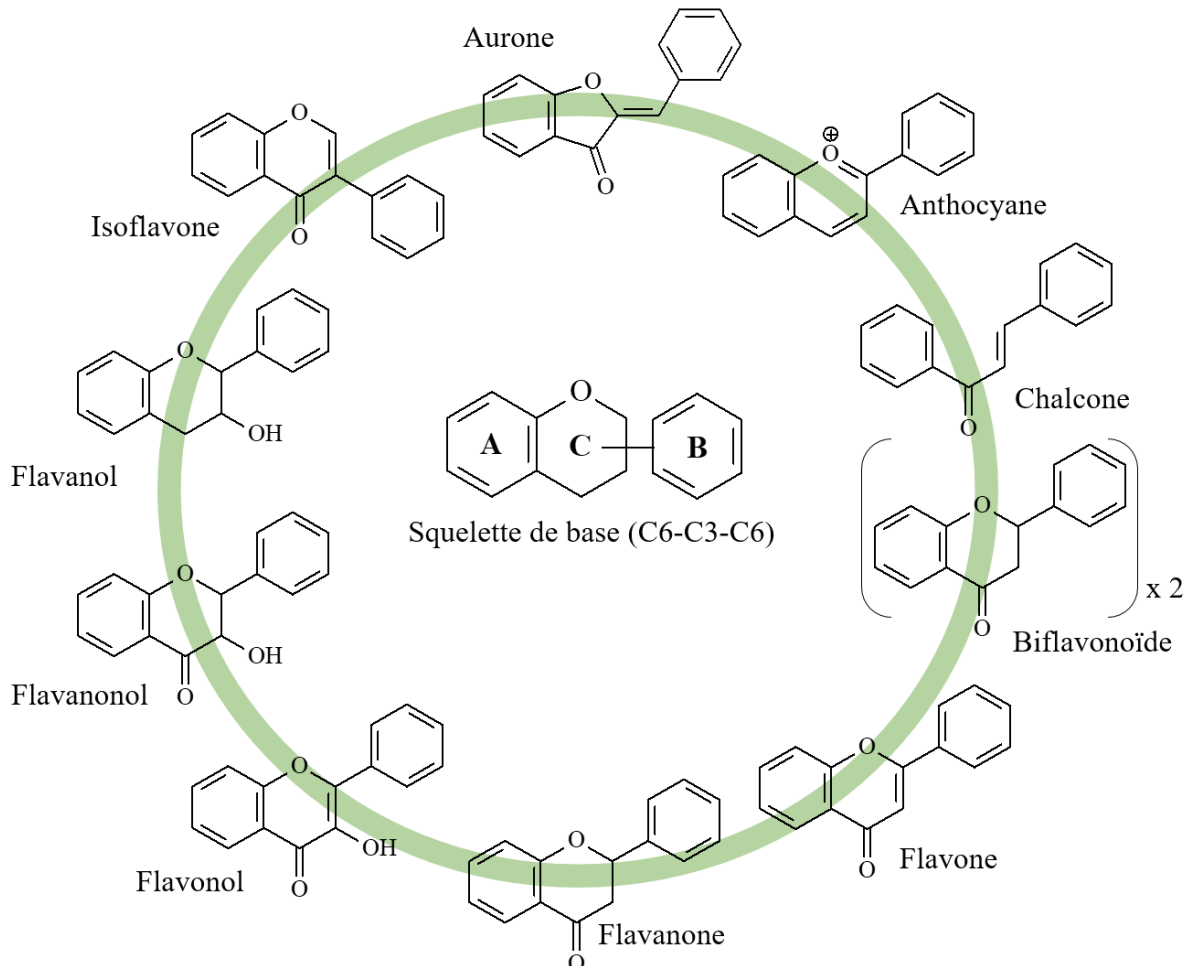


Figure 31. Diversité structurale des flavonoïdes.

La biosynthèse de ces polyphénols se fait par la voie du shikimate, un intermédiaire important dans la biosynthèse des composés aromatiques chez les plantes, produisant de l'acide cinnamique et ses dérivés. La condensation d'un des dérivés de l'acide cinnamique avec trois unités de malonyl-CoA forme une chalcone à 15 carbones, qui est le précurseur initial des autres classes de flavonoïdes (Falcone Ferreyra, Rius, et Casati, 2012). La cyclisation stéréospécifique de cette chalcone par l'enzyme chalcone isomérase forme la (*S*)-4', 5,7-trihydroxyflavanone conduisant au squelette de base des flavonoïdes (Figure 32).

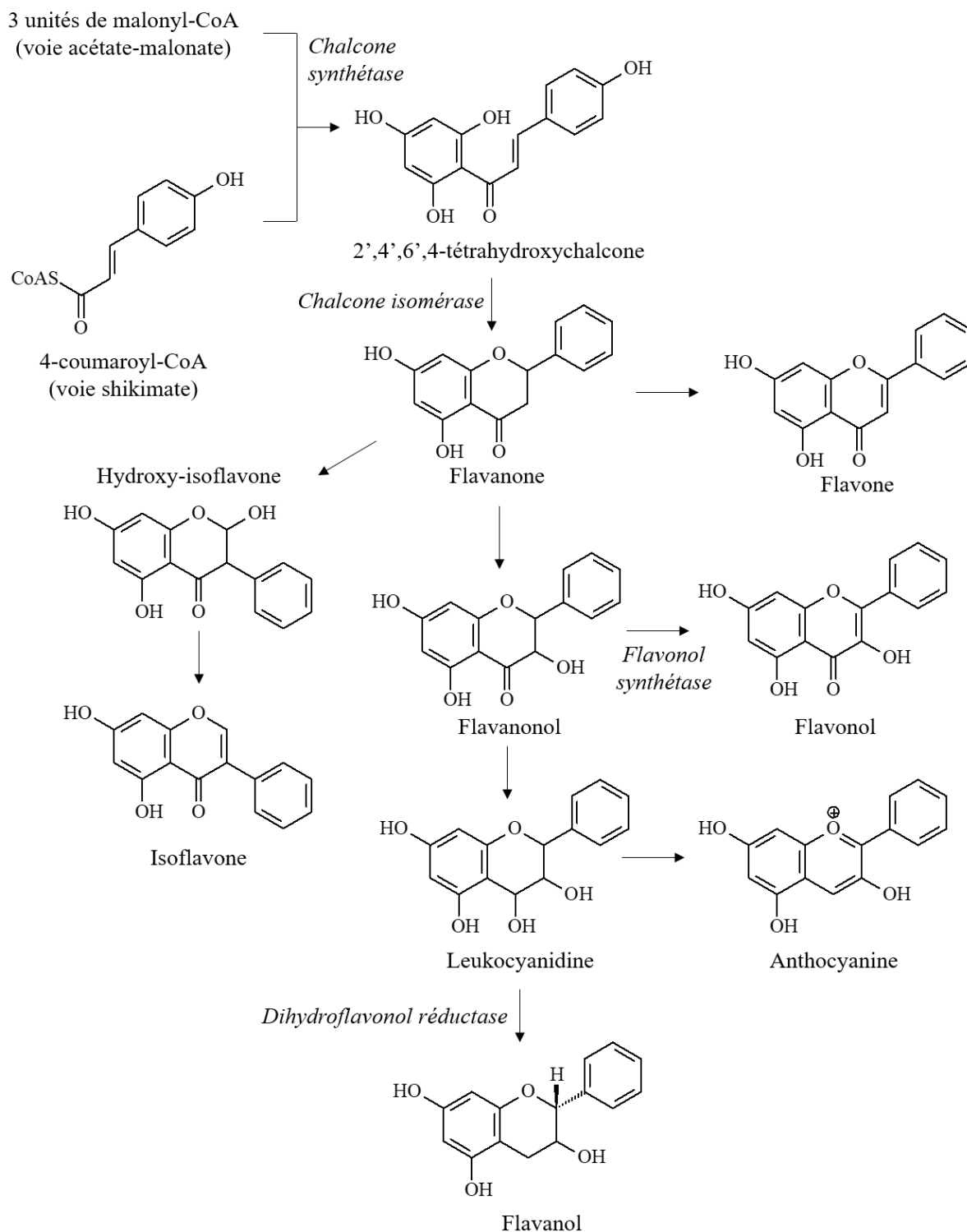


Figure 32. Voie de biosynthèse des flavonoïdes simplifiée d'après Falcone Ferreyra, Rius, et Casati, 2012.

Les flavonoïdes peuvent être polyhydroxylés, polyméthoxylés ou conjugués à des unités osidiques (généralement le glucose, le galactose ou le rhamnose) par des liaisons de type C-C ou C-O-C. Il existe plus de 8000 flavonoïdes connus, les plus abondants sont dérivés de la

quercétine, de la catéchine et du canféroï. La diversité structurale des flavonoïdes a bien sûr une influence directe sur leurs propriétés pharmacologiques (Oliveira Júnior et al., 2017).

De nombreuses études ont démontré les effets antiprolifératifs de flavonoïdes sur des cellules de mélanome murin et humain. Certains de ces composés sont présents en quantités importantes dans les fruits et légumes et font donc partie de l'alimentation humaine (AlQathamaa et Prieto, 2015). Les principaux flavonoïdes ayant une activité antiproliférative préclinique démontrée dans des modèles de mélanome humain comprennent: la quercétine, l'apigénine, la génistéine (Oliveira Júnior et al., 2017), l'épigallocatechine-3-gallate (EGCG), l'amentoflavone (AlQathamaa et Prieto, 2015), la fisétine, la galangine, la chrysine, le canféroï, la lutéoline et la diosmine (Chinembiri et al., 2014; Corina et al., 2017) (Figure 33).

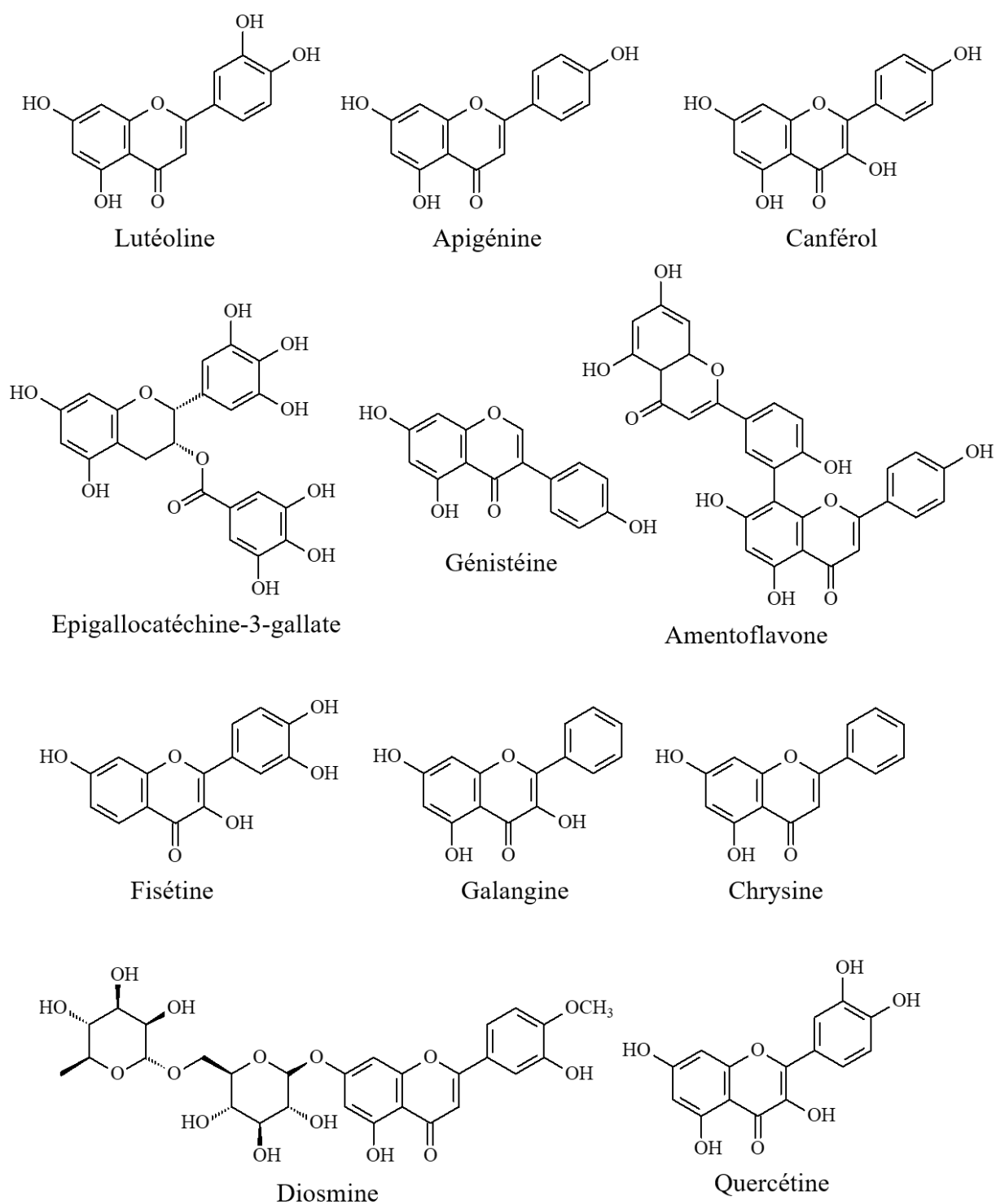


Figure 33. Principaux flavonoïdes présentant une activité anticancéreuse sur des modèles de mélanome murin et/ou humain.

Les flavonoïdes inhibent non seulement la prolifération des cellules de mélanome, mais aussi la migration cellulaire, réduisent la formation de métastases *in vivo*, limitent le processus d'angiogenèse, provoquent des changements dans le cytosquelette cellulaire et induisent l'arrêt

du cycle cellulaire et l'apoptose. Les principales cibles moléculaires touchées sont les protéines impliquées dans les voies intrinsèques et extrinsèques de l'apoptose (p. ex. les caspases et les protéines de la famille Bcl-2), les CDKs, la tubuline, les métalloprotéinases (p. ex. la MMP-2 et la MMP-9) et le VEGF. Les principales voies de signalisation prolifératives affectées sont les voies PI3K/AKT, MAPK, STAT3 et Wnt/ β -caténine (Oliveira Júnior et al., 2017) (Tableau 5). De plus, les flavonoïdes sont également capables de moduler le stress oxydatif intracellulaire, conduisant les cellules tumorales à la mort cellulaire. En général, ces molécules présentent une faible toxicité par rapport aux agents chimiothérapeutiques synthétiques, ce qui justifie l'intérêt de les étudier dans des modèles de mélanome métastatique et chimiorésistant (Chinembiri et al., 2014; Ravishankar et al., 2013).

Tableau 5. Récapitulatif des principaux effets de flavonoïdes extraits de plantes sur des cellules de mélanome.

Flavonoïde	Modèle	Lignée	Voies/cibles affectées	Référence
Apigénine	<i>In vitro</i> et <i>in vivo</i>	A375, A2058, B16F10, G361, 518A2	↓ERK1, ↓ERK2, ↓MMP-2, ↓MMP-9, ↓VEGF, ↓STAT3, ↑apoptose (caspase-3)	(Cao et al., 2016; Hasnat et al., 2015; Spoerlein et al., 2013)
Lutéoline	<i>In vitro</i> et <i>in vivo</i>	A375, A2058, B16F10	↑ stress oxydatif, ↓ intégrine β 3, ↑apoptose	(George et al., 2013; Kim et al., 2016; Ruan et al., 2012)
EGCG	<i>In vitro</i> et <i>in vivo</i>	B16F10, B16F3m, A375, Hs- 294T	↓COX-2, ↓PGE ₂ , ↓MMP-9, ↓VEGF, ↓ cycline D1, ↓ CDK2, ↑p16, ↑p21, ↑p27, ↑apoptose (caspase-3, -7, - 9, Bcl-2)	(AlQathamaa et Prieto, 2015; Nihal et al., 2005; Ohga et al., 2009; Zhang et al., 2016)
Chrysin	<i>In vitro</i>	518A2	↓MMP-2, ↓MMP-9	(Spoerlein et al., 2013)
Fiséatine	<i>In vitro</i> et <i>in vivo</i>	A375, 451Lu	↓Wtn/ β -caténine, ↓AKT, ↓mTOR, ↓MITF	(Syed et al., 2011; Syed et al., 2014)

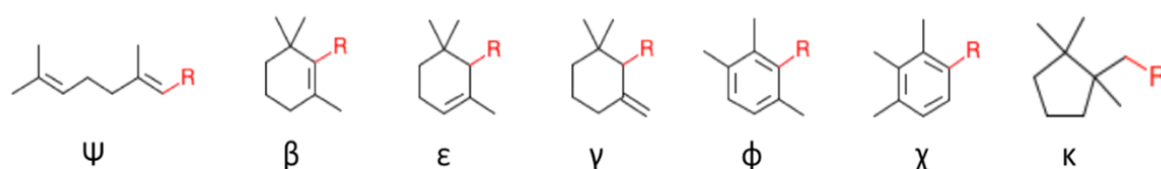
Quercétine	<i>In vitro</i> et <i>in vivo</i>	B16F10, A375, A2058, SK-MEL-2	↓MMP-9, ↓STAT3, ↓HGF/c-Met	(Cao et al., 2015; Cao et al., 2014; Pradhan et al., 2010)
Galangine	<i>In vitro</i> et <i>in vivo</i>	B16F10	↑apoptose (caspase-3 et 9, PARP), ↓MAPK, ↓FAK	(Zhang, Lan, et al., 2013; Zhang, Tang, et al., 2013)
Génistéine	<i>In vitro</i>	518A2	↓MMP-2, ↓MMP-9, ↓tubuline, ↓β-caténine	(Spoerlein et al., 2013)

Les caroténoïdes

Les caroténoïdes sont des pigments liposolubles synthétisés par les plantes terrestres, les micro- et macroalgues, les moisissures, levures, bactéries et archaea. On en trouve également chez les animaux, en particulier les crustacés, les poissons, les oiseaux et les mammifères, où ils proviennent de l'alimentation. Dans leur organisme producteur ou consommateur, les caroténoïdes assurent de nombreuses fonctions biologiques, pour la photoréception (vision, photosynthèse, phototropisme) (p. ex. le β-carotène, la violaxanthine, la zéaxanthine), la stabilisation mécanique des membranes (thylakoïdes) (p. ex. le β-carotène), la photoprotection et la protection contre l'oxydation (p.ex. la violaxanthine), en tant que phytohormone et allélochimique (p.ex. l'acide abscissique et le 5-deoxystrigol), chémoattractant visuel, olfactif ou gustatif (p.ex. β-carotène, β-damascone, β-ionone), provitamine A (p.ex. β-carotène, β-carotène 5,6-époxyde) et facteurs de transcription et de différenciation cellulaire (acide rétinoïque). Chez les bactéries, certains caroténoïdes sont également des facteurs de virulence permettant de lutter contre les mécanismes oxydatifs des phagocytes (p.ex. la staphyloxanthine, pigment de l'espèce *Staphylococcus aureus*) (Hashimoto, Uragami, et Cogdell, 2016).

A ce jour (février 2020), 1183 caroténoïdes naturels ont été identifiés à partir de 702 organismes producteurs. La base de données Japonaise sur les caroténoïdes (<http://carotenoiddb.jp/>) est la plus complète et détaillée pour trouver des informations mises à jour concernant la diversité structurale, les fonctions biologiques, les organismes producteurs, et la classification des caroténoïdes. Il existe ainsi des caroténoïdes en C30 (30 atomes de C), C40, C45 et C50, distribués dans les 3 règnes du vivant (eucaryotes, procaryotes et archaea).

Les caroténoïdes dont la structure chimique est composée uniquement d'atomes de carbone et d'hydrogène sont généralement désignés comme « carotènes » et « lycopènes » tandis que les caroténoïdes oxygénés sont regroupés sous le terme de « xanthophylles ». En fait, il existe une grande diversité structurale des caroténoïdes, qui repose sur les possibilités de cyclisation des carbones terminaux, de substitution et modification chimique (hydroxylation, époxydation, carboxylation, carbonylation, glycosylation, insaturation, alkoxylation, polymérisation isoprénique, lactonisation, sulfatation, cycloaddition, etc...) et d'isomérisation (isomérisation *cis/trans*) (Figure 34). Bien qu'ils se présentent naturellement en configuration *trans*, les caroténoïdes peuvent être convertis en leur configuration *cis* lorsqu'ils sont exposés à la chaleur, à la lumière et aux milieux acides (Maoka, 2019).



Catégories	Notation	Description
Hydroxylation	$C_n\text{-OH}$	Hydroxylation au carbone n
Saturation	$C_n, C_{n+1} + H$	Saturation entre les carbone n et $n+1$
Cyclisation	$\beta, \beta, \psi, \psi, \beta, \psi, \text{etc...}$	Cyclisation (groupe terminal)
Désaturation	$C_n, C_{n+1} - H$	Désaturation entre les carbones n et $n+1$
Stéréoisomérisation (RS)	$C_nR, C_nS, \text{etc...}$	Stéréoisomère (RS)
Apo	$C_n\text{-apo}$	Toute la molécule au-delà du carbone n a été remplacée par des atomes d'hydrogène et/ou oxygène
Époxydation	$C_m, C_n\text{-époxy}$	Époxydation entre le carbone m et n
Estérification	$C_n\text{-ester}$	Estérification au carbone n
Carbonylation	$C_n\text{-CO}, C_n\text{-COOH}, C_n\text{-COH}$	Carbonylation au carbone n
Isomérisation <i>cis / trans</i>	$C_n\text{-Z}, C_n\text{-E}$	Isomérisation <i>cis</i> ou <i>trans</i> au carbone n
Seco	$C_m, C_n\text{-seco}$	Fission de la liaison entre le carbone m et n
Retro	$C_m, C_n\text{-retro}$	Toutes les liaisons simples et doubles sont déplacées d'une position du carbone m au carbone n

Figure 34. Illustration de la diversité structurale des caroténoïdes. Groupements terminaux possibles par cyclisation et modifications structurales identifiées dans les caroténoïdes naturels. D'après <http://carotenoiddb.jp/>.

Les caroténoïdes partagent la même voie de biosynthèse que les terpénoïdes. Le mévalonate est le premier précurseur spécifique dans cette voie, constitué de 6 atomes de carbone (C6) qui, après une série de réactions, conduit à la formation du géranyle diphosphate (C10, GPP), du farnésyle diphosphate (C15, FPP) et du géranylgeranyle diphosphate (C20, GGPP). La dimérisation de deux molécules de GGPP entraîne la synthèse du phytoène, le premier composé à quarante carbones (C40), dépourvu de couleur. Une série de réactions d'insaturation du phytoène suit pour former le phytofluène, ζ-carotène, neurosporène et enfin le lycopène (Figure 35). Les caroténoïdes cycliques proviennent du lycopène et deviennent ensuite plus sensibles à l'oxygénation, ce qui permet la formation des xanthophylles (Britton, 1993).

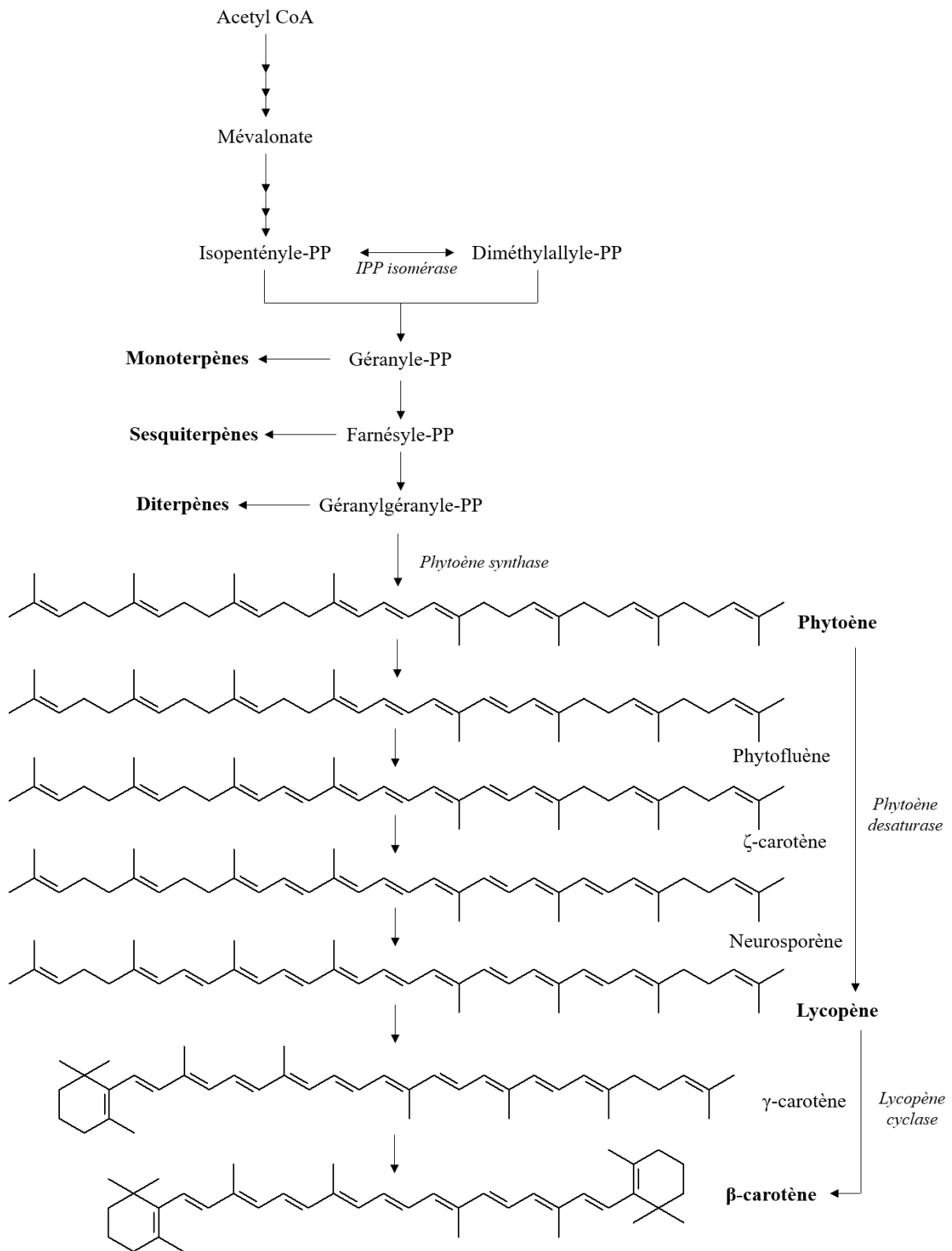


Figure 35. Voie de biosynthèse des caroténoïdes simplifiée, d'après Britton (1993).

Les principaux produits de dégradation des caroténoïdes sont les apocaroténoïdes, qui sont largement utilisés comme colorants naturels par les industries alimentaires et cosmétiques.

La bixine, extraite des graines de *Bixa orellana* L., est l'un des meilleurs exemples d'apocaroténoïde à haute valeur ajoutée (Raddatz-Mota et al., 2017). *B. orellana* est une plante originaire du Brésil (trouvée dans tous les biomes brésiliens), mais également présente dans d'autres pays d'Amérique Centrale et d'Amérique du Sud, notamment le Pérou, le Mexique et l'Équateur. Populairement connue sous le nom d'*urucum*, les graines de cette plante ont une teneur élevée en apocaroténoïdes, dont la bixine est le composé majoritaire. La voie de biosynthèse de la bixine a été initialement décrite par Bouvier, Dogbo, et Camara (2003). Selon eux, il existe trois enzymes-clés qui catalysent la conversion du lycopène en bixine: la LCD (lycopène dioxygénase), l'ADH (bixine aldéhyde déshydrogénase) et la CMT (norbixine carboxyméthyltransférase) (Figure 36). Malgré la présence du lycopène dans plusieurs groupes d'organismes, la bixine se trouve uniquement chez *B. orellana*.

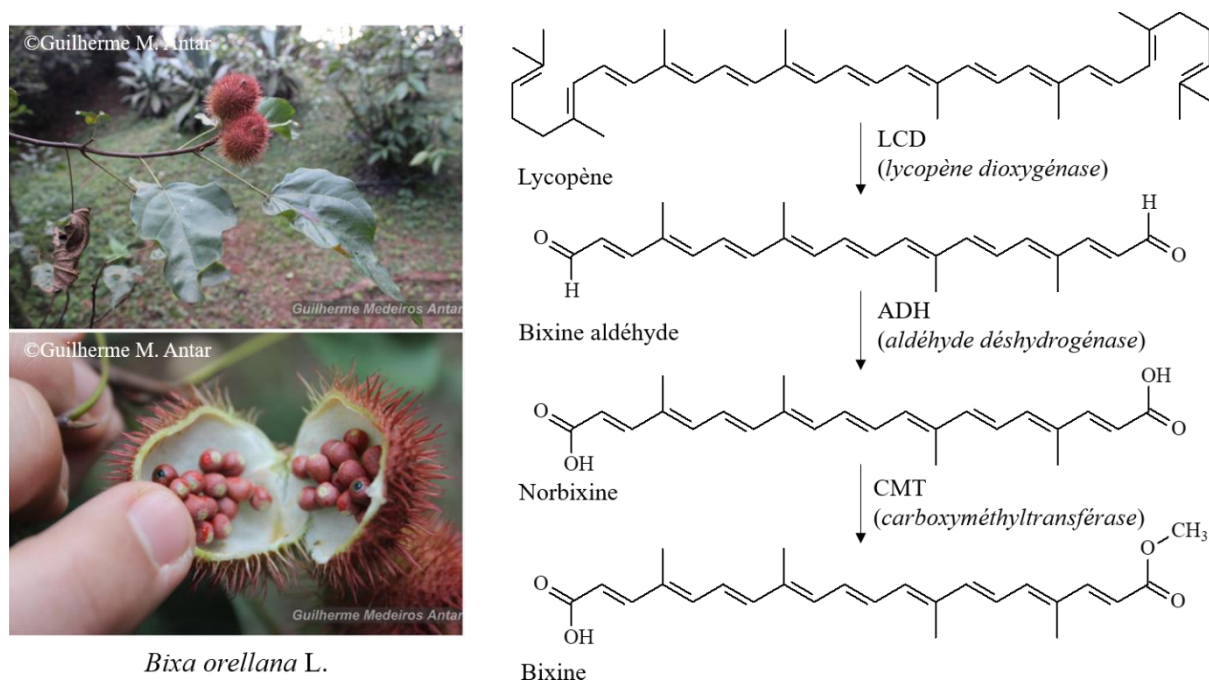


Figure 36. Voie de biosynthèse de la bixine proposée par Bouvier, Dogbo, et Camara (2003), l'apocaroténoïde majoritaire de la plante *Bixa orellana* (photos: www.floradobrasil.jbrj.gov.br).

En plus d'un usage comme colorants naturels, les caroténoïdes sont aussi reconnus pour leur potentiel pour la prévention nutritionnelle et le traitement de nombreuses maladies. Le β -carotène et le lycopène présentent une activité antioxydante, anti-inflammatoire et photoprotectrice (Kawata et al., 2018). La bixine exerce des effets antiprolifératifs sur plusieurs lignées cellulaires (Kumar, Phaniendra, et Periyasamy, 2018; Tibodeau, Isham, et Bible, 2010; Zhang et al., 2011), y compris des cellules de mélanome (Anantharaman et al., 2016), sur

lesquelles elle a induit un effet pro-apoptotique par l'augmentation de l'expression de la protéine Bax (pro-apoptotique), diminution de l'expression de la protéine Bcl-2 (anti-apoptotique) et par l'augmentation du stress oxydatif intracellulaire. Il a été également démontré que la bixine est capable de sensibiliser les cellules de leucémie (HL60) au traitement par la doxorubicine, potentialisant son effet pro-apoptotique (Santos et al., 2016).

2.4.2. Produits naturels issus d'algues

Les organismes marins représentent une source exceptionnelle de composés bioactifs, dont une grande partie correspond à des molécules allélopathiques présentant une cytotoxicité et/ou une activité antiproliférative sur cellules cancéreuses. Depuis les travaux pionniers en pharmacologie marine dans les années 1950-1970, des milliers de molécules présentant des structures chimiques et des mécanismes d'action originaux ont été découverts dans les organismes marins (Jimenez, Wilke, et Costa-Lotufo, 2018). On estime encore aujourd'hui que le potentiel de découverte de molécules originales au cours des prochaines décennies reste important, en particulier pour le développement de médicaments anticancéreux (Dyshlovoy et Honecker, 2018).

Un grand nombre d'études en pharmacologie marine concernent les molécules présentes dans les algues. Les algues sont des organismes eucaryotes dépourvus de tige, racine, feuille ou fleur, capables de pratiquer la photosynthèse oxygénique et vivant généralement dans un environnement aquatique (marin ou dulcicole) (Roy et al., 2011). On distingue classiquement les microalgues ou phytoplancton, unicellulaires, et les macroalgues, pluricellulaires. Les applications en santé des micro- et macroalgues sont très nombreuses et concernent divers domaines: alimentation, nutrition/santé, prévention, diagnostic et traitement des maladies liées à l'alimentation (malnutrition, obésité, diabète, cancers, caries), prévention et traitement des maladies liées à l'âge (neurodégénérescence, DMLA, problèmes cardiaques, ingénierie tissulaire), production de médicaments innovants (anti-venins, anticoagulants, antithrombotiques, anticancéreux, antiviraux, cytokines, hormones, vaccins, etc.). On estime qu'il existe environ 1500 espèces de macroalgues vertes, 1800 de macroalgues brunes et 6500 de macroalgues rouges. On estime que les microalgues regroupent quant à elles 30 000 à 1 000 000 d'espèces vertes, rouges et brunes (selon les sources) regroupées dans 12 phyla distincts (Figure 37) (Serive et al., 2017). Cette définition des algues exclut les cyanobactéries (procaryotes) qui font également l'objet d'un grand nombre de travaux pour identifier des molécules d'intérêt pharmaceutique.

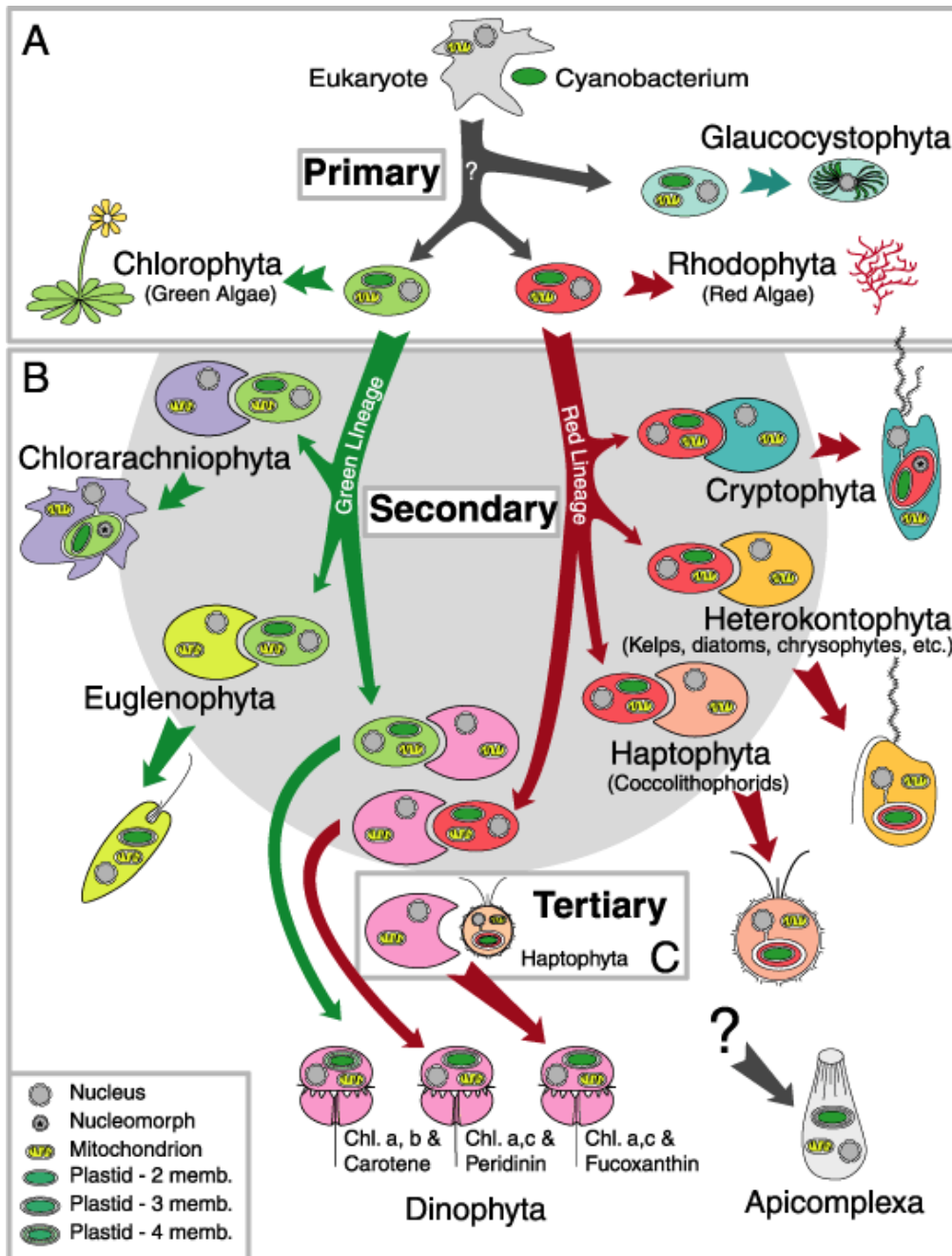


Figure 37. Diagramme montrant l'évolution de la diversité taxonomique algale par endosymbiose en série (A, B et C représentent respectivement les endosymbioses primaire, secondaire et tertiaire). Les microalgues sont réparties dans différentes divisions taxonomiques en fonction de leurs caractéristiques cellulaires, de leur composition pigmentaire et de leurs polysaccharides de réserve. D'après Delwiche (1999).

Actuellement, plus de 3.200 composés chimiques ont été identifiés dans des macroalgues. Ces composés présentent un potentiel pharmaceutique important, telles que des activités cytotoxiques, antiprolifératives, antimétastatiques, antiangiogéniques, antitumorales,

antioxydantes, antivirales, anticoagulantes, antibactériennes, antifongiques et anthelminthiques (Bourgougnon et Stiger-Pouvreau, 2011; Kornprobst, 2005). Les polysaccharides, les peptides, les acides gras, les pigments et les composés phénoliques sont parmi les principales classes de métabolites bioactifs identifiés dans les macroalgues (Barzkar et al., 2019).

Bien qu'elles aient fait l'objet de moins d'études pour des applications pharmaceutiques, les microalgues présentent un potentiel exceptionnel du fait du nombre important d'espèces restant à étudier, de la possibilité de les produire en grande quantité dans des conditions standardisées, et de leur plasticité métabolique permettant la biosynthèse et le bio-raffinage d'un grand nombre de molécules d'intérêt (polyphénols, pigments et acides gras/triglycérides, céramides, oxylipines, hétérocycles, anticorps, hormones, vaccins, vitamines et minéraux, etc.) (Kornprobst, 2005). Le travail de cette thèse étant en partie dédié à l'identification de pigments bioactifs dans des microalgues, un focus sera réalisé dans le chapitre suivant sur ces molécules. Il faut toutefois garder à l'esprit que de nombreux pigments présents chez les microalgues peuvent également être purifiés à partir de macroalgues ou de cyanobactéries.

2.4.2.1. Les microalgues

On trouvera dans une revue publiée en 2020 par notre équipe une étude bibliométrique approfondie présentant un panorama exhaustif des travaux de recherche réalisés sur les microalgues, à l'échelle Européenne et internationale (organisation de la recherche, réseaux de collaborations de recherche entre pays et organisations, principales espèces étudiées et concepts associés, domaines de recherche émergents, principales applications et marchés, principaux journaux publiant des travaux de recherche dédiés aux microalgues) (Rumin et al., 2020). Les espèces les plus étudiées et utilisées pour le développement de produits d'intérêt biotechnologique ou nutraceutique/pharmaceutique (alimentation/santé) sont *Chlorella vulgaris*, *Dunaliella salina*, *Haematococcus pluvialis*, *Odontella aurita*, *Porphyridium purpureum* (*ex cruentum*), *Isochrysis galbana*, *Phaeodactylum tricorutum*, *Cryptocodinium cohnii*, *Scenedesmus* sp., *Schizochytrium* sp. et *Nannochloropsis oculata* (Tableau 6). La cyanobactérie *Spirulina* (*Arthrospira* sp.) fait également partie des principaux microorganismes utilisés industriellement, surtout dans la production de suppléments alimentaires et de cosmétiques (Khan, Shin, et Kim, 2018; Mobin et Alam, 2017).

Tableau 6. Principales espèces de microalgues étudiées et leurs différents domaines d'application (Mobin et Alam, 2017; Mobin, Chowdhury, et Alam, 2019; Rumin et al., 2020).

Espèce/groupe	Produit	Domaine d'application
<i>Chlorella vulgaris</i>	Biomasse, extrait glucidique	Nutraceutique, aquaculture
<i>Dunaliella salina</i>	Caroténoïdes (β -carotène)	Nutraceutique, aquaculture
<i>Haematococcus pluvialis</i>	Caroténoïdes (astaxanthine)	Nutraceutique, pharmaceutique, aquaculture
<i>Odontella aurita</i>	Acides gras (EPA)	Pharmaceutique, cosmétique
<i>Porphyridium cruentum</i>	Polysaccharides	Pharmaceutique, cosmétique
<i>Isochrysis galbana</i>	Acides gras	Aquaculture
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	Lipides, acides gras	Aquaculture, biocarburants
<i>Cryptocodinium cohnii</i>	DHA	Pharmaceutique
<i>Scenedesmus</i> sp.	Protéines	Aquaculture, nutraceutique
<i>Schizochytrium</i> sp.	DHA and EPA	Nutraceutique
<i>Nannochloropsis oculata</i>	Biomasse, EPA	Pharmaceutique, aquaculture, nutraceutique

DHA: acide docosahexaénoïque. EPA: acide eicosapentaénoïque.

Bien que la chimiodiversité des microalgues soit très importante (Barzkar et al., 2019; Mobin, Chowdhury, et Alam, 2019), elle semble cependant inférieure à celle des macroalgues et surtout à celle des plantes terrestres, qui synthétisent une grande diversité de molécules allélopathiques pour résister à la prédation. Certaines molécules de structure chimique tout à fait originale sont cependant retrouvées exclusivement dans les microalgues, ce qui souligne leur potentiel pour la découverte de motifs chimiques originaux, pouvant présenter des modes d'action pharmacologiques tout à fait innovants (Figure 38). Particulièrement, la chimiodiversité des pigments (caroténoïdes, chlorophylles et phycobiliprotéines) est très importante et cette famille de molécules fait l'objet de nombreux travaux de recherche pour des développements en cancérologie (Picot, 2014). Ils peuvent en effet présenter un intérêt majeur pour la prévention, le diagnostic et le traitement des cancers du fait de leurs nombreuses activités biologiques (activité antioxydante, photoprotectrice, antitumorale, antimétastatique, antiangiogénique, photosensibilisante, fluorescente, chimio- et radiosensibilisante) (Andrade et al., 2018; Barzkar et al., 2019; Mobin, Chowdhury, et Alam, 2019; Sharma et Sharma, 2017).

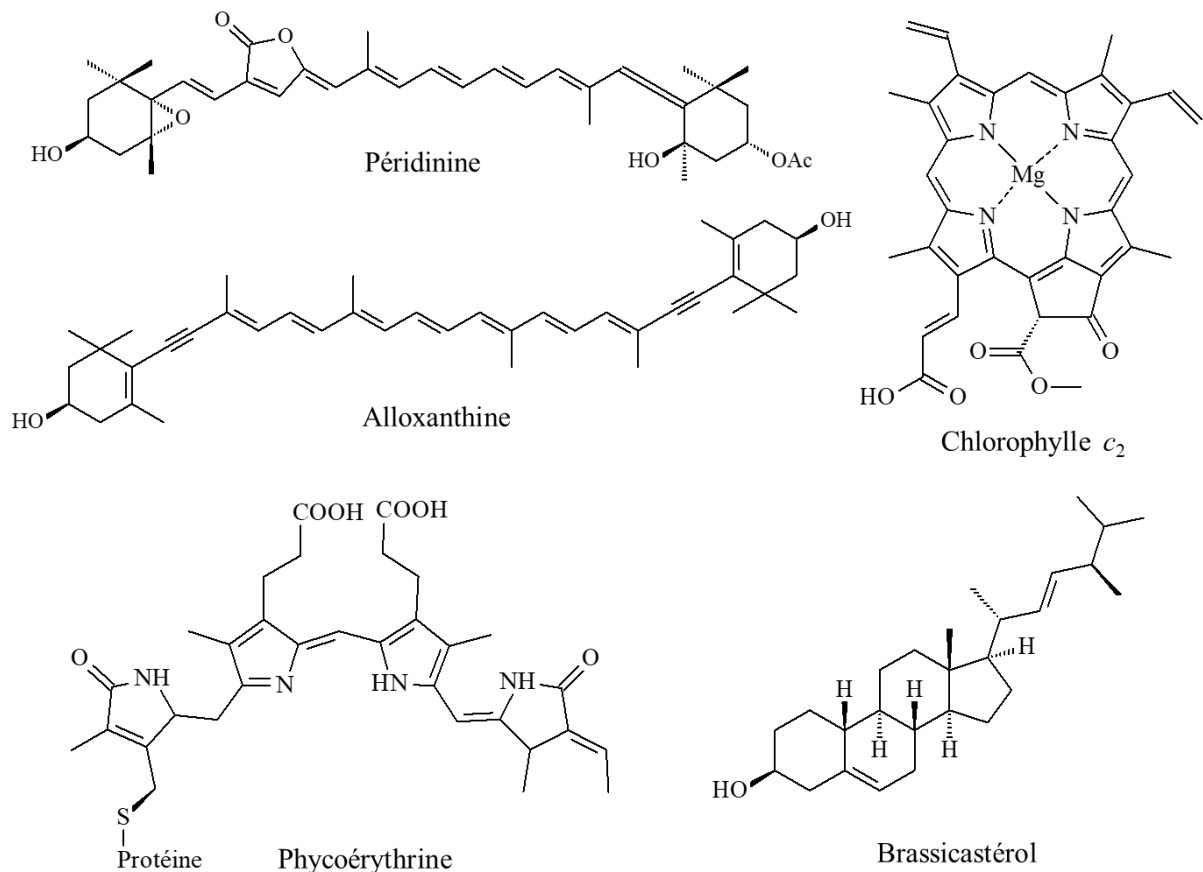


Figure 38. Diversité de molécules produites par les microalgues: caroténoïdes (ex. périidine et alloxanthine), chlorophylles (ex. chlorophylle c_2), phycobiliprotéines (ex. phycoérythrine), stérols (ex. brassicastérol), etc.

2.4.2.2. Les pigments de microalgues ayant un potentiel antimélanome: focus sur les chlorophylles et les caroténoïdes

Les chlorophylles

Les chlorophylles constituent le principal groupe de pigments naturels ; elles sont localisées dans les chloroplastes, où la photosynthèse oxygénique se produit en deux phases importantes: la phase photochimique, dans les membranes thylakoïdiennes, et la phase biochimique, dans le stroma. Ces organites contiennent également des pigments accessoires indispensables à la photosynthèse et à la photoprotection, les caroténoïdes (carotènes et xanthophylles) (Rabinowitch et Govindjee, 1965).

Les chlorophylles sont des structures macrocycliques asymétriques et insaturées, comportant quatre cycles pyrroles. Ces cycles sont numérotés de 1 à 4 ou de « A » à « D » selon le système de numérotation Fisher. Généralement, les chlorophylles sont formées par des

complexes dérivés de la porphyrine, ayant comme atome central le magnésium (Mg). Cependant, des complexes de coordination peuvent également se former avec le zinc (Zn). La chlorophylle *a* (Chl *a*) est le pigment photosynthétique le plus commun du règne végétal, présent chez tous les végétaux aquatiques et terrestres. La chlorophylle *b* (Chl *b*) est présente chez les végétaux supérieurs et les chlorophycées (algues vertes), alors que les chlorophylles *c* (Chl *c*₁, *c*₂ et *c*₃) sont présentes chez les algues de la lignée rouge (Roy et al., 2011). Les chlorophylles *d* (Chl *d*) et *f* (Chl *f*) ont été identifiées dans des organismes plus primitifs comme les cyanobactéries (Chen et al., 2010; Mohr et al., 2010).

La Chl *a* est le pigment utilisé dans la première étape du processus de photosynthèse, la phase photochimique, tandis que les autres pigments aident à la capture des photons et au transfert de l'énergie radiante de l'antenne collectrice vers le centre photochimique. Globalement, la phase claire (photochimique, à la lumière) qui a lieu dans les membranes des thylakoïdes où sont localisés les pigments, permet d'arracher des électrons à des molécules d'eau (oxydation en dioxygène) et de les transporter dans une chaîne redox pour produire de l'ATP et des cofacteurs sous forme réduite NADPH₂. Ces molécules sont utilisées lors de la phase sombre (chimique = cycle de Calvin, indépendante de la lumière) dans le stroma, pour fixer le CO₂ atmosphérique sur un pentose, le D-ribulose-1,5 bis phosphate pour former deux trioses (3-phosphoglycérate), à l'origine de la synthèse des hexoses, saccharose, amidon, lipides et acides aminés (protéines). La Chl *a* comporte une chaîne phytyle qui confère un caractère hydrophobe à sa structure, facilitant le transport dans la membrane thylakoïdienne et servant d'ancrage à des protéines membranaires du photosystème (Hooper, Eggink, et Chen, 2007). Les différences structurales entre les chlorophylles résident essentiellement dans le profil de substitution des cycles A et B et dans l'absence ou la présence de la chaîne phytyle liée au cycle D (Figure 39).

Il est important de noter que toutes les chlorophylles sont vertes, mais que leurs variations structurales rendent leurs spectres d'absorption légèrement différents. Cette diversité de gammes d'absorption spectrale permet aux différents organismes photosynthétiques d'utiliser des photons de longueurs d'onde différentes et donc d'occuper des niches écologiques variées en fonction de l'absorption différentielle de ces photons selon la profondeur de l'eau. D'un point de vue analytique, ces variations permettent également d'identifier les différents types de chlorophylles produites par les microalgues (Garrido, Zapata, et Muñiz, 1995; Zapata et al., 2004).

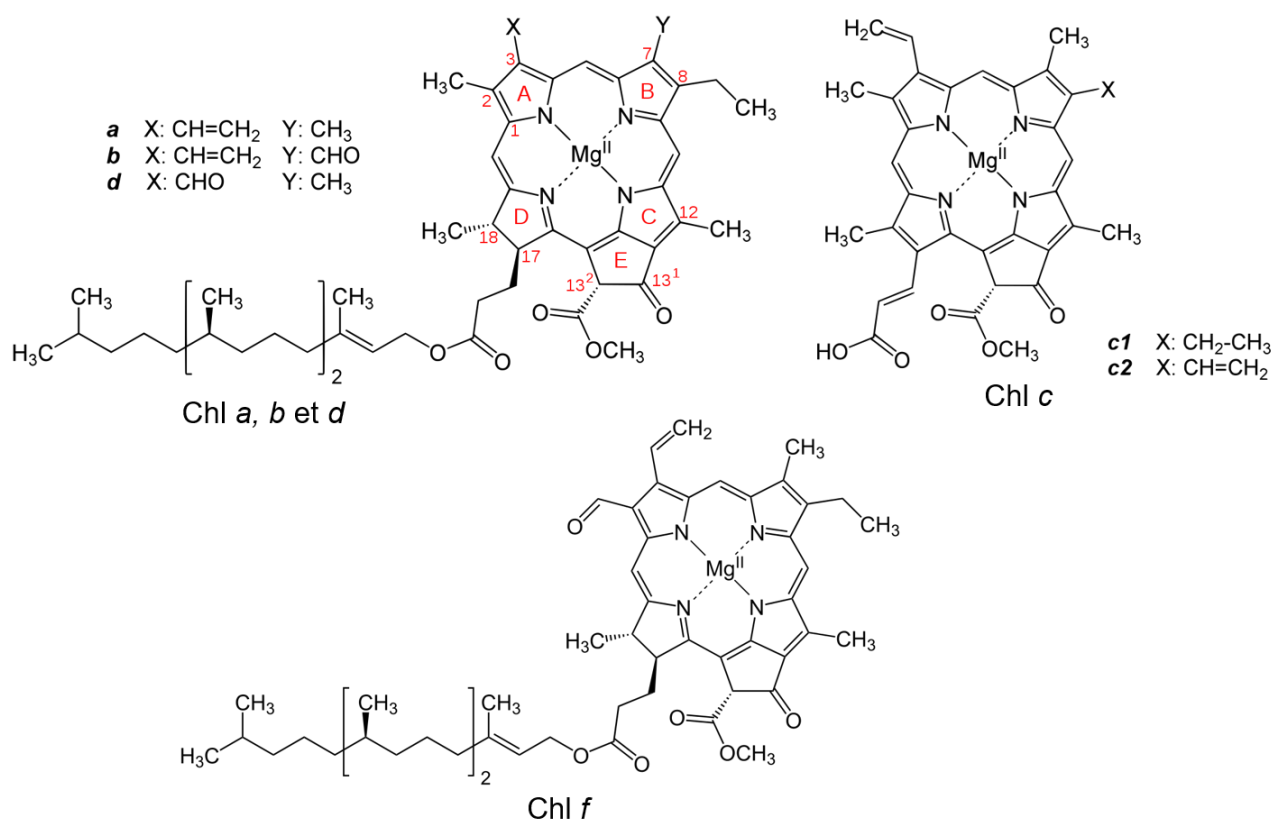


Figure 39. Diversité structurale des chlorophylles.

La voie de biosynthèse des chlorophylles part de l'acide 5-aminolevulinique, le précurseur commun de ces composés dont la dimérisation donne le porphobilinogène. Ce dernier est transformé en hydroxyméthylbilane contenant quatre cycles pyrrole. Après une étape de cyclisation, on obtient l'uroporphyrinogène III, qui subit ensuite des réactions de décarboxylation et d'oxydation, jusqu'à l'obtention de la chlorophyllide *a*, présentant l'anneau E. Finalement, l'ajout d'une chaîne phytyl provenant de la voie du mévalonate conduit à la synthèse de la chlorophylle *a* (Figure 40) (Roy et al., 2011).

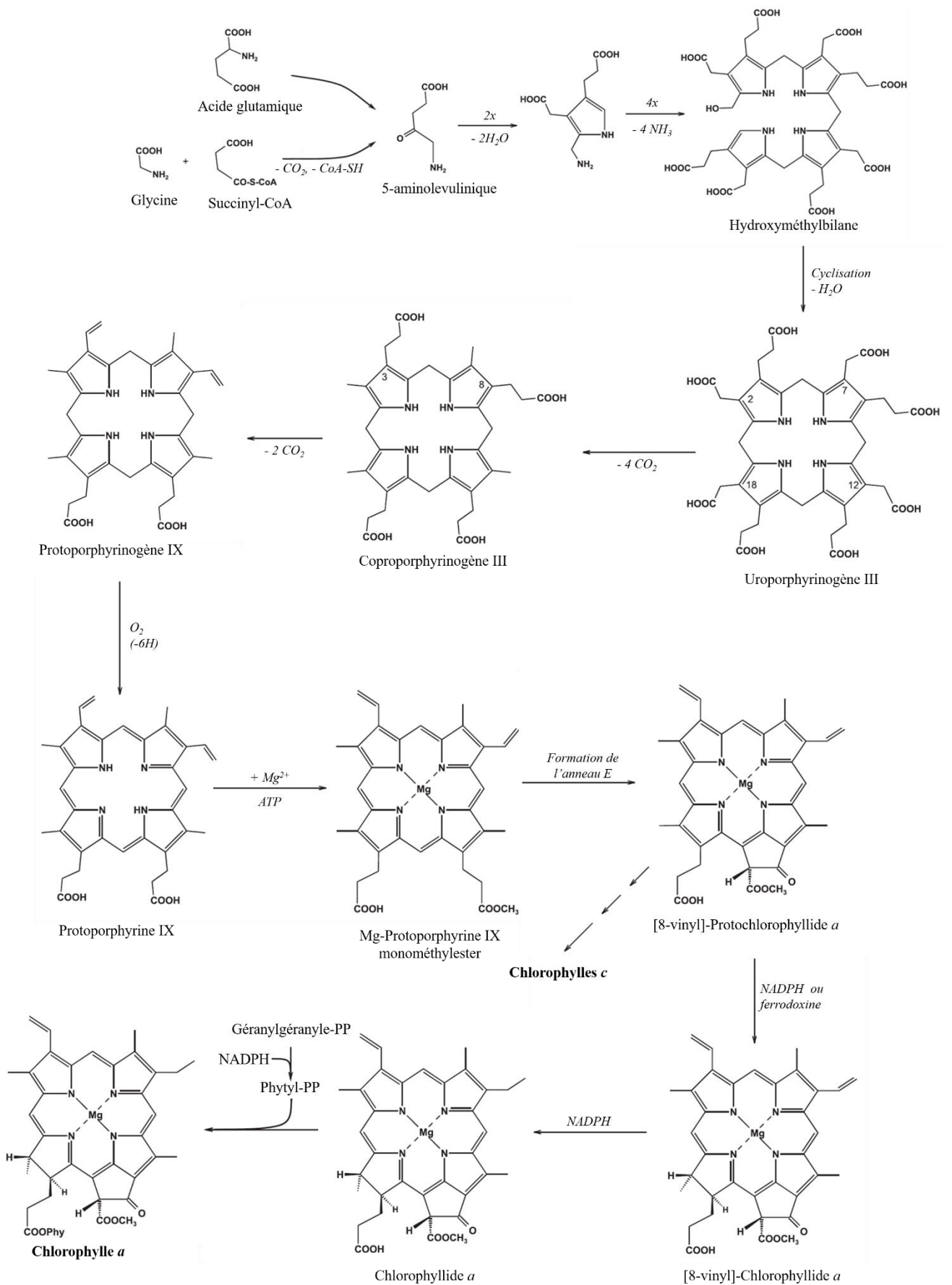


Figure 40. Voie de biosynthèse des chlorophylles d'après Roy et al. (2011).

Une fois synthétisées, les chlorophylles peuvent facilement se dégrader en dérivés ayant perdu l'ion magnésium et/ou la chaîne phytyle. Certains produits de dégradation des chlorophylles sont générés lors de l'extraction des pigments et ne font donc pas partie de la composition chimique naturelle des microalgues (Roy et al., 2011). A titre d'exemple, les principaux dérivés couramment extraits après dégradation de la chlorophylle *a* sont la chlorophyllide *a*, la phéophytine *a* et le phéophorbide *a* (Figure 41).

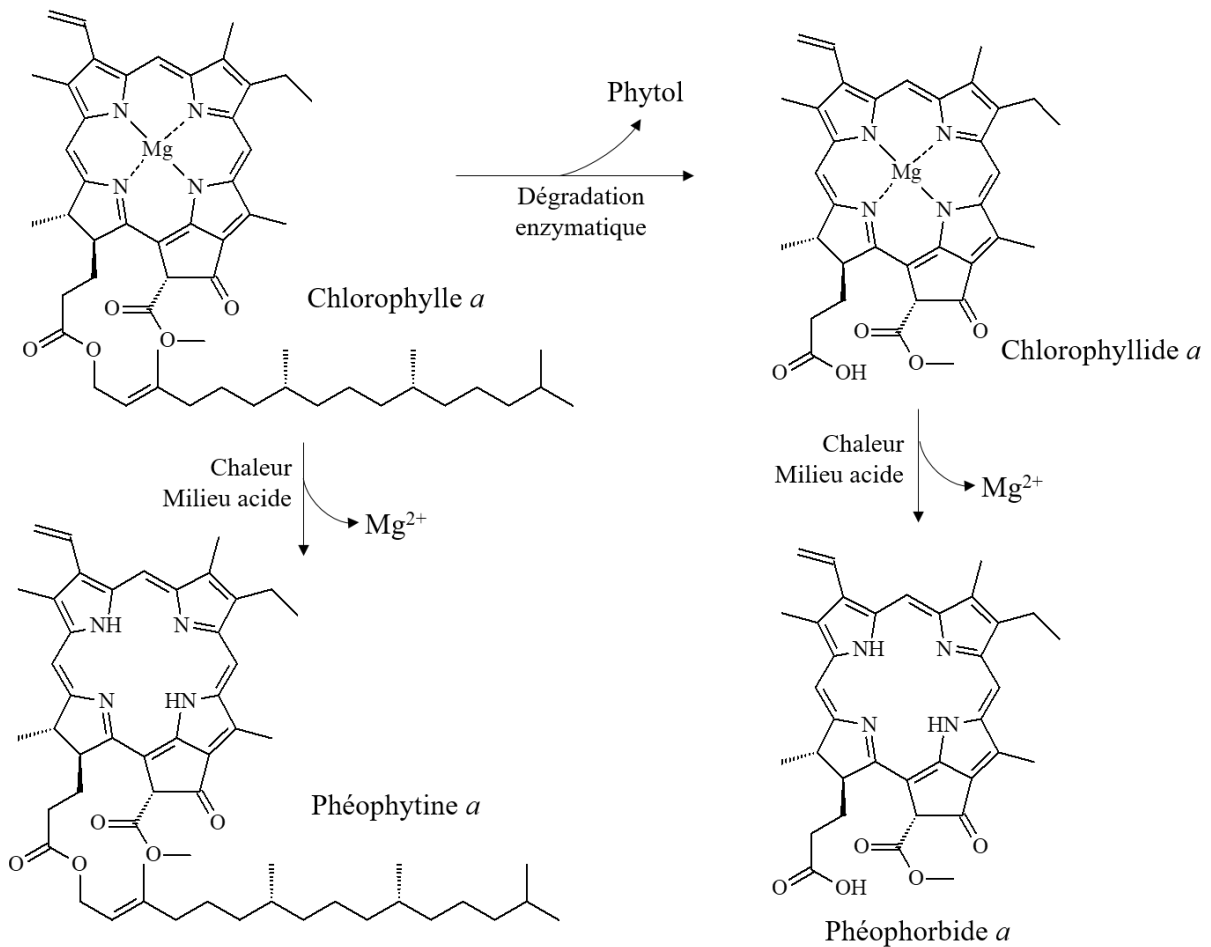


Figure 41. Principaux produits de dégradation de la chlorophylle *a*.

Les caroténoïdes

Les caroténoïdes sont parmi les pigments naturels les plus étudiés en cancérologie ces dernières années en raison de leur potentiel cytotoxique contre différentes lignées cellulaires tumorales, souvent associé à un effet pro-apoptotique ou pharmacomodulateur (Juin et al., 2018; Kim et al., 2013). Ces pigments liposolubles, qu'ils soient carotènes ou xanthophylles, sont présents dans toutes les espèces de microalgues et jouent un rôle important dans la photosynthèse. Sur les 1183 caroténoïdes connus à ce jour (*Carotenoids Database*:

<http://carotenoiddb.jp/>), seuls quelques-uns ont une importance commerciale significative (p. ex. β -carotène, fucoxanthine, astaxanthine) (Mobin, Chowdhury, et Alam, 2019). Selon les voies de biosynthèse présentes dans chaque espèce de microalgue, différents profils de substitution chimique peuvent être obtenus, résultant en une grande diversité de caroténoïdes. Comme dans les plantes, les carotènes sont des molécules précurseurs de xanthophylles. Le métabolisme des caroténoïdes part du lycopène. Une série d'enzymes intervient dans la conversion du lycopène en caroténoïdes cycliques puis oxygénés, présentant divers groupes fonctionnels (cétones, époxydes, hydroxyles, etc.). La figure 42 présente quelques exemples de voies de biosynthèse de xanthophylles chez les microalgues. Des cyclases, des époxydases ou de-époxydases, des kétolases, des synthases et des hydroxylases sont parmi les principales familles d'enzymes directement impliquées dans la biosynthèse des xanthophylles. Cependant, pour certains caroténoïdes les voies de biosynthèse restent encore inconnues ou pas complètement élucidées. C'est le cas de la fucoxanthine, un des époxy-caroténoïdes les plus étudiés et les plus utilisés en santé (Roy et al., 2011).

Certains modèles d'insaturation se retrouvent souvent dans les caroténoïdes de microalgues, tels que les systèmes acétylène ($C\equiv C$) et allène ($C=C=C$) observés dans la chaîne d'hydrocarbures de l'alloxanthine et de la fucoxanthine, respectivement. Le système acétylénique, par exemple, est extrêmement rare dans les produits naturels. Les caroténoïdes acétyléniques se trouvent exclusivement dans les algues, avec une grande abondance dans les microalgues (Takaichi, 2011). Du fait de leur originalité structurale, ces molécules peuvent présenter des activités pharmacologiques avec de modes d'action très variés, surtout en cancérologie.

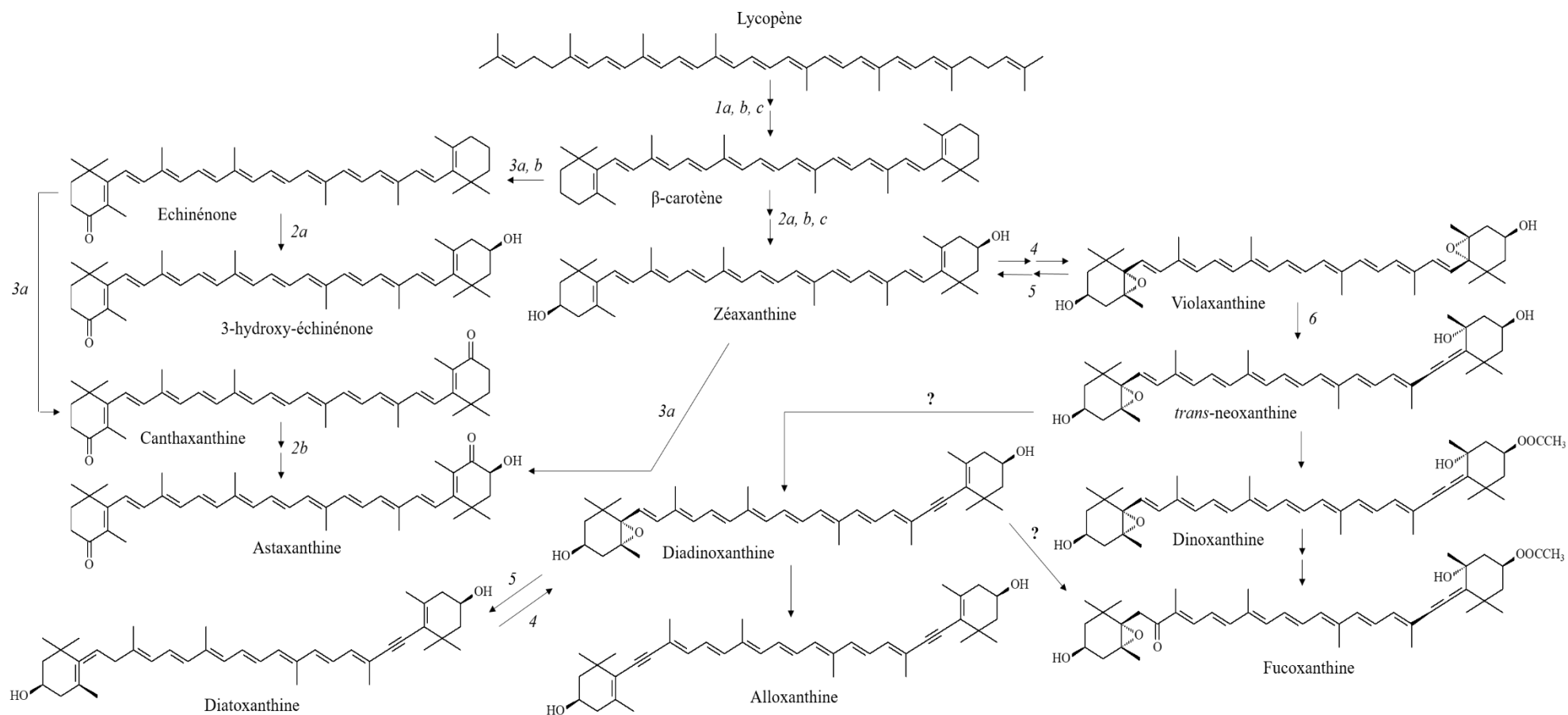


Figure 42. Diversité structurale et principales voies de biosynthèse de caroténoïdes retrouvés chez les microalgues. *1a, b, c*: LCYB/CrtL-b, CruA et CruP (lycopène β-cyclase); *2a, b, c*: CrtR, CHYB/CrtZ, CYP97A (carotène β-hydroxylase); *3a, b*: BKT/CrtW, CrtO (carotène β-kétolase); *4*: ZEP (zéaxanthine époxydase); *5*: VDE (violaxanthine dé-époxydase); *6*: NSY (néoxanthine synthase); ?: voie métabolique inconnue ou pas complètement élucidée. D’après Roy et al. (2011).

En ce qui concerne le mélanome, certains caroténoïdes ont montré des effets cytotoxiques, antiprolifératifs, pro-apoptotiques et anticancéreux importants dans des modèles *in vitro* et/ou *in vivo*. Les principaux caroténoïdes purifiés à partir de microalgues et évalués sur des modèles de mélanome murin et/ou humain comprennent: l'astaxanthine (Chen et al., 2017), la fucoxanthine (Kim et al., 2013), la canthaxanthine (Palozza et al., 1998), la zéaxanthine (Juin et al., 2018), le β -carotène (Guruvayoorappan et Kuttan, 2007), la diatoxanthine, la dinoxanthine et la péricidine (Haguet et al., 2017) (Figure 43). Ces molécules inhibent la croissance cellulaire et conduisent les cellules de mélanome à l'apoptose en activant la voie des caspases et en inhibant les protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2. De plus, Ils sont capables de moduler les voies de signalisation pro-inflammatoires impliquées dans la prolifération cellulaire, comme la voie NF- κ B (Juin et al., 2018).

Certains caroténoïdes marins induisent l'arrêt du cycle cellulaire par l'inhibition des CDKs (p. ex. CDK4) et des cyclines (p. ex. cyclineD1 et cycline D2), ainsi que par l'inhibition de la phosphorylation de la protéine RB (p-RB) et l'augmentation de l'expression des protéines régulatrices p15 et p27 (Kim et al., 2013). Ils augmentent également le stress oxydatif intracellulaire et provoquent la suppression des métalloprotéases (p. ex. MMP-1, MMP-2 et MMP-9), inhibant la migration des cellules métastatiques (Chen et al., 2017). Le tableau 7 résume les principaux effets de caroténoïdes extraits de microalgues marines sur des cellules de mélanome.

Tableau 7. Récapitulatif des effets des principaux caroténoïdes extraits de microalgues testés sur des cellules de mélanome.

Caroténoïdes	Modèle	Lignée	Principaux effets	Références
Astaxanthine	<i>In vitro</i> et <i>in vivo</i>	A375, A2058	Antiprolifératif, antimigratoire (\downarrow MMP-1, \downarrow MMP-2, \downarrow MMP-9), \downarrow stress oxydatif, arrêt du cycle cellulaire (G1), pro-apoptotique (\uparrow caspases 3 et 7)	(Chen et al., 2017)
Canthaxanthine	<i>In vitro</i>	SK-MEL-2	Antiprolifératif, pro-apoptotique	(Palozza et al., 1998)
Diatoxanthine	<i>In vitro</i>	A2058	Antiprolifératif	(Haguet et al., 2017)

Dinoxanthine	<i>In vitro</i>	A2058	Antiprolifératif	(Haguet et al., 2017)
Fucoxanthine	<i>In vitro</i> et <i>in vivo</i>	B16F10	Antiprolifératif, arrêt du cycle cellulaire (G1/G0), ↓p-RB, ↓cycline D1 et D2, ↓CDK4, ↑p15, ↑p27, pro-apoptotique (↑caspases 3 et 9, ↓Bcl-xL, ↓c-IAP-1, ↓c-IAP-2, ↓XIAP)	(Kim et al., 2013)
Péridinine	<i>In vitro</i>	A2058	Antiprolifératif	(Haguet et al., 2017)
Zéaxanthine	<i>In vitro</i>	A2058	Antiprolifératif, pro-apoptotique (↑caspase-3, ↑Bim, ↑Bid), ↓NF-κB, arrêt du cycle cellulaire, sensibilisation au vemurafenib	(Juin et al., 2018)
β-carotène	<i>In vitro</i>	B16F10	Antiprolifératif, pro-apoptotique (↑caspase-3, ↓Bcl-2), ↑p53, ↓NO, ↓iNOS, ↓TNF-α	(Guruvayoorappan et Kuttan, 2007)

NO: oxyde nitrique. iNOS: NO synthase inductible.

En général, les caroténoïdes n'ont pas un effet cytotoxique aussi puissant que les médicaments utilisés en clinique pour le traitement du mélanome métastatique. Cependant, en étant combinés à la chimiothérapie, ils sont capables de sensibiliser les cellules tumorales en réduisant les doses thérapeutiques de médicaments cytotoxiques (Juin et al., 2018). Une des hypothèses avancées pour expliquer cette chimiosensibilisation est l'intégration des caroténoïdes dans les membranes cytoplasmiques des cellules cancéreuses, en particulier au niveau des radeaux lipidiques, ce qui peut perturber la fluidité membranaire, activer les voies de signalisation pro-apoptotique et moduler le transport membranaire des agents cytotoxiques (Oliveira-Junior et al., 2016).

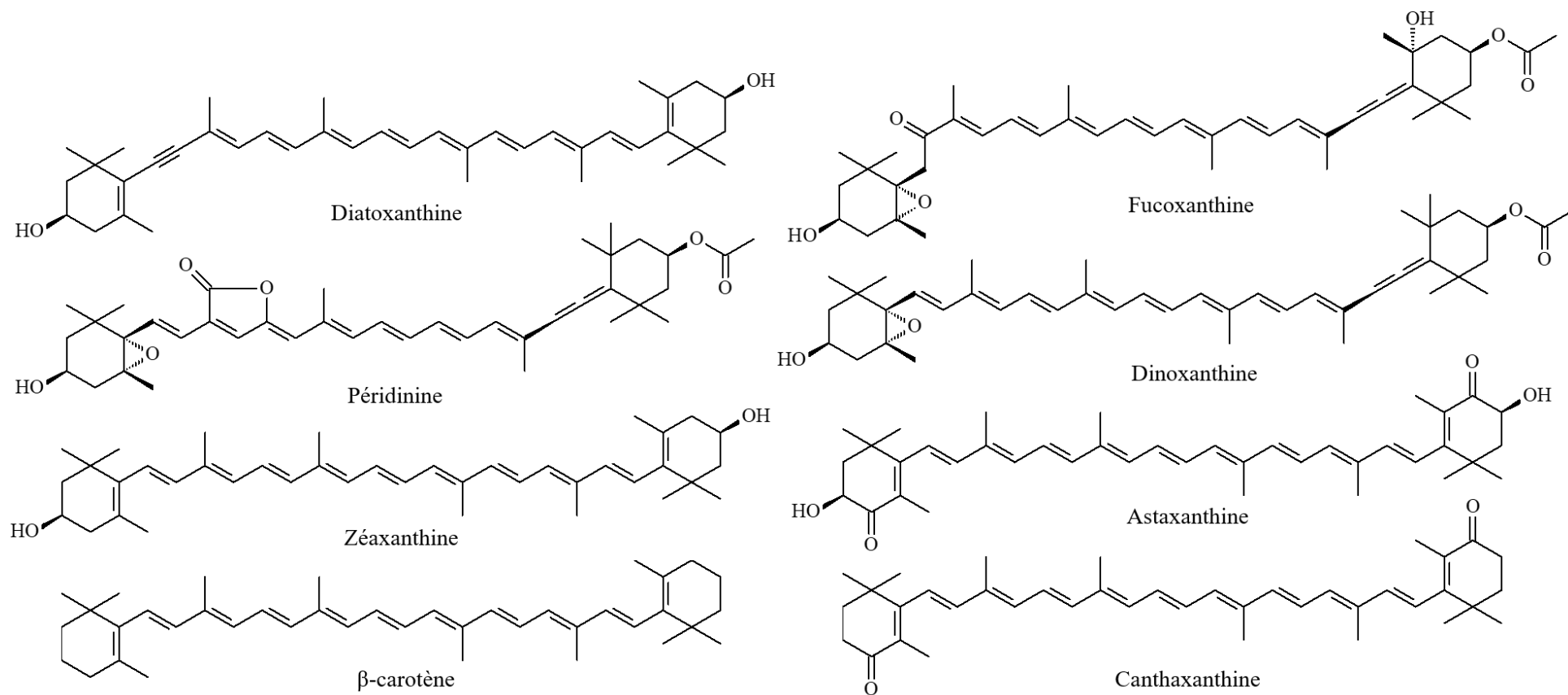


Figure 43. Exemples de caroténoïdes de microalgues présentant une activité anticancéreuse sur des modèles de mélanome murin et/ou humain.

2.5. Sensibilisation tumorale: une nouvelle stratégie pour améliorer l'efficacité de la chimiothérapie et de la radiothérapie

Dans le contexte d'échec de la monothérapie en raison de la chimiorésistance, l'utilisation de la *multidrug therapy* (polychimiothérapie ou thérapie combinée) pour le traitement du cancer est devenue une stratégie courante. La polychimiothérapie vise à cibler simultanément différentes voies biochimiques pour surmonter la résistance à chaque médicament pris séparément (Al-Lazikani, Banerji, et Workman, 2012). L'utilisation d'une combinaison de molécules cytotoxiques actives sur différentes cibles moléculaires dérégulées permet de retarder l'apparition d'une chimiorésistance, d'éviter la sélection de cellules cancéreuses MDR et de limiter les effets secondaires toxiques associés aux doses élevées de la monothérapie (Zugazagoitia et al., 2016). De plus, les progrès dans la caractérisation moléculaire des tumeurs permettent de sélectionner la combinaison et la séquence de traitements les plus efficaces avec des médicaments de thérapie ciblée (Al-Lazikani, Banerji, et Workman, 2012). La polychimiothérapie peut être combinée à la résection chirurgicale, l'hormonothérapie, l'immunothérapie, la radiothérapie et la photothérapie, mais elle s'accompagne souvent d'effets secondaires néfastes liés à la cytotoxicité sur tissus non tumoraux (Wang, Zhang, et Chen, 2019).

De nouvelles stratégies de polychimiothérapie limitant cette toxicité ont donc été envisagées. Comme les médicaments pro-apoptotiques entraînent classiquement une chimiorésistance, une approche alternative consiste à induire la mort des cellules cancéreuses par des mécanismes déclenchant des morts cellulaires de type *non-apoptotiques* (Kornienko et al., 2013; Levy, Towers, et Thorburn, 2017). Ainsi, de nombreux travaux de recherche visent aujourd'hui à identifier et combiner des molécules induisant l'autophagie (p. ex. rapamycine, temsirolimus, évérolimus, temozolomide) (Pérez-Hernández et al., 2019), la nécrose (p. ex. β -lapachone, shikonine) (Chen et al., 2017; Park et al., 2014), ou la ferroptose (p. ex. erastine, sorafenib, sulfasalazine) (Li et al., 2020).

Une évolution encore plus récente du concept de polychimiothérapie consiste à utiliser une molécule naturelle ou synthétique faiblement toxique (par exemple un nutriment cytostatique: resvératrol, curcumine, etc.) afin de sensibiliser la cellule tumorale à l'effet d'une chimiothérapie ou d'une radiothérapie. Ce concept, de *chimiosensibilisation* ou de *radiosensibilisation*, a été envisagé en observant en particulier que l'alimentation des patients cancéreux pouvait constituer un facteur modulant significativement l'efficacité des traitements antitumoraux (Leary et al., 2018). Par exemple, des études menées par Philippe Bougnoux ont montré qu'un régime enrichi en acides gras poly-insaturés (p. ex. les acides docosahexaénoïque

et eicosapentaénoïque, d'origine marine) entraîne une régression plus importante de la taille des tumeurs quelques semaines après le début de la radiothérapie ou chimiothérapie, comparé au groupe témoin (Bougnoux et al., 2009; Bougnoux et al., 2010; Hajjaji et Bougnoux, 2013). Dans cette stratégie, l'objectif est à la fois de ralentir la progression tumorale par une molécule cytostatique ne tuant pas les cellules (et donc n'induisant pas de chimiorésistance), et d'utiliser cette molécule pour potentialiser l'efficacité d'un agent cytotoxique ou d'une radiothérapie, ce qui permet de diminuer la dose de molécule anticancéreuse ou de rayonnement pour obtenir la même efficacité thérapeutique (Mokhtari et al., 2017). Les sensibilisants peuvent donc être définis comme des médicaments ou des nutriments (dans tous les cas des petites molécules de faible toxicité intrinsèque) capables d'améliorer l'indice thérapeutique des traitements antitumoraux en rendant les cellules tumorales plus sensibles aux médicaments anticancéreux (chimiosensibilisants), à la radiothérapie (radiosensibilisants) ou à l'immunothérapie (immunostimulants ou immunosensibilisants) (Joshi et Durden, 2019). La sensibilisation tumorale vise à améliorer ou maintenir la performance pharmacologique des médicaments cytotoxiques (chimiosensibilité ou *chemosensitivity*) aux doses les plus faibles possibles, réduisant l'impact de la chimiothérapie sur les tissus non tumoraux et limitant les mécanismes de chimiorésistance (Leary et al., 2018).

A ce jour, la plupart des chimiosensibilisants identifiés sont des nutriments d'origine végétale, notamment des dérivés phénoliques, des flavonoïdes, des alcaloïdes, des caroténoïdes, des acides gras, des terpénoïdes, des quinones, des saponines et des stéroïdes (Vinod, Maliekal, et Anto, 2013). Le chapitre suivant, rédigé et publié en début de thèse, présente une revue systématique exhaustive de la sensibilisation des cellules cancéreuses à la chimiothérapie par des produits naturels. Il est apparu lors de ce travail de revue que très peu de molécules marines ont été explorées pour des activités de chimio- et radiosensibilisation, ce qui a motivé notre travail de purification de caroténoïdes originaux de microalgues afin d'évaluer par la suite leur potentiel de chimiosensibilisation pour le traitement du mélanome métastatique. Cette stratégie nous a permis d'étudier l'activité chimiosensibilisante de caroténoïdes de deux microalgues marines. Nous avons également complété notre approche en évaluant des molécules originales issues de plantes terrestres ; les apocaroténoïdes présents dans les graines de la plante Brésilienne *Bixa orellana* et des flavonoïdes purifiés de *Gardenia* néo-Calédoniens.

**PARTIE A: SENSIBILISATION DE CELLULES
TUMORALES À LA CHIMIOTHÉRAPIE PAR DES
PRODUITS NATURELS**

PARTIE A: SENSIBILISATION DE CELLULES TUMORALES À LA CHIMIOTHÉRAPIE PAR DES PRODUITS NATURELS

Malgré le développement de nouvelles molécules agissant sur des cibles tumorales spécifiques et la conception de protocoles d'immunothérapie innovants, un grand nombre de patients atteints d'un cancer avancé décèdent à cause de la formation de métastases et de leurs conséquences cliniques. Les cellules cancéreuses métastatiques ont des mécanismes de résistance innée ou acquise à la chimiothérapie, qui se produisent souvent au cours du traitement. Dans la plupart des cas, la chimiothérapie exerce une réponse antitumorale significative dans les premiers mois, mais la tumeur va rapidement devenir résistante au traitement et reprendre sa croissance (Zugazagoita et al., 2016).

Des études précédentes ont montré que certains composés d'origine naturelle peuvent être associés à des agents anticancéreux afin de contenir ou de retarder les mécanismes de résistance. La diversité structurale des molécules extraites de plantes, d'algues, d'animaux et de micro-organismes permet de cibler à plusieurs niveaux les voies métaboliques associées à la prolifération et à la survie des cellules tumorales (Hajjaji et Bougnoux, 2013; Bougnoux et al., 2010; Juin et al., 2018). Parallèlement à l'identification de nouveaux agents chimiothérapeutiques, les produits naturels constituent également un large groupe de composés à potentiel chimiopréventif et, plus récemment, chimiosensibilisant (Vinod, Maliekal et Anto, 2013).

En termes de sensibilisation tumorale, les substances naturelles ayant un potentiel cytostatique peuvent être combinées à des agents cytotoxiques, renforçant leur capacité antitumorale. Cette stratégie permet de réduire les doses thérapeutiques des médicaments anticancéreux traditionnellement utilisés dans la thérapie antitumorale et, par conséquent, de limiter leurs effets toxiques sur les tissus sains. Ainsi, la thérapie combinée, qui est déjà réalisée avec des molécules synthétiques agissant sur différentes cibles thérapeutiques (par exemple, les inhibiteurs BRAF + les inhibiteurs MEK), pourrait désormais être réalisée avec des produits naturels en tant qu'agents chimiosensibilisants (Leary et al., 2018; Vinod, Maliekal et Anto, 2013).

Dans cette partie, nous présentons *le premier chapitre* de la thèse qui concerne une revue systématique des études précliniques (*in vitro* ou *in vivo*) impliquant l'utilisation de produits naturels pour la sensibilisation à la chimiothérapie. La recherche et la sélection d'articles ont été effectuées dans trois bases de données différentes (PubMed, Science Direct et Scopus), suivant les recommandations du protocole PRISMA (*Preferred Reporting Items for Systematic*

Reviews and Meta-Analyses). Une fois sélectionnés, les articles ont été classés en fonction du pays et de l'année de publication, des modèles expérimentaux employés, des classes de métabolites secondaires et du type de cancer étudié. Nous avons également mis en évidence les principaux mécanismes moléculaires impliqués dans l'effet chimiosensibilisant des substances naturelles testées.

CHAPITRE 1

Article publié dans Fitoterapia

SENSITIZATION OF TUMOR CELLS TO CHEMOTHERAPY BY NATURAL PRODUCTS: A SYSTEMATIC REVIEW OF PRECLINICAL DATA AND MOLECULAR MECHANISMS

Raimundo Gonçalves de Oliveira Júnior¹, Christiane Adrielly Alves Ferraz², Jackson Roberto Guedes da Silva Almeida², Raphaël Grougnet³, Valérie Thiéry¹, Laurent Picot^{1*}

¹ UMRi CNRS 7266 LIENSs, University of La Rochelle, 17042 La Rochelle, France.

² Center for Studies and Research of Medicinal Plants, Federal University of San Francisco Valley, 56306-000 Petrolina, Brazil.

³ UMR CNRS 8638 Laboratory of Pharmacognosy, Paris Descartes University, 75006 Paris, France.

*Corresponding author at: UMRi CNRS 7266 LIENSs, Université de La Rochelle, Curie B101 Faculté des Sciences et Technologies, Avenue Michel Crépeau, 17042 La Rochelle, France. E-mail address: laurent.picot@univ-lr.fr (L. Picot).

ABSTRACT

Purpose: Tumor cells are spontaneously or adaptively resistant to chemotherapeutic drugs, eventually leading to the selection of multiresistant cells responsible for tumor growth and metastasis. Chemosensitization of tumor cells to conventional drugs using non-toxic natural products is a recent and innovative strategy aiming to increase the cytotoxic efficiency of anticancer drugs, limit their toxic side effects and delay the appearance of acquired chemoresistance. This systematic review summarizes data obtained from preclinical studies reporting the use of natural products to sensitize tumor cells to chemotherapeutic agents. It also details the cellular and molecular mechanisms involved in chemosensitization.

Design: Search terms were combined and used to retrieve English language reports in PubMed, Science Direct and Scopus databases, published until October 2017. All articles were carefully analyzed and data extraction was conducted through standardized forms. Methodological quality assessment of *in vivo* studies was also performed.

Results: From a total of 669 articles surveyed, 104 met the inclusion criteria established. The main studied compounds as chemosensitizers were phenolic derivatives (26.9%) and flavonoids (17.3%). Most reports were authored by researchers from China (33.7%) and USA (26.9%). A large number of articles were published from 2011 to 2015 (50.0%), suggesting that the use of natural products as chemosensitizers is a recent issue. *In vivo* studies were conducted mainly using xenograft models, which were considered of moderate methodological quality.

Conclusion: Several natural products, belonging to diverse chemical families, are potent chemosensitizers in tumor cells enhancing the cytotoxicity of conventional drugs. These molecules usually have a pleiotropic effect on different molecular targets, acting on several cellular and molecular processes with low selectivity. All studied molecules were obtained from terrestrial plants and major developments should arise from future studies, considering the chemodiversity of molecules purified from other terrestrial taxa and marine organisms.

Keywords: cancer; chemotherapy; chemosensitization; drug resistance; natural products.

1. Introduction

Cancer is one of the most impactful diseases of the 21st century, affecting populations of diverse social, ethnic and economic characteristics. Although the genetic, epigenetic and pathophysiological mechanisms of cancer have been well described in recent years, cancer still represents the second cause of death in developed countries after heart disease [1,2].

To ensure their survival and proliferation, cancer cells acquire differentiated abilities compared to normal cells. In the development of malignant tumors, they may present constitutively active proto-oncogenes, which predisposes to carcinogenesis, maintaining proliferative signaling pathways active [3]. In addition, expression of tumor suppressor genes is usually decreased and the cell acquires sufficient autonomy to continue multiplying without the need for growth factors. Tumor cells also have replicative immortality mechanisms [4] and greater resistance to cell death mediated by the regulation of anti and pro-apoptotic proteins [5]. For tumor maintenance and progression, they stimulate the production of angiogenic factors and modulate cellular metabolism in order to obtain more nutrients [3,6].

In this sense, chemotherapy is one of the main alternatives for cancer treatment, using molecules capable of inhibiting proliferative signaling pathways, replicative immortality mechanisms and angiogenesis, besides inducing apoptosis of tumor cells [7-10]. However, the efficacy of conventional chemotherapeutics has been limited by drug resistance mechanisms [11]. Several studies have recognized that tumors exhibit a high degree of molecular and genetic heterogeneity, making them adapted to the usual cytotoxic agents. Unsuccessful treatments have been attributed to increased rates of drug efflux, alterations in drug metabolism (drug inhibition and degradation), cell death inhibition, epigenetic factor and mutations of drug targets (Figure 1). These mechanisms can act independently or in combination and through numerous signaling pathways [11-13].

A wide variety of natural compounds has been reported for cancer therapy [14,15]. Natural products are an inexhaustible source of molecules with unique structural models and innovative mechanisms of action. In fact, natural compounds can be used in a versatile manner, especially in cancer management: a) as chemotherapeutic agents [16,17]; b) in cancer prevention (chemopreventive agents) [18,19]; c) or improving the effectiveness of conventional chemotherapy (chemosensitizer agents) [20].

Most of the identified chemosensitizer natural compounds are phytochemicals, which are classified as phenolic derivatives, flavonoids, alkaloids, carotenoids, terpenoids, quinones, saponins and steroids depending on their molecular structure [20,21]. In general, these molecules act by increasing the residence time of chemotherapeutics in tumor cells, inducing

cell death by up-regulation of pro-apoptotic targets, promoting DNA damage or regulating the expression of altered and unaltered drug targets (Figure 1). When associated, these mechanisms enhance the cytotoxic effect of anticancer drugs, promoting a synergistic effect even in cells with acquired resistance [22-24].

The present systematic review was designed to summarize and analyze reports involving the use of natural products as chemosensitizers. Our focus was on preclinical studies (*in vitro* and *in vivo* approaches) in order to demonstrate to readers how these experimental models can contribute to the achievement of alternative strategies for cancer therapy.

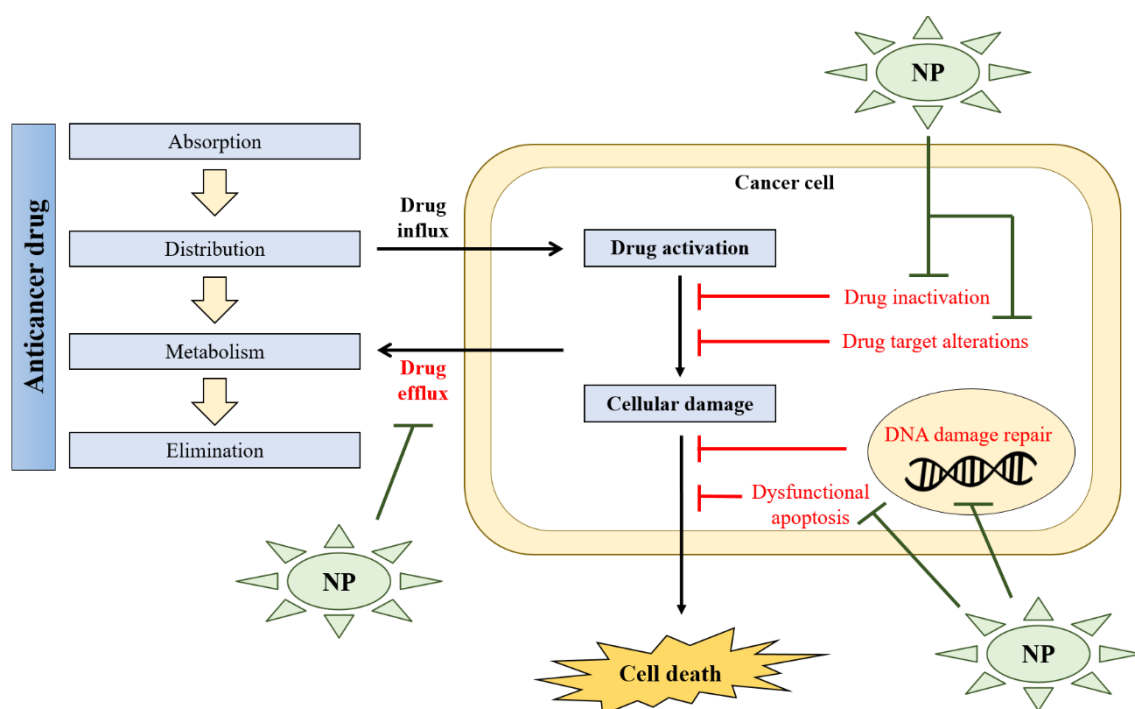


Figure 1. General drug resistance mechanisms implicated in cancer therapy and possibilities of intervention of natural products (NP) as chemosensitizer agents.

2. Materials and Methods

2.1. Search strategy

A systematic review was conducted through a literature search performed in October 2017 and included all reports published to date. This literature search was performed on specialized databases (PubMed, Science Direct and Scopus) using different combinations of the following keywords: chemosensitization, cancer, tumor, natural products, phytotherapy, medicinal plants, marine products and marine drugs. We did not contact investigators and we did not attempt to identify unpublished data. This systematic review was performed in

accordance with the criteria described on the Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA) statement [25].

2.2. Study selection

Manuscript selection was based on the inclusion criteria: pre-clinical (*in vitro* and *in vivo*) studies involving the use of natural compounds/secondary metabolites as chemosensitizer agents of tumor cells to chemotherapeutic drugs, as well as pre-clinical (*in vitro* and *in vivo*) studies involving associations/combinatorial treatment between natural compounds/secondary metabolites and conventional chemotherapeutic drugs for antitumor therapy; only articles published in English and containing keywords in the title or abstract were selected. Other review articles, meta-analysis, abstracts, conferences, editorials/letters, case reports, conference proceedings, manuscripts without full text available or articles that did not meet the inclusion criteria were excluded from this systematic review. Studies involving extracts, fractions, synthetic or semisynthetic derivatives were also excluded.

For the selection of the manuscripts, two independent investigators (RGOJ and CAAF) first selected the articles according to the title, then to the abstract and finally through an analysis of the full-text publication. In cases of non-consensus, a third independent review was consulted (JRGSA). The selected articles were carefully reviewed with the purpose of identifying and excluding the reports that did not fit the criteria described above. Additional papers were included in this review after the analysis of all references from the selected articles.

2.3. Data extraction

Data were collected and examined by the authors using standardized forms. The information from the selected manuscripts on studied natural compounds, experimental models, associated chemotherapeutic agent, doses or concentrations, route of administration, cell lines, biochemical assays, histological assessments and molecular mechanisms studied were extracted and assessed.

2.4. Methodological quality assessment

The risk of bias and quality of the *in vivo* preclinical investigations were assessed using a checklist adapted from Hooijmans et al. [26] and Siqueira-Lima et al. [27]. This analysis allowed evaluating the methodological quality of the selected studies regarding the randomization of the treatment allocation, blinded drug administration, blinded outcome

assessment and outcome measurements. Studies that reported randomization of animals, blinding and outcome measurements were considered of higher methodological quality.

3. Results

The primary search identified 669 reports (08 from PubMed, 562 from Science Direct and 99 from Scopus). However, 147 manuscripts were indexed in two or more databases and were considered only once, resulting in 552 original articles. After an initial screening of titles and abstract, 436 articles were excluded since they did not meet the inclusion criteria or presented extremely different themes from the proposal of this systematic review. Finally, 86 articles were fully analyzed and among these 39 were excluded. A detailed analysis of the list of references from all selected articles was performed, leading to the addition of 57 papers pertinent to this review and that met all inclusion criteria established after title, abstract and full text analysis. In total, 104 articles were included for data extraction. A flowchart illustrating the progressive study selection and numbers at each stage is shown in Figure 2.

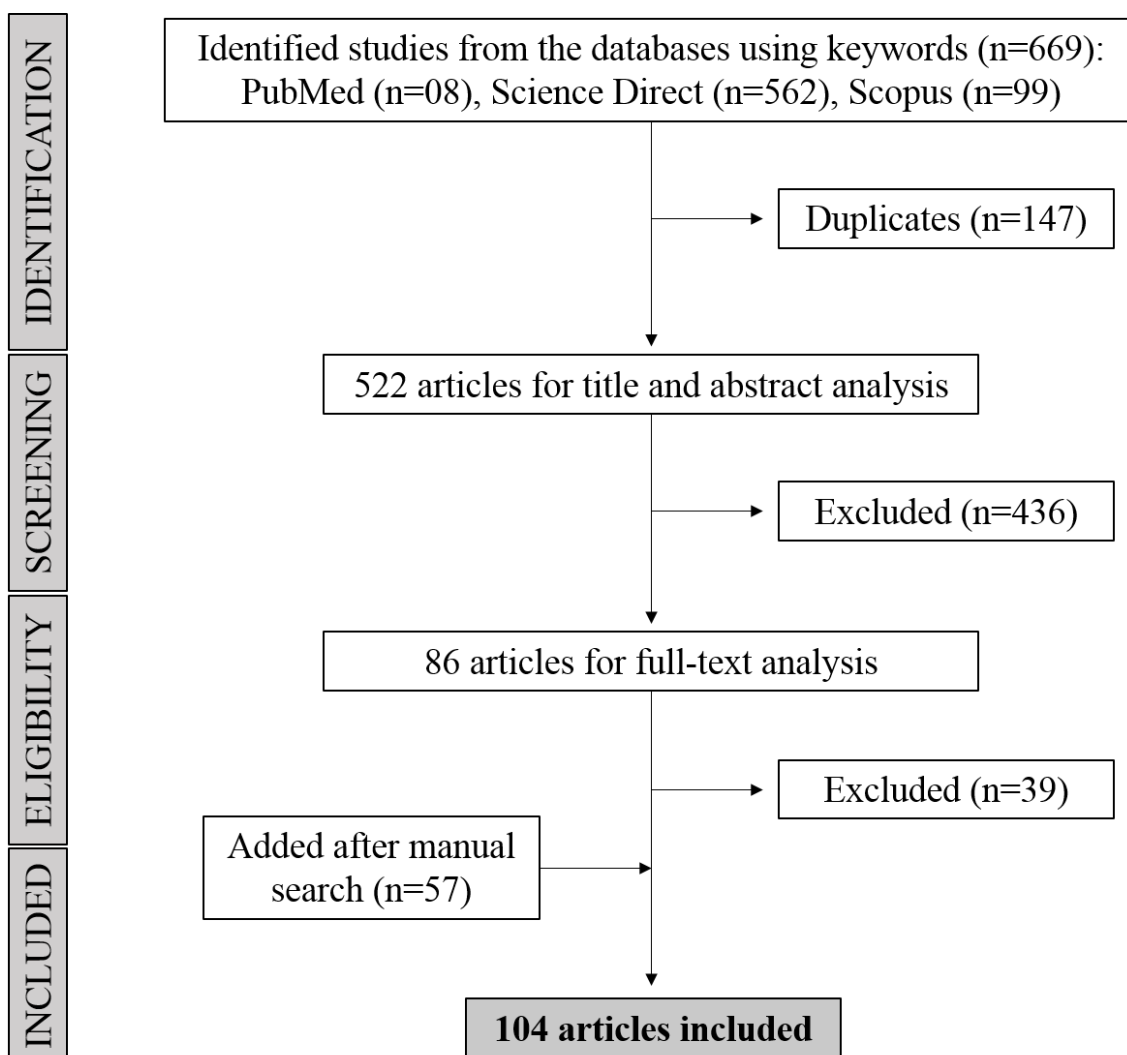


Figure 2. Flowchart detailing literature search according to PRISMA statement [25].

The articles selected for this review were categorically analyzed in relation to the country where the study was conducted, year of publication, natural compounds evaluated as chemosensitizers, cell lines and corresponding cancers. Table 1 summarizes the main information contained in the selected *in vitro* and *in vivo* reports. In general, the studies were conducted by research groups located in about 20 different countries. However, most of the investigations were authored by researchers from China (35 reports, 33.7%) and USA (28 reports, 26.9%). Regarding the annual evolution of the publications, a large number of articles were published from 2011 to 2015 (52 reports, 50.0%). Only in the last two years, 18 articles (17.3%) have been published, suggesting that the use of natural products as chemosensitizers is a recent issue that has attracted researchers' attention.

Table 1. General characteristics of included studies (*in vitro* and *in vivo* reports).

Authors, year, country	Model	Chemosensitizer	Combined conventional drug	Tumor cell line	Cancer
<i>Alkaloids</i>					
Song et al. (2007) [28], China	<i>In vitro</i> and <i>in vivo</i>	Oxymatrine	NM-3	SGC-7901, MKN-45 and MKN-74	Gastric cancer
Banerjee et al. (2009) [29], USA	<i>In vitro</i> and <i>in vivo</i>	3,3-diindolylmethane	CIP, OXP and GCT	PANC-1, Colo-357 and PANC-28	Pancreatic cancer
Sung et al. (2010) [30], USA	<i>In vitro</i>	Noscapine	TNF, TLD, PTX and BTZ	KBM-5 and U266	Leukemia
Chougule et al. (2011) [31], USA	<i>In vitro</i> and <i>in vivo</i>	Noscapine	GCT	A549 and H460	Lung cancer
Tong et al. (2012a) [32], China	<i>In vitro</i>	Berberine	DOX	A549; HeLa; HepG2	Lung cancer; cervical cancer; hepatocellular carcinoma
Qi et al. (2013) [33], USA	<i>In vitro</i> and <i>in vivo</i>	Noscapine	TMZ, BCE and CIP	U87MG	Glioblastoma
Wang et al. (2013a) [34], China	<i>In vitro</i> and <i>in vivo</i>	Sinomenine	5FU	Eca-109	Esophageal carcinoma
Guo et al. (2014) [35], China	<i>In vitro</i>	Berberine	RPM	SMMC7721 and HepG2	Hepatocellular carcinoma

Liu et al. (2015a) [36], China	<i>In vitro</i> and <i>in vivo</i>	Oxymatrine	5FU	Hep-G2 and SMMC-7721	Hepatocellular carcinoma
Doddapaneni et al. (2016) [37], USA	<i>In vitro</i>	Noscapine	DTX	MDA-MB231	Breast cancer
Zhao et al. (2016) [38], China	<i>In vitro</i>	Berberine	CIP	MCF-7	Breast cancer
<i>Carotenoids</i>					
Rajendran et al. (2010) [39], Singapore	<i>In vitro</i>	γ -Tocotrienol	DOX and PTX	HepG2, C3A, SNU-387, and PLC/PRF5	Hepatocellular carcinoma
Liu et al. (2015b) [40], China	<i>In vitro</i> and <i>in vivo</i>	α -carotene	PTX	LLC**	Lung cancer
Zhang et al. (2016) [41], China	<i>In vitro</i> and <i>in vivo</i>	β -carotene	5FU	EC1 and Eca109	Esophageal carcinoma
<i>Coumarins</i>					
Kim et al. (2014) [42], South Korea	<i>In vitro</i>	Bergamottin	BTZ and TLD	U266	Multiple myeloma
<i>Flavonoids</i>					
Stammler and Volm (1997) [43], Germany	<i>In vitro</i>	Epigallocatechin-3-gallate	DOX	SSW620-dox	Colon cancer

Dhanalakshmi et al. (2003) [44], USA	<i>In vitro</i>	Silibinin	CIP and CAP	DU145	Prostate cancer
Chisholm et al. (2004) [45], New Zealand	<i>In vitro</i>	Epigallocatechin-3-gallate	TOF	MDA-MB-231	Breast cancer
Peng et al. (2007) [46], USA	<i>In vitro</i>	Deguelin	DOX and DTX	SKBR-3, MCF-7 and MCF 10A	Breast cancer
Siddiqui et al. (2008) [47], USA	<i>In vitro</i>	Epigallocatechin-3-gallate	TRAIL	LNCaP	Prostate cancer
Shervington et al. (2009) [48], UK	<i>In vitro</i>	Epigallocatechin-3-gallate	CIP and TOF	1321N1; U87-MG	Astrocytoma; glioblastoma
Zhang et al. (2009) [49], China	<i>In vitro</i> and <i>in vivo</i>	Naringenin	DOX	A549; HepG2; MCF-7 and MCF-7/DOX	Lung cancer; hepatocellular carcinoma; breast cancer
Jin et al. (2011) [50], South Korea	<i>In vitro</i>	Naringenin	TRAIL	A549	Lung cancer
Stearns and Wang (2011) [51], USA	<i>In vitro</i> and <i>in vivo</i>	Epigallocatechin-3-gallate	TXN	PC-3ML	Prostate cancer
Hönicke et al. (2012) [52], Germany	<i>In vitro</i>	Epigallocatechin-3-gallate	IL-1Ra	U-2 OS	Osteosarcoma
Wu et al. (2012) [53], China	<i>In vivo</i>	Epigallocatechin-3-gallate	CCT	BGC-823	Gastric cancer

Kwak et al. (2013) [54], South Korea	<i>In vitro</i>	Epigallocatechin-3-gallate	VOR	HuCC-T1	Cholangiocarcinoma
Suzuki et al. (2014) [55], USA	<i>In vitro</i> and <i>in vivo</i>	Genistein	5FU	MIA PaCa-2	Pancreatic cancer
Wang et al. (2014a) [56], China	<i>In vitro</i> and <i>in vivo</i>	Myricetin	5FU	EC9706	Esophageal carcinoma
Abaza et al. (2015) [57], Kuwait	<i>In vitro</i>	Naringenin	CPT, 5FU, DOX, CIP, ELP, ETP, CAP and CPA	SW1116 and SW837; HTB26 and HTB132	Colon cancer; breast cancer
Wang et al. (2015) [58], USA	<i>In vitro</i>	Epigallocatechin-3-gallate + quercetin	DTX	LAPC-4-AI and PC-3	Prostate cancer
García-Vilas et al. (2016) [59], Spain	<i>In vitro</i>	Epigallocatechin-3-gallate	4MU	MDA-MB231	Breast cancer
Krajnovic et al. (2016) [60], Serbia	<i>In vitro</i> and <i>in vivo</i>	Isoxanthohumol	PTX	B16, A375 and B16F10	Melanoma

Naphthodianthrones

Lin et al. (2016) [61], China	<i>In vitro</i>	Hypericin	OXA	HCT8 and HCT116	Colon cancer
Lin et al. (2017) [62], China	<i>In vitro</i>	Hypericin	OXF	HCT116 and HCT8	Colon cancer

Phenolic derivatives

Anuchapreeda et al. (2002) [63], Thailand	<i>In vitro</i>	Curcumin	VBL	KB-V1	Cervical cancer
Hour et al. (2002) [64], China	<i>In vitro</i>	Curcumin	DOX, 5FU and PTX	PC-3 and DU145	Prostate cancer
Fulda and Debatin (2004) [65], Germany	<i>In vitro</i>	Resveratrol	DOX, VP16, ACD, PTX, MET, CYT, 5FU, CHM, MMS, TMD and NCD	SHEP; U373MG; PANC1; MCF7; LNCaP; Jurkat T-cell and Reh B-cell	Neuroblastoma; malignant glioma; pancreatic cancer; breast cancer; prostate cancer; leukemia
Wu et al. (2004) [66], China	<i>In vivo</i>	Resveratrol	5FU	H ₂₂	Hepatocellular carcinoma
Aggarwal et al. (2005) [67], USA	<i>In vitro</i> and <i>in vivo</i>	Curcumin	PTX	MDA-MB-435	Breast cancer
Bava et al. (2005) [68], India	<i>In vitro</i>	Curcumin	PTX	HeLa, SiHa, CaSki, and ME-180	Cervical cancer
Li et al. (2007) [69], USA	<i>In vitro</i> and <i>in vivo</i>	Curcumin	OXA	LoVo and Colo205	Colon cancer
Chen et al. (2009) [70], Taiwan	<i>In vitro</i>	Tannic acid	ATO	HL-60	Leukemia
Harikumar et al. (2009) [71], USA	<i>In vitro</i> and <i>in vivo</i>	Resveratrol	GCT	AsPC-1, MIA PaCa-2 and PANC1	Pancreatic cancer

Kunnumakkara et al. (2009) [72], USA	<i>In vitro</i> and <i>in vivo</i>	Curcumin	CCT	HCT116, HT29 and SW620	Colon cancer
Yu et al. (2009) [73], USA	<i>In vitro</i>	Curcumin	FOLFOX	HCT116 and HT29	Colon cancer
Hartojo et al. (2010) [74], USA	<i>In vitro</i>	Curcumin	5FU and CIP	Flo-1 and OE33	Esophageal adenocarcinoma
Bava et al. (2011) [75], India	<i>In vitro</i>	Curcumin	PTX	HeLa	Cervical cancer
Sreekanth et al. (2011) [76], India	<i>In vitro</i> and <i>in vivo</i>	Curcumin	PTX	3-MC*	Cervical cancer
Osman et al. (2012) [77], Saudi Arabia	<i>In vitro</i>	Resveratrol	DOX	MCF-7	Breast cancer
Saleh et al. (2012) [78], Egypt	<i>In vitro</i>	Curcumin	ETP	MCF-7; HeLa; HCT116; HepG2; U251	Breast cancer; cervical cancer; colon cancer; hepatocellular carcinoma; glioblastoma
Wang et al. (2012a) [79], China	<i>In vitro</i>	Curcumin	LAP	RS4;11, Reh and Jurkat	Acute lymphoblastic leukemia
Amiri et al. (2013) [80], Iran	<i>In vitro</i>	Resveratrol	ETP	HepG2; HCT116	Hepatocellular carcinoma; colon cancer
Díaz-Chávez et al. (2013) [81], Mexico	<i>In vitro</i>	Resveratrol	DOX	MCF-7	Breast cancer

Shakibaei et al. (2013) [82], Germany	<i>In vitro</i>	Curcumin	5FU	HCT116 and HCT116+ch3	Colon cancer
Carlson et al. (2014) [83], USA	<i>In vitro</i>	Curcumin + resveratrol	DOX	SKOV-3	Ovarian cancer
Qian et al. (2014) [84], China	<i>In vitro</i>	Curcumin	ADM	HepG2	Hepatocellular carcinoma
Buhrmann et al. (2015) [85], Germany	<i>In vitro</i>	Resveratrol	5FU	HCT116, HCT116R, SW480 and SW480R	Colon cancer
Cote et al. (2015) [86], USA	<i>In vitro</i>	Resveratrol + quercetin	DOX	SKOV-3	Ovarian cancer
Shakibaei et al. (2015) [87], Germany	<i>In vitro</i>	Curcumin	5FU	HCT116 and HCT116R	Colon cancer
Abaza et al. (2016) [88], Kuwait	<i>In vitro</i>	Methylferulate	CPT, 5FU, DOX, OXP, PTX, VBL, VCR, ETP, ELP, AMS, HHG and APD	SW1116 and SW837	Colon cancer
Ooko et al. (2016) [89], Germany	<i>In vitro</i>	Curcumin	DOX	CCRF-CEM and CEM/ADR5000	Acute lymphoblastic leukemia

Tyagi et al. (2017) [90], USA	<i>In vitro</i>	Calebin A	5FU and TLD	KBM-5	Chronic myeloid leukemia
<i>Quinones</i>					
Jafri et al. (2010) [91], USA	<i>In vitro</i> and <i>in vivo</i>	Thymoquinone	CIP	NCI-H460 and NCI-H146	Lung cancer
Li et al. (2010) [92], Singapore	<i>In vitro</i>	Thymoquinone	BTZ and TLD	U266 and RPMI 8226	Multiple myeloma
Sandur et al. (2010) [93], USA	<i>In vitro</i>	Plumbagin	BTZ and TLD	U266 and MM.1S	Multiple myeloma
Effenberger-Neidnicht and Schobert (2011) [94], Germany	<i>In vitro</i>	Thymoquinone	DOX	HL-60; 518A2; HT-29; KB-V1; MCF-7	Leukemia; melanoma; colon cancer; cervical cancer; breast cancer
Wang et al. (2014b) [95], China	<i>In vitro</i> and <i>in vivo</i>	Shikonin	GCT	PANC-1, BxPC-3 and AsPC-1	Pancreatic cancer
Daqian et al. (2015) [96], China	<i>In vitro</i>	Chimaphilin	DOX	U-2OS and U-2OSMR	Osteosarcoma
He et al. (2016) [97], China	<i>In vitro</i> and <i>in vivo</i>	Shikonin	CIP	HCT116, HT29 and SW620	Colon cancer
Song et al. (2016) [98], China	<i>In vitro</i> and <i>in vivo</i>	Shikonin	ATO	HepG2, Hep3B, Huh7	Hepatocellular carcinoma

Wang et al. (2017) [99], China	<i>In vitro</i>	Cryptotanshinone	PTX	CAL 27 and SCC 9	Tongue squamous cell carcinoma
<i>Saponins</i>					
Choi et al. (2003) [100], South Korea	<i>In vitro</i>	Protopanaxatriol	DOX	AML-2/D100 and AML-2/DX100	Acute myeloid leukemia
Kim et al. (2010) [101], South Korea	<i>In vitro</i>	Ginsenoside Rg3	DTX	LNCaP, PC-3 and DU145	Prostate cancer
Ming et al. (2010) [102], China	<i>In vitro</i>	β -aescin	5FU	SMMC-7721	Hepatocellular carcinoma
Wang et al. (2012b) [103], China	<i>In vitro</i> and <i>in vivo</i>	Escin	GCT	L6, BxPC-3, PANC-1, CFPAC-1 and SW-1990	Pancreatic cancer
Yang et al. (2012) [104], China	<i>In vivo</i>	Ginsenoside Rg3	PTX	MCF-7	Breast cancer
Wang et al. (2013b) [105], China	<i>In vitro</i> and <i>in vivo</i>	Steroidal saponin	DOX, 5FU, PTX and CIP	HepG2 and R-HepG2	Hepatocellular carcinoma
Chang et al. (2014) [106], China	<i>In vivo</i>	Ginsenoside Rg3	PTX + CIP	Eca-109	Esophageal carcinoma
Lee et al. (2014) [107], South Korea	<i>In vitro</i>	Ginsenoside Rg3	CIP	HTB5, J82, JON, UMUC14 and T24	Bladder cancer

Liu et al. (2017) [108], China	<i>In vitro</i>	Paris saponin I	CPT	H1299; H520; H460; H446	Lung adenocarcinoma; lung squamous cell carcinoma; lung large cell carcinoma
Yuan et al. (2017) [109], China	<i>In vitro</i> and <i>in vivo</i>	Ginsenoside Rg3	PTX	MDA-MB-231, MDA-MB-453 and BT-549	Breast cancer

Steroids

Lee et al. (2009) [110], South Korea	<i>In vitro</i>	Withaferin A	TRAIL	Caki, Huh7, SK-Hep1 and Hep3B	Renal cancer
Chen et al. (2010) [111], South Africa	<i>In vitro</i>	Cucurbitacin B	CIP	SRB1, SRB12, SCC13 and COLO160	Cutaneous squamous carcinoma
Iwanski et al. (2010) [112], USA	<i>In vivo</i>	Cucurbitacin B	GCT	PANC-1	Pancreatic cancer
Lee et al. (2011) [113], USA	<i>In vitro</i> and <i>in vivo</i>	Cucurbitacin B	MET	U2OS, G292, MG-63, HT-161, HOS, SAOS-2, and SJSA	Osteosarcoma
Cohen et al. (2012) [114], USA	<i>In vitro</i>	Withaferin A	SOF	BCPAP and SW1736	Thyroid cancer
Fong et al. (2012) [115], USA	<i>In vitro</i> and <i>in vivo</i>	Withaferin A	DOX	A2780, A2780/CP70 and CaOV3	Ovarian cancer

El-Senduny et al. (2015) [116], USA	<i>In vitro</i>	Cucurbitacin B	CIP	A2780 and A2780CP	Ovarian cancer
Li et al. (2015) [117], China	<i>In vitro</i> and <i>in vivo</i>	Withaferin A	OXP	PANC-1, MIAPaCa-2 and SW1990	Pancreatic cancer
Ben-Eltriki et al. (2016) [118], Canada	<i>In vitro</i>	20(S)-protopanaxadiol	CAL	LNCaP and C4-2	Prostate cancer

Terpenoids

Holland et al. (2006) [119], Australia	<i>In vitro</i>	Cannabidiol, Δ^9 -tetrahydrocannabinol	VBL	CCRF-CEM and CEM/VLB ₁₀₀	Acute T-lymphoblastoid leukemia
Sieber et al. (2009) [120], Germany	<i>In vitro</i>	Artesunate	RUX	Ramos	B-lymphoma
He et al. (2011) [121], China	<i>In vitro</i>	Lupeol	TRAIL	SMMC7721 and HepG2	Hepatocellular carcinoma
Kannaiyan et al. (2011) [122], Singapore	<i>In vitro</i>	Celastrol	TLD and BTZ	U266, RPMI 8226, RPMI-8226 and RPMI-8226-LR-5	Multiple myeloma
Torres et al. (2011) [123], Spain	<i>In vitro</i> and <i>in vivo</i>	Cannabidiol and Δ^9 -tetrahydrocannabinol	TMZ	U87MG (U87), A172, SW1783, U373MG (U373), T98G (T98), SW1088, and LN405	Glioma

Prasad et al. (2012) [124], USA	<i>In vivo</i>	Ursolic acid	CCT	HCT116, HT29, and Caco2	Colon cancer
Tong et al. (2012b) [125], China	<i>In vitro</i>	Pseudolaric acid B	ABT-737***	LNCaP, PC-3 and DU145	Prostate cancer
Wang et al. (2012c) [126], China	<i>In vitro</i>	Pristimerin	GCT	BxPC-3, PANC-1 and AsPC-1	Pancreatic cancer
Butturini et al. (2013) [127], Italy	<i>In vitro</i>	Cynaropicrin	CIP and DTX	THP-1	Monocytic leukemia
Liu et al. (2013) [128], China	<i>In vitro</i> and <i>in vivo</i>	Lupeol	S14161	HepG2 and SMMC7721	Hepatocellular carcinoma
Bamodu et al. (2015) [129], Taiwan	<i>In vitro</i>	Ovatodioidide	DOX	MDA-MB-231, HS578T and MCF-7	Breast cancer
Liu et al. (2016) [130], China	<i>In vitro</i> and <i>in vivo</i>	Lupeol	5FU	SGC7901 and BGC823	Gastric carcinoma
Reis et al. (2016) [131], Portugal	<i>In vitro</i>	Euphowelwitschines A and B, welwitschene, epoxywelwitschene and esulatin M	DOX	L5178Y	T-lymphoma

4-methylumbelliferone (4MU); 5-fluorouracil (5FU); adriamycin (ADM); amsacrine (AMS); actinomycin D (ACD); aphidicolin (APD); arsenic trioxide (ATO); *bis*-chloroethylnitrosourea (BCE); bortezomib (BTZ); calcitrol (CAL); camptothecin (CPT); capecitabine (CCT); carboplatin (CAP); cisplatin (CIP); cyclophosphamide (CPA); cycloheximide (CHM); cytarabine (CYT); docetaxel (DTX); doxorubicin (DOX); ellipticine (ELP); etoposide (ETP); 5FU + oxilaplatin (FOLFOX); gemcitabine (GCT); homoharringtonine (HHG); ifosfamide (IFO); IL-1 receptor antagonist (IL-Ra); L-asparaginase (LAP); methotrexate (MET); mimosine (MMS); nocodazole (NCD); oxaliplatin (OXP); paclitaxel (PTX); rapamycin

(RPM); rituximab (RUX); sorafenib (SOF); tamoxifen (TOF); taxane (TXN): DTX + PTX; temozolamide (TMZ); thalidomide (TLD); thymidine (TMD); TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand (TRAIL); vinblastine (VBL); vincristine (VCR); vorinostat (VOR). *3-Methylcholanthrene (3-MC)-induced tumorigenesis in Swiss albino mice. **LLC: mouse Lewis lung cancer cell line. ***ABT-737: Bcl-2 inhibitor.

Combinatorial therapy (natural compounds and conventional chemotherapeutic) were used in various types of cancer. Breast and colon cancer were the most cited (16 reports each), followed by leukemia and associate cancers, lung, pancreatic, prostate and cervical cancer. Concerning the conventional anticancer drugs mentioned, about 40 different chemotherapeutic agents have been reported in combination with one or more natural molecules, varying according to the type of cancer studied, as shown in Table 1. Similarly, a wide variety of natural compounds have been reported as chemosensitizer agents. Most of the molecules studied belong to the class of phenolic derivatives (28 reports, 26.9%) and flavonoids (18 reports, 17.3%). Besides these, terpenoids, alkaloids, saponins, quinones and steroids were also considerably cited. These and other important outcomes are graphically presented in figure 3.

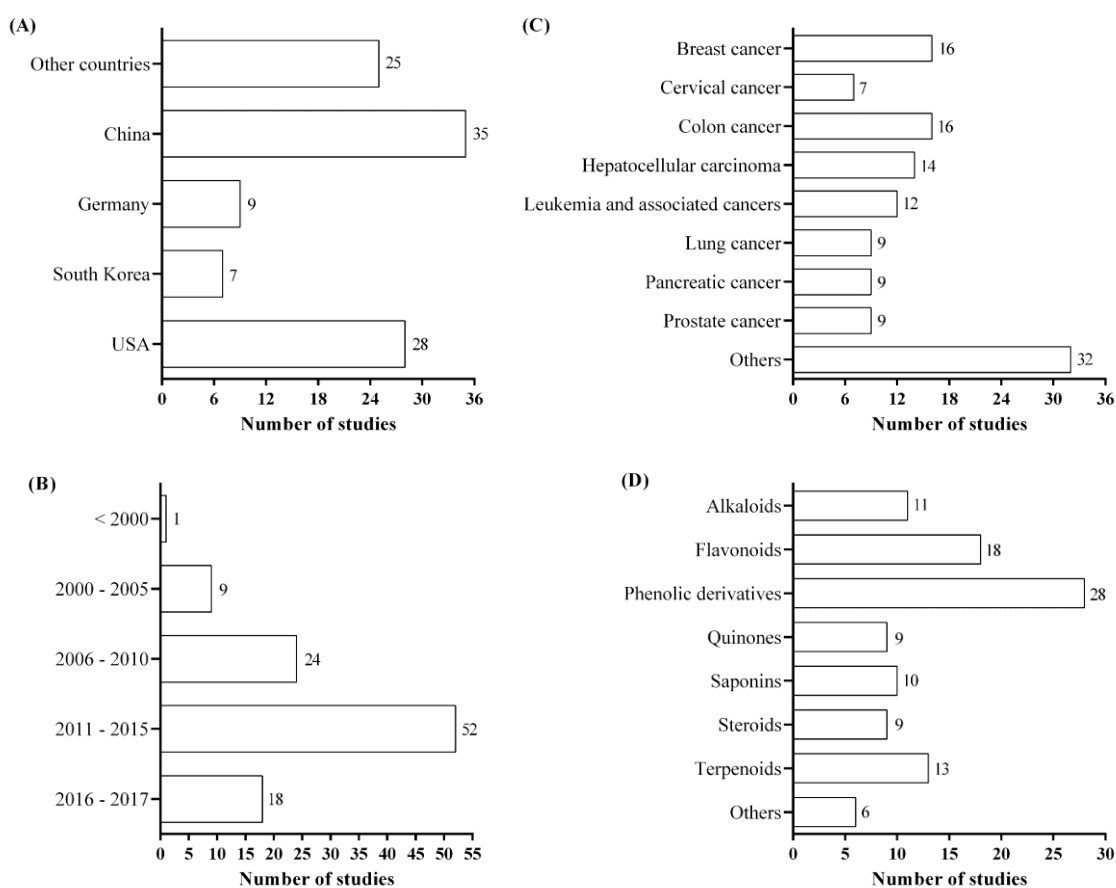


Figure 3. Distribution of the selected studies by country (A), year of publication (B), type of cancer studied (C) and chemical class of natural product evaluated as chemosensitizer (D).

Our systematic review consisted of 67 *in vitro* studies, 6 *in vivo* studies, and 31 reports presenting *in vitro* and *in vivo* outcomes. *In vitro* investigations included biochemical and molecular analysis, specially colorimetric and enzymatic assays, flow cytometry, western blot

and immunofluorescence techniques. *In vivo* reports were performed using allograft or xenograft model, as shown in Table 2. In general, natural compounds potentiated the antitumor effect of chemotherapeutics by reducing tumor volume and weight. In some cases, synergistic inhibition of metastasis and increased apoptosis index were also observed. Combinatorial treatments were performed on the same day or on alternate days for 1 to 4 weeks. The used chemotherapy drugs varied according to the type of cancer studied. All natural products tested *in vivo* were also assayed *in vitro*, providing relevant findings on molecular targets implicated in their pharmacological effect. The chemical structures of these compounds are shown in Figure 4.

Concerning to methodological quality, all *in vivo* studies were carefully analyzed through a standard checklist adapted for preclinical trials. As shown in Figure 5, all studies described the objectives, outcomes to be measured and main findings obtained. In general, combinatorial treatments (chemosensitizer and conventional chemotherapeutic, doses, routes of administration and frequency of treatment) were properly reported. Most of the studies (31 reports, 83.8%) have also reported randomization of animal allocation. On the other hand, none of the included articles reported sample size calculations. In addition, no information on blinding strategy was provided.

Table 2. *In vivo* studies involving natural compounds as chemosensitizer agents.

Chemosensitizer	Dose (route)	Combined drug	Dose (route)	Model (animal/sex)	Main outcomes (Cancer)	R	B	Reference
3,3'-diindolylmethane	5 mg/day (p.o.)	OXP	15 mg/kg (i.v.)	Xenograft (Mi/F)	Synergistic decrease in tumor weight and appearance of nodal metastasis (pancreatic cancer)	Y	N	Banerjee et al. (2009) [29]
Cucurbitacin B	0.5 or 1 mg/kg/day (i.p.)	GCT	25 mg/kg/day (i.p.)	Xenograft (Mi/F)	Synergistic decrease in tumor volume and weight, synergistic inhibition of metastasis (pancreatic cancer)	Y	N	Iwanski et al. (2010) [112]
	0.5 or 1 mg/kg (i.p.)	MET	50 or 150 mg/kg (i.p.)	Xenograft (Mi/F)	Synergistic decrease in tumor volume and weight (osteosarcoma)	Y	N	Lee et al. (2011) [113]
Curcumin	2% w/w/day (p.o.)	PTX	10 mg/kg/week (i.p.)	Xenograft (Mi/F)	Synergistic inhibition of breast cancer metastasis to the lung (breast cancer)	Y	N	Aggarwal et al. (2005) [67]
	1 g/kg/day (p.o.)	CCT	60 mg/kg/twice weekly (p.o.)	Xenograft (Mi/M)	Synergistic decrease in tumor volume, synergistic inhibition of metastasis (colon cancer)	Y	N	Kunnumakkara et al. (2009) [72]

Curcumin (liposomal formulation)	40 mg/kg/thrice weekly (i.v.)	OXP	5 mg/kg/thrice weekly (i.p.)	Xenograft (Mi/F)	Synergistic decrease in tumor volume, synergistic inhibition of angiogenesis (colon cancer)	Y	N	Li et al. (2007) [69]
	25 mg/kg/thrice weekly (i.p.)	PTX	10 mg/kg/twice weekly (i.p.)	Xenograft (Mi/F)	Synergistic decrease in tumor volume, improvement of apoptosis (cervical cancer)	Y	N	Sreekanth et al. (2011) [76]
Epigallocatechin-3-gallate	228 mg/kg/week (i.p.)	DTX + PTX	5 or 12.5 + 15 mg/kg/week (i.p.)	Xenograft (Mi/NR)	Synergistic decrease in tumor volume (prostate cancer)	Y	N	Stearns and Wang (2011) [51]
	1.5 mg/day (i.p.)	CCT	200 mg/kg/day (p.o.)	Xenograft (Mi/F)	Synergistic decrease in tumor volume and inhibition of microvessel formation (gastric cancer)	Y	N	Wu et al. (2012) [53]
Escin	2 mg/kg/day (i.p.)	GCT	100 mg/kg/twice weekly (i.p.)	Xenograft (Mi/M)	Synergistic decrease in tumor volume, improvement of apoptosis (pancreatic cancer)	Y	N	Wang et al. (2012b) [103]
Genistein	1.3 mg/kg/day (i.p.)	5FU	60 mg/kg/day (i.p.)	Xenograft (Mi/F)	Synergistic decrease in tumor volume, improvement of apoptosis (pancreatic cancer)	Y	N	Suzuki et al. (2014) [55]

Ginsenoside Rg3	6 mg/kg/day (p.o.)	PTX + CIP	10 + 5 mg/kg/day (i.p.)	Xenograft (Mi/F)	Synergistic decrease in tumor volume and weight (esophageal carcinoma)	Y	N	Chang et al. (2014) [106]
	10 mg/kg/day (p.o.)	PTX	20 mg/kg/day (p.o.)	Xenograft (Mi/F)	Synergistic decrease in tumor volume (breast cancer)	Y	N	Yang et al. (2012) [104]
	6 mg/kg/day (p.o.)	PTX	10 mg/kg/week (i.p.)	Xenograft (Mi/NR)	Synergistic decrease in tumor volume and weight, improvement of apoptosis (breast cancer)	Y	N	Yuan et al. (2017) [109]
Isoxanthohumol	20 mg/kg/day (NR)	PTX	3 mg/kg (NR)	Allograft (Mi/NR)	Synergistic decrease in tumor volume (melanoma)	Y	N	Krajnovic et al. (2016) [60]
Lupeol	20 mg/kg/thrice weekly (i.p.)	S14161	20 mg/kg/day (i.p.)	Xenograft (Mi/F)	Synergistic decrease in tumor volume (hepatocellular carcinoma)	Y	N	Liu et al. (2013) [128]
	30 mg/kg/day (i.p.)	5FU	10 mg/kg/day (i.p.)	Xenograft (Mi/NR)	Synergistic decrease in tumor volume and weight, improvement of apoptosis (gastric cancer)	N	N	Liu et al. (2016) [130]
Myricetin	25 mg/kg	5FU	20 mg/kg	Xenograft (Mi/NR)	Synergistic decrease in tumor volume (esophageal carcinoma)	N	N	Wang et al. (2014a) [56]

Naringenin	50 mg/kg/day (p.o.)	DOX	5 mg/kg/week (p.o.)	Allograft (Mi/F)	Synergistic decrease in tumor volume (lung cancer)	N	N	Zhang et al. (2009) [49]
Noscapine	300 mg/kg/day (p.o.)	GCT	30 mg/kg (i.v.)	Xenograft (Mi/F)	Synergistic decrease in tumor volume and inhibition of angiogenesis in tumor tissue (lung cancer)	Y	N	Chougule et al. (2011) [31]
	200 mg/kg/day (i.g.)	TMZ or CIP	2 mg/kg/day (i.p.)	Xenograft (Mi/F)	Synergistic decrease in tumor volume and weight (glioblastoma)	Y	N	Qi et al. (2013) [33]
Oxymatrine	40 mg/kg/day (i.p.)	5FU	10 mg/kg/day (i.p.)	Xenograft (Mi/NR)	Synergistic decrease in tumor volume and weight (hepatocellular carcinoma)	N	N	Liu et al. (2015a) [36]
	1, 2 or 4 g/l/thrice weekly (i.p.)	NM-3	10 mg/kg/thrice weekly (i.p.)	Xenograft (Mi/NR)	Synergistic decrease in tumor volume (gastric cancer)	Y	N	Song et al. (2007) [28]
Resveratrol	40 mg/kg/day (p.o.)	GCT	25 mg/kg/twice weekly (i.p.)	Xenograft (Mi/M)	Synergistic decrease in tumor volume (pancreatic cancer)	Y	N	Harikumar et al. (2009) [71]
	5, 10 and 15 mg/kg/day	5FU	5, 10 and 20 mg/kg	Allograft (Mi/NR)	Synergistic decrease in tumor area (hepatocellular carcinoma)	Y	N	Wu et al. (2004) [66]

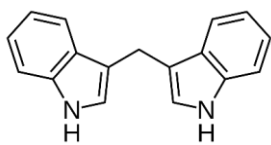
Shikonin	4 mg/kg/day (i.p.)	CIP	10 mg/kg/day (i.p.)	Xenograft (Mi/F)	Synergistic decrease in tumor volume and weight (colon cancer)	N	N	He et al. (2016) [97]
	3 mg/kg/day (i.p.)	ATO	10 mg/kg/day (i.p.)	Xenograft (Mi/NR)	Synergistic decrease in tumor volume and weight (hepatocellular carcinoma)	Y	N	Song et al. (2016) [98]
	2 mg/kg/day (i.p.)	GCT	100 mg/kg/twice weekly (i.p.)	Xenograft (Mi/M)	Synergistic decrease in tumor volume, synergistic inhibition of microvessel formation and induction of apoptosis (pancreatic cancer)	Y	N	Wang et al. (2014b) [95]
Sinomenine	25 mg/kg/twice weekly (i.t.)	5FU	12 mg/kg/twice weekly (i.t.)	Xenograft (Mi/M)	Synergistic decrease in tumor volume and weight (esophageal carcinoma)	Y	N	Wang et al. (2013a) [34]
Steroidal saponin	5, 10 or 15 mg/kg/day (i.v.)	DOX	8 mg/kg/day (i.v.)	Xenograft (Mi/NR)	Synergistic decrease in tumor volume (hepatocellular carcinoma)	N	N	Wang et al. (2013b) [105]
Thymoquinone	5 or 20 mg/kg/day (s.c.)	CIP	2.5 mg/kg/week (i.p.)	Xenograft (Mi/F)	Synergistic decrease in tumor volume (lung cancer)	Y	N	Jafri et al. (2010) [91]
Ursolic acid	250 mg/kg/day (p.o.)	CCT	60 mg/kg/twice weekly (p.o.)	Xenograft (Mi/M)	Synergistic decrease in tumor volume and weight,	Y	N	Prasad et al. (2012) [124]

					synergistic inhibition of metastasis (colon cancer)			
Withaferin A	2 mg/kg/day (i.p.)	DOX	1 mg/kg/day (i.p.)	Xenograft (Mi/NR)	Synergistic decrease in tumor volume and weight, synergistic inhibition of microvessel formation and induction of autophagy (ovarian cancer)	Y	N	Fong et al. (2012) [115]
	3 mg/kg/day (i.p.)	OXP	10 mg/kg/twice weekly (i.p.)	Xenograft (Mi/M)	Synergistic decrease in tumor volume and weight, synergistic induction of apoptosis (pancreatic cancer)	Y	N	Li et al. (2015) [117]
α -carotene	5 mg/kg/day (p.o.)	PTX	6 mg/kg/day (i.p.)	Xenograft (Mi/M)	Synergistic decrease in lung metastasis (lung cancer)	Y	N	Liu et al. (2015b) [40]
β -carotene	5 mg/kg/thrice weekly (i.g.)	5FU	5 mg/kg/thrice weekly (i.p.)	Xenograft (Mi/M)	Synergistic decrease in tumor volume and weight, improvement of apoptosis (esophageal carcinoma)	Y	N	Zhang et al. (2016) [41]
Δ^9 -Tetrahydrocannabinol	15 mg/kg (i.t.)	TMZ	5 mg/kg (i.t.)	Xenograft (Mi/NR)	Synergistic decrease in tumor volume and weight (glioma)	Y	N	Torres et al. (2011) [123]

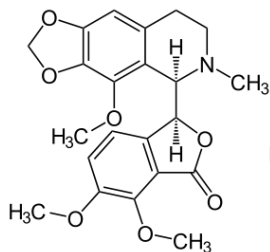
Combined drugs: 5-fluorouracil (5FU); arsenic trioxide (ATO); capecitabine (CCT); cisplatin (CIP); docetaxel (DTX); doxorubicin (DOX); gemcitabine (GCT); methotrexate (MET); oxaliplatin (OXP); paclitaxel (PTX); temozolamide (TMZ). Routes: i.g. (intra-gastric), i.t. (intratumoral),

i.p. (intraperitoneal), i.v. (intravenous), p.o. (per oral), s.c. (subcutaneous). F: female. M: male. NR: not reported. Mi: mice. R: reporting of randomization. B: reporting of blinding.

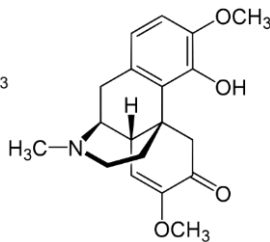
Alkaloids



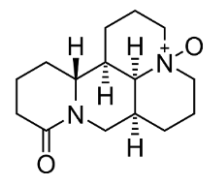
3,3'-diindolylmethane



Noscapine

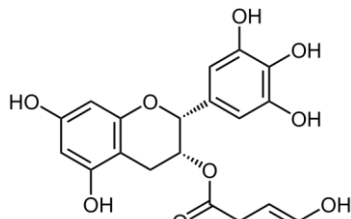


Sinomenine

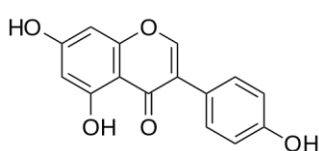


Oxymatrine

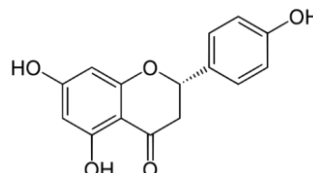
Flavonoids and phenolic derivatives



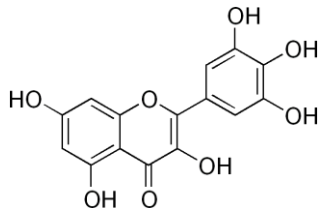
Epigallocatechin-3-gallate



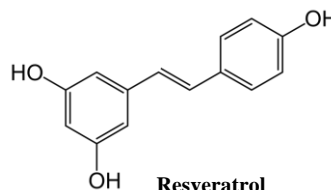
Genistein



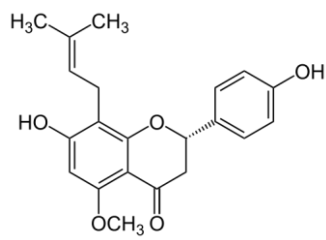
Naringenin



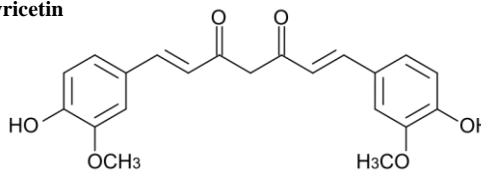
Myricetin



Resveratrol

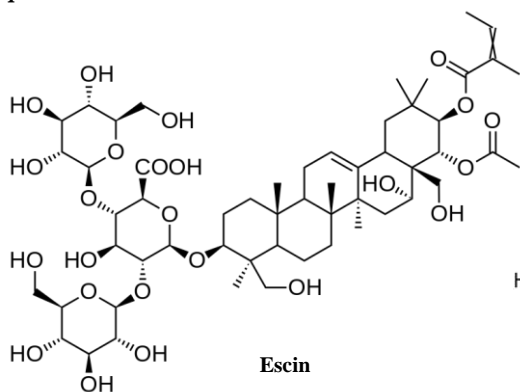


Isoxanthohumol

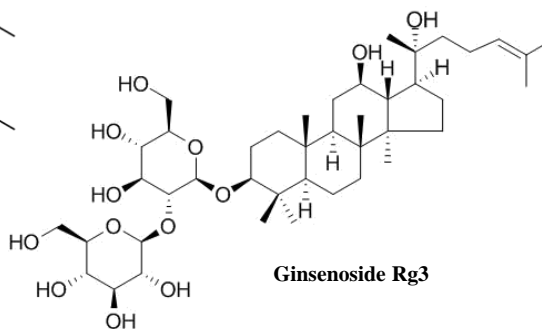


Curcumin

Saponins



Escin



Ginsenoside Rg3

(continued on next page)

(continued)

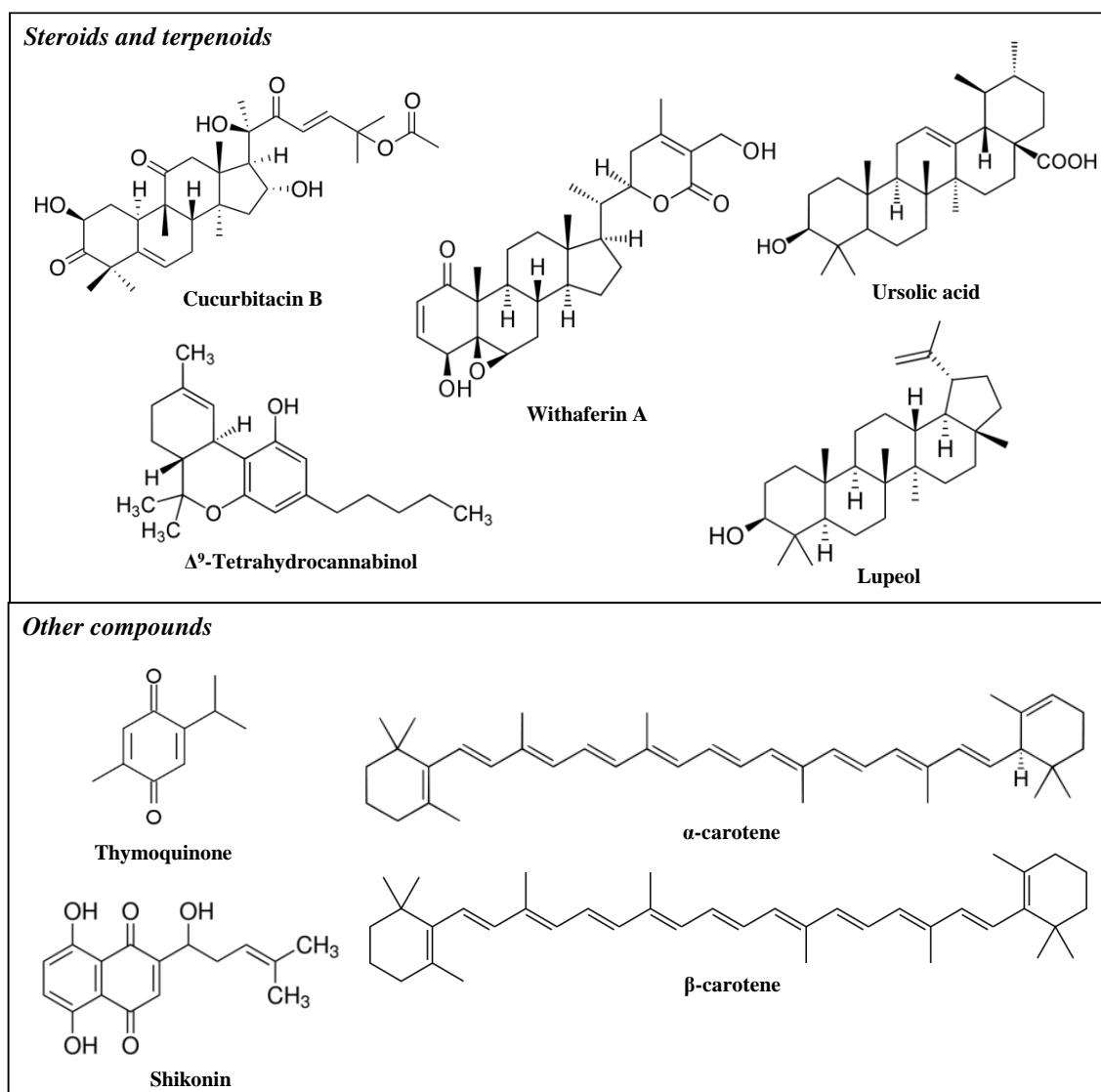


Figure 4. Chemical structure of the major natural compounds evaluated as chemosensitizer agents (*in vitro* and *in vivo* evidences).

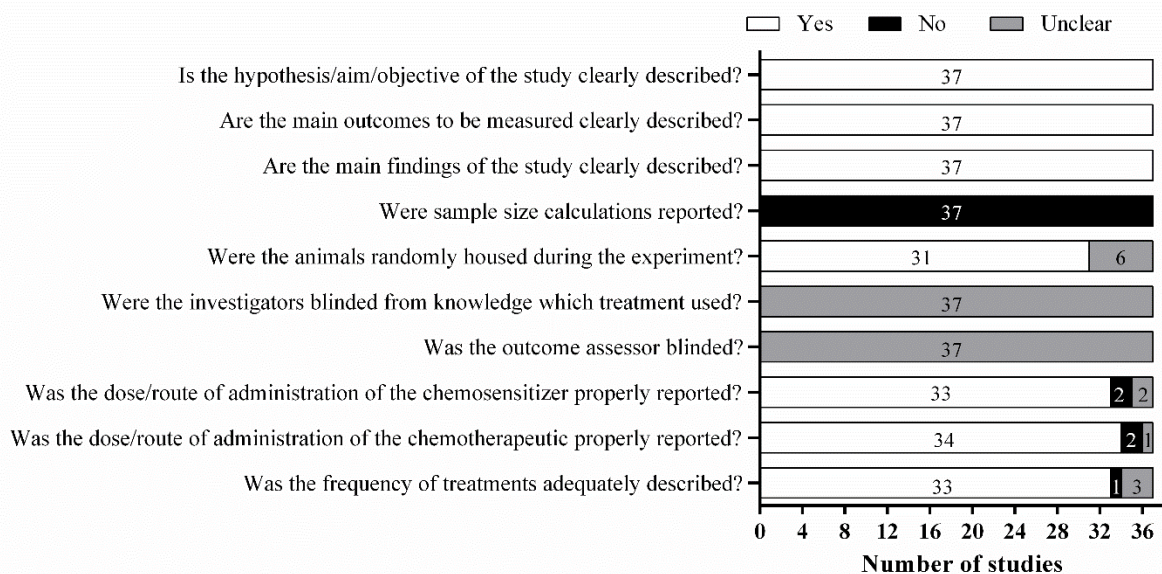


Figure 5. Methodological quality assessment of included *in vivo* studies. *Light bars* indicate the proportion of articles that met each criterion; *dark bars* indicate the proportion of studies that did not and *white gray bars* indicate the proportion of studies with unclear or insufficient answers.

4. Discussion

Cancer therapy is based on the use of one or more treatment strategies, including surgical removal of the tumor, radiotherapy, immunotherapy, phototherapy and chemotherapy. Although chemotherapy is recognized as one of the most effective strategies in the treatment of various types of cancer, the phenomenon of chemoresistance has become increasingly frequent, representing an obstacle to the use of anticancer drugs [132]. Tumor cells may develop a multidrug-resistant phenotype depending on the carcinogenic process *per se*, or even due to exposure to conventional chemotherapeutics [133]. In this sense, chemosensitization represents an alternative for overcoming chemoresistance. It consists in the use of molecules capable of improving the activity of another through the modulation of one or more mechanisms of resistance (Figure 1).

Historically, natural products have been shown to be more effective than conventional anticancer drugs because of their multi-target potential and low toxicity. Such compounds are already widely known as promising anti-tumor and chemopreventive agents. Fortunately, several research groups have also investigated the role of natural products in sensitizing tumor cells. In this systematic review, most of the included studies were published after 2011 (Figure 3), indicating that the use of natural compounds as chemosensitizer agents is still recent.

Interestingly, China has been the country that most explores the use of natural products as chemosensitizers (Figure 3). In fact, Traditional Chinese Medicine (TCM) has contributed to the development of new pharmaceutical products based on plant extracts or even molecules with unique chemical structures and innovative mechanisms of action [134]. In cancer therapy, TCM has provided molecules with antitumor and chemopreventive properties [135] and, more recently, chemosensitizing potential. Shikonin, a natural naphthoquinone derived from the Chinese medicinal herb *Lithospermum erythrorhizon*, showed synergistic effect with gemcitabine, cisplatin and arsenic trioxide against pancreatic [95], colon [97] and hepatocellular [98] cancer, respectively. Song et al. [28] and Liu et al. [36] have also demonstrated the chemosensitizing effect of oxymatrine, one of the major components extracted from *Sophora flavescens*, widely used in TCM. In addition, several phenolic derivatives and flavonoids commonly found in Chinese medicinal plants were investigated as chemosensitizers, including resveratrol [65], curcumin [64], naringenin [49] and myricetin [56].

Concerning to *in vivo* studies included, natural products were investigated using xenograft model. In this model, human tumor cells are transplanted via subcutaneous inoculation or into the organ type in which the tumor originated, into immunocompromised animals that do not reject human cells [136]. Xenograft models have been used not only to determine the *in vivo* activity of new anticancer drugs, but also to determine drug dose, treatment schedules and routes of administration [137]. In this context, *in vivo* reports included in this review were appropriately described. In addition to *in vitro* protocols, these models offer a wealth of information on the mechanisms of action involved in the chemosensitizing effect of natural products.

However, animal experiments should be well designed, efficiently executed and data must to be correctly analyzed and interpreted [138]. Regarding the methodological quality assessment, we found that most of studies were conducted randomly, but no information on blinding was provided (Figure 5). In addition, no study reported sample size calculations. Although these parameters are often required in clinical trials, the need of randomization and blinding have been strongly recommended for preclinical protocols in order to minimize the risk of bias and avoid unexpected outcomes in clinical trials [139-141]. For this reason, we consider that the *in vivo* studies included in this review presented moderate methodological quality.

In general, phenolic derivatives and flavonoids were the most cited compounds (Figure 3). Curcumin, resveratrol and epigallocatechin-3-gallate have been extensively evaluated in combinatorial treatment with clinically used chemotherapeutics. These compounds are widely

found in various medicinal plants and foods, such as red wine, fruits, vegetables and spices. The use of these molecules has been increasingly encouraged in cancer treatment mainly because of their low toxicity and immediate availability. Besides, phenolic compounds possess a strong antitumor activity by modulating different pathways involved in cell proliferation, invasion, metastasis and angiogenesis [19-22]. Usually, when cancer cells were treated by natural products in combination with chemotherapeutic drugs, there was an additive cytotoxic effect caused by the activation of alternative signaling pathways that induce cell death, or even by increasing the residence time of the anticancer drug in the cell, improving its performance.

Next, we selected the natural compounds most cited in this review in order to better understand the different mechanisms of action involved in the sensitization of tumor cells. All findings described below were extracted from *in vitro* and *in vivo* included studies.

4.1. Curcumin

Curcumin (diferuloyl methane) is a naturally occurring phenolic pigment found in rhizomes of *Curcuma longa* Linn., commonly known as turmeric. Usually, curcumin content in turmeric varies from 1 to 5% and it is widely used in foods, as a cosmetic ingredient, and in some medicinal preparations [142]. It has potent anti-inflammatory, anticancer and chemopreventive properties, but without exhibiting toxic effects in animal models even at high doses [143-145]. Curcumin has demonstrated multiple anticancer effects, including inhibition of cell proliferation, induction of apoptosis, inhibition of angiogenesis and metastasis. Several mechanisms have been implicated in these effects, such as activation of pro-apoptotic proteins and inhibition of nuclear factor κ B (NF- κ B) and phosphatidylinositol (PI)3-kinase/Akt (PI3K/Akt) pathways, commonly activated in multiresistant tumor cells [20]. In figure 6, we show the main mechanisms involved in the chemosensitizing effect of curcumin.

In contrast to healthy cells, NF- κ B pathway is constitutively active in the majority of solid and hematopoietic tumor cell lines. Additionally, chemotherapeutic agents and pro-inflammatory cytokines also activate NF- κ B over time, contributing to chemoresistance of tumor cells. NF- κ B is a tumorigenic transcription factor associated with evasion of apoptosis, sustained cell proliferation, invasion, metastasis and angiogenesis. It is a complex protein composed of different subunits (p50, p52, p65, RelB and c-Rel), mainly p50/p65. Under normal conditions, NF- κ B is retained in the cytoplasm by its interaction with inhibitors of κ B (I κ B α , I κ B β or I κ B ϵ). However, I κ B kinases (IKKs) are able to phosphorylate I κ B portion, resulting in its subsequent ubiquitination and proteasome-mediated degradation, and consequently in the release of NF- κ B, which then translocates to the nucleus [74, 146]. In this review, we have

identified that curcumin down-regulates NF- κ B activation induced by chemotherapeutic agents, such as paclitaxel [67,68,75], 5-fluorouracil [82] and capecitabine [72] in cervical, breast and colon cancer. Western blot and immunohistochemical analysis showed that curcumin inhibits NF- κ B (p65 subunit), I κ B α / β phosphorylation and IKK activation, resulting in synergistic antitumor effect when combined with conventional chemotherapeutic agents [64,87].

NF- κ B can also be stimulated via the PI3K/Akt signaling pathway. Initially, exposure to cellular survival factors (growth factors, cytokines, etc.) hyperactivates PI3K, leading to high Akt activation, conferring cell survival and resistance to chemotherapy-induced apoptosis. In fact, Akt protects apoptosis by stimulating anti-apoptotic proteins (e.g. survivin) and inhibiting pro-apoptotic signals (e.g. BAD). Furthermore, Akt induces the release of NF- κ B through activation of IKK [79, 147]. Once available, NF- κ B upregulates the expression of multiple MDR genes in tumor cells that play a role in apoptosis, cell proliferation, invasion, metastasis and angiogenesis [72]. In this sense, pharmacological investigations have demonstrated that curcumin potentiates anticancer effects of chemotherapeutics not only by inhibiting PI3K, Akt and NF- κ B factors [68,75,79,82], but also the proteins expressed by the activation of these signaling pathways, including those involved in cell proliferation (e.g. Cyclin D1, COX-2, c-Myc), invasion (e.g. MMP-9), metastasis (e.g. CXCR4 and ICAM-1) and angiogenesis (e.g. VEGF) [72,79,87]. Finally, curcumin also acts synergistically with chemotherapeutics in the induction of apoptosis through stimulation of pro-apoptotic (e.g. BAD, BID, BIM, BAX, caspases 3, 8 and 9) proteins and inhibition of anti-apoptotic proteins (e.g. Bcl-2, Bcl-xL and survivin) [72,75,84].

MDRs may also involve efflux pumps that reduce the residence time of chemotherapeutic drugs in cancer cells. Anuchapreeda et al. [63] have investigated the role of curcumin in P-glycoprotein (Pgp) expression. Pgp, also known as multidrug resistance protein, is an important transmembrane protein that pumps many foreign drugs out of cells. Many synthetic Pgp modulators successfully reverse the MDR phenotype *in vitro*. On the other hand, the use of these compounds has been discouraged due to their toxicity profile observed in animal models and clinical trials. In this review, Pgp expression was found to be decreased by 11, 31, 60 and 64% in response to 1, 2, 3 and 4 days of treatment with 25 μ M curcumin, respectively, enhancing sensitivity of KB-V1 cells (cervical cancer) to vinblastine [63]. Since curcumin is considered a safe natural product, it has served as a prototype for obtaining new Pgp-modulating drugs [89].

pancreas, colon, lung and stomach [80, 150]. In recent years, resveratrol has been evaluated not only as a chemopreventive or chemotherapeutic agent, but also as a chemosensitizer. In our review, *in vitro* and *in vivo* evidences demonstrated that resveratrol potentiates the antitumor effect of several chemotherapeutics, mainly doxorubicin [65,77,81], 5-Fluorouracil [65,66,85], etoposide [80] and gemcitabine [71].

Similar to curcumin, resveratrol sensitizes tumor cells by inhibiting the NF- κ B signaling pathway [85], as shown in figure 7. In addition, this phenolic derivative modulates the expression of MDR genes by down-regulating targets related to cell proliferation (e.g. cyclin D1, COX-2 and c-Myc), invasion (e.g. MMP-9), metastasis (e.g. CXCR4 and ICAM-1) and angiogenesis (e.g. VEGF) [71,85]. Resveratrol also enhances the cytotoxicity of chemotherapeutics through the induction of apoptosis by regulating the expression of pro (e.g. p53, caspases 3 and 8) and anti-apoptotic (e.g. Bcl-2, Bcl-xL, XIAP and survivin) mediators in tumor cells [65,71,80,85].

Díaz-Chávez et al. [81] showed that resveratrol sensitizes breast cancer cells to doxorubicin therapy by inhibiting HSP27 expression. HSP27 is present in several cell types, located mainly in the cytosol, but also in the perinuclear region, endoplasmic reticulum and nucleus. It is usually overexpressed during different stages of cell development and differentiation. High HSP27 expression has been observed in several types of cancer, suggesting that it plays an important role in cell proliferation, metastasis and chemoresistance. HSP27 acts as an independent ATP chaperone by inhibiting protein aggregation and stabilizing partially denatured proteins. In apoptosis, it interacts with mitochondrial membranes, interfering with the activation of the cytochrome-c/Apaf-1 complex and consequently preventing the activation of pro-caspase 9 [151].

Interestingly, resveratrol also enhances the efficacy of chemotherapeutics not only by interfering with intracellular signaling pathways, but also by modulating the expression of transmembrane proteins involved in cell proliferation and cytoskeleton stabilization. Buhrmann et al. [85] showed that resveratrol induces chemosensitization of colon cancer cells to 5-fluorouracil through up-regulation of intercellular junctions, epithelial-to-mesenchymal transition and apoptosis. In this investigation, resveratrol increased the expression of adhesion molecules, such as E-cadherin and claudin-2 (also involved in tight junctions), ensuring greater cell adhesion and consequently preventing mechanisms of cell proliferation. Furthermore, resveratrol significantly attenuated drug resistance by inhibiting epithelial-mesenchymal transition factors, such as vimentin. This protein is attached to the nucleus, endoplasmic reticulum and mitochondria, laterally or terminally. The vimentin filaments are associated with

the nuclear and plasma membranes, maintaining the position of the nucleus and the mitotic spindle and guaranteeing flexibility to the cell. It is a component of the cytoskeleton that interacts closely with microtubules, ensuring their stabilization [152]. Once inhibited by resveratrol, vimentin disperses in aggregates, causing loss of cytoplasmic integrity and changes in cellular morphology (Figure 7).

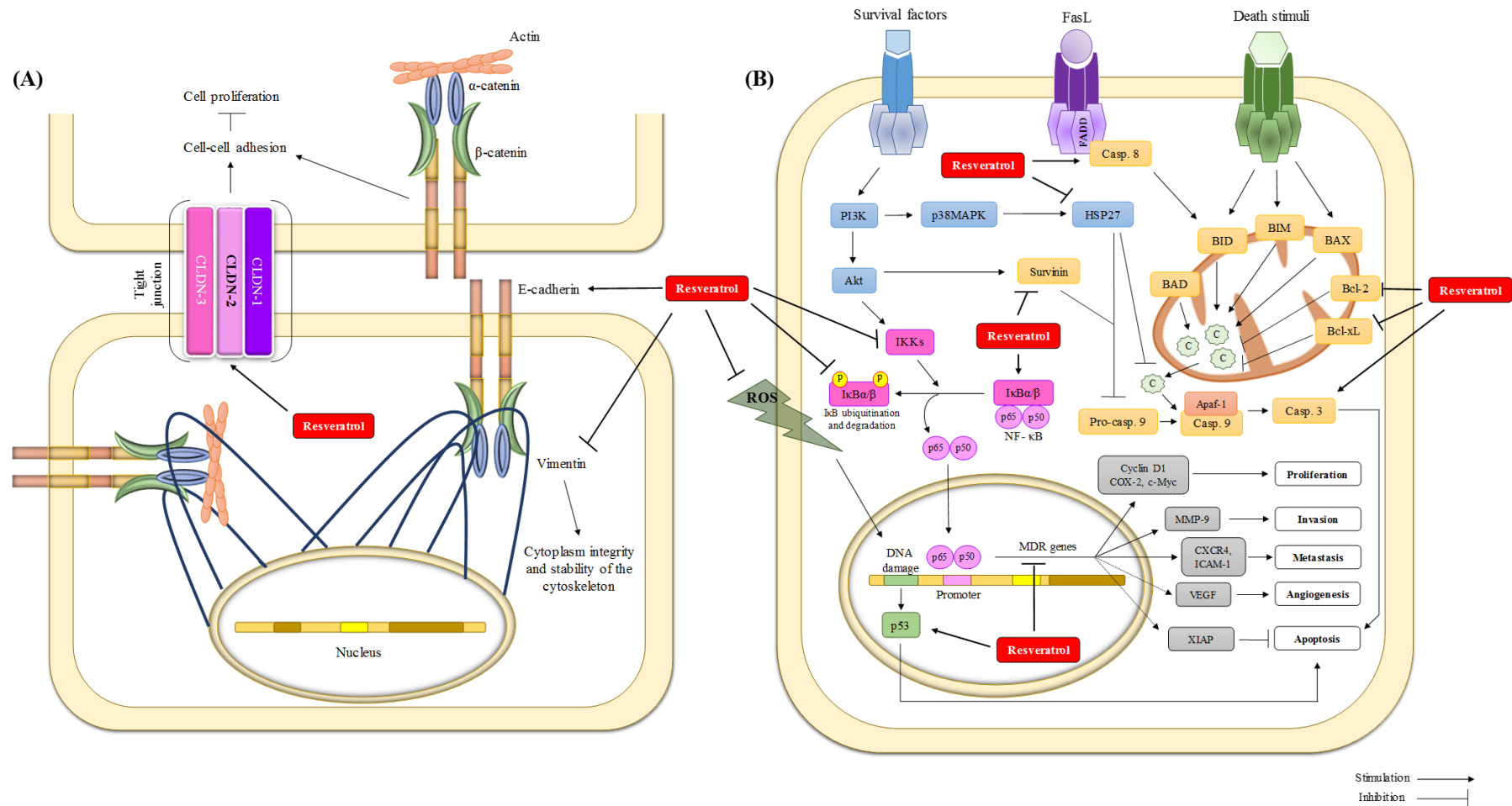


Figure 7. Molecular mechanisms of resveratrol-mediated chemosensitization. Resveratrol interferes in the expression of adhesion molecules and in the stability of the cell cycle (A), and modulates signaling pathways involved in apoptosis, cell proliferation, invasion, metastasis and angiogenesis (B).

4.3. Epigallocatechin-3-gallate

Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) is a major flavonoid found in green tea (*Camelia sinensis*) that possesses a broad spectrum of pharmacological activities, including antiangiogenic [153], anticarcinogenic [154], antimetastatic [155,156] and chemopreventive effects [157]. These properties are attributed to its antioxidant potential, cell signaling modulation, apoptosis induction, cell cycle arrest and inhibition of different MMPs (matrix metalloproteinases). In recent years, EGCG has been shown to be effective in sensitizing tumor cells to conventional chemotherapy. In fact, EGCG potentiates the antitumor effect of TRAIL (TNF α -related apoptosis-inducing ligand) [47], 4-MU (4-methylumbelliferone) [59], taxane [51], IL-1Ra (IL-1 receptor antagonist) [52], capecitabine [53], vorinostat [54], cisplatin [48], tamoxifen [45,48], docetaxel [58] and doxorubicin [43] in various types of cancer, mainly breast [45,59] and prostate cancer [47,51,58].

In vitro and *in vivo* assays have demonstrated that EGCG enhances the antitumor effect of other drugs by inducing apoptosis. In general, EGCG up-regulates apoptotic proteins (e.g. BAD, BAK, BAX, caspases 3, 6, 7, 8 and 9) and down-regulates anti-apoptotic factors (e.g. Bcl-2, Bcl-xL, XIAP, CIAP-1, survivin and Smac/Diablo) [47, 54, 58]. EGCG also induces the expression of genes that are directly associated with cell cycle arrest and apoptosis, such as p53, p73 and p21 [51].

Several studies have demonstrated that EGCG synergistically inhibits biomarkers associated with angiogenesis (e.g. VEGF, angiopoietin 1 and 2), invasion and metastasis (MMP-2, 3, and 9) [47, 52-54], improving the performance of chemotherapy in reducing tumor weight and/or volume in xenograft models [53]. Although inhibition of the NF- κ B pathway does not appear to be directly involved in the mechanism of EGCG-induced tumor cell sensitization, this flavonoid inhibits the Akt pathway, indirectly resulting in lower expression of factors associated with cell proliferation, invasion, metastasis, angiogenesis, and apoptosis. In addition, Wang et al. [58] showed that EGCG combined with quercetin inhibits STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3) expression, contributing to sensitization of prostate cancer cells to docetaxel. In the same study, the authors also demonstrated the potential of these flavonoids to block MRP1 (multidrug resistance-associated protein 1), increasing the residence time of docetaxel in tumor cells. All mechanisms involved in the sensitization of tumor cells by EGCG are summarized in figure 8.

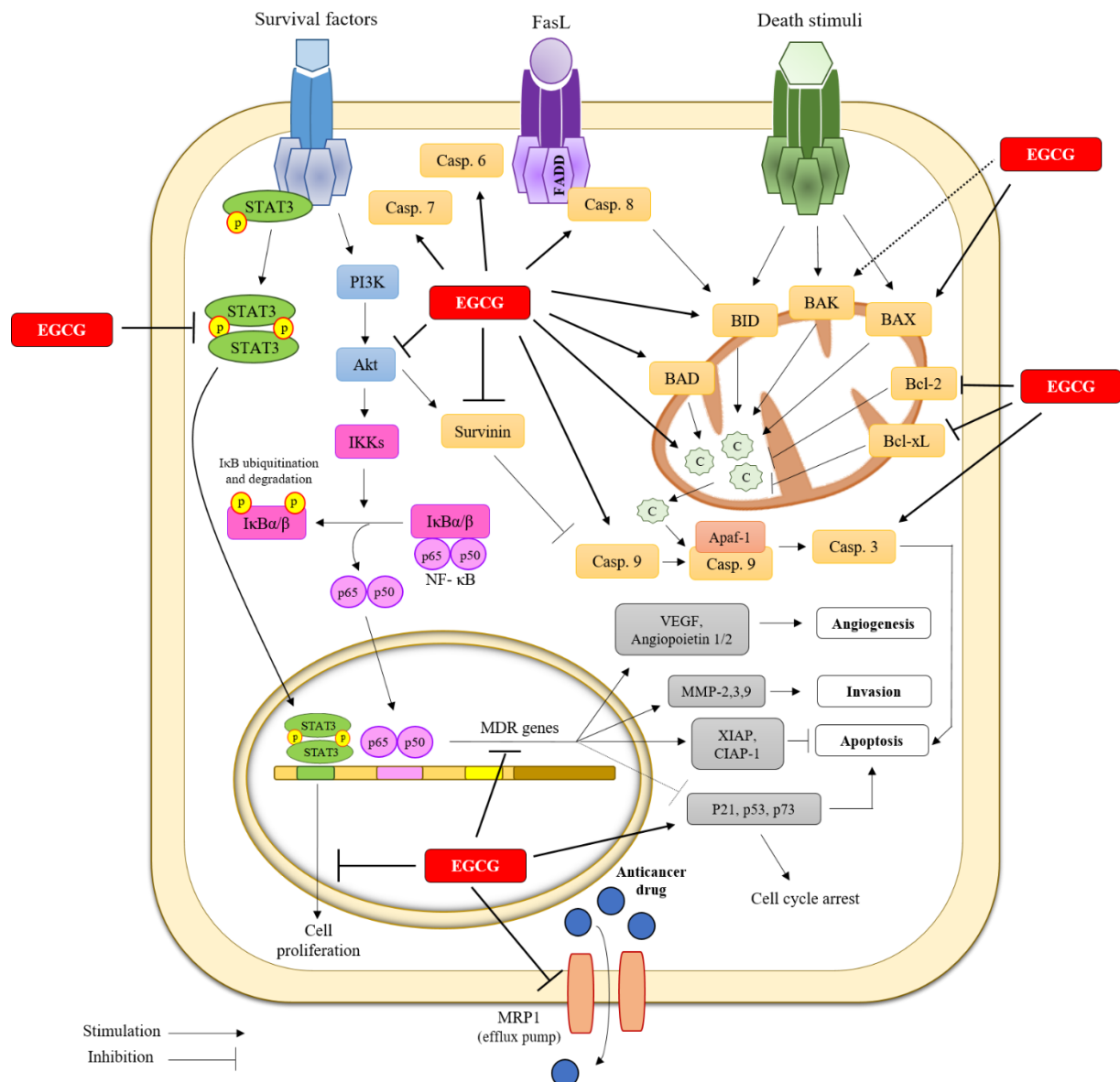


Figure 8. Molecular mechanisms of epigallocatechin-3-gallate (EGCG)-mediated chemosensitization. EGCG modulates signaling pathways involved in apoptosis, cell proliferation, invasion, metastasis and angiogenesis.

5. Conclusion

This systematic review unified information from the literature on the use of natural compounds as chemosensitizers in cancer therapy. *In vitro* and *in vivo* studies demonstrated that natural products act synergistically with drugs traditionally used in cancer therapy, enhancing their antitumor efficacy through various mechanisms, including induction of apoptosis and inhibition of cell proliferation, invasion, metastasis, and angiogenesis. Although the *in vivo* tests presented moderate methodological quality, this report highlights the potential of natural products as anticancer drug candidates in future clinical research for combinatorial

treatments. Considering that chemosensitization of cancer cells by natural products is a recent strategy and that only few resources have been explored at the moment, this research field should be expanding rapidly in the coming years and provide efficient alternatives to manage tumor chemoresistance.

References

- [1] J.S. You, P.A. Jones, Cancer Genetics and Epigenetics: Two Sides of the Same Coin? *Cancer Cell*. 22 (2012) 9–20. doi: 10.1016/j.ccr.2012.06.008.
- [2] T.J. Harris, F. McCormick, The molecular pathology of cancer, *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 7 (2010) 251–265. doi: 10.1038/nrclinonc.2010.41.
- [3] D. Hanahan, R.A. Weinberg, Hallmarks of cancer: the next generation, *Cell*. 144 (2011) 646–674. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
- [4] J.W. Shay, W.E. Wright, Role of telomeres and telomerase in cancer, *Semin. Cancer Biol.* 21 (2011) 349–353. doi: 10.1016/j.semcancer.2011.10.001.
- [5] M. Hassan, H. Watari, A. AbuAlmaaty, et al., Apoptosis and Molecular Targeting Therapy in Cancer, *Biomed. Res. Int.* 2014 (2014) 150845. doi: 10.1155/2014/150845.
- [6] Y.A. Fouad, C. Aanei, Revisiting the hallmarks of cancer, *Am. J. Cancer Res.* 7 (2017) 1016–1036.
- [7] R.S.Y. Wong, Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment, *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 30 (2011) 87. doi: 10.1186/1756-9966-30-87.
- [8] L. Zitvogel, L. Galluzzi, M.J. Smyth, et al., Mechanism of action of conventional and targeted anticancer therapies: reinstating immunosurveillance, *Immunity*. 39 (2013) 74–88. doi: 10.1016/j.immuni.2013.06.014.
- [9] T. Otto, P. Sicinski, Cell cycle proteins as promising targets in cancer therapy, *Nat. Rev. Cancer*. 17 (2017) 93–115. doi: 10.1038/nrc.2016.138.
- [10] L. Galluzzi, O. Kepp, M.G.V. Heiden, et al., Metabolic targets for cancer therapy, *Nat. Rev. Drug Discov.* 12 (2013) 829–846. doi: 10.1038/nrd4145.
- [11] G. Housman, S. Byler, S. Heerboth, et al., Drug resistance in cancer: an overview, *Cancers (Basel)*. 6 (2014) 1769–1792. doi: 10.3390/cancers6031769.
- [12] I.A. Cree, P. Charlton, Molecular chess? Hallmarks of anti-cancer drug resistance, *BMC Cancer*. 17 (2017) 10. doi: 10.1186/s12885-016-2999-1
- [13] C. Holohan, S. Van Schaeybroeck, D.B. Longley, et al., Cancer drug resistance: an evolving paradigm, *Nat. Rev. Cancer*. 13 (2013) 714–726. doi: 10.1038/nrc3599.

- [14] S. Shukla, A. Mehta, Anticancer potential of medicinal plants and their phytochemicals: a review, *Braz. J. Bot.* 38 (2015) 199–210. doi: 10.1007/s40415-015-0135-0
- [15] V. Ruiz-Torres, J.A. Encinar, M. Herranz-López, et al., An Updated Review on Marine Anticancer Compounds: The Use of Virtual Screening for the Discovery of Small-Molecule Cancer Drugs, *Molecules.* 22 (2017) E1037. doi: 10.3390/molecules22071037.
- [16] S. Sukhdev, B. Sharma, S.S. Kanwar, et al., Lead Phytochemicals for Anticancer Drug Development, *Front. Plant. Sci.* 7 (2016) 1667. doi: 10.3389/fpls.2016.01667.
- [17] C. Calcabrini, E. Catanzaro, A. Bishayee, et al., Marine Sponge Natural Products with Anticancer Potential: An Updated Review, *Mar. Drugs.* 15 (2017) E310. doi: 10.3390/md15100310.
- [18] R. Kotecha, A. Takami, J.L. Espinoza, Dietary phytochemicals and cancer chemoprevention: a review of the clinical evidence, *Oncotarget.* 7 (2016) 52517–52529. doi: 10.18632/oncotarget.9593.
- [19] H. Wang, T.O. Khor, L. Shu, et al., Plants Against Cancer: A Review on Natural Phytochemicals in Preventing and Treating Cancers and Their Druggability, *Anticancer Agents Med. Chem.* 12 (2012) 1281–1305.
- [20] B.S. Vinod, T.T. Maliekal, R.J. Anto, Phytochemicals as chemosensitizers: from molecular mechanism to clinical significance, *Antioxid. Redox. Signal.* 18 (2013) 1307–1348. doi: 10.1089/ars.2012.4573.
- [21] P. Dandawate, S. Padhye, A. Ahmad, et al., Novel strategies targeting cancer stem cells through phytochemicals and their analogs, *Drug. Deliv. Transl. Res.* 3 (2013) 165–182. doi: 10.1007/s13346-012-0079-x.
- [22] S.A. Hussain, A.A. Sulaiman, C. Balch, et al., Natural Polyphenols in Cancer Chemoresistance, *Nutr. Cancer.* 6 (2016) 879–891. doi: 10.1080/01635581.2016.1192201.
- [23] G. Jacquemin, S. Shirley, O. Micheau, Combining naturally occurring polyphenols with TNF-related apoptosis-inducing ligand: a promising approach to kill resistant cancer cells? *Cell. Mol. Life. Sci.* 67 (2010) 3115–3130. doi: 10.1007/s00018-010-0407-6.
- [24] S.C Gupta, R. Kannappan, S. Reuter, et al., Chemosensitization of tumors by resveratrol, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1215 (2011) 150–160. doi: 10.1111/j.1749-6632.2010.05852.x.
- [25] D. Moher, A. Liberati, J. Tetzlaff, et al., Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement, *PLoS Med.* 6 (2009) e1000097. doi: 10.1371/journal.pmed.1000097.
- [26] C.R. Hooijmans, M.M. Rovers, R.B. de Vries, et al., SYRCLE's risk of bias tool for animal studies, *BMC Med. Res. Methodol.* 14 (2014) 43. doi: 10.1186/1471-2288-14-43.

- [27] P.S. Siqueira-Lima, J.C. Silva, J.S.S. Quintans, et al., Natural products assessed in animal models for orofacial pain – a systematic review, *Braz. J. Pharmacog.* 27 (2017) 124–134. doi: 10.1016/j.bjp.2016.06.005.
- [28] M.Q. Song, J.S. Zhu, J.L. Chen, et al., Synergistic effect of oxymatrine and angiogenesis inhibitor NM-3 on modulating apoptosis in human gastric cancer cells, *World J. Gastroenterol.* 13 (2007) 1788–1793. doi: 10.3748/wjg.v13.i12.1788
- [29] S. Banerjee, Z. Wang, D. Kong, et al., 3,3'-Diindolylmethane enhances chemosensitivity of multiple chemotherapeutic agents in pancreatic cancer, *Cancer Res.* 69 (2009) 5592–5600. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-0838.
- [30] B. Sung, K.S. Ahn, B.B. Aggarwal, Noscapine, a benzyloisoquinoline alkaloid, sensitizes leukemic cells to chemotherapeutic agents and cytokines by modulating the NF-kappaB signaling pathway, *Cancer Res.* 70 (2010) 3259–3268. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-4230.
- [31] M.B. Chougule, A. Patel, P. Sachdeva, et al., Enhanced anticancer activity of gemcitabine in combination with noscapine via antiangiogenic and apoptotic pathway against non-small cell lung cancer, *PLoS One*, 6 (2011) e27394. doi: 10.1371/journal.pone.0027394.
- [32] N. Tong, J. Zhang, Y. Chen, et al., Berberine sensitizes multiple human cancer cells to the anticancer effects of doxorubicin *in vitro*, *Oncol. Lett.* 3 (2012) 1263–1267. doi: 10.3892/ol.2012.644.
- [33] Q. Qi, X. Liu, S. Li, et al., Synergistic suppression of noscapine and conventional chemotherapeutics on human glioblastoma cell growth, *Acta. Pharmacol. Sin.* 34 (2013) 930–938. doi: 10.1038/aps.2013.40.
- [34] J. Wang, Z.R. Yang, W.G. Dong, et al., Cooperative inhibitory effect of sinomenine combined with 5-fluorouracil on esophageal carcinoma, *World J. Gastroenterol.* 19 (2013) 8292–8300. doi: 10.3748/wjg.v19.i45.8292.
- [35] N. Guo, A. Yan, X. Gao, et al., Berberine sensitizes rapamycin-mediated human hepatoma cell death *in vitro*, *Mol. Med. Rep.* 10 (2014) 3132–3138. doi: 10.3892/mmr.2014.2608.
- [36] Y. Liu, T. Bi, W. Dai, et al., Oxymatrine synergistically enhances the inhibitory effect of 5-fluorouracil on hepatocellular carcinoma *in vitro* and *in vivo*, *Tumour Biol.* 37 (2016) 7589–7597. doi: 10.1007/s13277-015-4642-1.
- [37] R. Doddapaneni, K. Patel, N. Chowdhury, et al., Noscapine chemosensitization enhances docetaxel anticancer activity and nanocarrier uptake in triple negative breast cancer, *Exp. Cell Res.* 346 (2016) 65–73. doi: 10.1016/j.yexcr.2016.05.006.

- [38] Y. Zhao, Z. Jing, Y. Li, et al., Berberine in combination with cisplatin suppresses breast cancer cell growth through induction of DNA breaks and caspase-3-dependent apoptosis, *Oncol. Rep.* 36 (2016) 567–572. doi: 10.3892/or.2016.4785.
- [39] P. Rajendran, F. Li, K.A. Manu, et al., γ -Tocotrienol is a novel inhibitor of constitutive and inducible STAT3 signalling pathway in human hepatocellular carcinoma: potential role as an antiproliferative, pro-apoptotic and chemosensitizing agent, *Br. J. Pharmacol.* 163 (2011) 283–298. doi: 10.1111/j.1476-5381.2010.01187.x.
- [40] Y.Z. Liu, C.M. Yang, J.Y. Chen, et al., Alpha-carotene inhibits metastasis in Lewis lung carcinoma *in vitro*, and suppresses lung metastasis and tumor growth in combination with taxol in tumor xenografted C57BL/6 mice, *J. Nutr. Biochem.* 26 (2015) 607–615. doi: 10.1016/j.jnutbio.2014.12.012.
- [41] Y. Zhang, X. Zhu, T. Huang, et al., β -Carotene synergistically enhances the anti-tumor effect of 5-fluorouracil on esophageal squamous cell carcinoma *in vivo* and *in vitro*, *Toxicol. Lett.* 261 (2016) 49–58. doi: 10.1016/j.toxlet.2016.08.010.
- [42] S.M. Kim, J.H. Lee, G. Sethi, et al., Bergamottin, a natural furanocoumarin obtained from grapefruit juice induces chemosensitization and apoptosis through the inhibition of STAT3 signaling pathway in tumor cells, *Cancer Lett.* 354 (2014) 153–163. doi: 10.1016/j.canlet.2014.08.002.
- [43] G. Stammer, M. Volm, Green tea catechins (EGCG and EGC) have modulating effects on the activity of doxorubicin in drug-resistant cell lines, *Anticancer Drugs.* 8 (1997) 265–268.
- [44] S. Dhanalakshmi, P. Agarwal, L.M. Glode, et al., Silibinin sensitizes human prostate carcinoma DU145 cells to cisplatin- and carboplatin-induced growth inhibition and apoptotic death, *Int. J. Cancer.* 106 (2003) 699–705.
- [45] K. Chisholm, B.J. Bray, R.J. Rosengren, Tamoxifen and epigallocatechin gallate are synergistically cytotoxic to MDA-MB-231 human breast cancer cells, *Anticancer Drugs.* 15 (2004) 889–897.
- [46] X.H. Peng, P. Karna, R.M. O'Regan, Down-regulation of inhibitor of apoptosis proteins by deguelin selectively induces apoptosis in breast cancer cells, *Mol. Pharmacol.* 71 (2007) 101–111.
- [47] I.A. Siddiqui, A. Malik, V.M. Adhami, et al., Green tea polyphenol EGCG sensitizes human prostate carcinoma LNCaP cells to TRAIL-mediated apoptosis and synergistically inhibits biomarkers associated with angiogenesis and metastasis, *Oncogene.* 27 (2008) 2055–2063.

- [48] A. Shervington, V. Pawar, S. Menon, et al., The sensitization of glioma cells to cisplatin and tamoxifen by the use of catechin, *Mol. Biol. Rep.* 36 (2009) 1181–1186. doi: 10.1007/s11033-008-9295-3.
- [49] F.Y. Zhang, G.J. Du, L. Zhang, et al., Naringenin enhances the anti-tumor effect of doxorubicin through selectively inhibiting the activity of multidrug resistance-associated proteins but not P-glycoprotein, *Pharm. Res.* 26 (2009) 914–925. doi: 10.1007/s11095-008-9793-y.
- [50] C.Y. Jin, C. Park, H.J. Hwang, et al., Naringenin up-regulates the expression of death receptor 5 and enhances TRAIL-induced apoptosis in human lung cancer A549 cells, *Mol. Nutr. Food Res.* 55 (2011) 300–309. doi: 10.1002/mnfr.201000024.
- [51] M.E. Stearns, M. Wang, Synergistic Effects of the Green Tea Extract Epigallocatechin-3-gallate and Taxane in Eradication of Malignant Human Prostate Tumors, *Transl. Oncol.* 4 (2011) 147–156.
- [52] A.S. Hönicke, S.A. Ender, J. Radons, Combined administration of EGCG and IL-1 receptor antagonist efficiently downregulates IL-1-induced tumorigenic factors in U-2 OS human osteosarcoma cells, *Int. J. Oncol.* 41 (2012) 753–758. doi: 10.3892/ijo.2012.1498.
- [53] H. Wu, Y. Xin, C. Xu, et al., Capecitabine combined with (-)-epigallocatechin-3-gallate inhibits angiogenesis and tumor growth in nude mice with gastric cancer xenografts, *Exp. Ther. Med.* 3 (2012) 650–654. doi: 10.3892/etm.2012.448.
- [54] T.W. Kwak, D.H. Kim, C.W. Chung, et al., Synergistic Anticancer Effects of Vorinostat and Epigallocatechin-3-Gallate against HuCC-T1 Human Cholangiocarcinoma Cells, *Evid. Based Complementary Altern. Med.* 2013 (2013) 18515. doi: 10.1155/2013/185158.
- [55] R. Suzuki, Y. Kang, X. Li, et al., Genistein potentiates the antitumor effect of 5-Fluorouracil by inducing apoptosis and autophagy in human pancreatic cancer cells, *Anticancer Res.* 34 (2014) 4685–4692.
- [56] L. Wang, J. Feng, X. Chen, et al., Myricetin enhance chemosensitivity of 5-fluorouracil on esophageal carcinoma *in vitro* and *in vivo*, *Cancer Cell Int.* 14 (2014) 71. doi: 10.1186/s12935-014-0071-2.
- [57] M.S. Abaza, K.Y. Orabi, E. Al-Quattan, et al., Growth inhibitory and chemosensitization effects of naringenin, a natural flavanone purified from *Thymus vulgaris*, on human breast and colorectal cancer, *Cancer Cell Int.* 15 (2015) 46. doi: 10.1186/s12935-015-0194-0.

- [58] P. Wang, S.M. Henning, D. Heber, et al., Sensitization to docetaxel in prostate cancer cells by green tea and quercetin, *J. Nutr. Biochem.* 26 (2015) 408–415. doi: 10.1016/j.jnutbio.2014.11.017.
- [59] J.A. García-Vilas, A.R. Quesada, M.A. Medina, Screening of synergistic interactions of epigallocatechin-3-gallate with antiangiogenic and antitumor compounds, *Synergy.* 3 (2016) 5–13. doi: 10.1016/j.synres.2016.05.001.
- [60] T. Krajnović, G.N. Kaluđerović, L.A. Wessjohann, et al., Versatile antitumor potential of isoxanthohumol: Enhancement of paclitaxel activity *in vivo*, *Pharmacol. Res.* 105 (2016) 62–73. doi: 10.1016/j.phrs.2016.01.011.
- [61] S. Lin, K. Lei, W. Du, et al., Enhancement of oxaliplatin sensitivity in human colorectal cancer by hypericin mediated photodynamic therapy via ROS-related mechanism, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 71 (2016) 24–34. doi: 10.1016/j.biocel.2015.12.003.
- [62] S. Lin, L. Yang, H. Shi, et al., Endoplasmic reticulum-targeting photosensitizer Hypericin confers chemo-sensitization towards oxaliplatin through inducing pro-death autophagy, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 87 (2017) 54–68. doi: 10.1016/j.biocel.2017.04.001.
- [63] S. Anuchapreeda, P. Leechanachai, M.M. Smith, et al., Modulation of P-glycoprotein expression and function by curcumin in multidrug-resistant human KB cells, *Biochem. Pharmacol.* 64 (2002) 573–582.
- [64] T.C. Hour, J. Chen, C.Y. Huang, et al., Curcumin enhances cytotoxicity of chemotherapeutic agents in prostate cancer cells by inducing p21(WAF1/CIP1) and C/EBPbeta expressions and suppressing NF-kappaB activation, *Prostate.* 51 (2002) 211–218.
- [65] S. Fulda, K.M. Debatin, Sensitization for anticancer drug-induced apoptosis by the chemopreventive agent resveratrol, *Oncogene.* 23 (2004) 6702–6711.
- [66] S.L. Wu, Z. J. Sun, L. Yu, et al., Effect of resveratrol and in combination with 5-FU on murine liver cancer, *World J. Gastroenterol.* 10 (2004) 3048–3052.
- [67] B.B. Aggarwal, S. Shishodia, Y. Takada, et al., Curcumin suppresses the paclitaxel-induced nuclear factor-kappaB pathway in breast cancer cells and inhibits lung metastasis of human breast cancer in nude mice, *Clin. Cancer Res.* 11 (2005) 7490–7498.
- [68] S.V. Bava, V.T. Puliappadamba, A. Deepti, et al., Sensitization of taxol-induced apoptosis by curcumin involves down-regulation of nuclear factor-??B and the serine/threonine kinase Akt and is independent of tubulin polymerization, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 6301–6308. doi:10.1074/jbc.M410647200.

- [69] L. Li, B. Ahmed, K. Mehta, R. Kurzrock, Liposomal curcumin with and without oxaliplatin: effects on cell growth, apoptosis, and angiogenesis in colorectal cancer, *Mol. Cancer Ther.* 6 (2007) 1276–1282. doi:10.1158/1535-7163.MCT-06-0556.
- [70] K.S. Chen, Y.C. Hsiao, D.Y. Kuo, et al., Tannic acid-induced apoptosis and -enhanced sensitivity to arsenic trioxide in human leukemia HL-60 cells, *Leuk. Res.* 33 (2009) 297–307. doi:10.1016/j.leukres.2008.08.006.
- [71] K.B. Harikumar, A.B. Kunnumakkara, G. Sethi, et al., Resveratrol, a multitargeted agent, can enhance antitumor activity of gemcitabine *in vitro* and in orthotopic mouse model of human pancreatic cancer, *Int. J. Cancer.* 127 (2010) 257–268. doi:10.1002/ijc.25041.
- [72] A.B. Kunnumakkara, P. Diagaradjane, P. Anand, et al., Curcumin sensitizes human colorectal cancer to capecitabine by modulation of cyclin D1, COX-2, MMP-9, VEGF and CXCR4 expression in an orthotopic mouse model, *Int. J. Cancer.* 125 (2009) 2187–2197. doi:10.1002/ijc.24593.
- [73] Y. Yu, S.S. Kanwar, B.B. Patel, et al., Elimination of Colon Cancer Stem-Like Cells by the Combination of Curcumin and FOLFOX, *Transl. Oncol.* 2 (2009) 321–328. doi:10.1593/tlo.09193.
- [74] W. Hartojo, A.L. Silvers, D.G. Thomas, et al., Curcumin promotes apoptosis, increases chemosensitivity, and inhibits nuclear factor kappaB in esophageal adenocarcinoma., *Transl. Oncol.* 3 (2010) 99–108. doi:10.1593/tlo.09235.
- [75] S. V. Bava, C.N. Sreekanth, A.K.T. Thulasidasan, et al., Akt is upstream and MAPKs are downstream of NF- κ B in paclitaxel-induced survival signaling events, which are down-regulated by curcumin contributing to their synergism, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 43 (2011) 331–341. doi:10.1016/j.biocel.2010.09.011.
- [76] C.N. Sreekanth, S. V Bava, E. Sreekumar, et al., Molecular evidences for the chemosensitizing efficacy of liposomal curcumin in paclitaxel chemotherapy in mouse models of cervical cancer, *Oncogene.* 30 (2011) 3139–3152. doi:10.1038/onc.2011.23.
- [77] A.M.M. Osman, H.M. Bayoumi, S.E. Al-Harhi, et al., Modulation of doxorubicin cytotoxicity by resveratrol in a human breast cancer cell line, *Cancer Cell Int.* 12 (2012) 47. doi:10.1186/1475-2867-12-47.
- [78] E.M. Saleh, R.A. El-awady, N.A. Eissa, et al., Antagonism between curcumin and the topoisomerase II inhibitor etoposide: A study of DNA damage, cell cycle regulation and death pathways, *Cancer Biol. Ther.* 13 (2012) 1058–1071. doi:10.4161/cbt.21078.

- [79] H. Wang, Q.R. Geng, L. Wang, et al., Curcumin potentiates antitumor activity of L-asparaginase via inhibition of the AKT signaling pathway in acute lymphoblastic leukemia., *Leuk. Lymphoma*. 53 (2012) 1376–82. doi:10.3109/10428194.2011.649478.
- [80] F. Amiri, A.H. Zarnani, H. Zand, et al., Synergistic anti-proliferative effect of resveratrol and etoposide on human hepatocellular and colon cancer cell lines, *Eur. J. Pharmacol.* 718 (2013) 34–40. doi:10.1016/j.ejphar.2013.09.020.
- [81] J. Díaz-Chávez, M.A. Fonseca-Sánchez, E. Arechaga-Ocampo, et al., Proteomic Profiling Reveals That Resveratrol Inhibits HSP27 Expression and Sensitizes Breast Cancer Cells to Doxorubicin Therapy, *PLoS One*. 8 (2013) 1–11. doi:10.1371/journal.pone.0064378.
- [82] M. Shakibaei, A. Mobasheri, C. Lueders, et al., Curcumin Enhances the Effect of Chemotherapy against Colorectal Cancer Cells by Inhibition of NF- κ B and Src Protein Kinase Signaling Pathways, *PLoS One*. 8 (2013) 1–13. doi:10.1371/journal.pone.0057218.
- [83] L.J. Carlson, B. Cote, A.W. Alani, et al., Polymeric micellar co-delivery of resveratrol and curcumin to mitigate *in vitro* doxorubicin-induced cardiotoxicity, *J. Pharm. Sci.* 103 (2014) 2315–2322. doi:10.1002/jps.24042.
- [84] H. Qian, Y. Yang, X. Wang, Curcumin enhanced adriamycin-induced human liver-derived Hepatoma G2 cell death through activation of mitochondria-mediated apoptosis and autophagy, *Eur. J. Pharm. Sci.* 43 (2011) 125–131. doi:10.1016/j.ejps.2011.04.002.
- [85] C. Buhrmann, P. Shayan, P. Kraeche, et al., Resveratrol induces chemosensitization to 5-fluorouracil through up-regulation of intercellular junctions, Epithelial-to-mesenchymal transition and apoptosis in colorectal cancer, *Biochem. Pharmacol.* 98 (2015) 51–58. doi:10.1016/j.bcp.2015.08.105.
- [86] B. Cote, L.J. Carlson, D.A. Rao, et al., Combinatorial resveratrol and quercetin polymeric micelles mitigate doxorubicin induced cardiotoxicity *in vitro* and *in vivo*, *J. Control. Release*. 213 (2015) 128–133. doi:10.1016/j.jconrel.2015.06.040.
- [87] M. Shakibaei, P. Kraeche, B. Popper, et al., Curcumin potentiates antitumor activity of 5-fluorouracil in a 3D alginate tumor microenvironment of colorectal cancer, *BMC Cancer*. 15 (2015) 250. doi:10.1186/s12885-015-1291-0.
- [88] M.S.I. Abaza, M. Afzal, R.J. Al-Attiyah, et al., Methylferulate from *Tamarix aucheriana* inhibits growth and enhances chemosensitivity of human colorectal cancer cells: possible mechanism of action., *BMC Complement. Altern. Med.* 16 (2016) 384. doi:10.1186/s12906-016-1358-8.
- [89] E. Ooko, T. Alsalim, B. Saeed, et al., Modulation of P-glycoprotein activity by novel synthetic curcumin derivatives in sensitive and multidrug-resistant T-cell acute lymphoblastic

leukemia cell lines, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 305 (2016) 216–233. doi:10.1016/j.taap.2016.06.002.

[90] A.K. Tyagi, S. Prasad, M. Majeed, et al., Calebin A, a novel component of turmeric, suppresses NF- κ B regulated cell survival and inflammatory gene products leading to inhibition of cell growth and chemosensitization, *Phytomedicine*. 34 (2017) 171–181. doi:10.1016/j.phymed.2017.08.021.

[91] S.H. Jafri, J. Glass, R. Shi, et al., Thymoquinone and cisplatin as a therapeutic combination in lung cancer: *In vitro* and *in vivo*., *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 29 (2010) 87. doi:10.1186/1756-9966-29-87.

[92] F. Li, P. Rajendran, G. Sethi, Thymoquinone inhibits proliferation, induces apoptosis and chemosensitizes human multiple myeloma cells through suppression of signal transducer and activator of transcription 3 activation pathway, *Br. J. Pharmacol.* 161 (2010) 541–554. doi:10.1111/j.1476-5381.2010.00874.x.

[93] S.K. Sandur, M.K. Pandey, B. Sung, et al., 5-hydroxy-2-methyl-1,4-naphthoquinone, a vitamin K3 analogue, suppresses STAT3 activation pathway through induction of protein tyrosine phosphatase, SHP-1: potential role in chemosensitization., *Mol. Cancer Res.* 8 (2010) 107–118. doi:10.1158/1541-7786.MCR-09-0257.

[94] K. Effenberger-Neidnicht, R. Schobert, Combinatorial effects of thymoquinone on the anti-cancer activity of doxorubicin, *Cancer Chemother. Pharmacol.* 67 (2011) 867–874. doi:10.1007/s00280-010-1386-x.

[95] Y. Wang, Y. Zhou, G. Jia, et al., Shikonin suppresses tumor growth and synergizes with gemcitabine in a pancreatic cancer xenograft model: Involvement of NF- κ B signaling pathway, *Biochem. Pharmacol.* 88 (2014) 322–333. doi:10.1016/j.bcp.2014.01.041.

[96] W. Daqian, W. Chuandong, Q. Xinhua, et al., Chimaphilin inhibits proliferation and induces apoptosis in multidrug resistant osteosarcoma cell lines through insulin-like growth factor-I receptor (IGF-IR) signaling, *Chem. Biol. Interact.* 237 (2015) 25–30. doi:10.1016/j.cbi.2015.05.008.

[97] G. He, G. He, R. Zhou, et al., Enhancement of cisplatin-induced colon cancer cells apoptosis by shikonin, a natural inducer of ROS *in vitro* and *in vivo*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 469 (2016) 1075–1082. doi:10.1016/j.bbrc.2015.12.100.

[98] J. Song, Z. Zhao, X. Fan, et al., Shikonin potentiates the effect of arsenic trioxide against human hepatocellular carcinoma *in vitro* and *in vivo*, *Oncotarget*. 7 (2016). doi:10.18632/oncotarget.12041.

- [99] Y. Wang, H.L. Lu, Y.D. Liu, et al., Cryptotanshinone sensitizes antitumor effect of paclitaxel on tongue squamous cell carcinoma growth by inhibiting the JAK/STAT3 signaling pathway, *Biomed. Pharmacother.* 95 (2017) 1388–1396. doi:10.1016/j.biopha.2017.09.062.
- [100] C.H. Choi, G. Kang, Y.D. Min, Reversal of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance by protopanaxatriol ginsenosides from Korean red ginseng, *Planta Med.* 69 (2003) 235–240. doi:10.1055/s-2003-38483.
- [101] S.M. Kim, S.Y. Lee, J.S. Cho, et al., Hong, Combination of ginsenoside Rg3 with docetaxel enhances the susceptibility of prostate cancer cells via inhibition of NF- κ B, *Eur. J. Pharmacol.* 631 (2010) 1–9. doi:10.1016/j.ejphar.2009.12.018.
- [102] Z.J. Ming, Y. Hu, Y.H. Qiu, et al., Synergistic effects of β -aescin and 5-fluorouracil in human hepatocellular carcinoma SMMC-7721 cells, *Phytomedicine.* 17 (2010) 575–580. doi:10.1016/j.phymed.2009.12.009.
- [103] Y.W. Wang, S.J. Wang, Y.N. Zhou, et al., Escin augments the efficacy of gemcitabine through down-regulation of nuclear factor- κ B and nuclear factor- κ B-regulated gene products in pancreatic cancer both *in vitro* and *in vivo*, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 138 (2012) 785–797. doi:10.1007/s00432-012-1152-z.
- [104] L.Q. Yang, B. Wang, H. Gan, et al., Enhanced oral bioavailability and anti-tumour effect of paclitaxel by 20(s)-ginsenoside Rg3 *in vivo*, *Biopharm. Drug Dispos.* 33 (2012) 425–436. doi: 10.1002/bdd.1806.
- [105] H. Wang, Z. Zhai, N. Li, et al., Steroidal saponin of *Trillium tschonoskii*. Reverses multidrug resistance of hepatocellular carcinoma, *Phytomedicine.* 20 (2013) 985–991. doi:10.1016/j.phymed.2013.04.014.
- [106] L. Chang, B. Huo, Y. Lv, et al., Ginsenoside Rg3 enhances the inhibitory effects of chemotherapy on esophageal squamous cell carcinoma in mice, *Mol. Clin. Oncol.* 2 (2014) 1043–1046. doi:10.3892/mco.2014.355.
- [107] Y.J. Lee, S. Lee, J.N. Ho, et al., Synergistic antitumor effect of ginsenoside Rg3 and cisplatin in cisplatin-resistant bladder tumor cell line, *Oncol. Rep.* 32 (2014) 1803–1808. doi:10.3892/or.2014.3452.
- [108] Z. Liu, Q. Zheng, W. Chen, et al., Chemosensitizing effect of Paris Saponin I on Camptothecin and 10-hydroxycamptothecin in lung cancer cells via p38 MAPK, ERK, and Akt signaling pathways, *Eur. J. Med. Chem.* 125 (2017) 760–769. doi:10.1016/j.ejmech.2016.09.066.

- [109] Z. Yuan, H. Jiang, X. Zhu, et al., Ginsenoside Rg3 promotes cytotoxicity of Paclitaxel through inhibiting NF- κ B signaling and regulating Bax/Bcl-2 expression on triple-negative breast cancer, *Biomed. Pharmacother.* 89 (2017) 227–232. doi:10.1016/j.biopha.2017.02.038.
- [110] T.J. Lee, H.J. Um, D.S. Min, et al., Withaferin A sensitizes TRAIL-induced apoptosis through reactive oxygen species-mediated up-regulation of death receptor 5 and down-regulation of c-FLIP, *Free Radic. Biol. Med.* 46 (2009) 1639–1649. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2009.03.022.
- [111] W. Chen, A. Leiter, D. Yin, et al., Cucurbitacin B inhibits growth, arrests the cell cycle, and potentiates antiproliferative efficacy of cisplatin in cutaneous squamous cell carcinoma cell lines, *Int. J. Oncol.* 37 (2010) 737–743.
- [112] G.B. Iwanski, D.H. Lee, S. En-Gal, et al., Cucurbitacin B, a novel *in vivo* potentiator of gemcitabine with low toxicity in the treatment of pancreatic cancer, *Br. J. Pharmacol.* 160 (2010) 998–1007. doi:10.1111/j.1476-5381.2010.00741.x.
- [113] D.H. Lee, N.H. Thoennissen, C. Goff, et al., Synergistic effect of low-dose cucurbitacin B and low-dose methotrexate for treatment of human osteosarcoma, *Cancer Lett.* 306 (2011) 161–170. doi:10.1016/j.canlet.2011.03.001.
- [114] S.M. Cohen, R. Mukerji, B.N. Timmermann, et al., A novel combination of withaferin A and sorafenib shows synergistic efficacy against both papillary and anaplastic thyroid cancers, *Am. J. Surg.* 204 (2012) 895–901. doi:10.1016/j.amjsurg.2012.07.027.
- [115] M.Y. Fong, S. Jin, M. Rane, et al., Withaferin a synergizes the therapeutic effect of doxorubicin through ROS-mediated autophagy in ovarian cancer, *PLoS One.* 7 (2012) 1–16. doi:10.1371/journal.pone.0042265.
- [116] F.F. El-Senduny, F.A. Badria, A.M. EL-Waseef, et al., Approach for chemosensitization of cisplatin-resistant ovarian cancer by cucurbitacin B, *Tumor Biol.* 37 (2016) 685–698. doi:10.1007/s13277-015-3773-8.
- [117] X. Li, F. Zhu, J. Jiang, et al., Synergistic antitumor activity of withaferin A combined with oxaliplatin triggers reactive oxygen species-mediated inactivation of the PI3K/AKT pathway in human pancreatic cancer cells, *Cancer Lett.* 357 (2015) 219–230. doi:10.1016/j.canlet.2014.11.026.
- [118] M. Ben-Eltriki, S. Deb, H. Adomat, et al., Calcitriol and 20(S)-protopanaxadiol synergistically inhibit growth and induce apoptosis in human prostate cancer cells, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 158 (2016) 207–219. doi:10.1016/j.jsbmb.2015.12.002.

- [119] M.L. Holland, J.A. Panetta, J.M. Hoskins, et al., The effects of cannabinoids on P-glycoprotein transport and expression in multidrug resistant cells, *Biochem. Pharmacol.* 71 (2006) 1146–1154. doi:10.1016/j.bcp.2005.12.033.
- [120] S. Sieber, G. Gdynia, W. Roth, et al., Combination treatment of malignant B cells using the anti-CD20 antibody rituximab and the anti-malarial artesunate, *Int. J. Oncol.* 35 (2009) 149–158.
- [121] Y. He, F. Liu, L. Zhang, et al., Growth inhibition and apoptosis induced by lupeol, a dietary triterpene, in human hepatocellular carcinoma cells., *Biol. Pharm. Bull.* 34 (2011) 517–22. doi:10.1248/bpb.34.517.
- [122] R. Kannaiyan, H.S. Hay, P. Rajendran, et al., Celastrol inhibits proliferation and induces chemosensitization through down-regulation of NF- κ B and STAT3 regulated gene products in multiple myeloma cells, *Br. J. Pharmacol.* 164 (2011) 1506–1521. doi:10.1111/j.1476-5381.2011.01449.x.
- [123] S. Torres, M. Lorente, F. Rodriguez-Fornes, et al., A Combined Preclinical Therapy of Cannabinoids and Temozolomide against Glioma, *Mol. Cancer Ther.* 10 (2011) 90–103. doi:10.1158/1535-7163.MCT-10-0688.
- [124] S. Prasad, V.R. Yadav, B. Sung, et al., Ursolic acid inhibits growth and metastasis of human, colorectal cancer in an orthotopic nude mouse model by targeting multiple cell signaling pathways: Chemosensitization with capecitabine, *Clin. Cancer Res.* 18 (2012) 4942–4953. doi:10.1158/1078-0432.CCR-11-2805.
- [125] J. Tong, S. Yin, Y. Dong, et al., Pseudolaric Acid B Induces Caspase-Dependent Apoptosis and Autophagic Cell Death in Prostate Cancer Cells, *Phytother. Res.* 27 (2013) 885–891. doi: 10.1002/ptr.4808.
- [126] Y. Wang, Y. Zhou, H. Zhou, et al., Pristimerin Causes G1 Arrest, Induces Apoptosis, and Enhances the Chemosensitivity to Gemcitabine in Pancreatic Cancer Cells, *PLoS One.* 7 (2012) 1–12. doi:10.1371/journal.pone.0043826.
- [127] E. Butturini, A.C. Prati, G. Chiavegato, et al., Mild oxidative stress induces S-glutathionylation of STAT3 and enhances chemosensitivity of tumoural cells to chemotherapeutic drugs, *Free Radic. Biol. Med.* 65 (2013) 1322–1330. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2013.09.015.
- [128] F. Liu, Y. He, Y. Liang, et al., PI3-kinase inhibition synergistically promoted the anti-tumor effect of lupeol in hepatocellular carcinoma., *Cancer Cell Int.* 13 (2013) 108. doi:10.1186/1475-2867-13-108.

- [129] O.A. Bamodu, W.C. Huang, D.T.W. Tzeng, et al., Ovatodiolide sensitizes aggressive breast cancer cells to doxorubicin, eliminates their cancer stem cell-like phenotype, and reduces doxorubicin-associated toxicity, *Cancer Lett.* 364 (2015) 125–134. doi:10.1016/j.canlet.2015.05.006.
- [130] Y. Liu, T. Bi, W. Dai, et al., Lupeol enhances inhibitory effect of 5-fluorouracil on human gastric carcinoma cells, *Naunyn. Schmiedebergs. Arch. Pharmacol.* 389 (2016) 477–484. doi:10.1007/s00210-016-1221-y.
- [131] M.A. Reis, O.B. Ahmed, G. Spengler, et al., Jatrophone diterpenes and cancer multidrug resistance - ABCB1 efflux modulation and selective cell death induction, *Phytomedicine.* 23 (2016) 968–978. doi:10.1016/j.phymed.2016.05.007.
- [132] B.C. Baguley, Multiple drug resistance mechanisms in cancer, *Mol. Biotechnol.* 46 (2010) 308–316. doi: 10.1007/s12033-010-9321-2.
- [133] Q. Wu, Z. Yang, Y. Nie, et al., Multi-drug resistance in cancer chemotherapeutics: mechanisms and lab approaches, *Cancer Lett.* 347 (2014) 159–166. doi: 10.1016/j.canlet.2014.03.013.
- [134] W.Y. Wu, J.J. Hou, H.L. Long, et al., TCM-based new drug discovery and development in China, *Chin. J. Nat. Med.* 12 (2014) 241–250. doi: 10.1016/S1875-5364(14)60050-9.
- [135] J. Liu, S. Wang, Y. Zhang, et al., Traditional Chinese medicine and cancer: History, present situation, and development, *Thorac. Cancer.* 6 (2015) 561–569. doi: 10.1111/1759-7714.12270.
- [136] A. Richmond, Y. Su, Mouse xenograft models vs GEM models for human cancer therapeutics, *Dis. Model Mech.* 1 (2008) 78–82. doi: 10.1242/dmm.000976.
- [137] J. Jung, Human Tumor Xenograft Models for Preclinical Assessment of Anticancer Drug Development, *Toxicol. Res.* 30 (2014) 1–5. doi: 10.5487/TR.2014.30.1.001.
- [138] M.F. Festing, D.G. Altman, Guidelines for the design and statistical analysis of experiments using laboratory animals, *ILAR J.* 43 (2002) 244–258.
- [139] J.A. Hirst, J. Howick, J.K. Aronson, et al., The need for randomization in animal trials: an overview of systematic reviews, *Plos One.* 9 (2014) e98856. doi: 10.1371/journal.pone.0098856.
- [140] P.J. Karanicolas, F. Farrokhyar, M. Bhandari, Blinding: Who, what, when, why, how? *Can. J. Surg.* 53 (2010) 345–348.
- [141] J.E. Aguilar-Nascimento, Fundamental steps in experimental design for animal studies, *Acta. Cir. Bras.* 20 (2005) 2–8.

- [142] V.S. Govindarajan, Turmeric: chemistry, technology, and quality, *Crit Rev Food Sci Nutr.* 12 (1980) 199–301.
- [143] N. Chainani-Wu, Safety and anti-inflammatory activity of curcumin: a component of tumeric (*Curcuma longa*), *J. Altern. Complement. Med.* 9 (2003) 161–168.
- [144] B. Chandran, A. Goel, A randomized, pilot study to assess the efficacy and safety of curcumin in patients with active rheumatoid arthritis, *Phytother. Res.* 26 (2012) 1719–1725. doi: 10.1002/ptr.4639.
- [145] S.C. Gupta, S. Patchva, B.B. Aggarwal, Therapeutic Roles of Curcumin: Lessons Learned from Clinical Trials, *AAPS J.* 15 (2013) 195–218. doi: 10.1208/s12248-012-9432-8.
- [146] M. Karin, Nuclear factor- κ B in cancer development and progression, *Nature.* 441 (2006) 431–436.
- [147] I. Vivanco, C.L. Sawyers, The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer, *Nat. Rev. Cancer.* 2 (2002) 489–501.
- [148] E.M. Varoni, A.F.L. Faro, J. Sharifi-Rad, et al., Anticancer Molecular Mechanisms of Resveratrol, *Front. Nutr.* 3 (2016). doi: 10.3389/fnut.2016.00008.
- [149] N.C. Whitlock, S.J. Baek, The anticancer effects of resveratrol – Modulation of transcription factors, *Nutr. Cancer.* 64 (2012) 493–502. doi: 10.1080/01635581.2012.667862.
- [150] J.K. Aluyen, Q.N. Ton, T. Tran, et al., Resveratrol: potential as anticancer agent, *J. Diet Suppl.* 9 (2012) 45–56. doi: 10.3109/19390211.2011.650842.
- [151] J. Acunzo, C. Andrieu, V. Baylot, et al., Hsp27 as a therapeutic target in cancers, *Curr. Drug Targets.* 15 (2014) 423–431.
- [152] A. Satelli, S. Li, Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy, *Cell. Mol. Life Sci.* 68 (2011) 3033–3046. doi: 10.1007/s00018-011-0735-1.
- [153] Y. Sakamoto, N. Terashita, T. Muraguchi, et al., Effects of epigallocatechin-3-gallate (EGCG) on A549 lung cancer tumor growth and angiogenesis, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 77 (2013) 1799–1803.
- [154] H. Fujiki, S. Yoshizawa, T. Horiuchi, et al., Anticarcinogenic effects of (-)-epigallocatechin gallate, *Prev. Med.* 21 (1992) 503–509.
- [155] C. Braicu, C.D. Gherman, A. Irimie, et al., Epigallocatechin-3-Gallate (EGCG) inhibits cell proliferation and migratory behaviour of triple negative breast cancer cells, *J. Nanosci. Nanotechnol.* 13 (2013) 632–637.
- [156] S. Shankar, S. Ganapathy, S.R. Hingorani, et al., EGCG inhibits growth, invasion, angiogenesis and metastasis of pancreatic cancer, *Front. Biosci.* 1 (2008) 440–452.

[157] J.D. Lambert, C.S. Yang, Mechanisms of cancer prevention by tea constituents, *J. Nutr.* 133 (2013) 3262S–3267S.

**PARTIE B: LES PLANTES DU BRÉSIL ET DE LA
NOUVELLE-CALÉDONIE COMME SOURCES DE
NOUVEAUX COMPOSÉS ACTIFS ET
CHIMIOSENSIBILISANTS SUR LE MÉLANOME**

PARTIE B: LES PLANTES DU BRÉSIL ET DE LA NOUVELLE-CALÉDONIE COMME SOURCE DE NOUVEAUX COMPOSÉS ACTIFS ET CHIMIOSENSIBILISANTS SUR LE MÉLANOME

Les plantes médicinales sont l'une des principales sources de nouvelles molécules anticancéreuses. En ce qui concerne le mélanome, des représentants de diverses classes de métabolites secondaires ont montré des effets antiprolifératifs importants, agissant principalement sur le cycle cellulaire et sur les voies biochimiques conduisant à la mort cellulaire par apoptose (AlQathamaa et Prieto, 2015; Ferrer et al., 2005; Wang et al., 2009). Dans cette partie, nous avons étudié la composition chimique et le potentiel antimélanome et chimiosensibilisant de flavonoïdes et caroténoïdes isolés de plantes du Brésil et de la Nouvelle-Calédonie. Ces deux régions sont largement reconnues pour leur diversité d'espèces végétales, dont beaucoup sont endémiques et menacées d'extinction. Afin de valoriser leurs composés bioactifs et de mettre en évidence leur potentiel chimiosensibilisant, nous avons divisé cette partie en deux chapitres:

Le chapitre 2 est dédié à l'étude d'une série de flavonoïdes semi-synthétisés ou directement isolés de l'exsudat des bourgeons de *Gardenia oudiepe*, une plante endémique de la Nouvelle-Calédonie. Les gardenias appartiennent à la famille Rubiaceae et sont très valorisées commercialement. Leurs fleurs exhalent des odeurs souvent agréables et sont donc largement utilisées en parfumerie. En termes d'activités pharmacologiques, *Gardenia* a démontré des effets anti-inflammatoire, antioxydant, antimicrobienne, cytotoxique et anti-angiogénique (Billo, Cabalian, et al., 2005; Billo, Fournet, et al., 2005; Santi et al., 2019). *G. oudiepe* est parmi les principales espèces d'intérêt médicinal du genre, dont les extraits sont riches en flavones méthoxylées exerçant des activités antiprotozoaire et anti-inflammatoire (Mai et al., 2015; Santi et al., 2018). Les flavonoïdes étudiés dans ce chapitre ont été fournis par l'Equipe Produits Naturels, Analyse, Synthèse (UMR CNRS 8038) de l'Université Paris Descartes. Il s'agit d'un groupe de flavones d'occurrence rare en raison de leur degré de méthoxylation élevé. Après un test de criblage, nous avons sélectionné les deux polyméthoxyflavones (PMFs) ayant une plus forte activité antiproliférative pour l'étude de leur mode d'action. Les PMFs ont été également combinées au vemurafenib et à la dacarbazine à des concentrations non toxiques, afin d'évaluer leur effet chimiosensibilisant sur des cellules de mélanome humain métastatique (lignée A2058) portant la mutation oncogénique BRAF^{V600E}.

Le chapitre 3 concerne l'étude de la composition chimique d'extraits de *Bixa orellana* actifs sur les cellules A2058, ainsi que l'isolement, la caractérisation structurale et l'évaluation du potentiel chimiosensibilisant de la bixine, identifié comme le pigment majoritaire de la plante. Le roucouyer ou roucou (*B. orellana*) est un arbuste originaire d'Amérique Tropicale (Raddatz-Mota et al., 2017). Au Brésil, cette plante est populairement appelée *urucum* et se trouve dans tous les biomes brésiliens, en particulier dans la région amazonienne, où ses graines sont utilisées par des tribus indigènes comme colorant naturel. L'enveloppe cireuse de ses graines contient des caroténoïdes rouge-orangés non toxiques utilisés comme colorants en industries agro-alimentaire, pharmaceutique et cosmétique. Les deux pigments majoritaires des graines de roucou sont la bixine, un apocaroténoïde liposoluble rouge, et la norbixine, son dérivé hydrophile orange déméthylé (Bouvier, Dogbo et Camara, 2003). Des études précédentes ont montré que la bixine est faiblement antiproliférative sur cellules cancéreuses mais pourrait présenter un intérêt pour les sensibiliser aux anticancéreux conventionnels (Kumar, Phaniendra et Periyasamy, 2018; Zang et al., 2011; Santos et al., 2016). Dans ce chapitre, nous présentons l'effet antiprolifératif de la bixine associée aux agents chimiothérapeutiques (vemurafenib et dacarbazine). Étant donné que les caroténoïdes interfèrent souvent avec la production d'espèces réactives de l'oxygène dans l'environnement cellulaire, nous avons travaillé sur l'hypothèse que la bixine augmente le stress oxydatif intracellulaire, affectant l'intégrité de la membrane et par conséquent potentialisant l'effet cytotoxique des agents antitumoraux associés. De plus, nous avons identifiés deux nouveaux apocaroténoïdes jamais décrits dans la littérature, ainsi que d'autres métabolites connus mais non décrits jusqu'alors dans cette espèce.

CHAPITRE 2

Article soumis dans Chemico-Biological Interactions

POLYMETHOXYFLAVONES FROM *Gardenia oudiepe* (RUBIACEAE) INDUCE CYTOSKELETON DISRUPTION-MEDIATED APOPTOSIS AND SENSITIZE BRAF-MUTATED MELANOMA CELLS TO CHEMOTHERAPY

Raimundo Gonçalves de Oliveira-Júnior¹, Nolwenn Marcoult-Fréville¹, Grégoire Prunier¹, Laureen Beaugeard¹, Edilson Beserra de Alencar Filho², Eduard David Simões Mourão², Sylvie Michel³, Lucindo José Quintans-Júnior⁴, Jackson Roberto Guedes da Silva Almeida⁵, Raphaël Grougnet^{3#}, Laurent Picot^{1#*}

¹ LIENSs UMRi CNRS 7266, La Rochelle Université, 17042 La Rochelle, France.

² Department of Pharmacy, Universidade Federal do Vale do São Francisco, 56304-205, Petrolina, Pernambuco, Brazil.

³ Equipe Produits Naturels, Analyse, Synthèse, UMR CNRS 8038, Université Paris Descartes, 75006 Paris, France.

⁴ LANEF, Universidade Federal de Sergipe, 49100-000 São Cristóvão, Sergipe, Brazil

⁵ NEPLAME, Universidade Federal do Vale do São Francisco, 56304-205, Petrolina, Pernambuco, Brazil.

*Corresponding authors at: 1) UMRi CNRS 7266 LIENSs, La Rochelle Université, Curie B101 Faculté des Sciences et Technologies, Avenue Michel Crépeau, 17042 La Rochelle, France. E-mail address: laurent.picot@univ-lr.fr (Laurent Picot).

Both authors have equally contributed to the supervision of this study.

ABSTRACT

A series of 10 natural and semisynthetic flavonoids (**1** to **10**) were obtained from *Gardenia oudiepe* (Rubiaceae), an endemic plant from New Caledonia. Most of them were polymethoxylated flavones (PMFs) of rare occurrence. After a cell viability screening test, PMFs **2** and **3** showed significant cytotoxic activity against A2058 human melanoma cells ($IC_{50} = 3.92$ and $8.18 \mu\text{M}$, respectively) and were selected for in-depth pharmacological assays. Both compounds inhibited cell migration and induced apoptosis and cell cycle arrest after 72h of treatment. Immunofluorescence assays indicated that these outcomes were possibly related to the induction of cytoskeleton disruption associated to actin and tubulin depolymerization. These data were confirmed by molecular docking studies, which showed a good interaction between PMFs **2** and **3** and tubulin, particularly at the colchicine binding site. As A2058 are considered as chemoresistant to conventional chemotherapy, compounds **2** and **3** ($1/2IC_{50}$) were associated to clinically-used antimelanoma drugs (vemurafenib and dacarbazine) and combined therapies efficacy was assessed by the MTT assay. PMFs **2** restored the sensitivity of A2058 cells to dacarbazine treatment ($IC_{50} = 49.38 \mu\text{M}$ vs. $>100 \mu\text{M}$). Taken together, these data suggest that PMFs from *G. oudiepe* could be potential leaders for the design of new antimelanoma drugs.

Keywords: apoptosis; cancer; cytoskeleton; flavonoids; melanoma; multidrug resistance.

1. Introduction

Malignant melanoma is one of the most aggressive forms of skin cancer. Although it accounts for about 1% of all malignant skin tumors diagnosed in developed countries (e.g. USA), cutaneous melanoma is responsible for most of skin cancer deaths [1]. It presents a high invasive and metastatic potential, which hinders its treatment by conventional therapies. When the diagnosis is delayed, melanoma metastasis spreads quickly into many organs (e.g. bones, liver, brain, lungs, etc.) and survival rate falls down dramatically [2,3]. Until recent years, the treatment of advanced melanoma was very limited, mostly focused on the use of dacarbazine, an alkylating agent used as monotherapy or combined with other conventional anticancer drugs [4]. Fortunately, new therapeutic options have emerged in the past decades. Promising results were obtained with small molecules targeting the RAF/MEK pathway (e.g. vemurafenib and dabrafenib, two BRAF inhibitors; and trametinib, a MEK inhibitor), mainly in BRAF-mutated metastatic melanoma [5–7]. However, multidrug resistance mechanisms are increasingly common in melanoma cells, requiring the use of first-line drugs at high doses or even combinations of several drugs (e.g. BRAF inhibitors could be combined with alkylating agents or MEK inhibitors) [8–10]. Depending on the clinical stage, these therapeutic approaches are no longer efficient and usually generate harmful side effects [11,12].

Recent studies have investigated flavonoids as new candidates for the treatment of melanoma. They exhibited significant cytotoxicity against several tumor cell lines through down-regulation of growth factors (e.g. EGF and VEGF), alterations of survival signaling pathways (e.g. ERK, Akt-1, NF- κ B, JNK, MAPK), cell cycle arrest and apoptosis induction by modulation of pro-apoptotic and anti-apoptotic proteins (e.g. caspases, Bcl-2, Bcl-xL, Bad,) and oxidative stress [13–17]. Among flavonoids with promising antitumor potential, polymethoxyflavones (PMFs) have been highlighted because of their pharmacological versatility, acting as multitarget drugs in numerous experimental models. In addition to modulating signaling pathways typically involved in apoptosis and cell proliferation [18,19], previous studies have shown that PMFs induce cytoskeleton disarrangement associated with depolymerization of actin filaments and microtubules [20,21]. PMFs are also capable of sensitizing cancer cells to chemotherapy, enhancing the efficacy of clinically-used anticancer drugs with no additional toxicity [22,23].

Although the anticancer effects of PMFs have been previously reported, their antimelanoma potential is still largely unexplored to date. In this context, the aim of this study was to investigate the antimelanoma effects of natural and semisynthetic flavones from *Gardenia oudiepe* (Rubiaceae), a non-endangered shrub endemic to New Caledonia. These

molecules were obtained from bud exudates of the plant and exhibit rare substitution patterns on A and B rings. In this paper, we describe the influence of the methoxy/hydroxy substituents on the antimelanoma activity of a PMFs series. Besides, we provide unprecedented evidences about two flavones with pro-apoptotic activity mediated by caspase activation and cytoskeleton disruption in chemoresistant BRAF-mutated melanoma cells.

2. Materials and Methods

2.1. Plant material

Bud exudates of *G. oudiepe* were collected in October 2008 in Forêt Plate, North Province of New Caledonia. After plant identification, a voucher specimen (POU-0290) was deposited at the Herbarium of the Botanical and Tropical Ecology Department of the IRD Center, Noumea, New Caledonia.

2.2. Isolation of flavones 1–7 from *G. oudiepe*

Bud exudates of *G. oudiepe* (200.0 g) were dissolved in dichloromethane. After filtration and evaporation of the solvent, 52.0 g of exudates free from vegetal pieces were recovered. Chromatographic fractionations on normal phase silica gel using cyclohexane/dichloromethane and dichloromethane/methanol (increasing polarity) as eluent solvents provided flavones **1–7**.

2.3. Semi-synthesis of flavones 8–10 from kaempferol

Flavones **8 – 10** were obtained as previously reported [24]. Compound **8** was obtained by methylation of kaempferol (100 mg) (Sigma-Aldrich[®], France), using 4 equiv. of dimethyl sulfate (Me₂SO₄) and 2 equiv. of 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene (DBU). The reaction was performed at room temperature in dried acetone for 1 h. After precipitation and washing with iced water, obtained residues were solubilized with ethyl acetate (15 mL) and treated with a solution of 1 N HCl (3 mL). Finally, reaction product was extracted with ethyl acetate (3 x 10 mL) and the organic phase was washed with a saturated solution of NaCl, then dried over Na₂SO₄. Paper filtration and solvent evaporation provided a mixture, which was purified by silica gel column chromatography using as eluent dichloromethane/methanol (95/5, v/v, yield: 70%).

For preparation of compounds **9** and **10**, kaempferol (80 mg, 0.28 mmol) was acetylated using acetic anhydride in dry pyridine. The reaction was performed by stirring for 15 min at

room temperature. After precipitation and washing with iced water, recrystallization in CH₂Cl₂/CH₃OH (9/1, v/v) provided 108 mg (0.26 mmol) of triacetyl derivative **9** (yield: 95%). The same procedure for the semi-synthesis of **9** was applied for 4 h instead of 15 min. After precipitation and washing with iced water, recrystallization in CH₂Cl₂/CH₃OH (9/1, v/v) provided 120 mg (0.26 mmol) of tetra acetyl derivative **10** (yield: 95%). ¹H and ¹³C NMR data of **8** – **10** were in accordance with those previously reported [24,25].

2.4. Cell line and culture conditions

All pharmacological assays were performed on A2058 human melanoma cells (ATCC® CRL-11147, LGC ATCC Standards, France). This aggressive cell line expresses the oncogenic BRAF V600E mutation and is therefore considered as highly invasive and metastatic. Previously, we have demonstrated that this cell line is also resistant to conventional chemotherapy [26]. Cells were grown in DMEM culture medium and supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and 1% penicillin-streptomycin (Dominique Dutscher, France), at 37 °C in humidified atmosphere with 5% CO₂.

2.5. Cell viability assay

Compounds **1** – **10** were solubilized in DMSO at 10⁻² M and diluted in DMEM to obtain 10 μM solutions. Final concentrations of DMSO were lower than 1%, tested as negative control and validated as non-cytotoxic concentration. Cell viability was determined by the MTT assay as previously reported [27]. Confluent cells were trypsinized and centrifuged at 1200 g for 5 min. The supernatant was discarded and cell pellet was suspended in culture cell medium to obtain a 4 x 10⁴ cel.mL⁻¹ suspension. Cells (2 x 10³/well) were added into 96-well plates with **1** – **10** (10 μM) and incubated for 72 h. After treatments, 20 μL of a MTT solution (5 g.L⁻¹) was added to each well and microplates were incubated for 4 h. Formazan crystals were dissolved in DMSO (100 μL) and absorbances were measured using a FLUOstar Omega microplate reader (BMG Labtech, France). Cell viability was expressed as percentage of growth inhibition (GI%). Photomicrographs after treatments were obtained in a Nikon Eclipse TS100 inverted microscope (magnification X100) equipped with a numeric camera. The most bioactive flavones (**2** and **3**) were subsequently tested at increasing concentrations (1 – 20 μM) to determine their IC₅₀ by non-linear regression analysis.

2.6. Cell migration assay

Cell migration was determined by the wound healing assay as previously described [26]. Cells (2×10^3 /well) were grown in 24-well plates to 90% confluence. Cell monolayers were scratched with a sterile plastic tip, washed with PBS solution and incubated in a new cell culture medium containing low-toxic concentrations of **2** or **3** ($1/2IC_{50} = 2$ and $4 \mu\text{M}$, respectively) for 48 h. Cell migration was recorded using a ZEISS Axion Observer microscope in living cell mode (one photomicrograph every 10 min). Cell migration was calculated at 0, 24 and 48h of treatment by measuring the cell surface using ImageJ[®] software.

2.7. Apoptosis analysis

2.7.1. Annexin-V/6-CFDA staining

A2058 cells were incubated in 4-well slides (5×10^3 /well) for 24 h and then exposed to the PMFs **2** ($4 \mu\text{M}$, IC_{50}) and **3** ($8 \mu\text{M}$, IC_{50}) during 72 h. After treatments, cells were washed with PBS and double stained with annexin V-Cy3 (red fluorescence) and 6-carboxyfluorescein diacetate (6-CFDA, green fluorescence) solution, according to manufacturer's recommendations (Sigma-Aldrich[®], France). Before visualization, DAPI was added to wells for DNA staining of necrotic cells. Staurosporine ($1 \mu\text{M}$, for 4 h) was used as standard drug. Cells were observed under fluorescence microscope (ZEISS Axion Observer, France).

2.7.2. Caspase-3 activity

Caspase-3 activity was determined using a commercial assay based on the hydrolysis of Ac-DEVD-pNA (CASP3C kit, Sigma-Aldrich[®], France). Cells (2.5 mL of a cell suspension at $5 \times 10^5 \text{ cel.mL}^{-1}$) were incubated in 75 cm^2 flasks and exposed to cell culture medium (12.5 mL , negative control) or compounds **2** ($4 \mu\text{M}$, IC_{50}) and **3** ($8 \mu\text{M}$, IC_{50}) for 72 h. After treatments, cells were washed with PBS, lysed with lysis buffer and the enzymatic activity was measured according to manufacturer's recommendations. Results were expressed as $\mu\text{mol pNA/min/mL}$. Staurosporine ($1 \mu\text{M}$, for 4 h) was used as standard drug.

2.8. Cell cycle analysis

Cell cycle analysis was performed by flow cytometry, using propidium iodide (PI) staining. A2058 cells were grown in control culture medium or treated with the PMFs **2** ($4 \mu\text{M}$, IC_{50}) and **3** ($8 \mu\text{M}$, IC_{50}) for 72 h. Then, cells were stained in PBS containing PI $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$, RNase A $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ and 0.1% Triton X-100 (ThermoFisher Scientific, France), at $37 \text{ }^\circ\text{C}$ for 15 min. After staining, melanoma cells were analyzed using a FACS Cantoll flux cytometer

(BD Biosciences, France) equipped with an air cooled blue LASER ($\lambda = 488 \text{ nm}$, 20 mW). Light diffusion parameters (forward and lateral scatter lights) were adjusted to define the size threshold excluding cellular debris and cell clusters for single-cell fluorescence analysis. PI fluorescence was measured using a FL3 filter ($\lambda = 670 \text{ nm}$) and analyzed using the BD FACS Diva Software (BD Biosciences, France). Distribution of A2058 cells in different cell cycle phases was determined according to their DNA content as measured by the fluorescence intensity of PI: diploid cells (2n): G0/G1 phase; replicative cells ($2n < \text{DNA content} < 4n$): S phase; tetraploid cells (4n): G2/M phase; hypodiploid cells (DNA content $< 2n$): apoptotic sub-G1 phase [26,28].

2.9. Cytoskeleton analysis

2.9.1. Actin staining with phalloidin

Cells were incubated in 4-well culture slides ($1 \times 10^4/\text{well}$) for 24 h. After incubation, cells were treated with compounds **2** ($4 \mu\text{M}$, IC_{50}) and **3** ($8 \mu\text{M}$, IC_{50}) for 24 h, washed with PBS and then fixed with 4% paraformaldehyde, for 15 min at $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Subsequently, cells were permeabilized with 0.1% Triton X100 for 10 min, washed with PBS and stained with a fluorescent conjugated phalloidin solution (Phalloidin-TRITC $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, Sigma-Aldrich®, France) for 40 min at room temperature. After phalloidin staining, DAPI was added to all wells for nucleus staining (15 min, at room temperature). Finally, cells were washed with PBS to remove excess staining solution and immediately visualized under fluorescence microscope (ZEISS Axion Observer, France).

2.9.2. Immunofluorescence assay for α -tubulin staining

Melanoma cells were grown in 4-well culture slides ($1 \times 10^4/\text{well}$) for 24 h, washed with PBS and then exposed to PMFs **2** ($4 \mu\text{M}$, IC_{50}) and **3** ($8 \mu\text{M}$, IC_{50}) for 24 h. Cells were fixed with 4% paraformaldehyde in PBS, for 15 min at $37 \text{ }^\circ\text{C}$. After fixation, cells were permeabilized and saturated with a 3% BSA solution containing 0.1% Triton X100 in PBS, and then incubated overnight at $4 \text{ }^\circ\text{C}$ with a mouse anti- α -tubulin-FITC monoclonal antibody (Sigma-Aldrich®, France) at 1:50 dilution in PBS. After incubation, cells were washed with PBS and nucleus staining was performed with a DAPI solution during 15 min at room temperature. Photomicrographs were taken on a Zeiss fluorescence microscope (ZEISS Axion Observer, France).

2.10. Docking study

Molecular docking procedures were performed to access the interaction modes for **2** and **3** with tubulin. Analyses were performed using both nocodazole and colchicine binding sites, which are slightly displaced in the region between the A and B domains of tubulin [29]. Crystallographic structures of tubulin complexed with colchicine and nocodazole were obtained from RCSB protein data bank [29,30] (<https://www.rcsb.org/>), under the codes PDB IDs: 4O2B and 5CA1, respectively. The use of colchicine and nocodazole complexes with tubulin aimed to compare the interaction modes of **2** and **3**, considering the specificities of these two crystallographic structures, both available on RCSB PDB data bank.

All the docking procedures were made using the Autodock Vina [31] module of Autodock and AutodockTools packages [32]. This module contains a more recent algorithm that provides better results in comparison with the original Lamarckian Genetic Algorithm of Autodock, with a very smallest computational cost [31].

Before docking procedures, an initial geometry optimization of the ligands was made through the PM3 semiempirical Hamiltonian, using the Gaussian 09W package [33], installed on CENAPAD-UFC cluster architecture (<http://www.cenapad.ufc.br/>). Redocking procedure was performed using the crystallographic structure of colchicine and nocodazole complexes, considering a grid box with dimensions of 14 x 14 x 14 Å and internal spacing of 1.0 Å (default of Vina), providing excellent results concerning energy and RMSD (Root Mean Square Deviation) values. The last parameter must be lower than 2.0 Å for an acceptable redocking analysis. Then, the same parameters were used for the docking procedures using **2** and **3**. 2D and 3D images were generated with Chimera 1.13.1rc [34] and Maestro free module of Schrodinger package [35]. Thus, conformers, orientations, interaction profiles and energies generated were analyzed to corroborate the experimental bioactivity data.

2.11. Chemosensitization of melanoma cells to chemotherapy

The chemosensitizing effect of compounds **2** and **3** was evaluated by measuring cell viability in 96-well plates. Cells (2×10^3 /well) were treated with low-toxic concentrations of **2** (2 µM, $\frac{1}{2}IC_{50}$) and **3** (4 µM, $\frac{1}{2}IC_{50}$) in combination with increasing concentrations of vemurafenib and dacarbazine (1 – 100 µM). Vemurafenib (Selleckchem[®], France) and dacarbazine (Sigma-Aldrich[®], France) were also tested alone to compare their antiproliferative activity with those of combined treatments. After 72 h of treatment, cell viability was determined using the MTT assay as described above and results were expressed as IC_{50} . The combination index (CI) was calculated using the software CompuSyn (version 1.0), according

to Chou-Talalay method [36]. $CI < 1.0$ indicates synergism, $CI > 1.0$ indicates antagonism, and $CI \cong 1.0$ indicates an additive effect.

2.12. Statistical analysis

All results are presented as mean \pm standard error of the mean (SEM), from at least three independent measurements ($n=3$). Statistical analysis was performed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test or unpaired Student's t test, according to the case. Values of $p < 0.05$ were considered statistically significant. All analyses were performed using GraphPad Prism 6.0 software (GraphPad Prism Software, Inc., San Diego, CA, USA).

3. Results and Discussion

3.1. Structure-activity relationship

Previous reports have shown that flavon-3-ol are potential candidates for new anticancer drugs and methylation of these compounds frequently improves their antiproliferative effect against tumor cells [21,37,38]. However, the influence of the hydroxy and methoxy substitution pattern of the flavone core remains unclear in terms of antimelanoma potential. This prompted us to screen a series of natural 3-methoxy-PMFs (**1-8**) together with two acetylated kaempferol derivatives (**9, 10**) for antiproliferative activity toward A2058 melanoma cells at 10 μ M. This aggressive cancer cell line expresses the oncogenic BRAF V600E mutation and is therefore considered as highly invasive and metastatic. The resistance of this cell line to conventional chemotherapy was previously demonstrated [26].

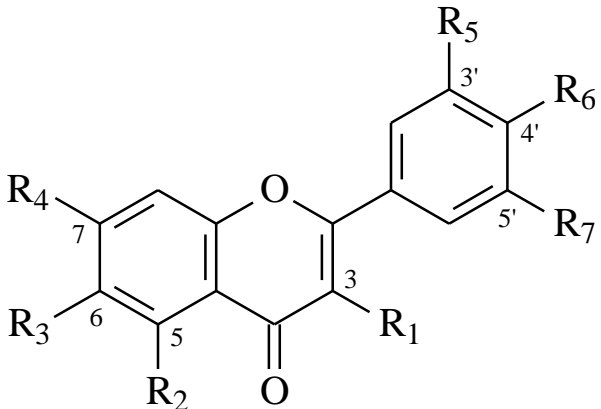
Considering the obtained results, some structure-activity relationships may be established (Table 1). PMFs **2**, with a structure including a 5,7-dihydroxy-6-methoxy A-ring, a 3-methoxy C-ring and one methoxy group on the B-ring on position C4', was the most active with 66.53% of growth inhibition. Compound **2**, with an additional methoxy group on C3' and a hydroxyl group on C5' still demonstrated 42.86% of growth inhibition. With the same A- and C-rings, less or more hindered B-ring led to dramatically less efficient derivatives **1** (bearing a single phenol on C4') and **4** (3',4', 5'-trimethoxy).

Flavones **8** and **6-7**, with the same B- and C-rings than **2** and **3**, respectively, but with modified pattern on A-ring (5,7-dihydroxy or 5-hydroxy-7-methoxy), were also much less active. Acetylated derivatives **9** and **10** did not show any relevant antiproliferative activity.

In summary, 5,7-dihydroxy-6-methoxy A-ring and methoxy groups on C3 and C4' seem to be crucial for antimelanoma activity, in agreement with previous studies involving other

types of tumor cell lines [39–42]. In order to decipher the mode of action of the most active PMFs, we decided to conduct a thorough pharmacological study of compounds **2** and **3**.

Table 1. Chemical structures and antiproliferative activity of compounds **1-10**.

Substitution pattern	Compound (PMF)	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇	Antiproliferative activity (%)
	1	OMe	OH	OMe	OH	H	OH	H	18.55 ± 5.16
	2	OMe	OH	OMe	OH	H	OMe	H	66.53 ± 5.71
	3	OMe	OH	OMe	OH	OMe	OMe	OH	42.86 ± 8.27
	4	OMe	OH	OMe	OH	OMe	OMe	OMe	5.68 ± 5.00
	5	OMe	OH	H	OH	H	OH	H	22.29 ± 6.69
	6	OMe	OH	H	OH	OMe	OMe	OH	20.80 ± 6.50
	7	OMe	OH	H	OMe	OMe	OMe	OH	29.48 ± 4.95
	8	OMe	OH	H	OMe	H	OMe	H	29.79 ± 9.77
	9	OAc	OH	H	OAc	H	OAc	H	7.04 ± 7.39
	10	OAc	OAc	H	OAc	H	OAc	H	10.13 ± 5.27

Mean ± SEM of at least 3 determinations. PMF: polymethoxyflavone. All compounds were tested at 10 μM.

3.2. PMFs inhibit cell growth

The antiproliferative effect of compounds **2** and **3** on A2058 melanoma cells was determined by the MTT assay. Cells were treated with increasing concentrations (1 – 20 μM) of **2** and **3** for 72h and then IC_{50} values were calculated. PMFs **2** and **3** inhibited cell growth in a concentration-dependent manner, resulting in cell mortality increased by 90-92% upon treatment with 20 μM of both compounds (Figure 1). IC_{50} values for **2** and **3** were 3.92 and 8.18 μM respectively, indicating a stronger antiproliferative activity when compared to several methoxyflavones previously evaluated against human melanoma cells [21].

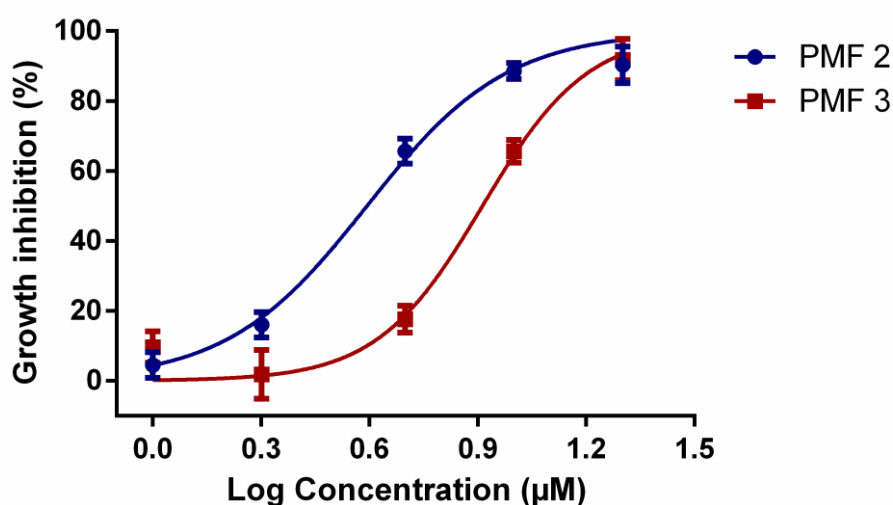


Figure 1. Effect of PMFs **2** and **3** on A2058 melanoma cells viability. Cells were cultured in the presence of increasing concentrations of molecules (1 – 20 μM) for 72h and then cell viability was determined by the MTT assay. Results are expressed as mean \pm SEM of at least three independent measurements.

3.3. PMFs induce apoptosis

Apoptosis induction is one of the most common effects provoked by anticancer drugs. In this sense, the pro-apoptotic effect of **2** and **3** was determined by double fluorescence staining with Annexin-V and 6-CFDA. DAPI was also used for DNA staining of permeable cells. As shown in Figure 2A, PMFs **2** (4 μM , $\sim\text{IC}_{50}$) and **3** (8 μM , $\sim\text{IC}_{50}$) increased the number of annexin-V and 6-CFDA double-stained cells compared to control, suggesting a significant pro-apoptotic activity. Besides, characteristic apoptotic features were observed in A2058 cells treated with **2** and **3**, including rounding cell, chromatin condensation, nuclear fragmentation

and apoptotic bodies. In contrast, these morphological changes were not evidenced in untreated cells.

To confirm the pro-apoptotic effect of the flavones, the caspase-3 activity, a hallmark of apoptosis, was also determined. Caspase-3 is an executor caspase and displays important role in both intrinsic and extrinsic apoptosis pathways. It is indispensable for certain processes associated with cell dismantling, such as apoptotic chromatin condensation, DNA fragmentation and formation of apoptotic bodies [43]. After 72h of treatment, both PMFs increased the caspase-3 activity compared to untreated cells ($p < 0.05$), confirming their capacity to induce apoptosis. Similar results were obtained for staurosporine (2 μM), a pro-apoptotic standard drug (Figure 2B).

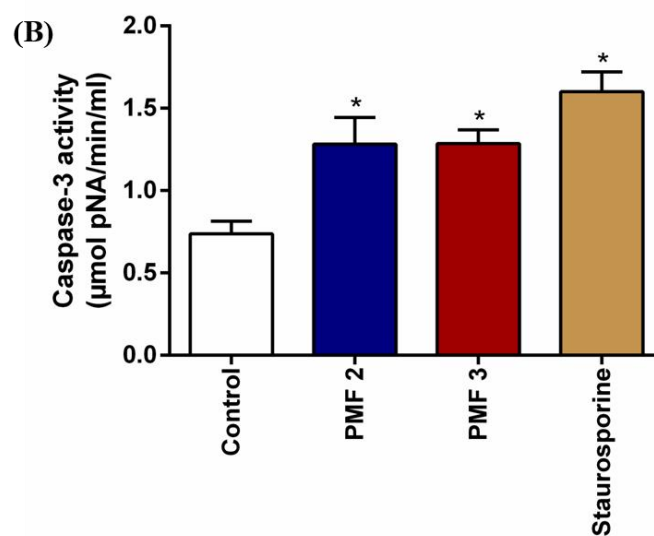
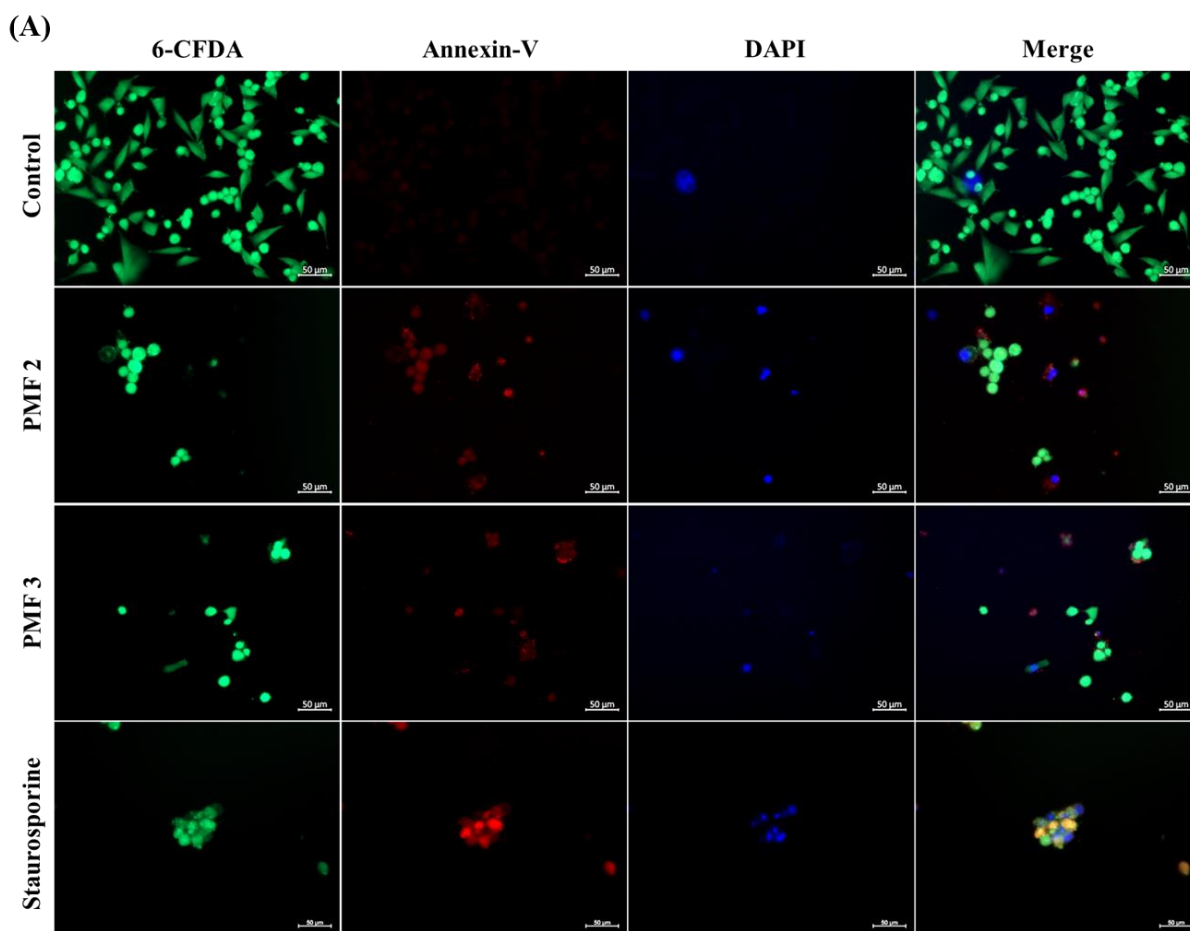


Figure 2. Pro-apoptotic effect of PMFs **2** (4 μ M, \sim IC₅₀) and **3** (8 μ M, \sim IC₅₀) on A2058 melanoma cells. (A) Photomicrographs were obtained after 72h of treatment using Annexin-V/6-CFDA double staining + DAPI for DNA staining of permeable cells. (B) Caspase-3 activity was determined by colorimetric assay. Staurosporine (2 μ M, 4h) was used as positive control. Data are expressed as mean \pm SEM, * p < 0.05 (vs. control group), according to ANOVA one-way followed by Tukey's post-test (n=3).

3.4. PMFs induce cell cycle arrest

To assess whether PMFs-induced cell growth inhibition was mediated via alterations in cell cycle progression, we investigated the effect of flavones **2** and **3** on cell cycle phase distribution by flow cytometry. Cell cycle phases were determined according to the DNA content, stained with propidium iodide solution. Exposure to compound **2** (4 μ M, \sim IC₅₀) increased sub-G1 cell population, which consists of cells with typical DNA fragmentation patterns caused by internucleosomal cleavage of chromatin, corroborating the pro-apoptotic effect previously demonstrated. In addition, PMF **2** caused a significant G2/M arrest at the expense of G0/G1 phase cell population (Figure 3). No relevant effect on cell cycle was observed for compound **3**-treated cells.

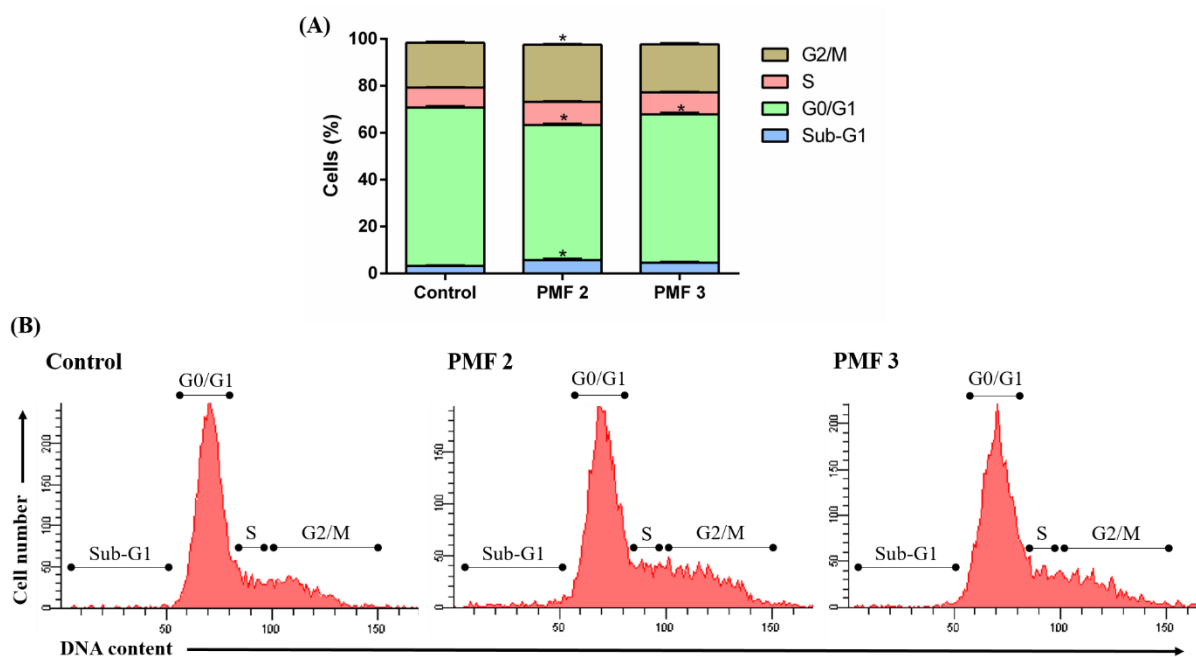


Figure 3. Effects of PMFs **2** (4 μ M, \sim IC₅₀) and **3** (8 μ M, \sim IC₅₀) on cell cycle progression after 72h of treatment. After incubation, melanoma cells were stained with propidium iodide and measured by flow cytometry, as shown in the quantitative distribution of cells in different phases of cell cycle (A) and in the representative histograms (B). Data are expressed as mean \pm SEM, * p <0.05 (vs. control group) according to ANOVA one-way followed by Tukey's post-test, from at least three independent measurements (n=3).

3.5. PMFs inhibit cell migration

As A2058 cell line has high invasive and metastatic potential, we determined the effect of PMFs **2** and **3** on cell motility by wound healing assay. To eliminate any interference of cytotoxicity-associated effects, compounds were tested at low-cytotoxic concentrations, equivalent to half of the calculated IC_{50} values ($1/2IC_{50} \sim 2$ and $4 \mu\text{M}$ for PMFs **2** and **3**, respectively). At these concentrations, **2** and **3** exerted minimal cytotoxicity, showing growth inhibition (GI) = 11.54 ± 3.81 and $15.35 \pm 4.89\%$, respectively, according to the MTT assay. As presented in Figure 4, the flavones **2** and **3** significantly reduced cell migration after 24 and 48h of exposure ($p < 0.05$). Interestingly, PMF **3**-treated cells were completely immobile, suggesting some relevant effects on cell morphology that would be compromising cell motility.

Generally, cell migration involves drastic changes in cell shape, which are mostly driven by the cytoskeleton. It is a highly integrated multistep process that is initiated by the protrusion of the cell membrane, followed by cell remodeling and retraction movements. Firstly, chemoattractant agents stimulate intracellular signaling pathways responsible for regulating actin filaments reorganization. The actin cytoskeleton is essential for the formation of protrusive structures and transducing the mechanical forces necessary for cell translocation at the leading edge. Subsequently, contractile forces mediated by actin/myosin stress fibers promote cell retraction, allowing the translocation of the cytoplasm and nucleus toward the leading edge. In parallel, microtubules play an important role in cell remodeling contributing to retraction movements. Previous studies have revealed that movements are significantly inhibited in cells treated with drugs known to interfere with microtubules assembly, which makes them less dynamic and less able to remodel [44–47]. In this context, we hypothesized that PMFs **2** and **3** would be inhibiting cell migration through cytoskeleton disruption.

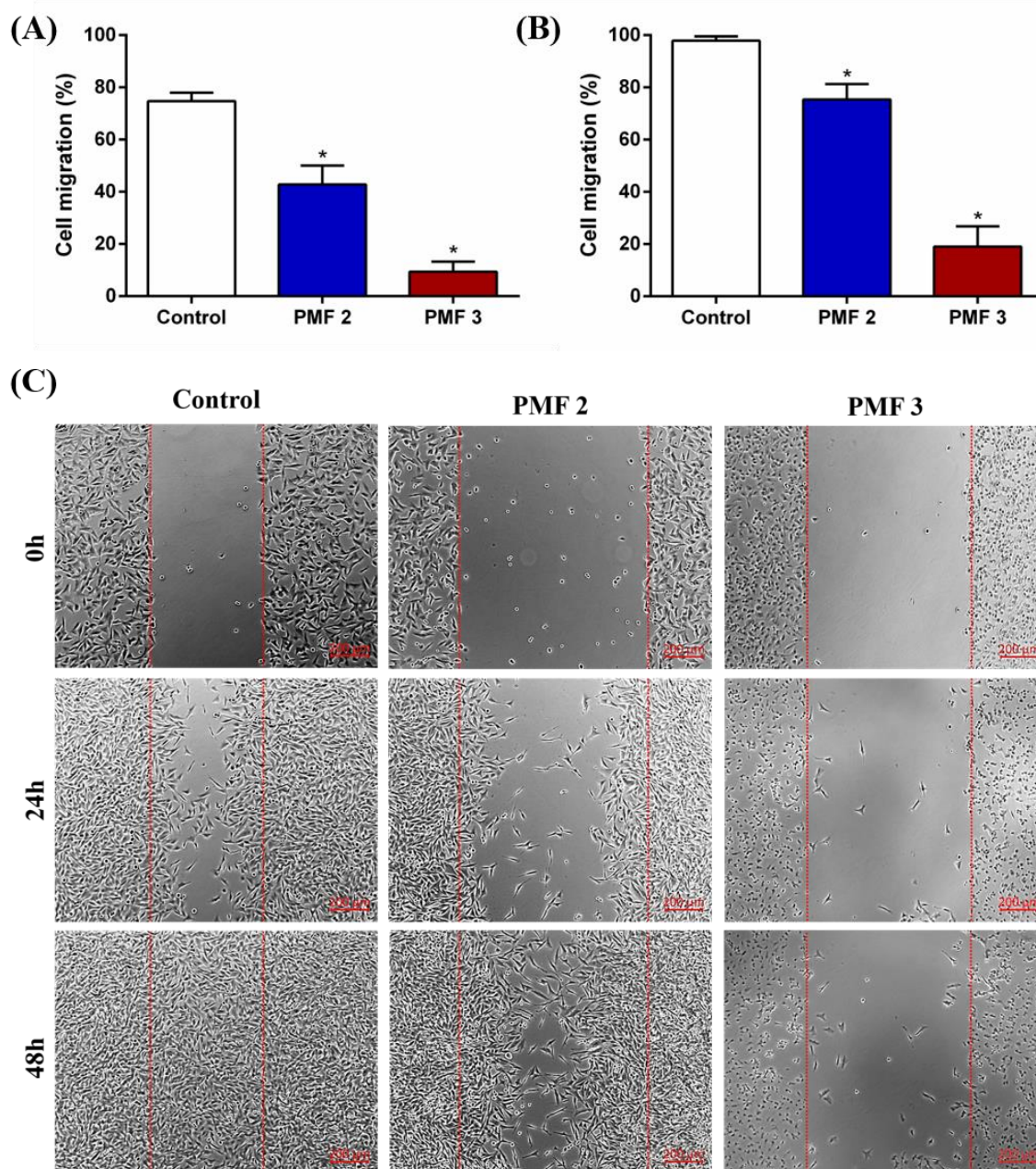


Figure 4. Effect of compounds **2** (2 μM , $\sim 1/2\text{IC}_{50}$) and **3** (4 μM , $\sim 1/2\text{IC}_{50}$) on cell mobility after 24h (A) and 48h (B) of treatment. Photomicrographs illustrate cell migration into the zone free of cells according to the treatment (C). Data are expressed as mean \pm SEM, $*p < 0.05$ (ANOVA one-way followed by Tukey's post-test), from at least three independent measurements.

3.6. PMFs promote cytoskeleton disruption

In order to assess the effect of flavones **2** and **3** on cytoskeleton integrity, A2058 cells were treated for 24h with both compounds at their respective IC_{50} (~ 4 and $8 \mu\text{M}$), and then actin filaments and microtubules structures were visualized by staining with phalloidin and immunofluorescence using a FITC-conjugated anti- α -tubulin monoclonal antibody,

respectively. As shown in Figure 5, untreated cells commonly appeared as fusiform cells with ramifications, presenting microfilaments that formed typical parallel stress fibers. In contrast, **2** and **3**-treated cells showed rounding morphology with the presence of peripheral ring of actin near the nucleus, blebbing and accumulation of fragmented F-actin, suggesting that these molecules altered actin filaments organization. These changes may be related not only to the effect on cell motility, but also to the previously shown pro-apoptotic activity. When cells undergo apoptosis, they partially detach from the extracellular matrix, round up, contract, and disassemble peripheral adhesion complexes. Concomitantly, there is loss of stress fibers and actin is rearranged into a peripheral ring. Finally, dynamic membrane protrusions (blebs) are formed followed by actin depolymerization, resulting in the formation of apoptotic bodies. As actin depolymerization has been shown to induce an apoptotic response in various cell lines, altered actin filaments dynamic seems to act as sensor and mediator of apoptosis [48–50].

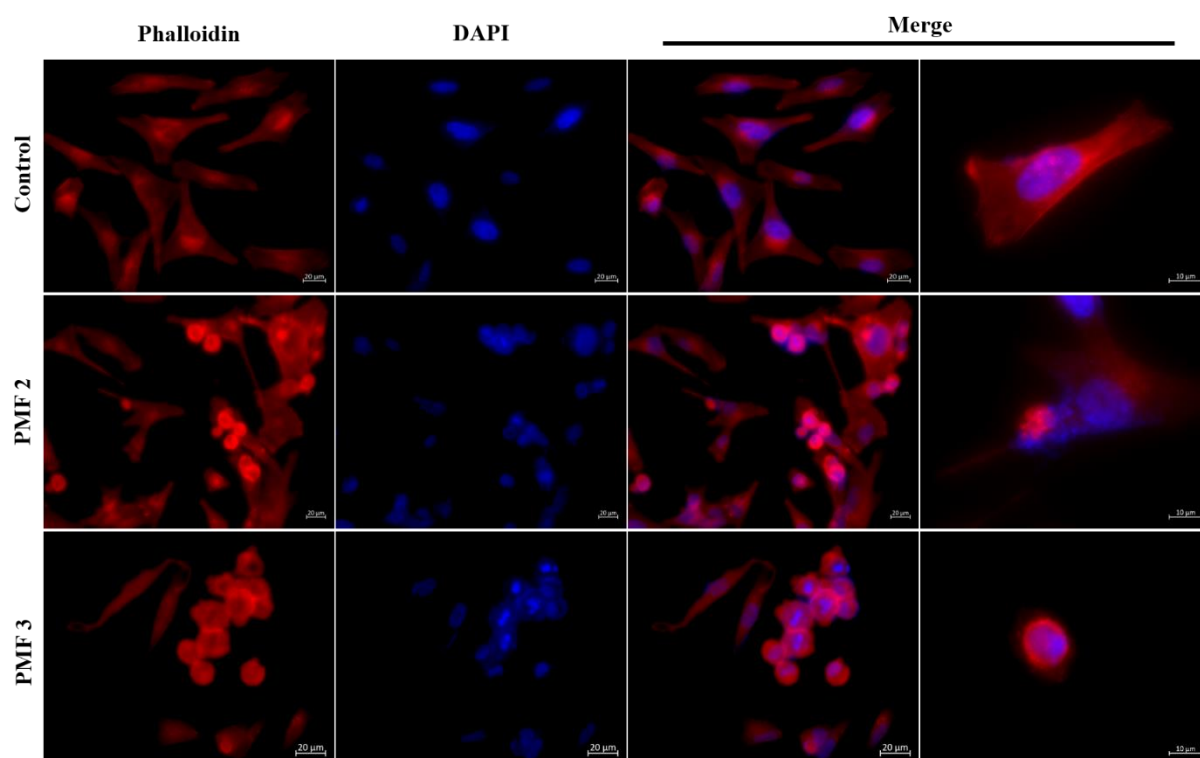


Figure 5. Effect of PMFs **2** (4 μ M, IC_{50}) and **3** (8 μ M, IC_{50}) on actin filaments of A2058 cells. After 24h of treatment, cells were fixed, permeabilized and actin filaments were stained with TRITC-conjugated phalloidin. DAPI was used for DNA staining. Photomicrographs were obtained under fluorescence microscope. Note the stress fiber formation in control cells and the decreasing of actin filaments and perinuclear accumulation of F-actin in PMF **2** and **3**-treated cells.

On the other hand, actin depolymerization can be also understood as a consequence of cytoskeleton disruption frequently associated to microtubules depolymerization. For this reason, we investigated the effect of PMFs **2** and **3** on tubulin dynamic. Melanoma cells were treated for 24h with **2** (4 μ M, \sim IC₅₀) and **3** (8 μ M, \sim IC₅₀), fixed with 4.0% paraformaldehyde, permeabilized and saturated with a PBS solution containing 0.1% triton X-100 and 3.0% BSA, and then stained with an anti- α -tubulin antibody, directly conjugated with FITC. DAPI was used to stain DNA content and cells were visualized under fluorescence microscope. In this assay, cells were also treated with nocodazole 50 nM (a tubulin destabilizing binder) and paclitaxel 50 nM (a tubulin stabilizing binder), allowing to compare different effects on microtubules with the ones observed for the flavonoids. Cells treated with **2** and **3** presented tubulin depolymerization, similar to nocodazole, as well as rounding morphology with accumulation of tubulin near the nucleus and blebbing. Paclitaxel-treated cells showed DNA fragmentation, a typical phenomenon in apoptosis, but microtubules were visibly stabilized (Figure 6).

Microtubules display important cellular functions including chromosomal segregation during cell division, intracellular transport and remodeling, and cell motility. Consequently, drugs that interfere with microtubule dynamics are able to block mitosis and cell migration, and induce cytoskeleton disruption-mediated apoptosis. In this context, tubulins are considered as valuable targets for anticancer drugs. Most of anti-tubulin drugs act on three well characterized sites, inhibiting tubulin polymerization (vinca alkaloids and colchicine sites) or preventing the microtubule disassembly (taxanes site) [51,52]. Recently, methoxylated flavones have been pointed as lead compounds in the design of new tubulin inhibitors. Although substitutions in the A-ring are apparently not relevant for this activity, previous studies have shown that methoxy groups on C3 and C4' are essential to promote tubulin depolymerization [21,38,53,54]. Considering that PMFs **2** and **3** have structural requirements for anti-tubulin activity and that their effects on microtubules were similar to nocodazole (a colchicine site binder), molecular docking studies were performed to better understand the interaction between tubulin with the flavones.

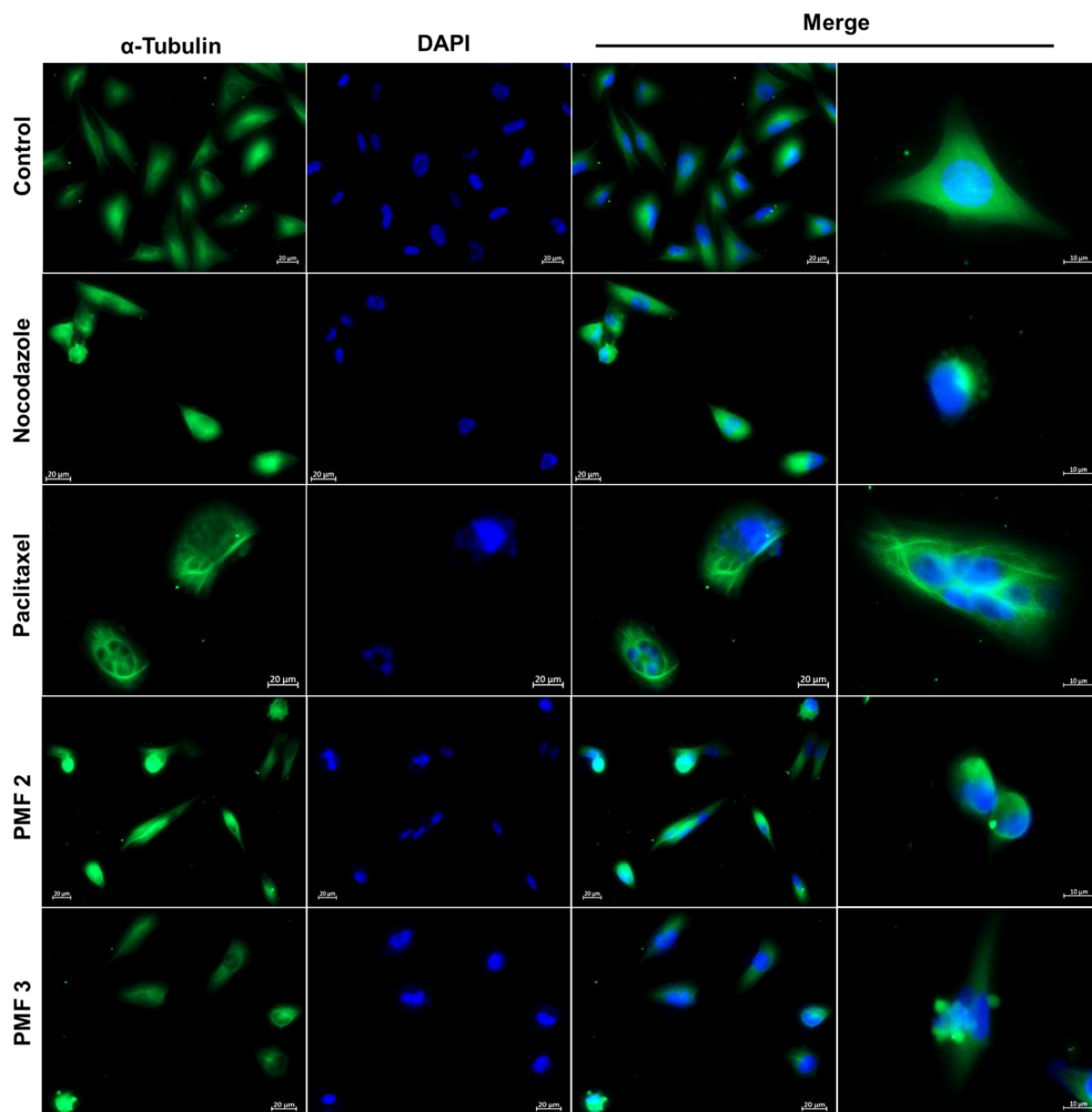


Figure 6. Effect of PMF **2** (4 μ M, IC₅₀) and **3** (8 μ M, IC₅₀), nocodazole (50 nM) and paclitaxel (50 nM) on microtubules organization of A2058 cells. After 24h of treatment, melanoma cells were fixed, permeabilized and α -tubulin was stained with a FITC-conjugated anti- α -tubulin monoclonal antibody. Photomicrographs were obtained under fluorescence microscope. Note intact microtubule network in control cells, while PMFs **2** and **3**-treated cells showed tubulin depolymerization (rounding morphology and perinuclear accumulation of tubulin), similar to nocodazole-treated cells.

3.7. Molecular docking studies

Molecular docking procedures were performed to access the interaction modes for **2** and **3** with tubulin. The analyses used both nocodazole and colchicine binding sites, which are

considered to be located in the same region, although slightly displaced between the A and B domains of tubulin [29] (Figure 7). It can be responsible for different modes of interaction with specific amino acids.

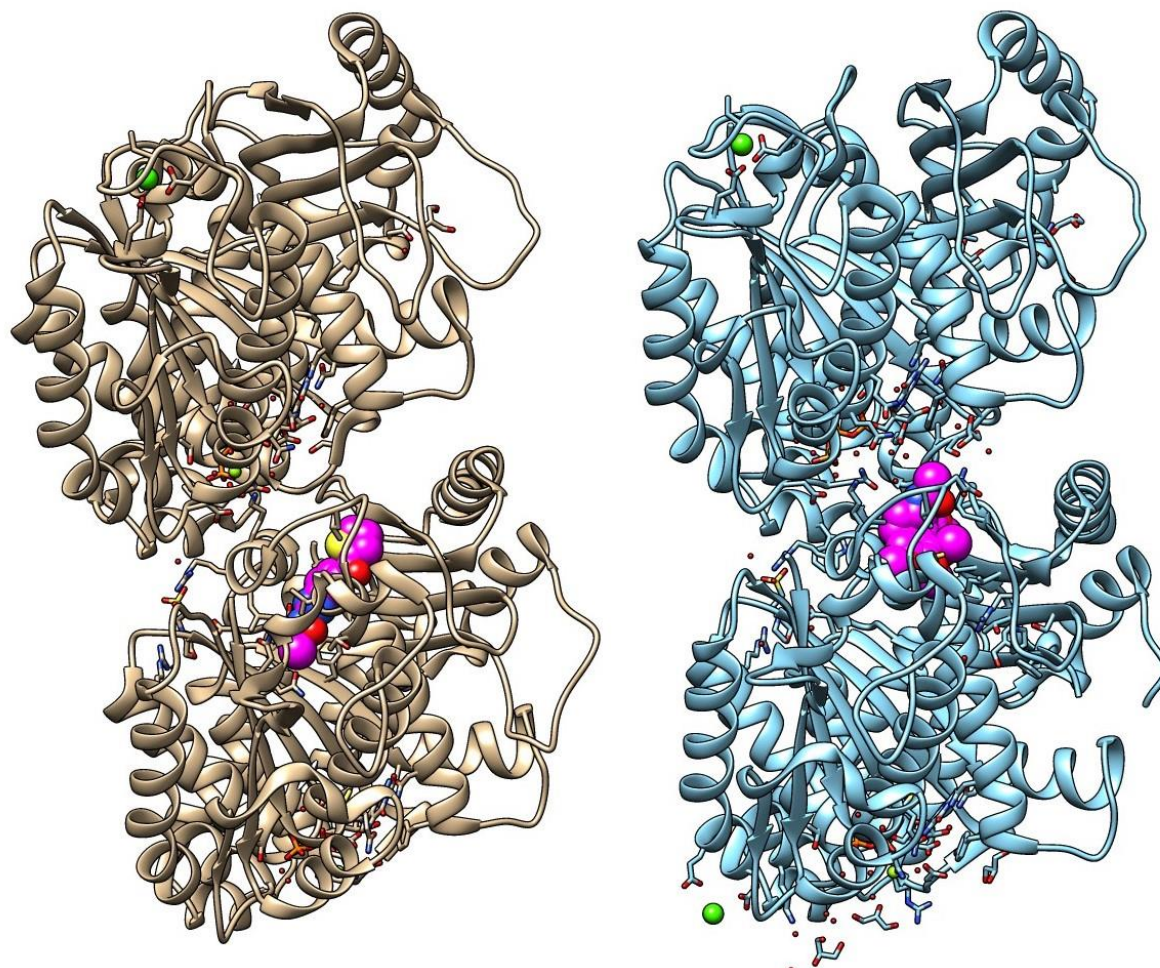


Figure 7. Binding sites of nocodazole (left) and colchicine (right) in tubulin. Both ligands are in magenta.

Initially, the original crystallographic complexes involving nocodazole and colchicine, with the tubulin, were submitted to a redocking procedure to check the efficiency of the Vina algorithm in these systems. Figure 8 (A and B) shows the best molecular geometries of colchicine and nocodazole after redockings (blue), comparing with the respective native geometries (orange). Binding energies (BE) and RMSD values for the best conformations of colchicine and nocodazole are given in Table 2. The excellent redocking results validate the Vina algorithm to verify the possible interaction modes for the tested flavonoids ($RMSD = 0.188 \text{ \AA}$ and $BE = -10 \text{ Kcal/mol}$ for colchicine; $RMSD = 1.085 \text{ \AA}$ and $BE = -9.0 \text{ Kcal/mol}$ for nocodazole).

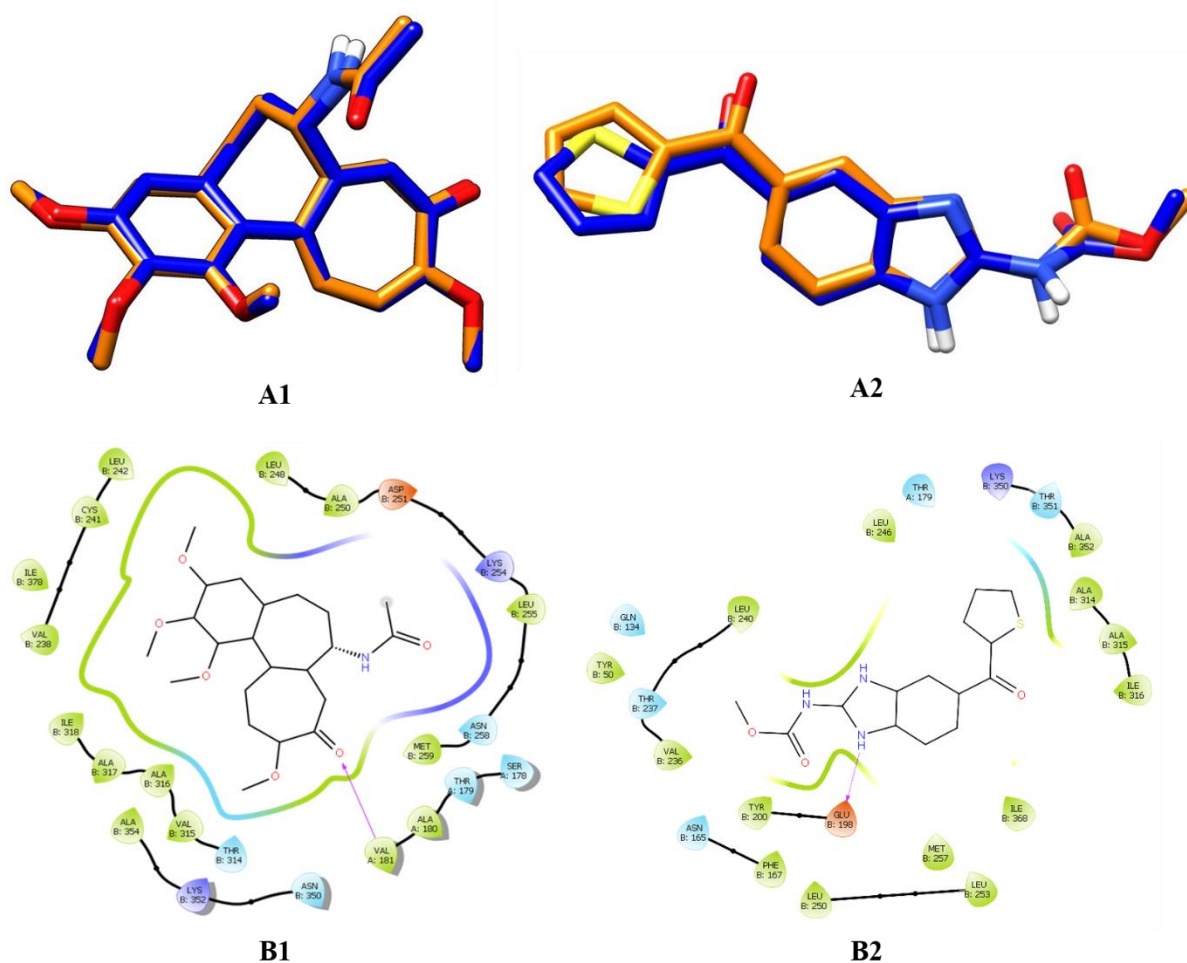


Figure 8. A1 and A2: Native (orange) and post-redocking (blue) conformations of colchicine and nocodazole in 3D view; B1 and B2: post-redocking complexes in 2D visualization, showing the interactions with specific amino acids (in green, hydrophobic *aa*; in cyan, polar *aa*; in blue, positively charged *aa*; in red, acid *aa*).

Table 2. Binding energies and RMSD values for the docked compounds (PMFs **2** and **3**, colchicine and nocodazole).

Entry	Compound	Binding Energy (Kcal/mol)	RMSD native (Å)	RMSD u.b. (Å)	RMSD l.b. (Å)
1	Colchicine	-10.0	0.188	-	-
2	Nocodazole	-9.0	1.085	-	-
3	2 _{col} (conf. 1)	-8.4	-	0.000	0.000
4	2 _{col} (conf. 2)	-8.0	-	7.429	1.320

5	2 _{col} (conf. 3)	-7.7	-	2.008	1.256
6	3 _{col} (conf. 1)	-8.2	-	0.000	0.000
7	3 _{col} (conf. 2)	-8.1	-	1.938	0.576
8	3 _{col} (conf. 3)	-7.8	-	7.653	1.418
9	3 _{col} (conf. 4)	-7.8	-	2.241	1.265
10	3 _{col} (conf. 5)	-7.3	-	7.866	1.561
11	2 _{noc} (conf. 1)	-5.0	-	0.000	0.000
12	2 _{noc} (conf. 2)	-4.1	-	3.062	1.427
13	3 _{noc} (conf. 1)	-2.6	-	0.000	0.000
14	3 _{noc} (conf. 2)	-1.9	-	2.010	0.473

*“col” indicates the docking using the original protein of colchicine complex as standard. “noc” indicates the use of nocodazole complex. “RMSD native” is related to the crystallographic conformation of colchicine; “RMSD u.b.” matches each atom in one conformation with itself in the other conformation, ignoring any symmetry; “RMSD l.b.” matches each atom in one conformation with the closest atom of the same element type in the other conformation, being calculated as the maximum value between atoms c1,c2 and c2,c1.

On the other hand, considering the energy values after docking procedures for PMFs **2** and **3**, it can be observed that the obtained geometries considering the exact binding site of colchicine (entries 3-10 in Table 2) are much more stable than the dockings at nocodazole exact binding site (entries 11-14 in Table 2). This may be explained by the fact that the molecular structure of colchicine has higher similarity with the flavones, considering the type of atoms (carbons and oxygens, only one nitrogen in colchicine), the relative size of rings, and the presence of six-member rings substituted with oxygens (methoxyl, hydroxyl and carbonyl in colchicine and PMFs) (Figure 8 and 9). Thus, the interaction profile with amino acids is more favorable in exact region of colchicine interactions.

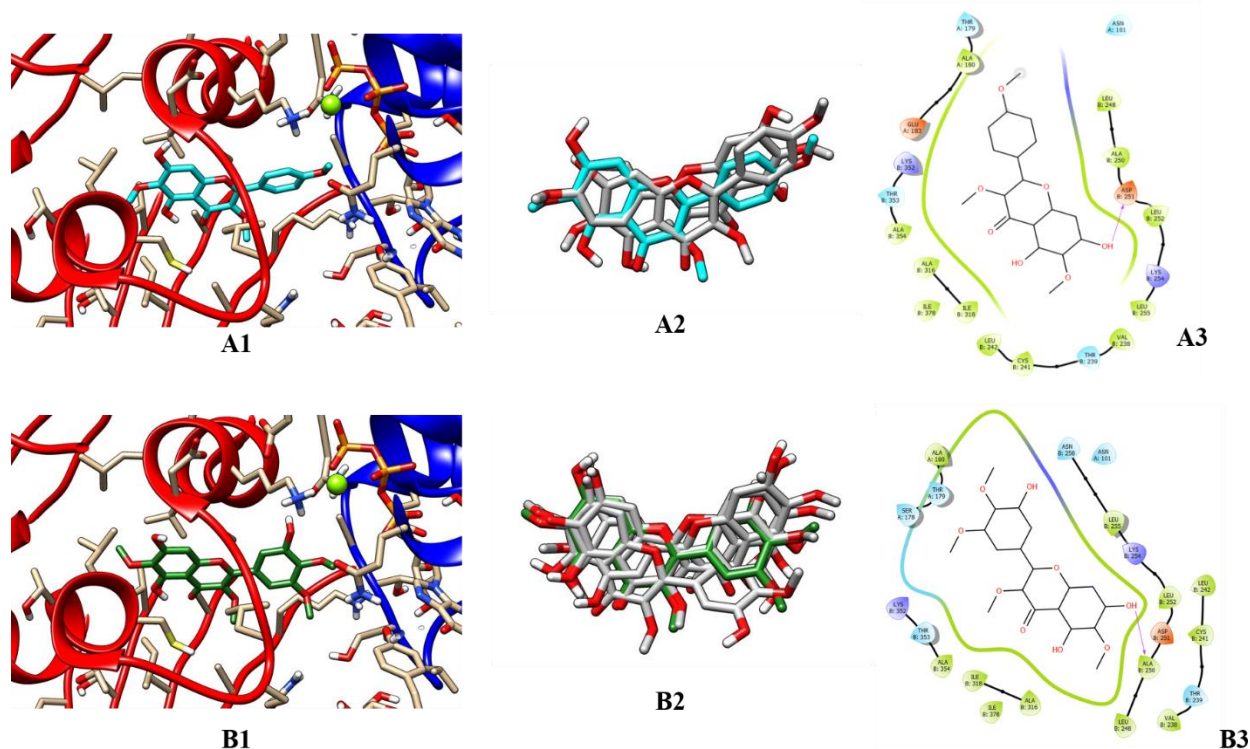


Figure 9. A1: Most stable pose of **2**; A2: Best poses of **2** (in cyan the most stable); A3: Best pose of **2** in 2D visualization; B1: Most stable pose of **3**; B2: Best poses of **3** (in cyan the most stable); B3: Best pose of **3** in 2D visualization.

Considering the exposed above, Figures 9 and 10 show the most stable geometries for **2** and **3** after docking in exact binding site of colchicine. It is important to note that the “symmetrical” structural profile of **2** and **3** (two opposite aromatic A and B-rings with methoxy/hydroxy groups) generated two conformational orientations as possible results. Both are in a same place but inverted by 180°, with near binding energy values (conf1/conf2 for **2**_{col} and conf1/conf3 for **3**_{col}, Table 2). Interestingly, all the *RMSD l.b.* values are less than 2.0 Å (Table 2), indicating that the same atoms types occupy similar positions, even with inverted structure. In fact, a compound can assume more than a unique stable conformation in the binding site, and the similar atoms types and locations in the possible conformers for **2** and **3** (carbons and oxygens), show that the best occupation region for these flavonoids does not suffer significant variation, possessing a good sample profile (Figure 9).

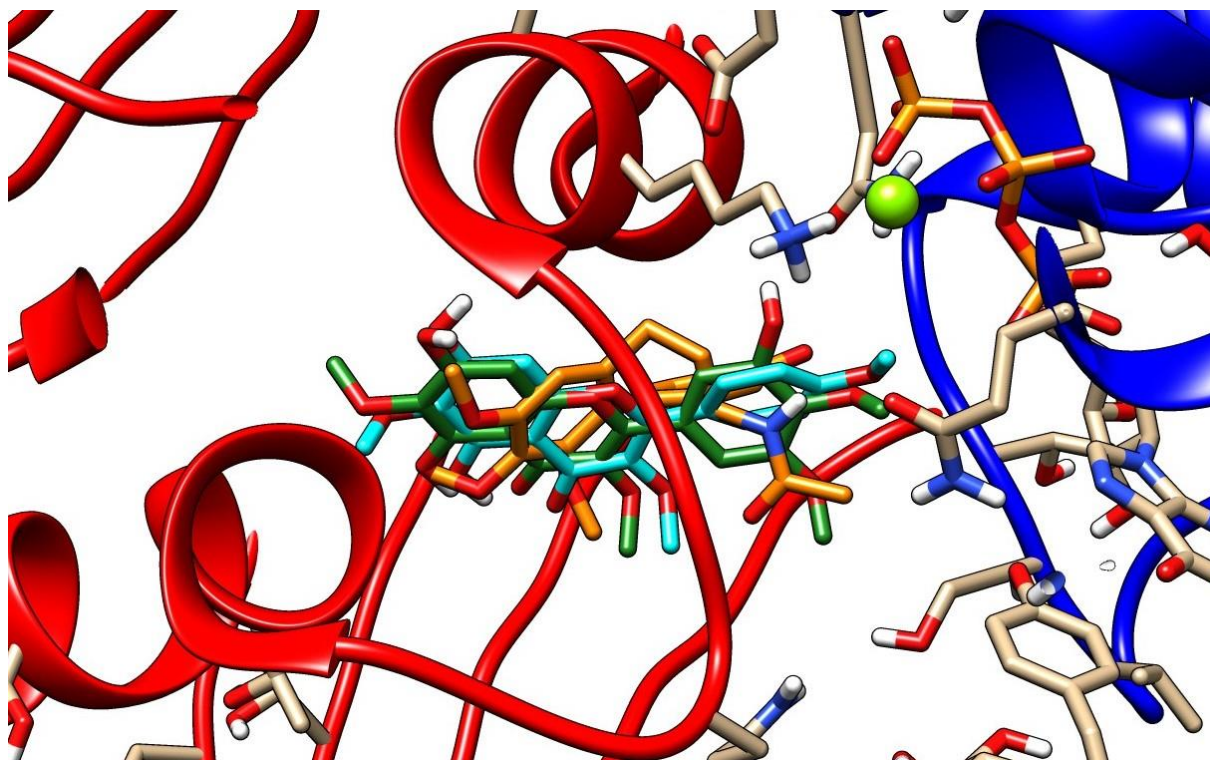


Figure 10. Superimposed structures of native colchicine (orange) and best poses of **2** (cyan) and **3** (green). In the protein 3D images, the A domain is in red and B domain in blue.

Additionally, considering the first best geometries of the compounds, the interacting amino acids can be observed through the 2D models (Figure 9). The colchicine binding site is predominantly hydrophobic, which favors the interaction with methoxylated flavonoids. On the other hand, the presence of some hydroxyl groups on flavonoid structures leads at least to one hydrogen bond with a donor character, as visualized in 2D maps. The common amino acids interacting with colchicine, **2** and **3** are: LEU242, CYS241, VAL 238, interacting with the trimethoxy group of colchicine and dihydroxy-methoxy group of **2** and **3**, in the best pose; ALA180, THR179, interacting with the other extremity of the ligands; ILE318, ALA316, ALA354, LYS352, LEU255, LYS254, ASP251, ALA250, LEU248, interacting with central points of the compounds.

Analyzing and comparing the binding energies between the ligands, colchicine presents the most stable pose at their specific binding site (-10 Kcal/mol), followed by **2**, which is slightly more stable than **3** for the best pose. Then, considering the overall of this first computational analysis by docking algorithms, the molecular binding profiles are in agreement with experimental results and corroborate the mechanism of action for **2** and **3** in tubulin depolymerization.

3.8. Chemosensitizing effect

Advanced melanoma is constantly associated with intrinsic or adaptively acquired mechanisms of drug resistance. Targeted therapies involving the use of BRAF and MEK inhibitors showed promising results in the past years, but their therapeutic efficacy is still limited. In most cases, the pharmacological response is temporary and patients develop tumor collapse within one year of treatment [55]. Recently, combined therapies have been employed in the treatment of advanced melanoma using drugs that act on different molecular targets in an attempt to maximize their effectiveness. Although a promising strategy, these drug associations display high toxicity and can lead to rapid liver, kidney and gastrointestinal failure [56]. However, the same approach has been performed using natural products as chemosensitizing agents. Plant-derived molecules are usually well tolerated and have a better safety profile, which encourages their use in adjuvant antimelanoma therapy [57]. In this context, we evaluated the chemosensitizing potential of PMFs **2** and **3** on A2058 melanoma cells.

Melanoma cells were treated with increasing concentrations of vemurafenib (a BRAF inhibitor) and dacarbazine (an alkylating agent), alone or combined to low-toxic concentrations of **2** (2 μ M, $\sim 1/2$ IC₅₀) and **3** (4 μ M, $\sim 1/2$ IC₅₀). After 72h of treatment, cell viability was measured by the MTT assay. As shown in Figure 11 and Table 3, A2058 cells were sensitive to vemurafenib, which exhibited IC₅₀ = 5.93 μ M, but resistant to dacarbazine (IC₅₀ > 100 μ M). When combined to PMFs **2** or **3**, vemurafenib showed no improved antiproliferative effect. In contrast, PMF **2** restored the sensitivity of melanoma cells to dacarbazine treatment, which showed IC₅₀ = 49.38 μ M.

Table 3. Effect of monotreatments (vemurafenib or dacarbazine) and combined treatments (vemurafenib or dacarbazine + PMFs **2** or **3**) on A2058 melanoma cells. Data are presented as IC₅₀ values and 95% confidence intervals.

Monotreatment	IC ₅₀ (μ M)	Combined treatment	IC ₅₀ (μ M)
Vemurafenib	5.93 (4.71–7.47)	Vemurafenib + PMF 2	7.98 (6.72–9.47)
		Vemurafenib + PMF 3	6.75 (5.61–8.12)
Dacarbazine	>100	Dacarbazine + PMF 2	49.38 (35.43–68.81)
		Dacarbazine + PMF 3	>100

PMFs **2** and **3** were tested at low-toxic concentrations ($1/2$ IC₅₀ \sim 2 and 4 μ M, respectively). Vemurafenib and dacarbazine were tested in increasing concentrations (1 – 100 μ M).

Combination index (CI) was calculated using the Chou-Talalay theorem in order to better characterize the sensitizing effect of flavone **2**. According to CI values, combined therapies can provide additive (CI ~ 1), synergistic (CI < 1) or antagonistic (CI > 1) effects. Compound **2** showed CI values of approximately 1.0 when associated with almost all tested dacarbazine concentrations, indicating an additive effect (Figure 11C). A synergistic effect was observed at dacarbazine 20 μM . Taken together, these results suggest that *G. oudiepe* is a potential source of antimelanoma PMFs, acting as cytotoxic or/and chemosensitizing agents on metastatic and chemoresistant tumor cells.

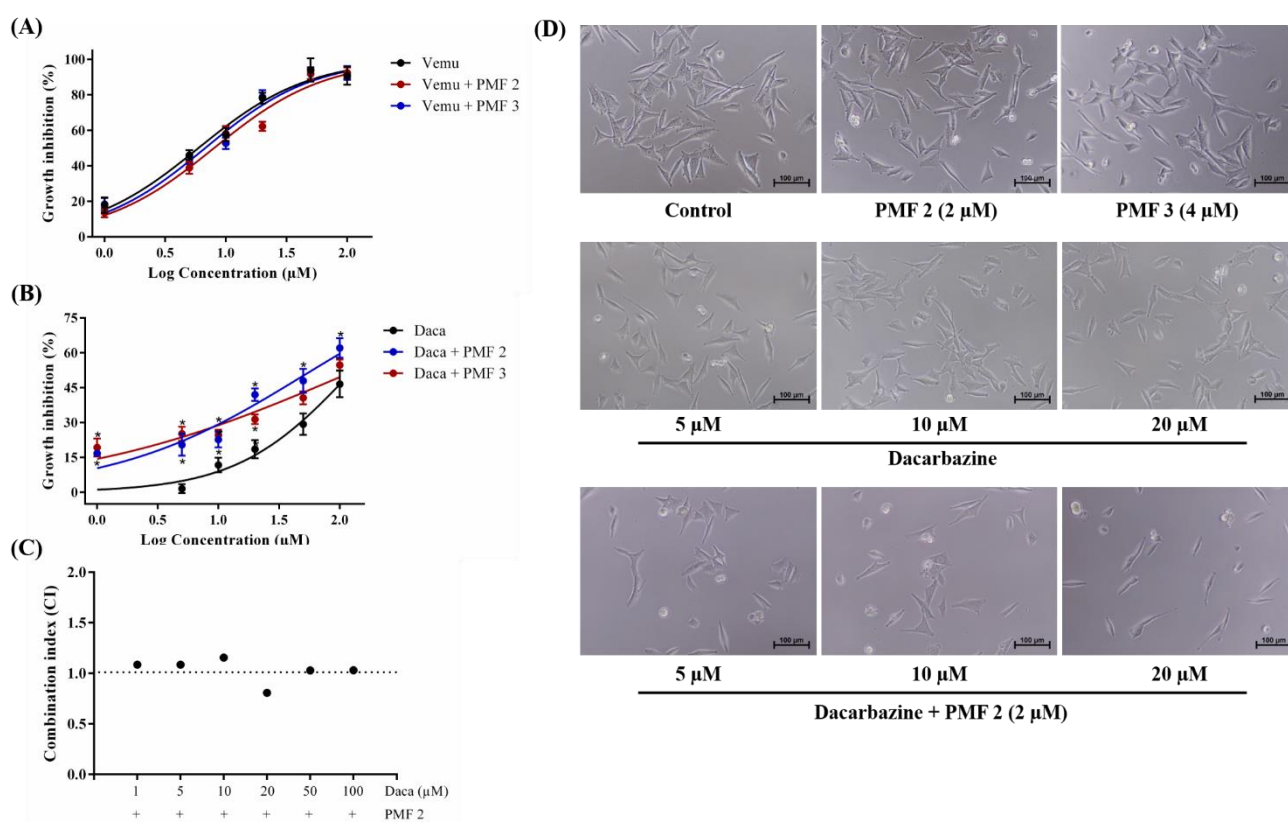


Figure 11. Chemosensitizing effect of PMFs **2** and **3** on A2058 cells. (A): antiproliferative effect of vemurafenib (Vemu, 1–100 μM) alone or in the presence of compounds **2** and **3** ($\sim \frac{1}{2}\text{IC}_{50}$). (B): antiproliferative effect of dacarbazine (Daca, 1–100 μM) alone or in the presence of compounds **2** and **3** ($\sim \frac{1}{2}\text{IC}_{50}$). (C): combination index for the association of dacarbazine with PMF **2**. (D) photomicrographs show reduction of cell density promoted by combined therapy, compared to monotherapies and control group. Results are expressed as mean \pm SEM, $*p < 0.05$ according to unpaired Student's *t* test, from at least three independent measurements.

4. Conclusions

The antimelanoma potential of ten natural and semisynthetic flavones from *G. oudiepe* was evaluated. PMFs **2** and **3** were the most active derivatives. They inhibited cell proliferation and migration, and induced cell arrest in G2/M phase. Both molecules also induced apoptosis after 72h of treatment. These outcomes are possibly related to the induction of cytoskeleton disruption associated with actin and tubulin depolymerization. These data were confirmed by molecular docking studies, which showed a good interaction between PMFs **2** and **3** and tubulin, particularly at the colchicine binding site. In addition, the flavones also restored the sensitivity of A2058 cells to dacarbazine treatment. These results suggest that the most active PMFs from *G. oudiepe* could be candidates for the treatment of metastatic melanoma or used as adjuvant in antimelanoma therapy.

Acknowledgments

This work was accomplished through technical-scientific collaboration by Franco-Brazilian Network on Natural Products (FB2NP). The authors thank the North Province of New Caledonia for facilitation of field investigations, Dr. Vincent Dumontet for plant collection and Chouaha Bouzidi for the management of the chemical library.

References

- [1] D. Schadendorf, A.C.J. Van Akkooi, C. Berking, K.G. Griewank, R. Gutzmer, A. Hauschild, A. Stang, A. Roesch, Melanoma, *Lancet*. 392 (2018) 971–984. doi:10.1016/S0140-6736(18)31559-9.
- [2] W.E. Damsky-Junior, L.E.R. Rodenbaum, M. Bosenberg, Decoding Melanoma Metastasis, *Cancers (Basel)*. 3 (2011) 126–163. doi:10.3390/cancers3010126.
- [3] F. Tas, Metastatic Behavior in Melanoma: Timing, Pattern, Survival, and Influencing Factors, *J. Oncol.* 2012 (2012) 647684. doi:10.1155/2012/647684.
- [4] C. Garbe, K. Peris, A. Hauschild, P. Saiag, M. Middleton, L. Bastholt, J. Grob, J. Malvehy, Diagnosis and treatment of melanoma. European consensus-based interdisciplinary guideline - Update 2016, *Eur. J. Cancer*. 63 (2016) 201–217. doi:10.1016/j.ejca.2016.05.005.
- [5] B. Domingues, J.M. Lopes, P. Soares, H. Pópulo, Melanoma treatment in review, *ImmunoTargets Ther.* 7 (2018) 35–49.
- [6] G. Mattia, R. Puglisi, B. Ascione, W. Malorni, A. Carè, P. Matarrese, Cell death-based treatments of melanoma: conventional treatments and new therapeutic strategies, *Cell Death Dis.* (2018) (2018)9:112. doi:10.1038/s41419-017-0059-7.

- [7] S. Jang, M.B. Atkins, Treatment of BRAF-mutant melanoma: The role of vemurafenib and other therapies, *Clin. Pharmacol. Ther.* 95 (2014) 24–31. doi:10.1038/clpt.2013.197.
- [8] W.P. Roos, S. Quiros, A. Krumm, S. Merz, O.J. Switzeny, M. Christmann, C. Loquai, B. Kaina, B-Raf inhibitor vemurafenib in combination with temozolomide and fotemustine in the killing response of malignant melanoma cells, *Oncotarget.* 5 (2014). doi:10.18632/oncotarget.2610.
- [9] F. Spagnolo, P. Ghiorzo, L. Orgiano, L. Pastorino, V. Picasso, E. Tornari, V. Ottaviano, P. Queirolo, BRAF-mutant melanoma: Treatment approaches, resistance mechanisms, and diagnostic strategies, *Onco. Targets. Ther.* 8 (2015) 157–168. doi:10.2147/OTT.S39096.
- [10] L. Tentori, P.M. Lacal, G. Graziani, Challenging resistance mechanisms to therapies for metastatic melanoma, *Trends Pharmacol. Sci.* 34 (2013) 656–666. doi:10.1016/j.tips.2013.10.003.
- [11] R. Mouawad, M. Sebert, J. Michels, J. Bloch, J.P. Spano, D. Khayat, Treatment for metastatic malignant melanoma: Old drugs and new strategies, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 74 (2010) 27–39. doi:10.1016/j.critrevonc.2009.08.005.
- [12] S. Jin, P.S. Mishra-kalyani, R. Sridhara, Unresectable and Metastatic Melanoma of the Skin : Literature Review of Clinical Trials and Efficacy Endpoints Since 2000, (2018). doi:10.1177/2168479018769286.
- [13] R.G. de Oliveira Júnior, C.A.A. Ferraz, M.G. Silva, E.M. de Lavor, L.A. Rolim, J.T. de Lima, A. Fleury, L. Picot, J. de S. Siqueira-Quintans, L.J. Quintans Júnior, Almeida, Flavonoids: Promising Natural Products for Treatment of Skin Cancer (Melanoma), in: F.A. Badria (Ed.), *Nat. Prod. Cancer Drug Discov.*, IntechOpen, 2017: pp. 161–2010. doi:10.5772/67573.
- [14] D. Kashyap, V.K. Garg, H.S. Tuli, M.B. Yerer, K. Sak, A.K. Sharma, M. Kumar, V. Aggarwal, S.S. Sandhu, Fisetin and quercetin: Promising flavonoids with chemopreventive potential, *Biomolecules.* 9 (2019) 1–22. doi:10.3390/biom9050174.
- [15] A. Sassi, M. Maatouk, D. El gueder, I.M. Bzéouich, S. Abdelkefi-Ben Hatira, S. Jemni-Yacoub, K. Ghedira, L. Chekir-Ghedira, Chrysin, a natural and biologically active flavonoid suppresses tumor growth of mouse B16F10 melanoma cells: In vitro and in vivo study, *Chem. Biol. Interact.* 283 (2018) 10–19. doi:10.1016/j.cbi.2017.11.022.
- [16] H.W. Li, T. Bin Zou, Q. Jia, E.Q. Xia, W.J. Cao, W. Liu, T.P. He, Q. Wang, Anticancer effects of morin-7-sulphate sodium, a flavonoid derivative, in mouse melanoma cells, *Biomed. Pharmacother.* 84 (2016) 909–916. doi:10.1016/j.biopha.2016.10.001.

- [17] D. Raffa, B. Maggio, M.V. Raimondi, F. Plescia, G. Daidone, Recent discoveries of anticancer flavonoids, *Eur. J. Med. Chem.* 142 (2017) 213–228. doi:10.1016/j.ejmech.2017.07.034.
- [18] M. Bhardwaj, N.H. Kim, S. Paul, R. Jakhar, J. Han, S.C. Kang, 5-Hydroxy-7-methoxyflavone triggers mitochondrial-associated cell death via reactive oxygen species signaling in human colon carcinoma cells, *PLoS One.* 11 (2016) 1–19. doi:10.1371/journal.pone.0154525.
- [19] M. Piedfer, S. Bouchet, R. Tang, C. Billard, D. Dauzonne, B. Bauvois, P70S6 kinase is a target of the novel proteasome inhibitor 3,3'-diamino-4'-methoxyflavone during apoptosis in human myeloid tumor cells, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1833 (2013) 1316–1328. doi:10.1016/j.bbamcr.2013.02.016.
- [20] S.T. Chien, S.S. Lin, C.K. Wang, Y. Bin Lee, K.S. Chen, Y. Fong, Y.W. Shih, Acacetin inhibits the invasion and migration of human non-small cell lung cancer A549 cells by suppressing the p38 α MAPK signaling pathway, *Mol. Cell. Biochem.* 350 (2011) 135–148. doi:10.1007/s11010-010-0692-2.
- [21] F. Estévez-Sarmiento, M. Said, I. Brouard, F. León, C. García, J. Quintana, F. Estévez, 3'-Hydroxy-3,4'-dimethoxyflavone blocks tubulin polymerization and is a potent apoptotic inducer in human SK-MEL-1 melanoma cells, *Bioorganic Med. Chem.* 25 (2017) 6060–6070. doi:10.1016/j.bmc.2017.09.043.
- [22] W. Ma, S. Feng, X. Yao, Z. Yuan, L. Liu, Y. Xie, Nobiletin enhances the efficacy of chemotherapeutic agents in ABCB1 overexpression cancer cells, *Sci. Rep.* 5 (2015) 18789. doi:10.1038/srep18789.
- [23] F. He, Q. Wang, X.L. Zheng, J.Q. Yan, L. Yang, H. Sun, L.N. Hu, Y. Lin, X. Wang, Wogonin potentiates cisplatin-induced cancer cell apoptosis through accumulation of intracellular reactive oxygen species, *Oncol. Rep.* 28 (2012) 601–605. doi:10.3892/or.2012.1841.
- [24] L.H. Mai, G.G. Chabot, P. Grellier, L. Quentin, V. Dumontet, C. Poulain, L.S. Espindola, S. Michel, H.T.B. Vo, B. Deguin, R. Grougnet, Antivascular and anti-parasite activities of natural and hemisynthetic flavonoids from New Caledonian *Gardenia* species (Rubiaceae), *Eur. J. Med. Chem.* 93 (2015) 93–100. doi:10.1016/j.ejmech.2015.01.012.
- [25] M.D. Santi, M.P. Zunini, B. Vera, C. Bouzidi, V. Dumontet, A. Abin-carrquiry, R. Grougnet, M.G. Ortega, Xanthine oxidase inhibitory activity of natural and hemisynthetic flavonoids from *Gardenia oudiepe* (Rubiaceae) in vitro and molecular docking studies, *Eur. J. Med. Chem.* 143 (2018) 577–582.

doi:10.1016/j.ejmech.2017.11.071.

- [26] R.G. de Oliveira Júnior, A. Bonnet, E. Braconnier, H. Groult, G. Prunier, L. Beaugeard, R. Grougnet, J.R.G. da Silva Almeida, C.A.A. Ferraz, L. Picot, Bixin, an apocarotenoid isolated from *Bixa orellana* L., sensitizes human melanoma cells to dacarbazine-induced apoptosis through ROS-mediated cytotoxicity, *Food Chem. Toxicol.* 125 (2019) 549–561. doi:10.1016/j.fct.2019.02.013.
- [27] N.M. Brikci-Nigassa, G. Bentabed-Ababsa, W. Erb, F. Chevallier, L. Picot, L. Vitek, A. Fleury, V. Thiéry, M. Souab, T. Robert, S. Ruchaud, S. Bach, T. Roisnel, F. Mongin, 2-Aminophenones, a common precursor to N-aryl isatins and acridines endowed with bioactivities, *Tetrahedron.* 74 (2018) 1785–1801. doi:10.1016/j.tet.2018.02.038.
- [28] C. Juin, R.G. de Oliveira Junior, A. Fleury, C. Oudinet, L. Pytowski, J.-B. Bérard, E. Nicolau, V. Thiéry, I. Lanneluc, L. Beaugeard, G. Prunier, J.R.G.D.S. Almeida, L. Picot, Zeaxanthin from *Porphyridium purpureum* induces apoptosis in human melanoma cells expressing the oncogenic BRAF V600E mutation and sensitizes them to the BRAF inhibitor vemurafenib, *Rev. Bras. Farmacogn.* 28 (2018) 457–467. doi:10.1016/j.bjp.2018.05.009.
- [29] Y. Wang, H. Zhang, B. Gigant, Y. Yu, Y. Wu, X. Chen, Q. Lai, Z. Yang, Q. Chen, J. Yang, Structures of a diverse set of colchicine binding site inhibitors in complex with tubulin provide a rationale for drug discovery, *FEBS J.* 283 (2016) 102–111. doi:10.1111/febs.13555.
- [30] H.M. Berman, J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T.N. Bhat, H. Weissig, I.N. Shindyalov, P.E. Bourne, The protein data bank, *Nucl. Acids Res.* 28 (2000) 235–242.
- [31] O. Trott, A. Olson, Autodock vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading, *J. Comput. Chem.* 31 (2010) 455–461. doi:10.1002/jcc.21334.AutoDock.
- [32] G.M. Morris, R. Huey, W. Lindstrom, M.F. Sanner, R.K. Belew, D.S. Goodsell, A.J. Olson, AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility, *J. Comput. Chem.* 30 (2009) 2785–2791. doi:10.1002/jcc.21256.
- [33] M.J. Frisch, G.W. Trucks, H.B. Schlegel, G.E. Scuseria, M.A. Robb, J.R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, G.A. Petersson, H. Nakatsuji, X. Li, M. Caricato, A. Marenich, J. Bloino, B.G. Janesko, R. Gomperts, M. Mennucci, H.P. Hratchian, J. V Ortiz, A.F. Izmaylov, J.L. Sonnenberg, D. Williams-Young, F. Ding, F. Lipparini, F. Egidi, J. Goings, B. Peng, A. Petrone, T. Henderson, D. Ranasinghe, V.G. Zakrzewski, J. Gao, N. Rega, G. Zheng, W. Liang, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M.

- Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, K. Throssell, J.A. Montgomery, J.E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J.J. Heyd, E. Brothers, K.N. Kudin, V.N. Staroverov, T. Keith, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J.C. Burant, S.S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, J.M. Millam, M. Klene, C. Adamo, R. Cammi, J.W. Ochterski, R.L. Martin, K. Morokuma, O. Farkas, J.B. Foresman, D.J. Fox, Gaussian 09, Revision A.02, (2016).
- [34] E.F. Pettersen, T.D. Goddard, C.C. Huang, G.S. Couch, D.M. Greenblatt, E.C. Meng, T.E. Ferrin, UCSF Chimera - a visualization system for exploratory research and analysis, *J. Comput. Chem.* 25 (2004) 1605–1612.
- [35] S. Maestro, Schrödinger Release 2019-2, (2019).
- [36] T. Chou, P. Talalay, Quantitative dose-effect relationships: the combined effects of multiples drugs or enzyme inhibitors, *Adv. Enzyme Regul.* 22 (1984) 27–55. doi:10.1016/0065-2571(84)90007-4.
- [37] M.M. Al-Dabbas, K. Al-Ismail, R. Abu-Taleb, F. Hashimoto, I.O. Rabah, K. Kitahara, K. Fujita, T. Suganuma, Chemistry and antiproliferative activities of 3-methoxyflavones isolated from *Varthemia iphionoides*, *Chem. Nat. Compd.* 47 (2011) 17–21. doi:10.1007/s10600-011-9821-8.
- [38] S. Rubio, J. Quintana, J.L. Eiroa, J. Triana, F. Estévez, Acetyl derivative of quercetin 3-methyl ether-induced cell death in human leukemia cells is amplified by the inhibition of ERK, *Carcinogenesis*. 28 (2007) 2105–2113. doi:10.1093/carcin/bgm131.
- [39] J. Gallus, K. Juvale, M. Wiese, Characterization of 3-methoxy flavones for their interaction with ABCG2 as suggested by ATPase activity, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1838 (2014) 2929–2938. doi:10.1016/j.bbamem.2014.08.003.
- [40] H.R. Kim, C.G. Park, J.Y. Jung, Acacetin (5,7-dihydroxy-4'-methoxyflavone) exhibits in vitro and in vivo anticancer activity through the suppression of NF- κ B/Akt signaling in prostate cancer cells, *Int. J. Mol. Med.* 33 (2014) 317–324. doi:10.3892/ijmm.2013.1571.
- [41] Q. Du, H. Chen, The methoxyflavones in *Citrus reticulata* Blanco cv. ponkan and their antiproliferative activity against cancer cells, *Food Chem.* 119 (2010) 567–572. doi:10.1016/j.foodchem.2009.06.059.
- [42] K.H. Shen, S.H. Hung, L. Te Yin, C.S. Huang, C.H. Chao, C.L. Liu, Y.W. Shih, Acacetin, a flavonoid, inhibits the invasion and migration of human prostate cancer DU145 cells via inactivation of the p38 MAPK signaling pathway, *Mol. Cell. Biochem.* 333 (2010) 279–291. doi:10.1007/s11010-009-0229-8.

- [43] A.G. Porter, R.U. Ja, Emerging roles of caspase-3 in apoptosis, *Cell Death Differ.* 6 (1999) 99–104.
- [44] A. Ganguly, H. Yang, R. Sharma, K.D. Patel, F. Cabral, The role of microtubules and their dynamics in cell migration, *J. Biol. Chem.* 287 (2012) 43359–43369. doi:10.1074/jbc.M112.423905.
- [45] H. Yamaguchi, J. Condeelis, Regulation of the actin cytoskeleton in cancer cell migration and invasion, *Biochim. Biophys. Acta.* 1773 (2007) 642–652. doi:10.1016/j.bbamcr.2006.07.001.
- [46] H. Yamaguchi, J. Wyckoff, J. Condeelis, Cell migration in tumors, *Curr. Opin. Cell Biol.* 17 (2005) 559–564. doi:10.1016/j.ceb.2005.08.002.
- [47] E.S. Welf, J.M. Haugh, Signaling pathways that control cell migration: models and analysis, *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.* 3 (2011) 231–240. doi:10.1002/wsbm.110.
- [48] S. Povea-Cabello, M. Oropesa-Ávila, P. de la Cruz-Ojeda, M. Villanueva-Paz, M. De La Mata, J.M. Suárez-Rivero, M. Álvarez-Córdoba, I. Villalón-García, D. Cotán, P. Ybot-González, J.A. Sánchez-Alcázar, Dynamic reorganization of the cytoskeleton during apoptosis: The two coffins hypothesis, *Int. J. Mol. Sci.* 18 (2017) 1–14. doi:10.3390/ijms18112393.
- [49] O. Ndozangue-Touriguine, J. Hamelin, J. Bréard, Cytoskeleton and apoptosis, *Biochem. Pharmacol.* 76 (2008) 11–18. doi:10.1016/j.bcp.2008.03.016.
- [50] M. Desouza, P.W. Gunning, J.R. Stehn, The actin cytoskeleton as a sensor and mediator of apoptosis, *Bioarchitecture.* 2 (2012) 75–87. doi:10.4161/bioa.20975.
- [51] H.I.F. Magalhães, D. V. Wilke, D.P. Bezerra, B.C. Cavalcanti, R. Rotta, D.P. de Lima, A. Beatriz, M.O. Moraes, J. Diniz-Filho, C. Pessoa, (4-Methoxyphenyl)(3,4,5-trimethoxyphenyl)methanone inhibits tubulin polymerization, induces G2/M arrest, and triggers apoptosis in human leukemia HL-60 cells, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 272 (2013) 117–126. doi:10.1016/j.taap.2013.06.001.
- [52] C. Dumontet, M.A. Jordan, Microtubule-binding agents: A dynamic field of cancer therapeutics, *Nat. Rev. Drug Discov.* 9 (2010) 790–803. doi:10.1038/nrd3253.
- [53] N. Shobeiri, M. Rashedi, F. Mosaffa, A. Zarghi, M. Ghandadi, A. Ghasemi, R. Ghodsi, Synthesis and biological evaluation of quinoline analogues of flavones as potential anticancer agents and tubulin polymerization inhibitors, *Eur. J. Med. Chem.* 114 (2016) 14–23. doi:10.1016/j.ejmech.2016.02.069.
- [54] H.R. Kim, C.G. Park, J.Y. Jung, Acacetin (5,7-dihydroxy-4'-methoxyflavone) exhibits

- in vitro and in vivo anticancer activity through the suppression of NF- κ B/Akt signaling in prostate cancer cells, *Int. J. Mol. Med.* 33 (2014) 317–324. doi:10.3892/ijmm.2013.1571.
- [55] A. Rossi, M. Roberto, M. Panebianco, A. Botticelli, F. Mazzuca, P. Marchetti, Drug resistance of BRAF-mutant melanoma: Review of up-to-date mechanisms of action and promising targeted agents, *Eur. J. Pharmacol.* 862 (2019) 172621. doi:10.1016/j.ejphar.2019.172621.
- [56] M.S. Pelster, R.N. Amaria, Combined targeted therapy and immunotherapy in melanoma: a review of the impact on the tumor microenvironment and outcomes of early clinical trials, *Ther. Adv. Med. Oncol.* 11 (2019) 1–11. doi:10.1177/1758835919830826.
- [57] R.G. de Oliveira Júnior, A.F. Christiane Adrielly, J.R.G. da Silva Almeida, R. Grougnet, V. Thiéry, L. Picot, Sensitization of tumor cells to chemotherapy by natural products: A systematic review of preclinical data and molecular mechanisms, *Fitoterapia.* 129 (2018) 383–400. doi:10.1016/j.fitote.2018.02.025.

CHAPITRE 3

Article publié dans Food and Chemical Toxicology

BIXIN, AN APOCAROTENOID ISOLATED FROM *Bixa orellana* L., SENSITIZES HUMAN MELANOMA CELLS TO DACARBAZINE-INDUCED APOPTOSIS THROUGH ROS-MEDIATED CYTOTOXICITY

Raimundo Gonçalves de Oliveira Júnior¹, Antoine Bonnet^{1,2}, Estelle Braconnier¹, Hugo Groult¹, Grégoire Prunier¹, Laureen Beaugeard¹, Raphaël Grougnet³, Jackson Roberto Guedes da Silva Almeida⁴, Christiane Adrielly Alves Ferraz⁴, Laurent Picot¹

¹ UMRi CNRS 7266 LIENSs, Université de La Rochelle, 17042 La Rochelle, France.

² Plateforme d'analyse haute résolution des biomolécules, UMR CNRS 7266 LIENSs, 17042 La Rochelle, France.

³ UMR CNRS 8638 Laboratoire de Pharmacognosie, Université Paris Descartes, 75006 Paris, France.

⁴ Núcleo de Estudos e Pesquisas de Plantas Mediciniais, Universidade Federal do Vale do São Francisco, 56306-000 Petrolina, Brazil.

*Corresponding author at: UMRi CNRS 7266 LIENSs, Université de La Rochelle, Curie B101 Faculté des Sciences et Technologies, Avenue Michel Crépeau, 17042 La Rochelle, France. E-mail address: laurent.picot@univ-lr.fr (Laurent Picot).

ABSTRACT

Cutaneous melanoma has a high capacity to metastasize and significant resistance to conventional therapeutic protocols, which makes its treatment difficult. The combination of conventional drugs with cytostatic molecules of low toxicity has been shown to be an interesting alternative for sensitization of tumor cells to chemotherapy. In this study, we evaluated the effect of bixin, an abundant apocarotenoid present in *Bixa orellana*, on the sensitization of human melanoma cells (A2058) to dacarbazine treatment, an anticancer agent clinically used for the therapy of metastatic melanoma. UPLC-DAD-MS/MS analyses of bioactive extracts from *B. orellana* seeds led to the identification of two new apocarotenoids: 6,8'-diapocarotene-6,8'-dioic acid and 6,7'-diapocarotene-6,7'-dioic acid. After being identified as its major compound, bixin (*Z*-bixin) was evaluated on A2058 cells expressing the oncogenic BRAF VE600 mutation and resistant to dacarbazine treatment. Bixin promoted growth inhibition, reduced cell migration, induced apoptosis and cell cycle arrest in the G2/M phase. When associated with dacarbazine, bixin restored the sensitivity of A2058 cells to chemotherapy, enhancing its antiproliferative, anti-migratory and pro-apoptotic effects. Combined treatment also induced higher ROS (reactive oxygen species) and MDA (malondialdehyde, a lipid peroxidation marker) generation than monotherapy, suggesting that the oxidative stress caused by bixin contributes significantly to its sensitizing effect. Taken together, these data suggest that bixin exerts intrinsic antimelanoma activity by mechanisms complementary to those of dacarbazine, encouraging its use in combined therapy for cutaneous melanoma treatment.

Keywords: annatto; dacarbazine; carotenoids; melanoma; multidrug resistance.

1. Introduction

Although it has a low incidence, melanoma is responsible for about 80% of skin cancer-associated mortality (MacKie et al., 2009). It has a high propensity to metastasize and is poorly responsive to most of the conventional therapies. In general, metastatic melanoma presents a dismal prognosis, with a five-year overall survival rate of only 15% and a median survival of less than eight months with treatment (Chakraborty et al., 2013; Locatelli et al., 2013).

In recent years, limited progress has been achieved in the treatment of metastatic melanoma through immunotherapy and target therapy (Flaherty and McArthur, 2010; Sosman and Puzanov, 2006). In 2011, the Food and Drug Administration (FDA) approved vemurafenib (BRAF inhibitor) and ipilimumab (monoclonal antibody) for clinical trials in patients with metastatic melanoma. Melanoma therapy may also include the use of alkylating agents (e.g., dacarbazine, temozolomide), platinum derivatives (e.g., cisplatin, carboplatin), vinca alkaloids (e.g., vindesine, vinblastine) and cytokines (e.g., IFN- α , IL-2) (Bhatia et al., 2009; Chapman et al., 2011; Jin et al., 2018; Locatelli et al., 2013). However, melanoma cells display multidrug resistance (MDR) mechanisms, which requires the use of higher doses to ensure a satisfactory pharmacological response. Unsuccessful treatments are often attributed to alterations in drug metabolism, efflux pump expression, apoptosis evasion mechanisms and mutations in specific therapeutic targets (Tentori et al., 2013).

To improve therapeutic response, several combinations of anticancer drugs with different mechanisms of action have been studied (Jin et al., 2018). Many combinatorial treatments tested in melanoma have associated immunologic agents (e.g., IFN- α , IL-2), hormones (e.g., tamoxifen) and target therapy drugs (e.g., vemurafenib) with dacarbazine, an alkylating agent considered as a single drug reference for the management of advanced melanoma. Nevertheless, the toxicity of these combinatorial treatments has been a limiting factor and no survival benefit has been demonstrated in comparison to monotherapy (Garbe et al., 2008; Mouawad et al., 2010).

A variety of natural products has been reported for cancer therapy, acting not only as chemotherapeutic or chemopreventive agents but also by enhancing the effectiveness of conventional chemotherapy (Vinod et al., 2013). Natural molecules sensitize tumor cells to chemotherapy by increasing the residence time of anticancer drugs in the cell, disrupting the cellular cytoskeleton, promoting DNA damage, inducing apoptosis, and/or regulating the expression of altered molecular targets (de Oliveira Júnior et al., 2018; Juin et al., 2018). In addition, natural products generally show a better tolerance profile compared to conventional therapy, have lower toxicity and promote fewer side effects.

Bixa orellana L. is a Brazilian medicinal plant, popularly known as "urucum" and "colorau" (in Brazil), "achiote" (in Mexico), and "annatto" (in the USA). *B. orellana* has economic importance mainly due to its seeds, which provide a red dye widely used in food products, textile, pharmaceutical and cosmetic industries. In fact, about 70% of all natural coloring agents consumed worldwide are derived from annatto. In traditional medicine, its seeds are commonly used to treat diabetes, diarrhea, hepatitis and dyslipidemia. Previous pharmacological investigations showed that *B. orellana* seeds have antimicrobial, anti-inflammatory, antioxidant, hypoglycemic and cytotoxic effects (Shahid-ul-Islam et al., 2016; Vilar et al., 2014). The therapeutic properties and industrial applications of annatto seeds are directly related to the carotenoid content, especially bixin, the major apocarotenoid of this species (Priya et al., 2017; Rivera-Madrid et al., 2016). In *in vitro* studies, bixin exhibited anticancer activity against HL60 (leukemia), B16 (melanoma), U20S (osteosarcoma), PC3 (prostate), HCT-116 (colon), MCF-7 (breast), DRO (anaplastic thyroid) and BHP-16 (papillary thyroid) cell lines. Bixin inhibited the proliferation of tumor cells in a concentration-dependent manner, through apoptosis induction and cell cycle arrest (Anantharaman et al., 2016; Santos et al., 2016; Tibodeau et al., 2010). Interestingly, this metabolite has shown low toxicity in animal models (Agner et al., 2004; Bautista et al., 2004; Paumgartten et al., 2002; Stohs, 2014), and it is therefore considered as a good candidate for sensitizing tumor cells.

In this present report, we described additional outcomes on the molecular mechanisms involved in the bixin pro-apoptotic effect and assessed its ability to sensitize melanoma cells to dacarbazine. All experiments were performed using the highly invasive A2058 human melanoma cell line, expressing the V600E BRAF oncogenic mutation, and resistant to dacarbazine therapy.

2. Materials and Methods

2.1. Plant material

Seeds of *Bixa orellana* were collected in Missão Velha (Coordinates: S 07°14'59", W 39°08'35"), State of Ceará, Brazil, in August 2017. Botanical identification was performed by comparison with a voucher specimen previously deposited at the Herbário Vale do São Francisco of the Universidade Federal do Vale do São Francisco (n° 16750). Once collected, botanical material was dried in an oven (40 °C) with air circulation, for 72 hours. All procedures for access to genetic patrimony and associated traditional knowledge were carried out and the project was registered in SisGen (Register #A45AFE5).

2.2. Extraction

Dried seeds (46 g) were submitted to sequential maceration using hexane (2.0 L), chloroform (2.0 L), ethyl acetate (2.0 L) and methanol (2.0 L) in increasing polarity order. Two hours were designed for each extraction solvent, employing constant stirring (1000 rpm) at 50 °C. Extractive solutions were filtrated and concentrated on a rotatory evaporator at a maximum temperature of 50 °C, resulting in hexane (Hex-Bo, 4.68 g), chloroform (CHCl₃-Bo, 1.88 g), ethyl acetate (EtOAc-Bo, 0.045 g) and methanol (MeOH-Bo, 0.22 g) extracts. All extracts were stored at -20 °C until chemical analysis and cell viability assay.

2.3. UPLC-DAD-MS/MS analysis

Analyses were carried out using an UHPLC system “Acquity UPLC H-class” (Waters, Milford, USA) coupled to a photodiode array (Waters 2996) and a high resolution mass spectrometer “XEVO G2S Q-TOF” equipped with an electrospray ionization source (Waters, Manchester, England). The UHPLC system was formed by a quaternary pump (Quaternary Solvent Manager, Waters) and an automatic injector (Sample Manager-FTN, Waters) equipped with a 10 µL injection loop. 5 µL of the samples were injected in a column “Acquity UPLC BEH C18” (Waters) (2.1 × 50 mm, 1.7 µm), and the products were eluted at a flow rate of 300 µL.min⁻¹ using a gradient composed of solvents A (water/formic acid 100/0.001 (v:v)) and B (methanol/ formic acid 100/0.001 (v:v)), according to the following procedure: 0–1 min, 10% B; 1–2.5 min 10%–50% B; 2.5–7 min 50% B; 7–10 min 50–30% B; 10–12 min, 30%-25% B; 12-15 min 25% B; 15-17 min 25%-20% B; 17-20 min 20% B; 20-23 min 20%-17% B; 23-26 min 17% B; 26-28 min 17-15% B; 28-31 min 15% B; 31-32 min 15-10% B; 32-35 min 10% B; 35-36 min 90%-10% B; 36-39 min 10% B. During the analysis, the column and the injector were maintained at 25 °C and 7 °C, respectively. The instrument was adjusted for the acquisition on a 250–800 nm interval in UV mode, with 5 spectra.s⁻¹ and 1.2 nm of resolution. The analyses were performed in positive ionization mode with MSE function in a centroid mode. The MS parameters was applied in the ESI source for the two ionization mode were: source temperature 120 °C, desolvation temperature 500 °C, gas flow-rate of the cone 50 L.h⁻¹, desolvation gas flow-rate 800 L.h⁻¹, capillary voltage 3.0 kV, sampling cone 130 V and source compensation 80 V. The instrument was adjusted for the acquisition on a 250–1300 m/z interval, with a scan time of 0.15 s. The mass spectrometer was calibrated before analysis using 0.5 mM sodium formate solution, and Leucine Enkephalin (M = 555.62 Da, 1 ng. µL⁻¹) was used as a lock-mass.

2.4. Isolation and characterization of bixin

After extraction, hexane extract showed a red precipitate. The supernatant was separated and the precipitate was washed successively in methanol, leading to isolation of bixin (1.15 g). The chemical characterization and purity of the sample were determined by UPLC-DAD-MS/MS analysis, as described in the previous topic. To ensure complete structural elucidation, ^1H and ^{13}C NMR experiments were performed on a JEOL JNM-LA400 spectrometer (Croissy-sur-Seine, France) operating at 400 MHz for ^1H experiment, 100 MHz for ^{13}C experiment. NMR spectra were obtained in deuterated DMSO ($\text{DMSO-}d_6$), using tetramethylsilane as an internal standard, with chemical shifts expressed in ppm (δ) and coupling constants (J) in Hz. Proton-coupling patterns were described as singlet (s), doublet (d), triplet (t), or multiplet (m).

2.5. Cell line and culture conditions

A2058 (ATCC[®] CRL-11147TM, LGC ATCC Standards, France) is a melanoma cell line obtained from metastatic cells removed from lymph nodes of a 43-year-old caucasian patient. Due to its highly invasive, metastatic and chemoresistance potentials related to V600E mutation in BRAF and mutations in *PTEN* and *p53* genes, A2058 provides a clinically relevant model for evaluation not only of new anti-melanoma molecules, but also of new chemosensitizer agents, allowing the assessment of combined therapy (Dankort et al., 2009; Juin et al., 2018). Cells were grown in 75 cm² flasks using DMEM (Dutscher, France) supplemented with 10% FCS (Dutscher, France) and 1% penicillin-streptomycin (1000 U.ml⁻¹ and 100 $\mu\text{g.ml}^{-1}$, respectively) (Dutscher, France), at 37 °C in a 5% CO₂ humidified atmosphere.

2.6. Cell viability assay

The antiproliferative activity of extracts (Hex-Bo, CHCl₃-Bo, EtOAc-Bo and MeOH-Bo) and bixin was determined using the MTT (Sigma-Aldrich[®], France) assay (Juin et al., 2018; Mosmann, 1983). Cells (2×10^3 /well) were grown in 96-well plates with extracts (100 $\mu\text{g.ml}^{-1}$) or increasing concentrations of bixin (0.1-100 μM). Cells were also exposed to varying concentrations of vemurafenib (0.1-100 μM) and dacarbazine (0.1-100 μM), alone or combined to bixin (0.1-100 μM) to assess its sensitizing effect. After 72h of treatment, 20 μl of a MTT solution (5 g.L⁻¹) was added to each well and microplates were again incubated for 4h. Subsequently, the cell culture medium was removed and formazan crystals were dissolved in 100 μl DMSO. Absorbance was read at 550 nm using FLUOstar Omega microplate reader (BMG Labtech, France) and then converted into cell growth inhibition (GI%). Cellular

morphology was observed after treatments under inverted phase contrast microscope (Nikon, Eclipse, France). IC_{50} was determined by nonlinear regression analysis using Prism 6.0 (GraphPad Software).

2.7. Cell migration assay

Cells (2×10^4 /well) were incubated and grown to 90% confluence in 24-well plates. Cell monolayers were scratched with a sterile plastic tip, washed with PBS and incubated in a new cell culture medium containing bixin (50 and 100 μ M), dacarbazine (50 and 100 μ M) or combined treatment, for 24h. Cell migration was microscopically (100x) monitored at 0 and 24h (Cisilotto et al., 2018). Results were expressed as percentage of cell migration calculated by measuring the cell surface using ImageJ software.

2.8. Apoptosis analysis

2.8.1. Annexin V-Cy3 and 6-CFDA detection assay

Apoptosis was evaluated by using double staining with annexin V-Cy3 (red) and 6-carboxyfluorescein diacetate (6-CFDA, green) (Sigma-Aldrich[®], France). Cells (5×10^3 /well) were incubated in culture conditions for 24h, and then treated with bixin (50 and 100 μ M), dacarbazine (50 μ M) or both (bixin 50 μ M + dacarbazine 50 μ M) for 72h. Cells were further washed with PBS, suspended in binding buffer and stained with Annexin V and 6-CFDA solution for 10 min, according to manufacturer's recommendations. DAPI solution was also added to the wells for DNA labelling of necrotic cells (Juin et al., 2018). Finally, cells were observed under fluorescent microscope (ZEISS Axion Observer, France).

2.8.2. Caspase-3 colorimetric assay

Caspase-3 activity was determined using a colorimetric assay (CASP3C kit, Sigma-Aldrich[®], France) based on the hydrolysis of the peptide substrate acetyl-Asp-Glu-Val-Asp *p*-nitroanilide (Ac-DEVD-pNA), resulting in the release of *p*-nitroanilide (pNA) (Juin et al., 2018). Cell suspension (2.5 ml at $5 \times 10^5 \text{ cell.ml}^{-1}$) was added to 75 cm^2 flasks containing 12.5 ml of cell culture medium (control group), bixin (50 μ M), dacarbazine (50 μ M) or combined drugs (bixin 50 μ M + dacarbazine 50 μ M) solubilized in cell culture medium. After 72h of treatment, cells were washed with PBS, lysed with lysis buffer, and caspase-3 activity was measured according to manufacturer's protocol. Results were expressed as $\mu\text{mol pNA/min/ml}$. Cells treated with Staurosporine 1 μ M for 4h were used as a positive control.

2.9. Oxidative stress analysis

2.9.1. Determination of ROS levels

Fluorescence microscopy imaging was used to investigate qualitative ROS generation in A2058 cells. Cells (5×10^3 /well) were incubated in culture conditions for 24h, and then exposed to bixin (50 μ M), dacarbazine (50 μ M) and combined drugs for 24h. After treatment, cells were washed with PBS and incubated with 2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA, 20 μ M) solution for 30 min at 37 °C. The reaction mixture was removed and replaced by 200 μ l of PBS in each well. An inverted fluorescent microscope (ZEISS Axio Observer, France) was used to visualize intracellular fluorescence (green) of cells and to capture images.

For quantitative ROS analysis, cells (4×10^3 /well) were seeded in 96-well black bottom culture plate and allowed to adhere for 24h in culture conditions. Then, cells were treated with bixin (50 μ M), dacarbazine (50 μ M) or combined drugs for 24h. Subsequently, culture medium was discarded and cells were washed in PBS before incubation with DCFH-DA 20 μ M solution for 45 min at 37 °C. Fluorescence intensity was measured in FLUOstar Omega microplate reader at excitation wavelength of 480 nm and emission wavelength of 520 nm. Values were expressed as the percentage of fluorescence intensity relative to the control group (untreated cells) (Ahamad et al., 2014).

2.9.2. Determination of MDA levels

Lipid peroxidation was determined by the reaction of malondialdehyde (MDA), an important marker for oxidative stress (Grotto et al., 2009), with thiobarbituric acid (TBA) to form a colorimetric product (532 nm), proportional to the MDA present (Lipid Peroxidation MDA assay kit, Sigma-Aldrich[®], France). Cells (2.5 ml at 5×10^5 cell.ml⁻¹) were grown in 75 cm² flasks to adhere for 24h. Then, cells were treated with bixin (50 μ M), dacarbazine (50 μ M) or combined drugs for 24h. After treatments, cells were washed and suspended in PBS. Cell suspensions were diluted in PBS to obtain standardized concentrations of 1×10^6 cell.ml⁻¹ for all groups. Subsequently, cells were lysed for MDA extraction and quantification according to manufacturer's recommendations.

2.10. Cell cycle analysis

A2058 cells were grown in control culture medium or treated with bixin 50 μM , dacarbazine 50 μM or combined therapy (dacarbazine + bixin) for 72h before being stained for 30 min at 37°C in PBS containing propidium iodide (PI 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), Rnase A (100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) and 0.1% Triton X-100 (ThermoFisher Scientific, France). Cells were analyzed using a FACS Cantoll flux cytometer (BD Biosciences, France) equipped with an air cooled blue LASER ($\lambda=488$ nm, 20 mW). Light diffusion parameters (forward and lateral scatter lights) were optimized to define the size threshold excluding cellular debris and cell clusters for single-cell fluorescence analysis. PI fluorescence was measured using a FL3 filter ($\lambda=670$ nm) and analyzed using the BD FACS Diva Software (BD Biosciences, France). Distribution of A2058 cells in the different cell cycle phases was determined according to their DNA content as measured by the fluorescence intensity of PI: diploid cells (2n): G0/G1 phase; replicative cells ($2n < \text{DNA content} < 4n$): S phase; tetraploid cells (4n): G2/M phase; hypodiploid cells (DNA content $< 2n$): apoptotic sub-G1 phase (Juin et al., 2018).

2.11. Statistical analysis

Data were expressed as mean \pm SEM from three independent experiments. Unpaired Student's t and one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison tests were performed according to the case (statistical significance when $p < 0.05$), using Prism 6.0 (GraphPad software).

3. Results and Discussion

3.1. Chemical composition of bioactive *B. orellana* extracts

Initially, the antiproliferative effect of all extracts was determined using the MTT assay. Hex-Bo, CHCl_3 -Bo and EtOAc-Bo presented high antiproliferative activity at 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (Table 1). MeOH-Bo was considered inactive against A2058 cells. Subsequently, the chemical characterization of bioactive extracts was performed by UPLC-DAD-MS/MS analysis.

Table 1. Antiproliferative activity (AA) of *B. orellana* extracts (100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) against A2058 cells.

Extract	Hex-Bo	CHCl ₃ -Bo	EtOAc-Bo	MeOH-Bo
AA (%)	96.11 \pm 3.43	93.26 \pm 3.24	84.54 \pm 3.16	12.03 \pm 2.30

Results are expressed as mean \pm SEM from at least three independent experiments.

UPLC-DAD has provided a chromatogram containing thirteen major peaks (Figure 1). Among the identified compounds, *Z*-bixin (**8**) was the major chemical constituent in all extracts, in agreement with previous reports (Shahid-ul-Islam et al., 2016; Vilar et al., 2014). Bixin derivatives (norbixin and methyl-bixin) have also been identified (Jondiko and Pattenden, 1989). In fact, bixin is the main apocarotenoid detected in *B. orellana* seeds, and the presence of its derivatives and isomers has been exhaustively reported in the literature, as well as their chromatographic profiles, which allowed us to determine them unambiguously in the analyzed extracts (Mercadante et al., 1997; Rehbein et al., 2007; Tocchini and Mercadante, 2001). Other compounds already described for this plant were also identified, such as geranylgeraniol (**9**), δ -tocotrienol (**12**), γ -tocotrienol (**13**) and eicosatrienoic acid (**4**) (Jondiko and Pattenden, 1989). Moreover, we also manage to identify two compounds previously undescribed in *B. orellana*: naringenin (**1**) and β -12'-apo-carotenoic acid (**11**). To date, only three flavonoids have been reported for this species (leucocyanidin, luteolin and apigenin) (Chisté et al., 2011; Shahid-ul-Islam et al., 2016). In addition to contribute to its chemical knowledge, the identification of the flavonoid naringenin demonstrates that our analytical method may be employed for the simultaneous analysis of carotenoids and phenolic compounds in *B. orellana* extracts (Figures 1, 2 and 3, Table 2).

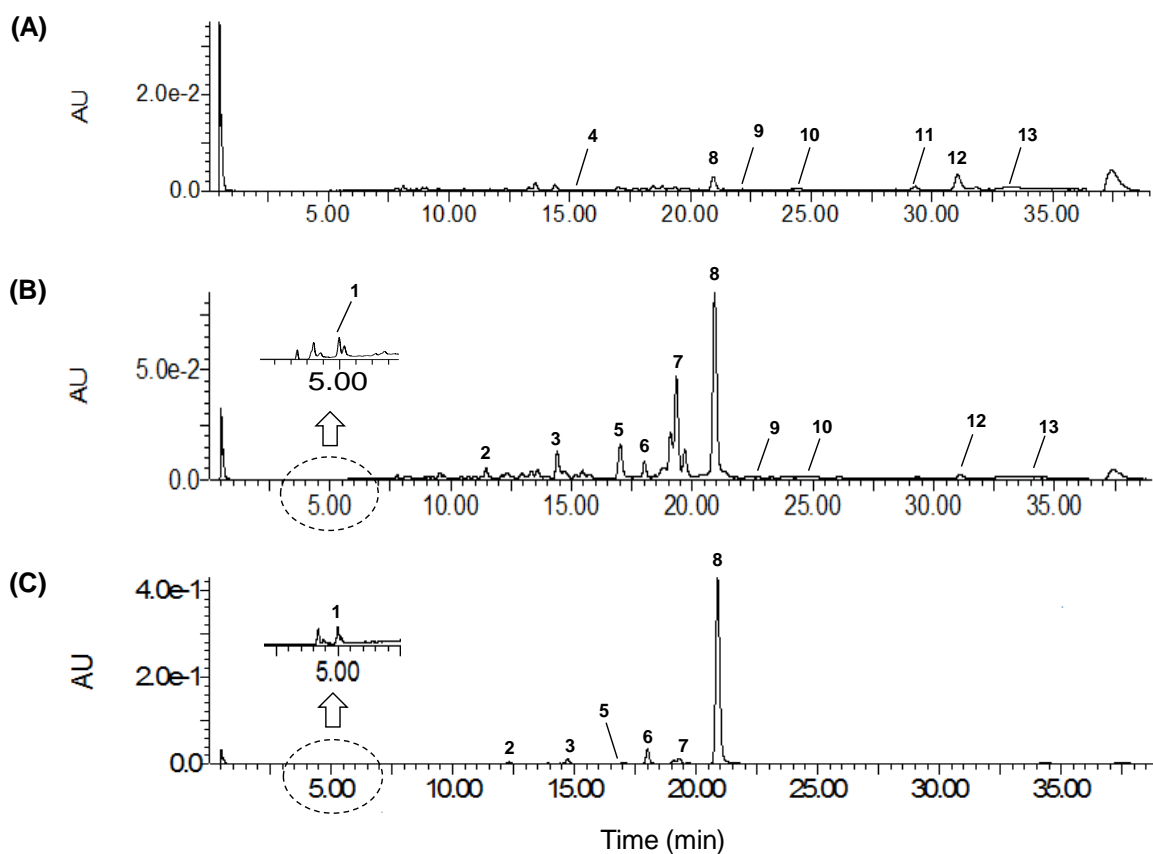


Figure 1. UPLC-DAD chromatograms of Hex-Bo (A), CHCl₃-Bo (B) and EtOAc-Bo (C) at 460 nm. Figure inset was processed at 320 nm. Peak characterization is given in table 2.

Interestingly, UPLC-DAD-MS/MS analysis also showed the presence of two unpublished compounds. Compounds **2** and **5** presented a characteristic UV absorption profile for apocarotenoids, with λ_{max} at around 420, 445 and 475 nm (Table 2). The ions m/z 355.1906 and 369.2057 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 377.1729 and 391.1878 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, allowed to establish the molecular formulas C₂₂H₂₆O₄ and C₂₃H₂₈O₄ for each compound, respectively. The structures of **2** and **5** were proposed after fragmentation study (Figure 4). All fragments present experimental mass consistent with theoretical values. In addition, some analogues of these molecules have been described in *B. orellana* extracts, suggesting that **2** and **5** can occur from known biosynthetic pathways (Mercadante et al., 1997; Rivera-Madrid et al., 2016). All these data led to the identification for **2** and **5** as the original following structures: 6,8'-diapocarotene-6,8'-dioic and 6,7'-diapocarotene-6,7'-dioic acids, respectively.

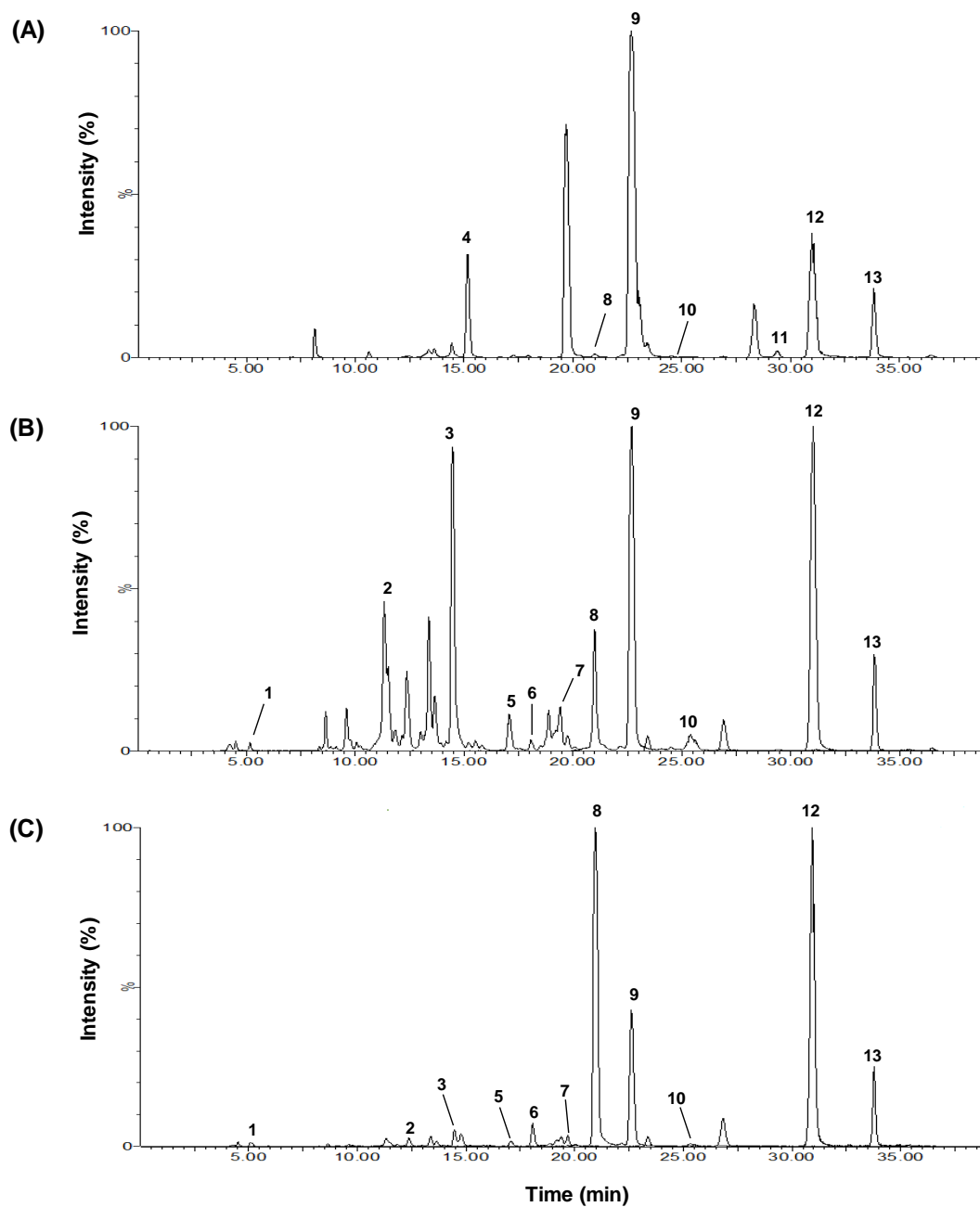


Figure 2. Total ion chromatograms (TICs) of Hex-Bo (A), CHCl₃-Bo (B) and EtOAc-Bo (C), in positive mode ionization. Peak characterization is given in table 2.

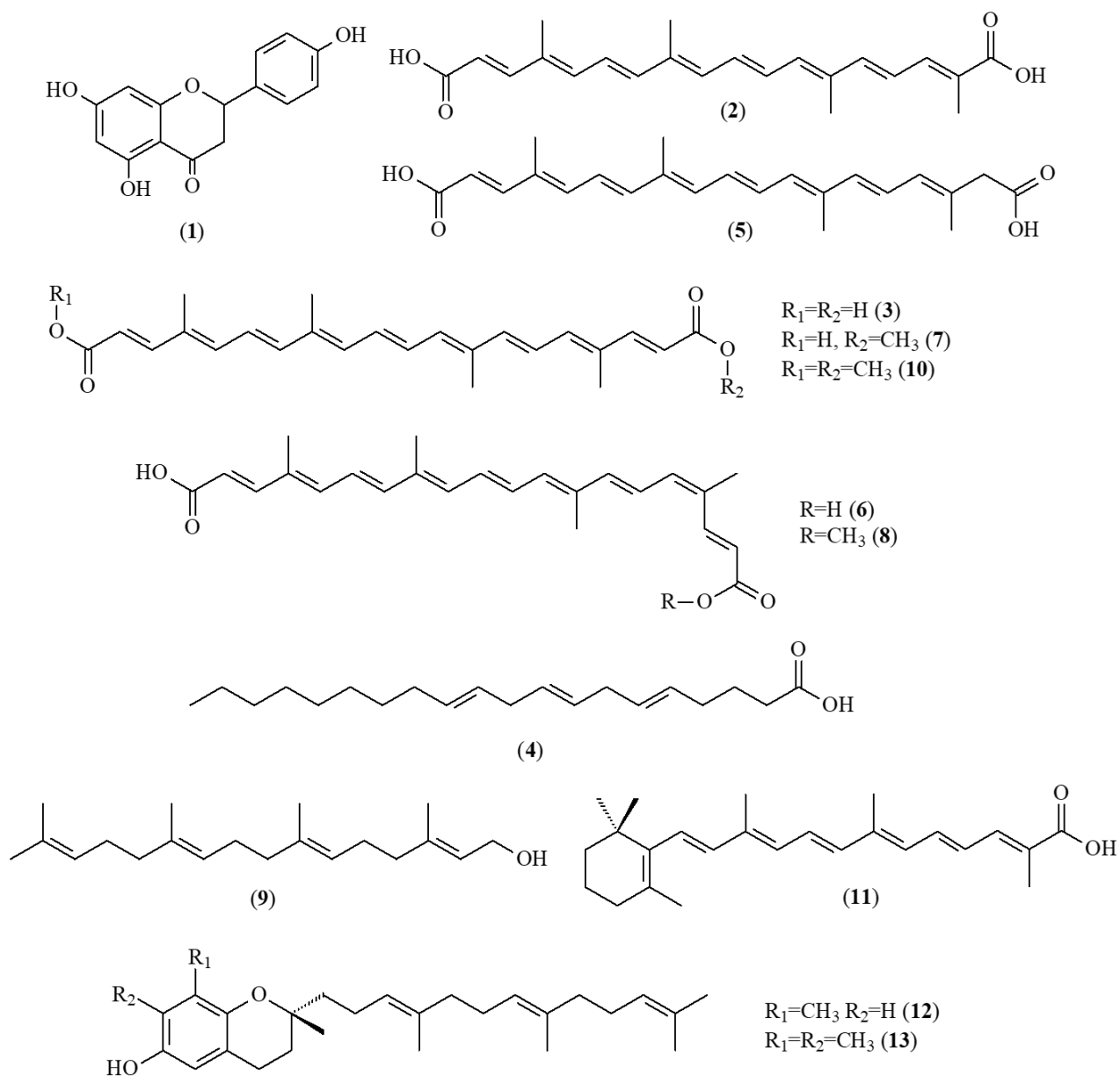


Figure 3. Chemical structure of compounds identified in *B. orellana* extracts. Compound number is in accordance with peak number presented in Figures 1 and 2, and Table 1.

Table 2. Identified compounds in *B. orellana* extracts by UPLC-DAD-MS/MS analysis. Peak number according to Figures 1 and 2.

Peak	Compound	t _R (min)	Molecular formula	λ _{max} (nm)	Experimental <i>m/z</i> (Δ, ppm)			MS ² fragments <i>m/z</i>
					M ⁺	[M+H] ⁺	[M+Na] ⁺	
1	Naringenin	4.99	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	290, 321		273.0759 (1.4 ppm)	153.0182, 147.0440	
2	6,8'-diapocarotene- 6,8'-dioic acid	11.34	C ₂₂ H ₂₆ O ₄	422, 448, 472		355.1906 (0.8 ppm)	377.1729 (0.0 ppm)	337.1802, 319.1695, 277.1592, 256.1455, 225.1274, 145.1009
3	<i>E</i> -norbixin	14.79	C ₂₄ H ₂₈ O ₄	432, 453, 484		381.2060 (1.6 ppm)	403.1884 (0.2 ppm)	349.1793, 321.1845, 283.1677, 251.1430, 217.1232
4	Eicosatrienoic acid	15.37	C ₂₀ H ₃₄ O ₂	-		307.2634 (1 ppm)	329.2457 (0.3 ppm)	289.2528, 271.2423, 261.2576, 247.2057, 231.2115, 135.1166
5	6,7'-diapocarotene- 6,7'-dioic acid	17.05	C ₂₃ H ₂₈ O ₄	425, 445, 478		369.2057 (2.4 ppm)	391.1878 (1.8 ppm)	351.1952, 337.1797, 319.1690, 309.1848, 291.1743, 277.1584, 255.1379, 225.1275, 209.1327, 157.1011, 145.1008
6	<i>Z</i> -norbixin	18.07	C ₂₄ H ₂₈ O ₄	430, 460, 485		381.2064 (0.5 ppm)	403.1890 (1.2 ppm)	363.1952, 345.1848, 335.2005, 317.1902, 282.1616
7	<i>E</i> -bixin	19.31	C ₂₅ H ₃₀ O ₄	430, 455, 485	394.2141 (0.8 ppm)	395.2216 (1.5 ppm)	417.2043 (0.2 ppm)	377.2105, 363.1952, 345.1850, 335.2004, 317.1900, 289, 1954 282.1609, 209.1324, 157.1011, 145.1011
8	<i>Z</i> -bixin	20.95	C ₂₅ H ₃₀ O ₄	430, 461, 490	394.2142 (0.8 ppm)	395.2227 (1.3 ppm)	417.2043 (0.2 ppm)	377.2103, 363.1950, 345.1840, 335.1996, 317.1903, 289.1942, 282.1600, 209.1322, 157.1010, 145.1011
9	Geranylgeraniol	22.78	C ₂₀ H ₃₄ O	-		291.2682 (2.0 ppm)	313.2510 (1.0 ppm)	273.2581, 233.2265, 217.1953, 191.1781, 177.1638, 163.1489,

								149.1310, 135.1173, 123.1163, 109.1012, 95.0859
10	Methyl-bixin	24.50	C ₂₆ H ₃₂ O ₄	432, 452, 482	408.2297 (1.0 ppm)	409.2351 (6.8 ppm)	431.2199 (0.2 ppm)	393.2072, 377.2113, 349.2157, 317.1895, 289.1946
11	β-12'-apo-carotenoic acid	29.41	C ₂₅ H ₃₄ O ₂	395	366.2556 (0.8 ppm)	367.2631 (1.6 ppm)	389.2458 (0.5 ppm)	349.2513, 297.1849, 268.2185, 243.1380, 225.1275, 199.1478
12	δ-tocotrienol	31.02	C ₂₇ H ₄₀ O ₂	296		397.3097 (2.5 ppm)	419.2924 (0.5 ppm)	191.1064, 177.0912, 137.0592,
13	γ-tocotrienol	33.82	C ₂₈ H ₄₂ O ₂	297		411.3248 (3.6 ppm)	433.3078 (1.1 ppm)	205.1220, 191.1063, 151.0748

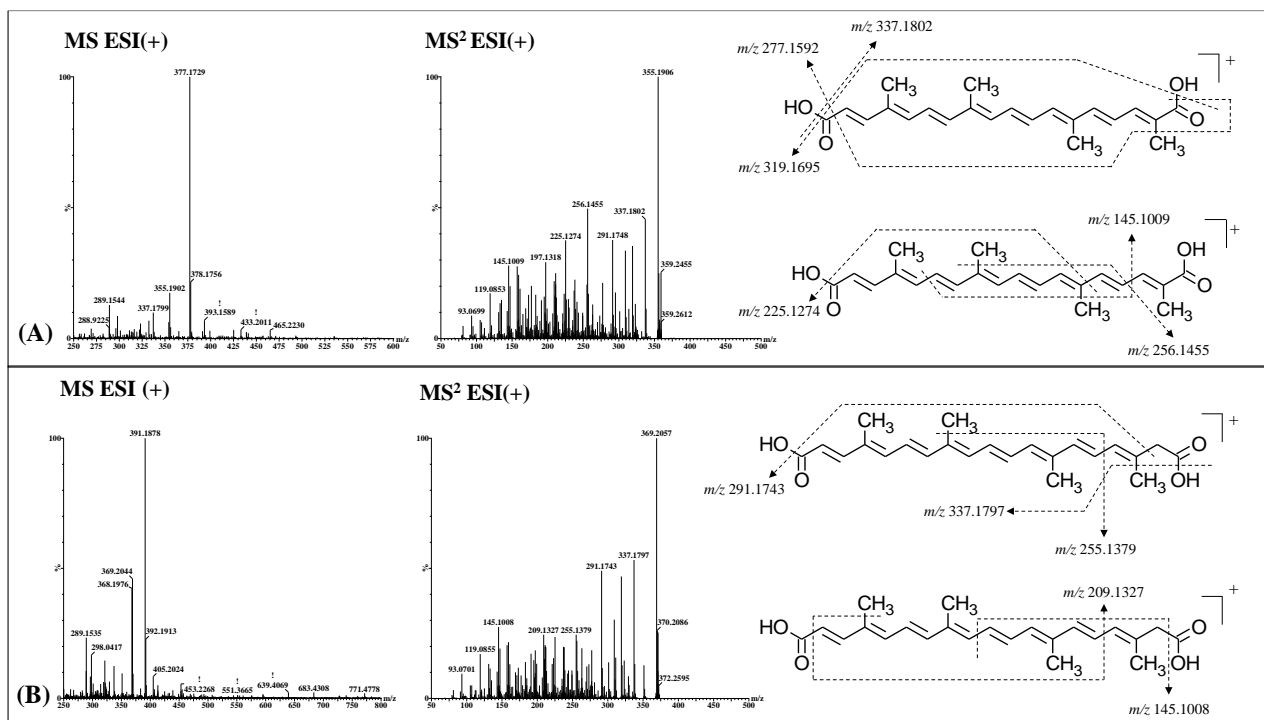


Figure 4. Fragmentation study of compounds 2 (A) and 5 (B).

3.2. Purification and characterization of bixin

Analytical UPLC analysis at 460 nm showed 91% purity for the bixin isomer isolated from the Hex-Bo. Peak at 20.95 min showed λ_{\max} at 430, 461 and 490 nm, with III/II band ratio of 33%, in accordance with previous studies (Chisté et al., 2011; Rios et al., 2007, 2005). In the positive ion mode, the $[M+H]^+$ molecular ion at m/z 395.2221 was dominant, and the MS/MS spectrum displayed fragments attributed to consecutive losses of H_2O (m/z 377.2103), CH_3OH (m/z 363.1950), $CH_3OH + CO$ (m/z 335.1996) and $CH_3OH + CO + H_2O$ (m/z 317.1903) (Figure 5), all consistent with literature data (Chisté et al., 2011; Rehbein et al., 2007).

NMR experiments were performed in order to confirm the putative structure. In the olefinic region, 1H NMR spectra showed signals at δ_H 7.88 (1H, d, $J = 15.5$ Hz, H-8'), δ_H 7.26 (1H, d, $J = 15.5$ Hz, H-8), δ_H 5.94 (1H, d, $J = 15.5$ Hz, H-7') and δ_H 5.82 (1H, d, $J = 15.5$ Hz, H-7) along with overlapped resonances integrating for ten protons at δ_H 6.40-6.95. A singlet integrating for three protons at δ_H 3.79 was attributed to the methyl ester protons. In addition, singlets at δ_H 1.89-1.97 accounted for the protons of the methyl groups linked to the polyunsaturated chain. In comparison with all-*E*-bixin or all-*Z*-bixin, the disruption of the symmetry in the NMR shifts is due to the influence of a single *Z* double bond in $\Delta 9'-10'$, and to the presence of a methyl ester group in 7', instead of a carboxylic acid in position 7. (Rehbein et al., 2007). The correlations observed in the 1H - 1H COSY spectrum confirm the unequivocal

assignment of the signals H-7/H-8 and H-7'/H-8' (Figure 5). H-8', neighboring the methyl ester group, is slightly more deshielded than H-8 neighboring the acid function. Previous chemical studies have also shown that the 9'-Z-bixin isomer is the most abundant in annatto seeds (Raddatz-Mota et al., 2017; Rivera-Madrid et al., 2016; Rodrigues et al., 2014; Tibodeau et al., 2010; Vilar et al., 2014), corroborating our results.

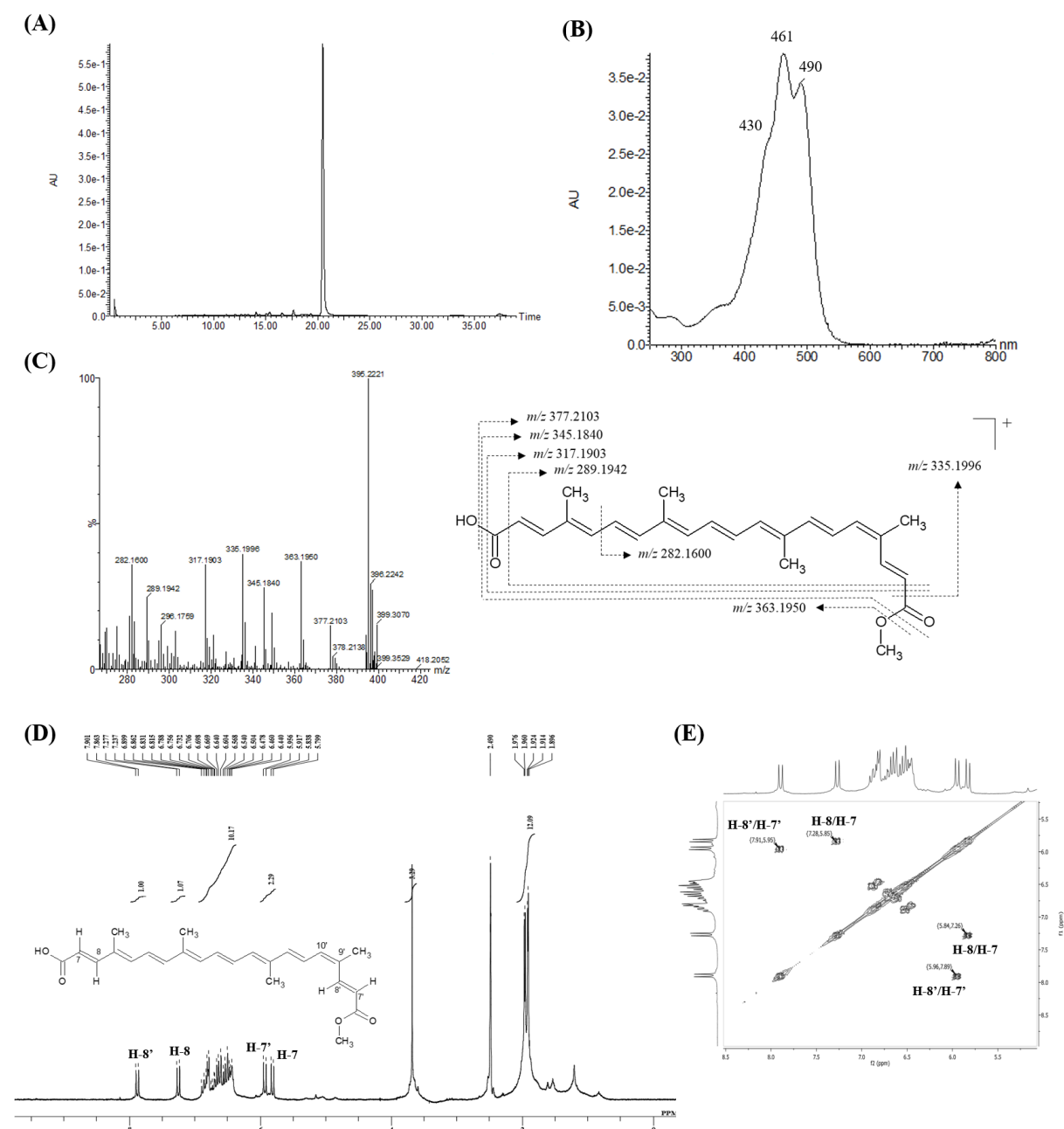


Figure 5. UPLC-DAD chromatogram (A), UV spectrum (B), MS²-ESI spectrum in positive mode ionization (C), ¹H NMR (D) and ¹H-¹H COSY (E) spectra of 9'-Z-bixin (bixin) purified from *B. orellana*.

3.3. Exposure to bixin inhibits proliferation and migration of A2058 cells

The intrinsic antiproliferative effect of bixin was determined by the MTT assay. Bixin promoted concentration-dependent cell growth inhibition, whose IC_{50} was determined as 40 μM (Figure 6). In the cell migration assay, exposure to bixin (50 and 100 μM) suppressed cell migration into the zone free of cells (Figure 6B). The migration rate decreased approximately in 55 and 72%, respectively, compared to the control group. These results suggest that bixin inhibits both proliferation and cell mobility.

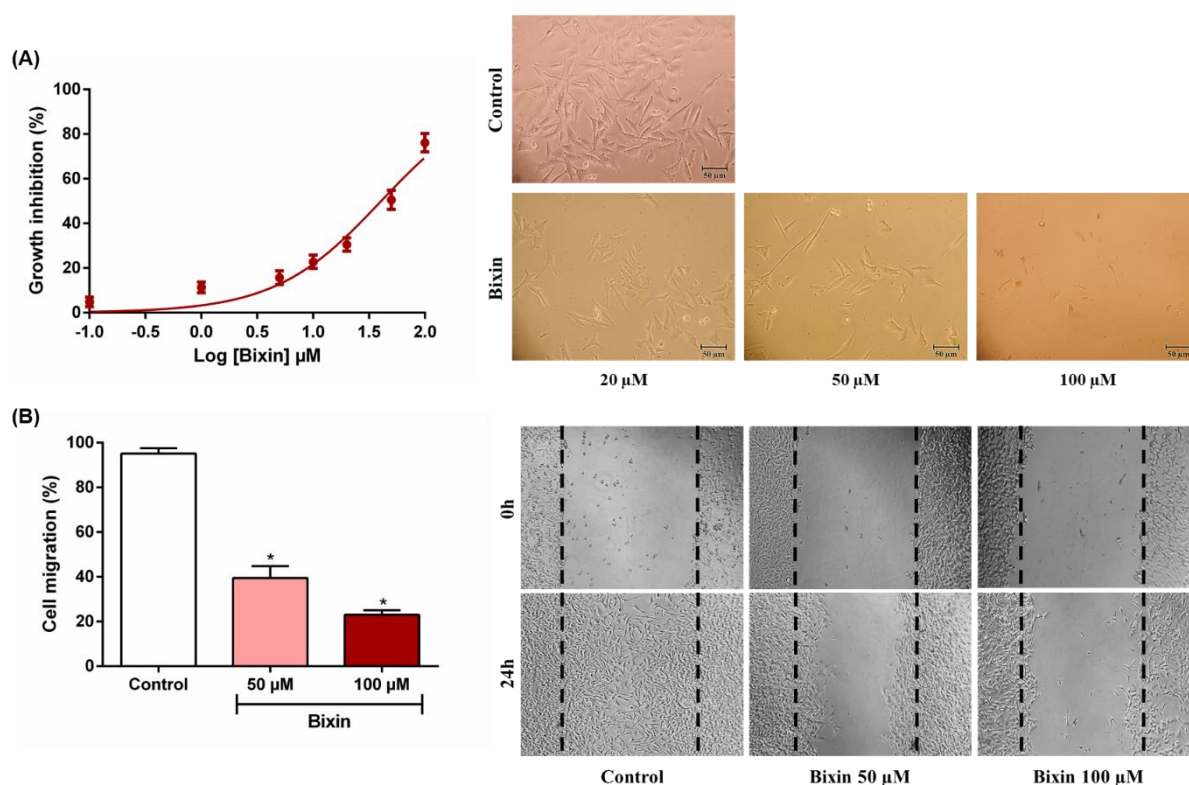


Figure 6. Effect of bixin (0.1-100 μM) on cell viability (A) and cell migration (B). Photomicrographs represent the reduction of cell population (A) and cell migration into the zone free of cells (B) according to the treatment. Data are expressed as mean \pm SEM, * $p < 0.05$ (ANOVA one-way followed by Tukey's post-test).

3.4. Bixin potentiates antiproliferative and antimigratory activities of dacarbazine

To assess the capacity of bixin to potentiate the antiproliferative effect of market-available anticancer agents, A2058 cells were treated for 72h with bixin, vemurafenib and dacarbazine. Combined treatments were applied in order to compare them to the respective monotherapy. Vemurafenib is a BRAF inhibitor widely used in the treatment of metastatic melanoma, whereas dacarbazine is an anticancer drug commonly used in combination with

other chemotherapeutic agents (e.g. vemurafenib). As shown in Table 3, A2058 cells were sensitive to vemurafenib ($IC_{50} = 6.96 \mu\text{M}$), but resistant to dacarbazine therapy ($IC_{50} > 100 \mu\text{M}$).

Table 3. Antiproliferative activity of bixin and combined therapy (bixin + anticancer drugs) against A2058 cells. Data are presented as IC_{50} values and 95% confidence interval.

Monotherapy	IC_{50} (μM)	Combined therapy	IC_{50} (μM)
Bixin	40.53 (34.11 – 48.17)	-	-
Vemurafenib	6.96 (5.87 – 8.24)	Vemurafenib + Bixin	8.03 (7.09 – 9.08)
Dacarbazine	>>100	Dacarbazine + Bixin	31.85 (23.90 – 42.45)

Bixin was not able to potentiate the antiproliferative effect of vemurafenib (Figure 7). However, melanoma cells were sensitive to dacarbazine when combined to bixin, exhibiting $IC_{50} = 31.85 \mu\text{M}$. Compared to the monotherapy, combined treatment induced a significant reduction in cell density (Figure 7D). Control A2058 cells showed a regular epithelial morphology and became sub-confluent in 72h, while treated cells exhibited cell shrinkage and appearance of apoptotic cells.

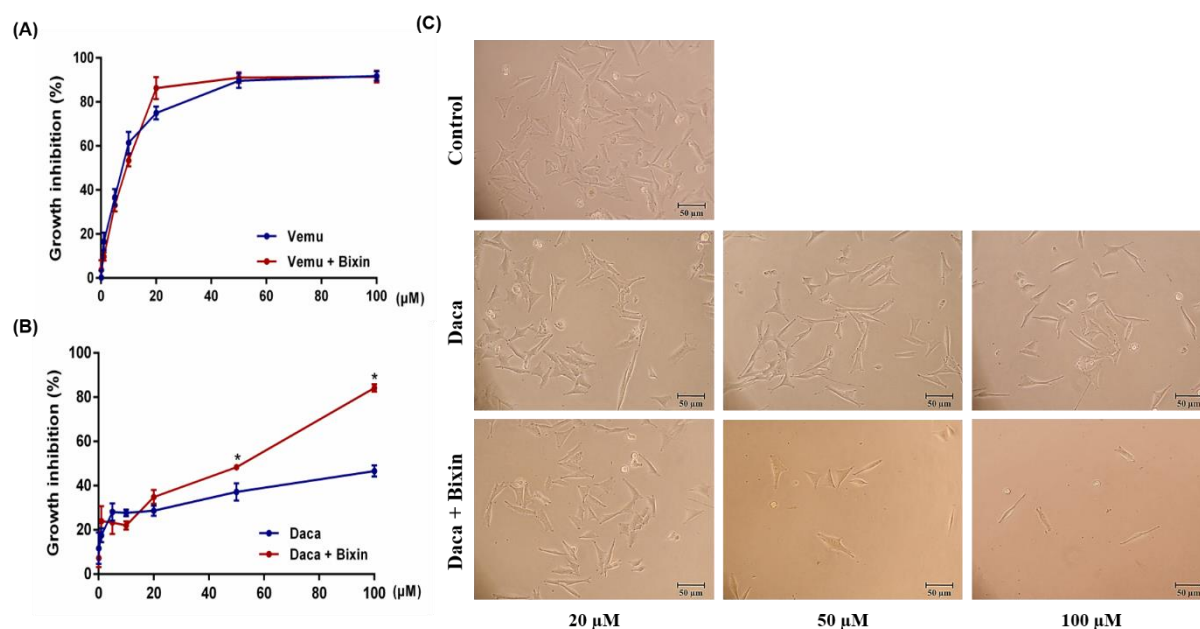


Figure 7. Antiproliferative activity of bixin combined to vemurafenib (vemu) (A) and dacarbazine (daca) (B) in the MTT assay. Photomicrographs show reduction of cell population

and cell shrinkage promoted by dacarbazine and bixin + dacarbazine treatments (C). Data are expressed as mean \pm SEM, * p <0.05 according to unpaired Student's *t*.

Although A2058 cells have been shown to be resistant to dacarbazine therapy in the MTT assay, a significant reduction in cell migration was observed after 24h treatment with dacarbazine 50 and 100 μ M. In addition, combined treatment (dacarbazine + bixin) presented a more intense pharmacological response when compared to monotherapy, suggesting that bixin also enhances the antimigratory potential of dacarbazine (Figure 8).

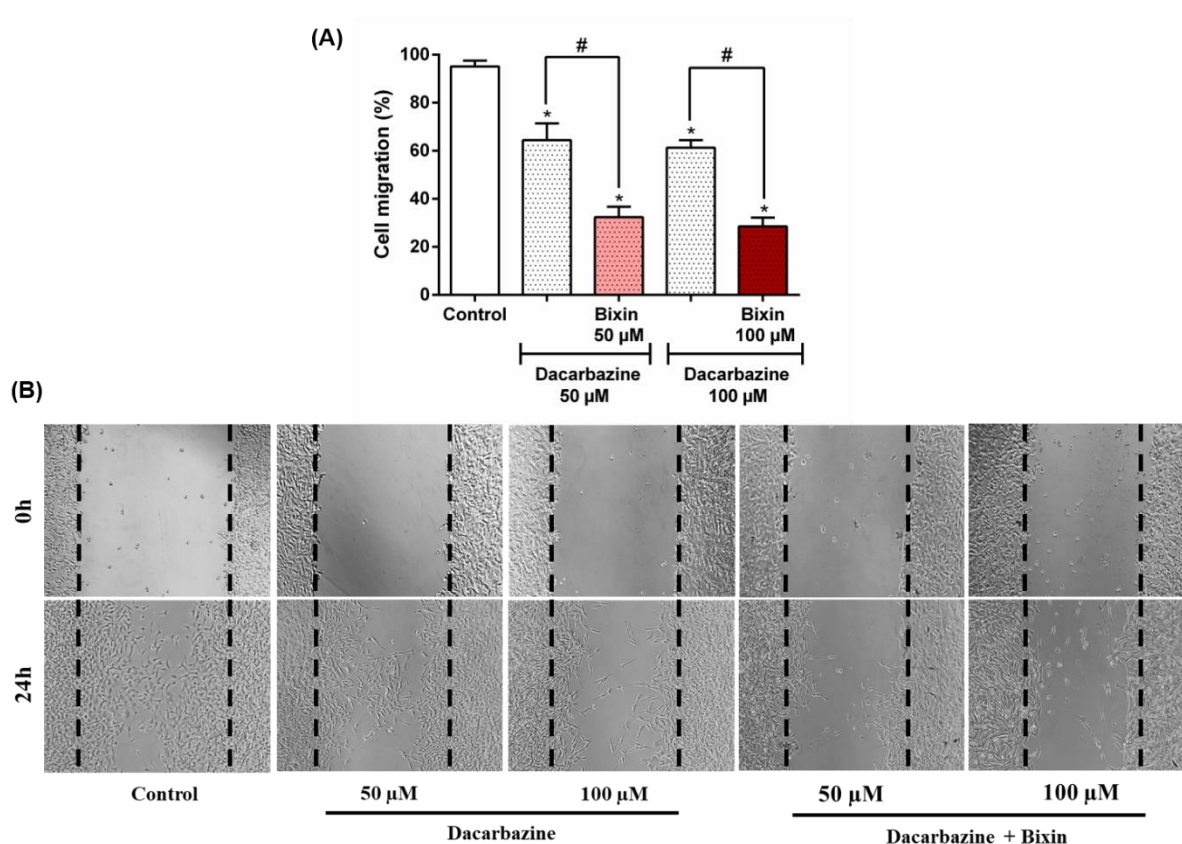


Figure 8. Bixin enhances antimigratory effect of dacarbazine (A). Photomicrographs represent cell migration into the zone free of cells according to the treatment (B). Data are expressed as mean \pm SEM, * p <0.05 (vs control group) and # p <0.05 (vs. dacarbazine), according to ANOVA one-way followed by Tukey's post-test.

3.5. Bixin enhances pro-apoptotic effect of dacarbazine

The pro-apoptotic effect of bixin and combined therapy was determined by double fluorescence staining with Annexin V and 6-CFDA, and by measuring the caspase-3 activity. 6-CFDA is used to measure cell viability, while Annexin V is a classic marker of

phosphatidylserine externalization, a typical phenomenon for apoptotic cells. In this sense, living cells will only stain with 6-CFDA (green), cells in early apoptosis will stain both with Annexin V (red) and 6-CFDA, and cells in late apoptosis will stain with Annexin V and DAPI (blue). As shown in Figure 9, bixin 50 μM increased the number of Annexin V and 6-CFDA double-stained cells, and Annexin V and DAPI stained cells, compared to control, suggesting that bixin presents significant pro-apoptotic activity. Dacarbazine 50 μM treatment also increased the number of cells in early apoptosis, but its pro-apoptotic effect was significantly improved when associated with bixin (Figure 9A). Moreover, caspase-3 activity was significantly higher ($p < 0.05$) in cells treated with combined therapy compared to treatments with dacarbazine or bixin (Figure 9B). Caspase-3 is one of the most important pro-apoptotic enzymes, which can be activated by both intrinsic (mitochondrial) and extrinsic (death ligand) apoptosis pathways.

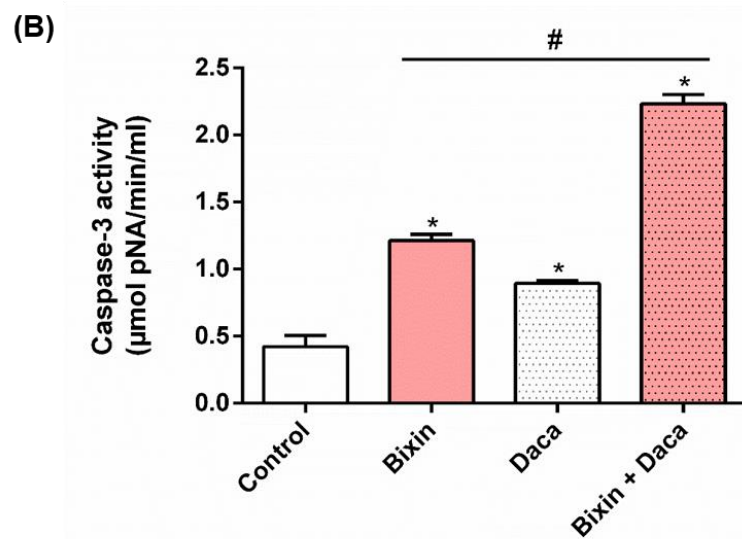
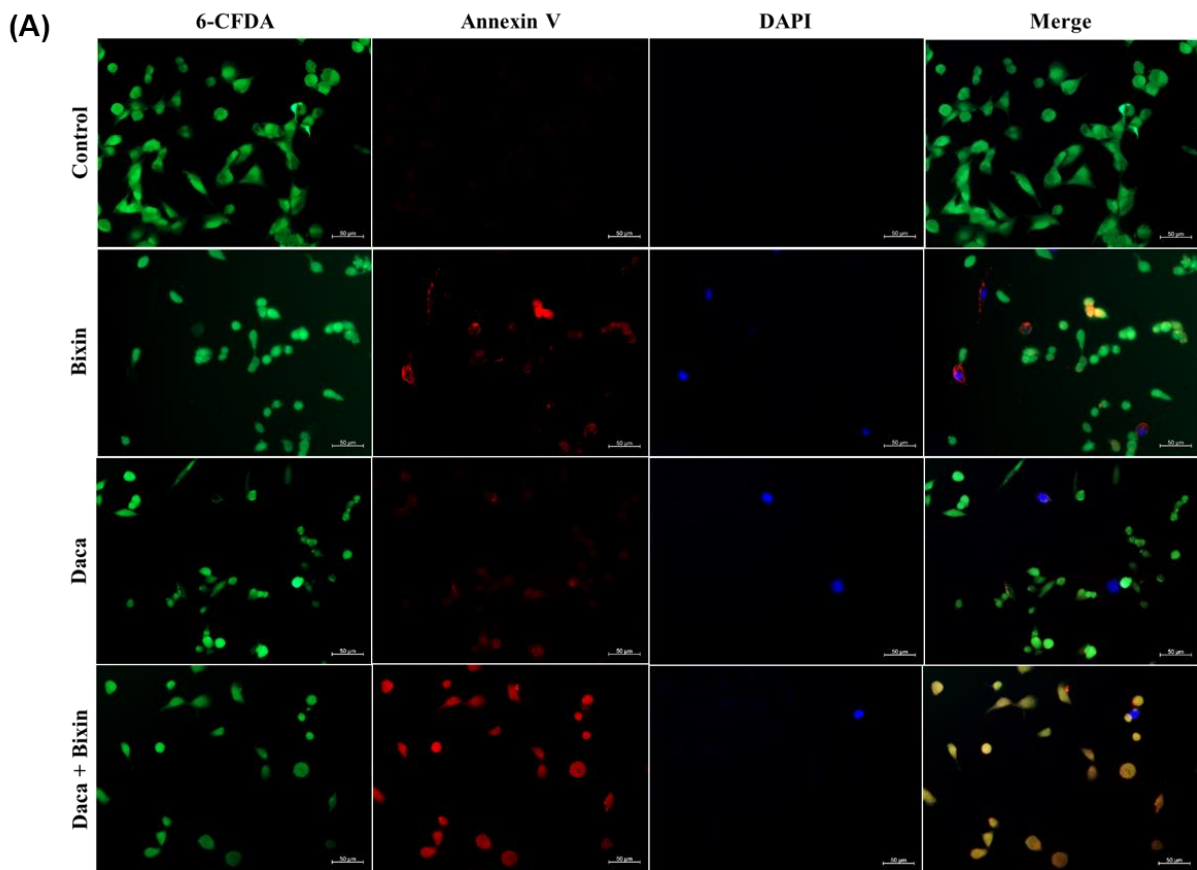


Figure 9. Bixin improves pro-apoptotic effect of dacarbazine. Fluorescent micrographs represent A2058 cells after Annexin V (red), 6-CFDA (green) and DAPI (blue) staining (A). Caspase-3 activity was evaluated after 72h of treatment (B). Cells were treated with bixin 50 μ M, dacarbazine 50 μ M (daca) or combined therapy (bixin + daca). Data are expressed as mean \pm SEM, * p <0.05 (vs. control group) and # p <0.05 (vs. dacarbazine), according to ANOVA one-way followed by Tukey's post-test.

3.6. Bixin increases oxidative stress in combined treatment with dacarbazine

Although carotenoids are widely known for their antioxidant potential, a dual anti/pro-oxidant activity can also be observed for the same molecules. In fact, carotenoids exhibit high reactivity due to their conjugated double bonds system, which allows them to be readily oxidized by reactive oxygen species (ROS). In regular or high amounts of ROS, they are rapidly autoxidized and exhibit an expressive pro-oxidant activity. Pro-oxidant effects have also been reported when high concentrations of carotenoids were used. In cancer cells, these effects may induce oxidative damage to DNA, cell membrane and proteins involved in cell survival, inhibiting tumor growth (Eghbaliferiz and Iranshahi, 2016; Nagao, 2004; Ribeiro et al., 2018). As previously reported, bixin has anti and pro-oxidant potential based on the tested concentrations and other biochemical factors (Anantharaman et al., 2016; Mohan et al., 2018; Tay-agbozo et al., 2018). The pharmacological activities of bixin have been demonstrated mostly on carcinogenesis and lipid peroxidation (Anantharaman et al., 2016; Santos et al., 2016), but the involvement of its pro-oxidant effect in sensitizing tumor cells to chemotherapy has not been properly explored so far.

In this study, we investigated ROS and MDA levels in A2058 cells treated with bixin, dacarbazine and combined drugs. ROS generation was assessed 24h after treatments. Fluorescent micrographs of stained cells suggested that bixin 50 μ M and dacarbazine 50 μ M elevated ROS intensity compared to control cells. In addition, combined therapy (bixin + dacarbazine) exhibited higher ROS intensity than control and monotherapy conditions (Figure 10A). Quantitative measurement of ROS level corroborated this result (Figure 10B). ROS production was significantly increased ($p < 0.05$) in cells treated with combined therapy compared to monotherapies. Similarly, combined therapy also increased MDA production compared to treatment with dacarbazine or bixin, suggesting cell membrane damage possibly caused by increased ROS production (Figure 10C). Possible damage to the cell membrane could facilitate the entry of dacarbazine into the cell, justifying the enhancement of its pro-apoptotic effect during combined therapy.

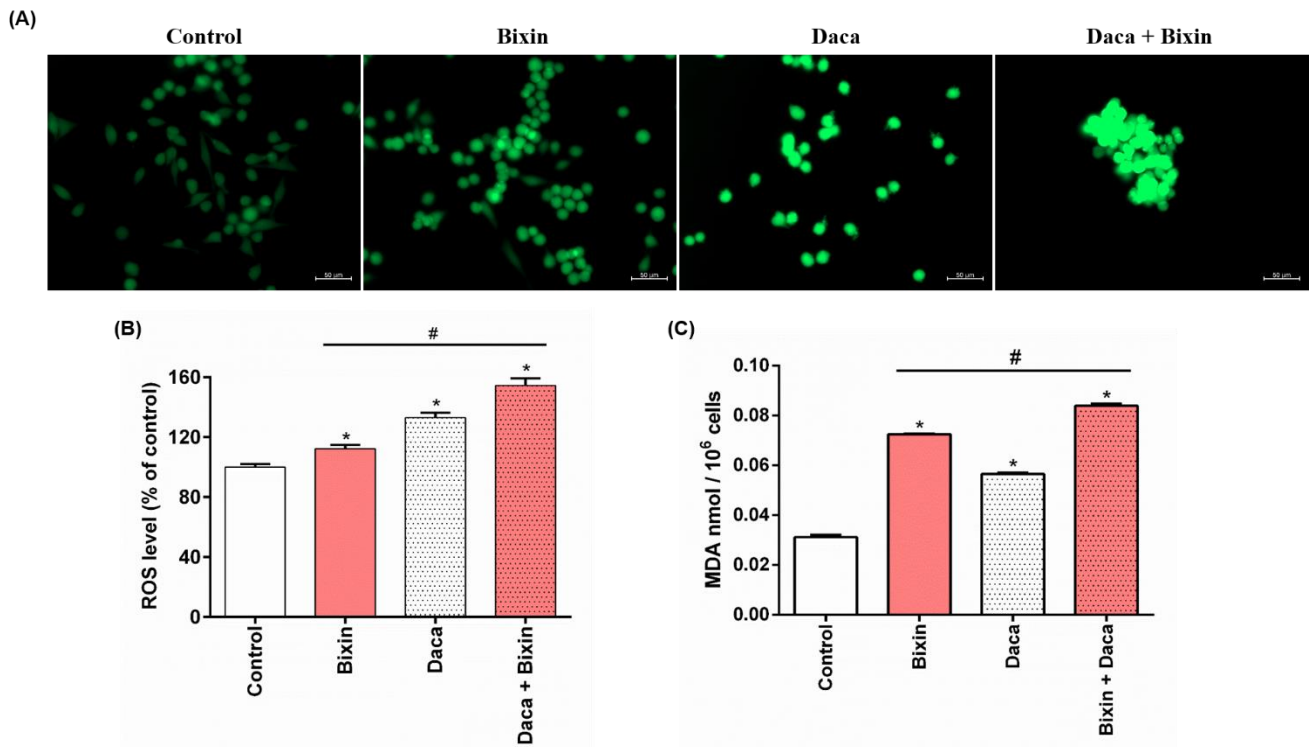


Figure 10. Effect of bixin 50 μM , dacarbazine 50 μM (daca), and combined therapy (bixin + daca) on qualitative (A) and quantitative (B) ROS generation and MDA production (C) in A2058 cells. Data are expressed as mean \pm SEM, * p <0.05 (vs. control group) and # p <0.05 (vs. bixin and dacarbazine groups), according to ANOVA one-way followed by Tukey's post-test.

3.7. Cell cycle analysis

Evaluation of cell cycle progression by flow cytometry revealed an increase in G2/M cell population after treatment with bixin 50 μM (Figure 11). Anantharaman et al. (2016) has also demonstrated that bixin induces cell cycle arrest in the G2/M phase in experiments performed with B16 murine melanoma cells. In addition, our results also showed an increase in sub-G1 (apoptotic) cells after exposure to dacarbazine 50 μM and combined therapy (dacarbazine + bixin) compared to untreated cells. However, no significant change between these groups was observed, indicating that bixin exerts no significant contribution on dacarbazine-induced cell cycle arrest.

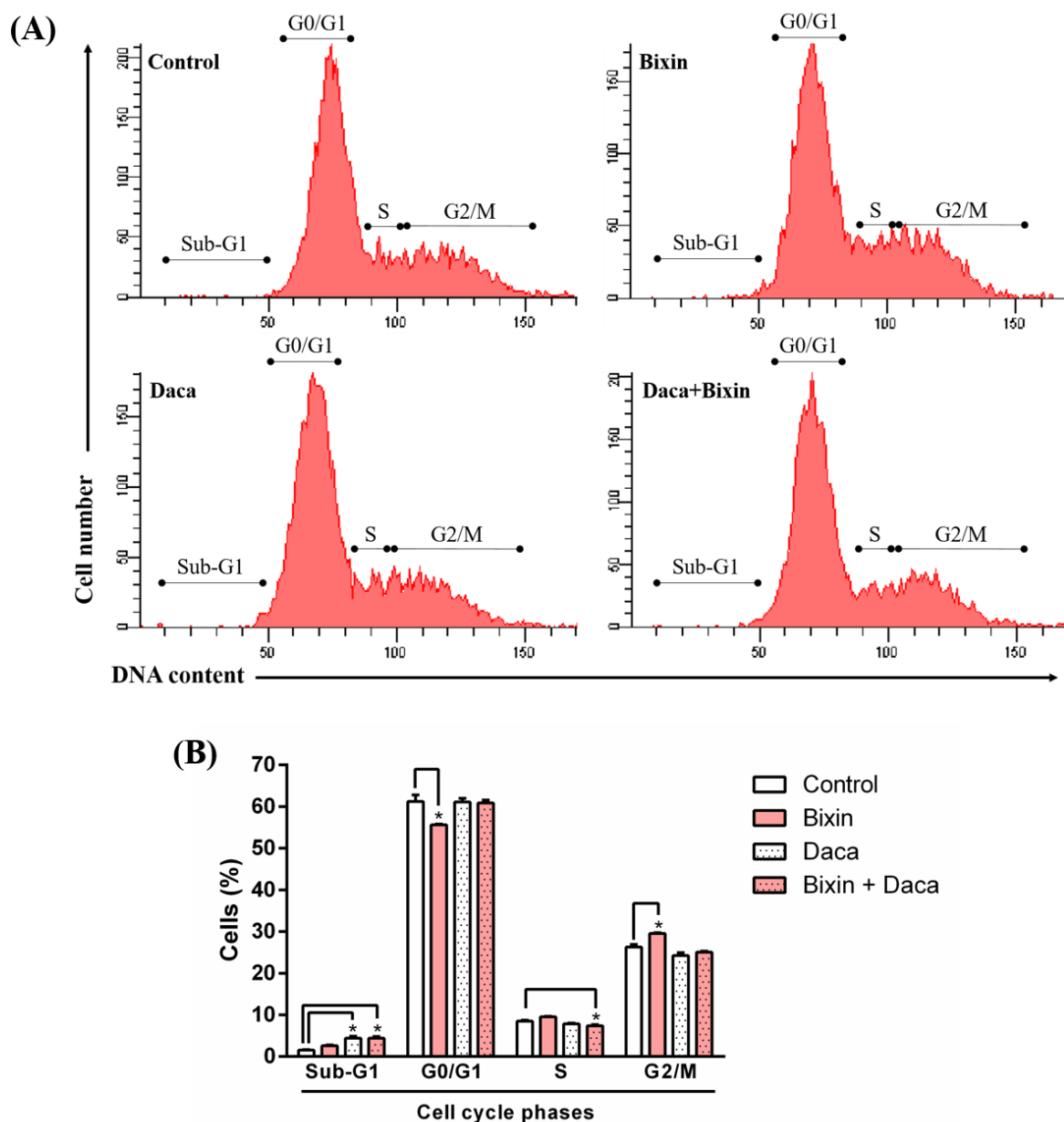


Figure 11. Effect of bixin 50 μM , dacarbazine 50 μM (daca) and combined therapy (daca + bixin) on different phases of cell cycle. A2058 cells were treated for 72h, stained with propidium iodide and measured by flow cytometry, as shown in the representative histograms (A) and quantitative distribution of cells in different phases of cell cycle (B). Data are expressed as mean \pm SEM, * $p < 0.05$ (vs. control group) according to ANOVA one-way followed by Tukey's post-test.

4. Conclusion

B. orellana bioactive extracts were chemically characterized by UPLC-DAD-MS/MS analysis, which led to the identification of two new apocarotenoids (compounds **2** and **5**). After being detected as a major component, 9'-Z-bixin was purified and tested in viability and cell

migration models. *In vitro* assays showed that bixin has restored the sensitivity of A2058 cells to dacarbazine therapy and enhanced its activity on cell migration. Different experiments also indicated that this apocarotenoid potentiates the pro-apoptotic effect of dacarbazine by increasing oxidative stress. However, further pharmacological investigations, especially using animal models, are mandatory to confirm these outcomes.

Acknowledgements

This study was supported by the French cancer league (Comité 17 de la Ligue Nationale contre le Cancer).

References

- Agner, A.R., Barbisan, L.F., Scolastici, C., Salvadori, D.M.F., 2004. Absence of carcinogenic and anticarcinogenic effects of annatto in the rat liver medium-term assay. *Food Chem. Toxicol.* 42, 1687–1693. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2004.06.005>
- Ahamad, M.S., Siddiqui, S., Jafri, A., Ahmad, S., Afzal, M., Arshad, M., 2014. Induction of apoptosis and antiproliferative activity of naringenin in human epidermoid carcinoma cell through ROS generation and cell cycle arrest. *PLoS One* 9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110003>
- Anantharaman, A., Hemachandran, H., Mohan, S., Manikoth Ayyathan, D., Kumar, D.T., George Priya Doss, C., Siva, R., 2016. Induction of apoptosis by apocarotenoids in B16 melanoma cells through ROS-mediated mitochondrial-dependent pathway. *J. Funct. Foods* 20, 346–357. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.11.019>
- Bautista, A.R.P.L., Moreira, E.L.T., Batista, M.S., Miranda, M.S., Gomes, I.C.S., 2004. Subacute toxicity assessment of annatto in rat. *Food Chem. Toxicol.* 42, 625–629. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2003.11.007>
- Bhatia, S., Tykodi, S.S., Thompson, J.A., 2009. Treatment of metastatic melanoma: an overview. *Oncology (Williston Park)*. 23, 488–96.
- Chakraborty, R., Wieland, C.N., Comfere, N.I., 2013. Molecular targeted therapies in metastatic melanoma. *Pharmgenomics. Pers. Med.* 6, 49–56. <https://doi.org/10.2147/PGPM.S44800>
- Chapman, P.B., Hauschild, A., Robert, C., Haanen, J.B., Ascierto, P., Larkin, J., Dummer, R., 2011. Improved survival with vemurafenic in melanoma with BRAF V600E mutation. *N Eng J Med* 364, 2507–2516. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1103782>. Improved
- Chisté, R.C., Yamashita, F., Gozzo, F.C., Mercadante, A.Z., 2011. Simultaneous extraction and

- analysis by high performance liquid chromatography coupled to diode array and mass spectrometric detectors of bixin and phenolic compounds from annatto seeds. *J. Chromatogr. A* 1218, 57–63. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.10.094>
- Cisilotto, J., Sandjo, L.P., Faqueti, L.G., Fernandes, H., Joppi, D., Biavatti, M.W., Creczynski-Pasa, T.B., 2018. Cytotoxicity mechanisms in melanoma cells and UPLC-QTOF/MS2 chemical characterization of two Brazilian stingless bee propolis: Uncommon presence of piperidinic alkaloids. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 149, 502–511. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.11.038>
- Dankort, D., Curley, D.P., Cartlidge, R.A., Nelson, B., Karnezis, A.N., Damsky Jr, W.E., You, M.J., DePinho, R.A., McMahon, M., Bosenberg, M., 2009. BRAFV600E cooperates with Pten loss to induce metastatic melanoma. *Nat. Genet.* 41, 544–552. <https://doi.org/10.1038/ng.356>
- de Oliveira Júnior, R.G., Christiane Adrielly, A.F., da Silva Almeida, J.R.G., Grougnet, R., Thiéry, V., Picot, L., 2018. Sensitization of tumor cells to chemotherapy by natural products: A systematic review of preclinical data and molecular mechanisms. *Fitoterapia* 129, 383–400. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2018.02.025>
- Eghbaliferiz, S., Iranshahi, M., 2016. Prooxidant Activity of Polyphenols, Flavonoids, Anthocyanins and Carotenoids: Updated Review of Mechanisms and Catalyzing Metals. *Phyther. Res.* 1391, 1379–1391. <https://doi.org/10.1002/ptr.5643>
- Flaherty, K.T., McArthur, G., 2010. BRAF, a target in melanoma. *Cancer* 116, 4902–4913. <https://doi.org/10.1002/cncr.25261>
- Garbe, C., Radny, P., Linse, R., Dummer, R., Gutzmer, R., Ulrich, J., Stadler, R., Weichenthal, M., Eigentler, T.K., Ellwanger, U., Hauschild, A., 2008. Adjuvant low-dose interferon α 2a with or without dacarbazine compared with surgery alone: A prospective-randomized phase III DeCOG trial in melanoma patients with regional lymph node metastasis. *Ann. Oncol.* 19, 1195–1201. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdn001>
- Grotto, D., Santa Maria, L., Valentini, J., Paniz, C., Schmitt, G., Garcia, S.C., Pomblum, V.J., Rocha, J.B.T., Farina, M., 2009. Importance of the lipid peroxidation biomarkers and methodological aspects for malondialdehyde quantification. *Quim. Nova* 32, 169–174. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000100032>
- Jin, S., Mishra-kalyani, P.S., Sridhara, R., 2018. Unresectable and Metastatic Melanoma of the Skin: Literature Review of Clinical Trials and Efficacy Endpoints Since 2000. <https://doi.org/10.1177/2168479018769286>
- Jondiko, I.J.O., Pattenden, G., 1989. Terpenoids and an apocarotenoid from seeds of *Bixa*

- orellana. *Phytochemistry* 28, 3159–3162. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(89\)80298-5](https://doi.org/10.1016/0031-9422(89)80298-5)
- Juin, C., Oliveira Junior, R.G. de, Fleury, A., Oudinet, C., Pytowski, L., Bérard, J.B., Nicolau, E., Thiéry, V., Lanneluc, I., Beaugeard, L., Prunier, G., Almeida, J.R.G.D.S., Picot, L., 2018. Zeaxanthin from *Porphyridium purpureum* induces apoptosis in human melanoma cells expressing the oncogenic BRAF V600E mutation and sensitizes them to the BRAF inhibitor vemurafenib. *Brazilian J. Pharmacogn.* 28, 457–467. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2018.05.009>
- Locatelli, C., Filippin-monteiro, F.B., Creczynski-pasa, T.B., 2013. Current Therapies and New Pharmacologic Targets for Metastatic Melanoma. *Recent Adv. Biol. Ther. Manag. Melanoma.* <https://doi.org/10.5772/46052>
- MacKie, R.M., Hauschild, A., Eggermont, A.M.M., 2009. Epidemiology of invasive cutaneous melanoma. *Ann. Oncol.* 20, vi1-vi7. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdp252>
- Mercadante, A.Z., Steck, A., Pfander, H., 1997. Isolation and structure elucidation of minor carotenoids from annatto (*Bixa orellana* L.) seeds. *Phytochemistry* 46, 1379–1383. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(97\)00462-7](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(97)00462-7)
- Mohan, S., Rajendra, P., Hemachandran, H., Kumar, P., 2018. Prospects and progress in the production of valuable carotenoids: Insights from metabolic engineering, synthetic biology, and computational approaches 266, 89–101. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.12.010>
- Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55–63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)
- Mouawad, R., Sebert, M., Michels, J., Bloch, J., Spano, J.P., Khayat, D., 2010. Treatment for metastatic malignant melanoma: Old drugs and new strategies. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 74, 27–39. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2009.08.005>
- Nagao, A., 2004. Functions and Actions of Retinoids and Carotenoids: Building on the Vision of James Allen Olson Carotene Oxygenases: A New Family of Double Bond Cleavage Enzymes. *Am. Soc. Nutr. Sci.* 246–250.
- Paumgarten, F.J.R., De-Carvalho, R.R., Araujo, I.B., Pinto, F.M., Borges, O.O., Souza, C.A.M., Kuriyama, S.N., 2002. Evaluation of the developmental toxicity of annatto in the rat. *Food Chem. Toxicol.* 40, 1595–1601. [https://doi.org/10.1016/S0278-6915\(02\)00133-3](https://doi.org/10.1016/S0278-6915(02)00133-3)
- Priya, R., Sneha, P., Madrid, R.R., C, G.P.D., 2017. Molecular Modeling and Dynamic Simulation of *Arabidopsis Thaliana* Carotenoid Cleavage Dioxygenase Gene: A

- Comparison with *Bixa orellana* and *Crocus Sativus* 2721, 2712–2721. <https://doi.org/10.1002/jcb.25919>
- Raddatz-Mota, D., Pérez-Flores, L.J., Carrari, F., Mendoza-Espinoza, J.A., de León-Sánchez, F.D., Pinzón-López, L.L., Godoy-Hernández, G., Rivera-Cabrera, F., 2017. Achiote (*Bixa orellana* L.): a natural source of pigment and vitamin E. *J. Food Sci. Technol.* 54, 1729–1741. <https://doi.org/10.1007/s13197-017-2579-7>
- Rehbein, J., Dietrich, B., Grynbaum, M.D., Hentschel, P., Holtin, K., Kuehnle, M., Schuler, P., Bayer, M., Albert, K., 2007. Characterization of bixin by LC-MS and LC-NMR. *J. Sep. Sci.* 30, 2382–2390. <https://doi.org/10.1002/jssc.200700089>
- Ribeiro, D., Freitas, M., Silva, A.M.S., Carvalho, F., Fernandes, E., 2018. Antioxidant and pro-oxidant activities of carotenoids and their oxidation products. *Food Chem. Toxicol.* 120, 681–699. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.07.060>
- Rios, A. de O., Mercadante, A.Z., Borsarelli, C.D., 2007. Triplet state energy of the carotenoid bixin determined by photoacoustic calorimetry. *Dye. Pigment.* 74, 561–565. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2006.03.018>
- Rios, A.D.O., Borsarelli, C.D., Mercadante, A.Z., 2005. Thermal degradation kinetics of bixin in an aqueous model system. *J. Agric. Food Chem.* 53, 2307–2311. <https://doi.org/10.1021/jf0481655>
- Rivera-Madrid, R., Aguilar-Espinosa, M., Cárdenas-Conejo, Y., Garza-Caligaris, L.E., 2016. Carotenoid Derivates in Achiote (*Bixa orellana*) Seeds: Synthesis and Health Promoting Properties. *Front. Plant Sci.* 7, 1–7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01406>
- Rodrigues, L.M., Alcázar-Alay, S.C., Petenate, A.J., Meireles, M.A.A., 2014. Bixin extraction from defatted annatto seeds. *Comptes Rendus Chim.* <https://doi.org/10.1016/j.crci.2013.10.010>
- Santos, G., Almeida, M., Antunes, L., Bianchi, M., 2016. Effect of bixin on DNA damage and cell death induced by doxorubicin in HL60 cell line. *Hum. Exp. Toxicol.* 35, 1319–1327. <https://doi.org/10.1177/0960327116630352>
- Shahid-ul-Islam, Rather, L.J., Mohammad, F., 2016. Phytochemistry, biological activities and potential of annatto in natural colorant production for industrial applications – A review. *J. Adv. Res.* 7, 499–514. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2015.11.002>
- Sosman, J.A., Puzanov, I., 2006. Molecular targets in melanoma from angiogenesis to apoptosis. *Clin. Cancer Res.* 12, 2376–2384. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-2558>
- Stohs, S.J., 2014. Safety and efficacy of *Bixa orellana* (achiote, annatto) leaf extracts. *Phyther.*

Res. 28, 956–960. <https://doi.org/10.1002/ptr.5088>

- Tay-agbozo, S., Street, S., Kispert, L., 2018. Journal of Photochemistry & Photobiology , B : Biology The carotenoid Bixin found to exhibit the highest measured carotenoid oxidation potential to date consistent with its practical protective use in cosmetics , drugs and food. J. Photochem. Photobiol. B Biol. 186, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2018.06.016>
- Tentori, L., Lacal, P.M., Graziani, G., 2013. Challenging resistance mechanisms to therapies for metastatic melanoma. Trends Pharmacol. Sci. 34, 656–666. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2013.10.003>
- Tibodeau, J.D., Isham, C.R., Bible, K.C., 2010. Annatto constituent cis-bixin has selective antimyeloma effects mediated by oxidative stress and associated with inhibition of thioredoxin and thioredoxin reductase. Antioxid. Redox Signal. 13, 987–97. <https://doi.org/10.1089/ars.2009.2896>
- Tocchini, L., Mercadante, A.Z., 2001. Extração E Determinação, Por Clae, De Bixina E Norbixina Em Coloríficos. Ciência e Tecnol. Aliment. 21, 310–313. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612001000300010>
- Vilar, D. de A., Vilar, M.S. de A., de Lima e Moura, T.F.A., Raffin, F.N., de Oliveira, M.R., Franco, C.F. de O., de Athayde-Filho, P.F., Diniz, M. de F.F.M., Barbosa-Filho, J.M., 2014. Traditional uses, chemical constituents, and biological activities of Bixa orellana L.: a review. Sci. World J. 857292, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2014/857292>
- Vinod, B.S., Maliekal, T.T., Anto, R.J., 2013. Phytochemicals As Chemosensitizers: From Molecular Mechanism to Clinical Significance. Antioxid. Redox Signal. 18, 1307–1348. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4573>

**PARTIE C: LES MICROALGUES MARINES COMME
SOURCE DE NOUVEAUX COMPOSÉS ACTIFS ET
CHIMIOSENSIBILISANTS SUR LE MÉLANOME**

PARTIE C: LES MICROALGUES MARINES COMME SOURCE DE NOUVEAUX COMPOSÉS ACTIFS ET CHIMIOSENSIBILISANTS SUR LE MÉLANOME

Un grand nombre de travaux a établi que les pigments d'algues présentent un intérêt majeur pour la prévention et le traitement du mélanome. Comme pour les plantes, les caroténoïdes sont l'un des principaux groupes de pigments produits par les microalgues. Ils sont capables d'inhiber la prolifération cellulaire et d'activer les voies de signalisation conduisant les cellules de mélanome à l'apoptose (Chen et al., 2017; Kim et al., 2013; Palozza et al., 1998). En faibles concentrations, ils agissent comme des agents cytostatiques et peuvent être combinés avec des molécules cytotoxiques, potentialisant leur effet antiprolifératif (Juin et al., 2018). Certains caroténoïdes sont synthétisés exclusivement par des microalgues et constituent donc des modèles structuraux uniques, offrant de nouvelles possibilités d'intervention pharmacologique.

Poursuivant l'étude des effets anticancéreux de pigments extraits de microalgues, une thématique de recherche développée depuis plus de dix ans dans l'équipe BCBS (Biotechnologies et Chimie des Bioressources pour la Santé) du laboratoire LIENS (Littoral Environnement et Sociétés, LIENSs UMR CNRS 7266), nous avons consacré la dernière partie de cette thèse à l'identification, la purification et l'évaluation du potentiel chimiosensibilisant des caroténoïdes de deux espèces de microalgues marines: *Rhodomonas salina* et *Tisochrysis lutea*.

Les microalgues ont été cultivées par le Laboratoire de Physiologie et Biotechnologie des Algues (PBA) de l'IFREMER (Nantes), qui nous a fourni la biomasse lyophilisée nécessaire pour l'étude de sa composition pigmentaire et de son potentiel antimélanome. Ces espèces ont été sélectionnées en raison de leur importance commerciale, étant largement utilisées en aquaculture et en industries alimentaire, cosmétique et pharmaceutique. De plus, une analyse chimique préliminaire a révélé que ces espèces contenaient des caroténoïdes d'intérêt en cancérologie, ainsi que de pigments encore inconnus (Serive et al., 2017). Dans ce contexte, la partie C de cette thèse est structurée en deux chapitres:

Le chapitre 4 concerne l'étude de la composition pigmentaire de *R. salina* et de l'effet antiprolifératif de caroténoïdes purifiés. *R. salina* est une espèce marine flagellée qui appartient à la classe des Cryptophycées et à la famille des Pyrénomnadacées. Grâce à sa teneur élevée en acides aminés essentiels, en acides gras insaturés et en glucosides, cette microalgue est couramment cultivée pour être utilisée en aquaculture (Chaloub et al., 2015; Tremblay et al., 2007). Sa composition pigmentaire est majoritairement constituée de chlorophylle *a*,

chlorophylle *c*, alloxanthine et β -carotène (Serive et al., 2017). Dans ce chapitre, nous décrivons le profil pigmentaire complet de *R. salina* par UPLC-DAD-MS/MS, ainsi que la purification de deux caroténoïdes: l'alloxanthine et la crocoxanthine. Ces caroténoïdes ont été testés sur des cellules de mélanome métastatique et leur potentiel chimiosensibilisant a également été évalué. Jusqu'à présent, aucune étude de l'effet antiprolifératif de ces molécules n'avait été réalisée.

Le chapitre 5 est dédié à la détermination de la composition pigmentaire de *T. lutea*, ainsi qu'à la purification de la fucoxanthine, son pigment majoritaire. *T. lutea* (ex *Isochrysis affinis galbana* ou *T-Iso*) est une microalgue brune (Haptophyta) originalement isolée à Tahiti. Cette espèce est largement utilisée en aquaculture car elle contient une grande quantité d'acides gras polyinsaturés (AGPI), en particulier l'acide docosahexaénoïque (DHA) (Garnier et al., 2016). *T. lutea* présente également un potentiel nutraceutique et pharmaceutique prometteur, non seulement en tant que source riche en AGPI mais aussi en raison de sa teneur élevée en caroténoïdes, notamment en fucoxanthine (Serive et al., 2017). Des travaux précédents en pharmacologie marine ont démontré que la fucoxanthine présente un potentiel anticancéreux, étant capable d'induire l'apoptose dans une grande variété de cellules cancéreuses et de prévenir l'initiation, la croissance, les métastases et l'angiogenèse des tumeurs *in vivo* (Chung et al., 2013; Wang et al., 2019). Cependant, les étapes d'extraction et de purification du composé sont souvent complexes et atteignent un faible rendement, ce qui limite son utilisation par les industries pharmaceutiques. Dans ce dernier chapitre, nous avons mis au point une méthode de séparation de la fucoxanthine par chromatographie de partage centrifuge (CPC) à partir de l'extrait brut de *T. lutea*. La CPC est une technique *eco-friendly* de chromatographie liquide-liquide qui permet une séparation plus rapide et moins coûteuse de composés structurellement divers, avec une capacité de charge d'échantillon plus élevée, une utilisation moindre de solvant et une récupération complète du produit d'intérêt. Malgré le fait que cette technique soit largement utilisée pour la purification de composés extraits de plantes, peu d'études décrivent l'utilisation de la CPC pour la purification de substances algales. En ce qui concerne les microalgues, l'utilisation de la CPC comme stratégie de séparation de composés bioactifs est pratiquement inexistante. Une fois purifiée, la fucoxanthine a été testée sur des cellules de mélanome, associée ou non aux anticancéreux vemurafenib et dacarbazine. En outre, les analyses par UPLC-DAD-MS/MS ont également permis d'identifier de nouveaux pigments pour cette microalgue, dont l'importance chimiotaxonomique est abordée tout au long du chapitre.

CHAPITRE 4

Article accepté dans Brazilian Journal of Pharmacognosy

CAROTENOIDS FROM *Rhodomonas salina* INDUCE APOPTOSIS AND SENSITIZE A2058 MELANOMA CELLS TO CHEMOTHERAPY

Raimundo Gonçalves de Oliveira-Júnior¹, Elodie Nicolau², Antoine Bonnet¹, Grégoire Prunier¹, Laureen Beugeard¹, Nicolas Joguet³, Valérie Thiéry¹, and Laurent Picot^{1*}

^a UMRi CNRS 7266 LIENSs, La Rochelle Université, 17042 La Rochelle, France.

^b Laboratoire BRM/PBA, IFREMER, 44311 Nantes, France.

^c IDCAPS, R&D INNOV'IA, 17000 La Rochelle, France.

*Corresponding author at: UMRi CNRS 7266 LIENSs, La Rochelle Université, Curie B101 Faculté des Sciences et Technologies, Avenue Michel Crépeau, 17042 La Rochelle, France. E-mail address: laurent.picot@univ-lr.fr (Laurent Picot).

ABSTRACT

Melanoma is an aggressive tumor with invasive and metastatic potential, frequently exhibiting multidrug resistance mechanisms. In our continuous search for antimelanoma molecules, we have identified some effective marine compounds capable of not only inducing cell death, but also of sensitizing chemoresistant tumor cells to clinically used anticancer drugs. In this report, the cryptophyte *Rhodomonas salina* was chemically investigated in order to identify pigments efficiently inhibiting melanoma cells proliferation. All pharmacological tests were performed on A2058 cells expressing the oncogenic BRAF V600E mutation and resistant to dacarbazine treatment. Flash chromatography of *R. salina* ethanol extract led to purification of alloxanthin and crocoxanthin, which showed significant antiproliferative activity against A2058 cells, exhibiting $IC_{50} = 29$ and $50 \mu\text{M}$, respectively. These carotenoids promoted growth inhibition, decreased cell migration and induced apoptosis and sub-G1 cells accumulation after 72h of treatment. In addition, alloxanthin potentiated the cytotoxic activity of vemurafenib (a BRAF inhibitor) and restored the sensitivity of A2058 cells to dacarbazine treatment.

Keywords: alloxanthin; chemosensitivity; crocoxanthin; cutaneous melanoma; drug resistance; microalgae.

1. Introduction

Cutaneous melanoma is an aggressive tumor deriving from melanocyte cells. In Europe, more than 20 000 people die from melanoma every year. It is the most frequent tumor in young adults aged 25 to 35 years old, and it is responsible for 70% of mortality by skin cancers (Schadendorf et al., 2018). The incidence of melanoma is increasing worldwide and most cases are associated with excessive exposure to UV radiation. In addition, advanced and metastatic melanoma (stages III and IV) have very poor prognosis and the overall positive responses to monotherapy using conventional anticancer drugs are weak, ranging from 4 to 26% (Matthews et al., 2017; Prado et al., 2019; Tracey and Vij, 2019).

The classical antimelanoma drugs include alkylants agents (e.g. dacarbazine, temozolomide, fotemustine, carmustine, semustine), platinum drugs (cisplatin and carboplatin), vinca alkaloids (vindezine and vinblastine), taxanes (docetaxel and paclitaxel) and tamoxifen (Garbe et al., 2016). Recently, promising results have been obtained with immunotherapy (monoclonal antibodies, e.g. ipilimumab), target therapy (BRAF inhibitors, e.g. vemurafenib; MEK inhibitors, e.g. cobimetinib) and combined treatments (BRAF inhibitors associated to MEK inhibitors, e.g. vemurafenib + cobimetinib) (Napolitano et al., 2018; Schadendorf et al., 2018). However, these treatments induce severe toxicity, including neutropenia, thrombocytopenia, fatigue, nausea, vomiting, and neurosensory troubles (Jang and Atkins, 2014; Lopatka et al., 2018; Roos et al., 2014; Voskoboynik and Arkenau, 2014). The wide range of antineoplastic treatments ineffective at killing melanoma cells implies that the drug resistance mechanisms in melanoma are complex. In fact, melanoma cells are constitutively or adaptively resistant to pro-apoptotic drugs, acquiring mutations and cellular adaptations during the treatment that result in intrinsic survival mechanisms (Spagnolo et al., 2015, 2014; Tentori et al., 2013). Cytotoxic molecules usually lead to the selection of tumor cells variants overexpressing efflux transporters, such as P-glycoprotein (P-gp) and multidrug-resistance factor-1 (MDR1), and anti-apoptotic proteins (e.g. Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1), which justifies treatment failure (Housman et al., 2014).

Microalgae are a source of biomolecules considered not only promising dietary supplements (Gille et al., 2018), but also compounds that possess several therapeutic properties such as antioxidant, anti-inflammatory (Habashy et al., 2018), hypocholesterolemic (Sengupta et al., 2018) and anticancer (Juin et al., 2018). Among these compounds, a range of bioactive carotenoids can be isolated, including β -carotene, fucoxanthin, zeaxanthin, lutein, violaxanthin, echinenone and canthaxanthin, and some of them are produced exclusively by microalgae (Casagrande et al., 2019). These pigments have often been associated with anticancer effects,

including against cutaneous melanoma cell lines (Baudelet et al., 2013; Haguët et al., 2017; Pasquet et al., 2011). They exert antiproliferative effect by inducing apoptosis and modulating signalling pathways involved in survival, cell proliferation, invasion and metastasis. Moreover, some carotenoids have been particularly investigated in combined treatments with drugs clinically used in melanoma therapy. In a recent study, we demonstrated that zeaxanthin isolated from *Porphyridium purpureum* sensitizes chemoresistant human melanoma cells to vemurafenib, enhancing its antiproliferative effect (Juin et al., 2018). Indeed, the use of natural molecules as sensitizer agents has been encouraged because of their low *in vivo* toxicity, allowing the reduction of effective doses of conventional anticancer drugs and consequently limiting potential toxic effects without affecting the therapeutic response (de Oliveira Júnior et al., 2018; Vinod et al., 2013).

In this report, we continue our search for new antimelanoma molecules through a chemical and pharmacological investigation of *Rhodomonas salina*. It is a marine cryptophyte microalga, known to be rich in starch and routinely used in the diet of different invertebrate species (Chaloub et al., 2015; Tremblay et al., 2007). We have previously shown that chlorophyll *c*₂, alloxanthin and β -carotene are the most common pigments found in *R. salina*, which makes it a promising source not only of nutrients but also of bioactive compounds (Serive et al., 2017). Nevertheless, many carotenoids remain unknown in this species and their anticancer potential has not yet been properly explored. In the present study, we describe the complete pigment profile of *R. salina* extract and the antiproliferative activity of two of its most promising carotenoids (alloxanthin and crocoxanthin) against chemoresistant human melanoma cells (A2058 cells) expressing the oncogenic BRAF mutation.

2. Materials and Methods

2.1. Microalgae culture, harvest and freeze-drying

Rhodomonas salina CCAP 978/27 (Figure 1) was grown in a commercial 16 L photobioreactor LUCY© (Synoxis algae, Le Cellier, France) containing 0.2 μm filtered and autoclaved seawater enriched with Walne's medium 4 ml.L^{-1} (Walne, 1970). The culture was realized in batch condition with a continuous irradiance of 120 $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ photosynthetically active radiation (PAR) in a climate room at 18°C. A pH 9 regulation was maintained with a regulated CO₂ injection. After 20 days, cells reached a concentration of $5.84.10^6 \text{ cell.ml}^{-1}$. At this early stationary phase, 16 L of the culture were harvested by centrifugation. The microalgae paste was freeze-dried at -80°C and freeze-dried before extraction.



Figure 1. *Rhodomonas salina* strain CCAP 978/27. ©IFREMER, Nantes, France.

2.2. Sonication-assisted extraction of *R. salina* pigments

Pigments were extracted from the lyophilized biomass (2 g) in absolute ethanol (500 ml). The mixture was sonicated at 50 W–30 kHz (UP50H ultrasonicator, Hielscher Ultrasonics GmbH, Germany) for 30 min, on ice and under constant stirring (Haguet et al., 2017). The extractive solution was filtered (PVDF 0.22 μm membrane) and the solvent was evaporated under vacuum, resulting in the *R. salina* extract (Rs-EtOH, 0.53 g).

2.3. Scanning electron microscopy (SEM)

To confirm cell rupture during sonication-assisted extraction, *R. salina* cells were freeze-dried before or after sonication, placed on a conductive double layer carbon support and examined by SEM using a Philips-FEI Quanta 200 ESEM/ FEG microscope (environmental mode) equipped with a FEG canon delivering 1 to 30 kV beam current (Haguet et al., 2017).

2.4. UPLC-DAD-MS/MS analysis

Pigment profile of Rs-EtOH was obtained by ultra-high performance liquid chromatography system (Acquity UPLC H-class, Waters Milford USA) coupled to a photodiode array (Waters 2996) or a high resolution mass spectrometry (XEVO G2S Q-TOF) equipped with an electrospray ionization source (Waters, Manchester, England). The UPLC system was formed by a quaternary pump (Quaternary Solvent Manager, Waters) and an automatic injector (Sample Manager-FTN, Waters) equipped with a 10 μl injection loop. 10 μl (DAD analysis) or 5 μl (MS analysis) of Rs-EtOH solution were injected in a C18 column

(Acquity UPLC BEH C18, Waters) (2.1×50 mm, $1.7 \mu\text{m}$), using a flow rate of $300 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ and a gradient composed of solvents A (water/formic acid, 100/0.001, v:v) and B (methanol/formic acid, 100/0.001, v:v), according to the following procedure: 0–1 min, 80% B; 1–2 min, 80%–81% B; 2–5 min, 81% B; 5–7 min, 81–81.5% B; 7–10 min, 81.5% B; 10–11 min, 81.5%–83% B; 11–14 min, 83% B; 14–16 min, 83%–85% B; 16–20 min, 85% B; 20–23 min, 85%–95% B; 23–27 min, 90% B; 27–29 min, 90%–95% B; 29–35 min, 95% B; 35–37 min, 95%–98% B; 37–43 min, 98% B; 43–44 min, 100% B; 44–48 min, 100% B; 48–48.5 min, 100%–20% B; 48.5–51 min, 20% B. During the analysis, the column and the injector were maintained at $25 \text{ }^\circ\text{C}$ and $7 \text{ }^\circ\text{C}$, respectively. The instrument was adjusted for the acquisition on a 300–800 nm interval in UV mode, with $5 \text{ spectra}\cdot\text{s}^{-1}$ and 1.2 nm of resolution. The analyses were performed in positive ionization mode with MSE function in a centroid mode. Final ESI conditions were: source temperature $120 \text{ }^\circ\text{C}$, desolvation temperature $500 \text{ }^\circ\text{C}$, gas flow-rate of the cone $50 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$, desolvation gas flow-rate $800 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$, capillary voltage 3.0 kV , sampling cone 130 V and source compensation 80 V . The instrument was set to acquire over the m/z 250–1300 m/z interval, with a scan time of 0.15 s . The mass spectrometer was calibrated before analysis using 0.5 mM sodium formate solution. Leucine Enkephalin ($M = 555.62 \text{ Da}$, $1 \text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$) was used as a lock-mass. UPLC-DAD chromatogram was recorded at 300–800 nm (full scan) and UPLC-MS^E data were collected in positive mode (ESI⁺). The mass error between experimental and theoretical parent and fragment ions was calculated as $([\text{experimental } m/z - \text{theoretical } m/z] / \text{theoretical } m/z) \times 10^6$ (ppm).

2.5. Purification of alloxanthin and crocoxanthin

Rs-EtOH was fractionated by flash liquid chromatography, using an Interchim Puriflash PF430 system. Rs-EtOH (100 mg) was solubilized in methanol and added to 10 g of celite[®] 545 (Sigma-Aldrich[®], France). The mixture was homogenized manually until complete solvent evaporation and then placed in a pre-column. The pre-column containing Rs-EtOH-adsorbed celite[®] was coupled on the top of a PF-C18 column (20 g, $15 \mu\text{m}$) and eluted with a mobile phase composed of a ternary solvent gradient: A (methanol/water, 80/20), B (acetonitrile/water, 90/10) and C (isopropanol). The gradient flow program was set as follows: 0–5 min, 100% A; 5–9 min, 100% B; 9–45 min, 30% B and 70% C; 45–50 min, 100% C; 50–55 min, 100% C; 55–60 min, 100% B; 60–65 min, 100% A; 65–70 min, 100% A. The flow rate was $5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ and elution was monitored at 450 nm , with an automatic collector (10 ml per tube). This fractionation protocol was adapted from a previous study (Baudelet et al., 2013), considered an effective method for purification of microalgae pigments, especially carotenoids.

2.6. Cell viability assay

All pharmacological assays were performed using A2058 (ATCC® CRL-11147™) cell line. A2058 are highly invasive and metastatic human melanoma cells, BRAF-mutated (Ronca et al., 2013), tumorigenic at 100% frequency in nude mice (supplier's information) and very to conventional chemotherapy (de Oliveira Júnior et al., 2019). Cells were grown in DMEM (Dutscher, France), supplemented with 10% heat-inactivated (56 °C, 30 min) FCS (Dutscher, France) and penicillin-streptomycin (1000 U.ml⁻¹ and 100 µg.ml⁻¹, respectively) (Dutscher, France), at 37 °C in a 5% CO₂ humidified atmosphere. Rs-EtOH and isolated carotenoids were solubilized in DMSO before dilution in the cell culture medium. The DMSO final concentration was lower than 1% and tested as negative control. A2058 cells (2 x 10³/well) were treated with Rs-EtOH (1-100 µg.mL⁻¹), alloxanthin (1-100 µM) or crocoxanthin (1-100 µM). After 72h, cell viability was measured using the MTT assay as previously described (Juin et al., 2018; Mosmann, 1983). Cell morphology was evaluated after treatments under inverted phase contrast microscope (Nikon, Eclipse, France). IC₅₀ was calculated by nonlinear regression analysis using Prism 6.0 (GraphPad Software).

2.7. Cell migration assay

Antimigratory activity of alloxanthin and crocoxanthin was determined as previously reported (Cisilotto et al., 2018). A2058 cells (2 x 10⁴/well) were incubated and grown to 90% confluence in 24-well plates. Cell monolayers were scratched with a sterile plastic tip, washed with PBS and incubated in a fresh cell culture medium containing alloxanthin (14.5 µM, ½IC₅₀) or crocoxanthin (25 µM, ½IC₅₀), for 48h. Cell migration was microscopically monitored at 0, 24 and 48h (ZEISS Axion Observer, France), and results were expressed as percentage of cell migration calculated by measuring the cell surface using ImageJ® software.

2.8. Annexin V-Cy3 / 6-CFDA analysis

Cells were incubated for 24h and subsequently treated with alloxanthin (29 µM, IC₅₀) or crocoxanthin (50 µM, IC₅₀). After 72h of treatment, cells were washed with PBS and double stained with annexin V-Cy3 (red fluorescence) and 6-carboxyfluorescein diacetate (6-CFDA, green fluorescence) solution according to manufacturer's recommendations (Sigma-Aldrich®, France) and finally observed under fluorescent microscope (ZEISS Axion Observer, France) (de Oliveira Júnior et al., 2019).

2.9. Nuclear fragmentation

Cells were incubated for 24h in 4-well chamber slides (5000 cells/well) and then treated with alloxanthin (29 μM , IC_{50}) or crocoxanthin (50 μM , IC_{50}) for 72h. Cells were washed in PBS before being fixed with formaldehyde 4% solution for 30 min at 37 °C. Subsequently, cells were washed in PBS, permeabilized with Triton X-100 1% and finally stained with DAPI according to manufacturer's instructions (ProLong™ Gold Antifade Mountant with DAPI kit, ThermoFischer Scientific, France). Nuclear condensation and fragmentation of untreated and treated cells were observed under fluorescent microscope (ZEISS Axion Observer, France).

2.10. Caspase-3 activity

Caspase-3 activity was determined using a colorimetric assay (CASP3C kit, Sigma-Aldrich®, France) as previously reported. Cells were treated with alloxanthin (29 μM , IC_{50}) or crocoxanthin (50 μM , IC_{50}) for 72 h. After treatment, cells were washed with PBS, lysed with lysis buffer, and caspase-3 activity ($\mu\text{mol pNA}/\text{min}/\text{ml}$) was measured according to manufacturer's instructions.

2.11. Cell cycle analysis

A2058 cells were treated with alloxanthin (29 μM , IC_{50}) or crocoxanthin (50 μM , IC_{50}) for 72h before being stained with PBS containing propidium iodide (PI 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), Rnase A (100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) and 0.1% Triton X-100 (ThermoFisher Scientific, France) for 15 min, at 37°C. Cells were analysed using a FACS Cantoll flux cytometer (BD Biosciences, France) equipped with an air cooled blue LASER ($\lambda = 488 \text{ nm}$, 20 mW) as previously described (Juin et al., 2018).

2.12. Sensitization of A2058 cells to vemurafenib and dacarbazine

Vemurafenib (Selleckchem®, France) and dacarbazine (Sigma-Aldrich®, France) were diluted to a 10 mM stock solution in PBS, before dilution in cell culture medium. A2058 cells were treated for 72h with increasing concentrations of vemurafenib (1-100 μM) or dacarbazine (1-100 μM), alone or combined to alloxanthin (14.5 μM , $\frac{1}{2}\text{IC}_{50}$) or crocoxanthin (25 μM , $\frac{1}{2}\text{IC}_{50}$). Antiproliferative activity of monotherapies and combined therapies was calculated using MTT assay as described above and results were expressed as IC_{50} . The combination index (CI) was calculated using the software CompuSyn (version 1.0), according to Chou-Talalay method (Chou and Talalay, 1984). $\text{CI} < 1.0$ indicates synergism, $\text{CI} > 1.0$ indicates antagonism, and CI values equal to 1.0 indicate additive effect.

2.13. Statistical analysis

Data were expressed as mean \pm SEM and analyzed by unpaired Student's *t* test or one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test (statistical significance when $p < 0.05$), according to the case, using Prism 6.0 (GraphPad software). Pharmacological results were obtained from at least three independent measurements ($n=3$ or more).

3. Results and Discussion

3.1. Sonication-assisted extraction of *R. salina* pigments

Microalgae have hard cell wall in most of cases, which limits metabolites extraction by conventional methods. Accordingly, sonication-assisted extraction has been increasingly used to obtain compounds from different microalgae as previously demonstrated by our research group (Baudelet et al., 2013; Haguët et al., 2017; Juin et al., 2015). To ensure complete extraction of pigments, *R. salina* freeze-dried biomass was sonicated for 30 min at 50 W-30 kHz, using ethanol as solvent. Scanning electron microscopy of freeze-dried biomass before sonication revealed cells with intact cell morphology. In contrast, *R. salina* cells showed cell wall disruption after sonication-assisted extraction, allowing the direct contact of the solvent with the intracellular content (Figure 2).

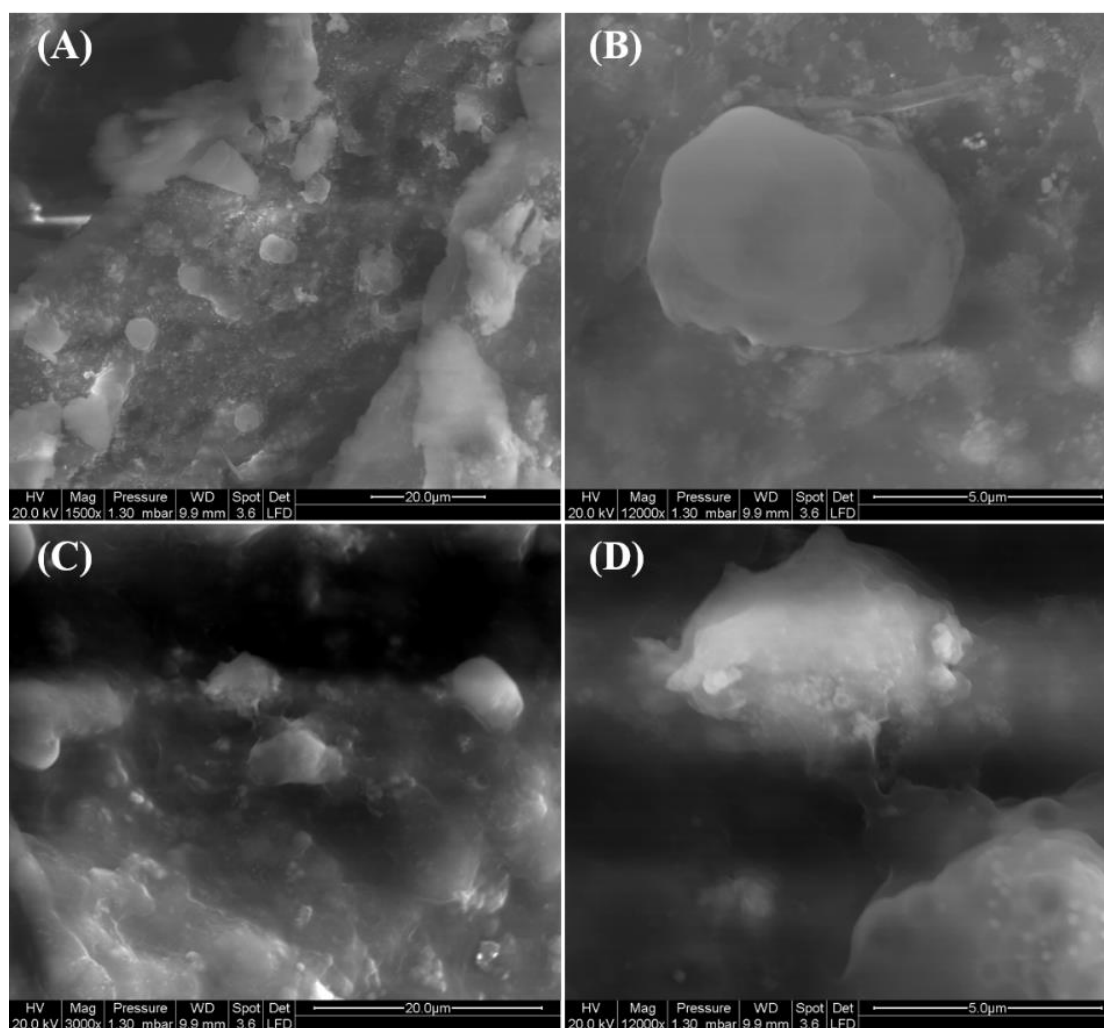


Figure 2. Scanning electron microscopy observation of freeze-dried *R. salina* cells before (A, B) and after sonication-assisted extraction (C, D). Magnification $\times 3000$ (A, C), $\times 12000$ (B, D).

3.2. Pigment profile of *R. salina* extract (*Rs-EtOH*)

UPLC-DAD-MS/MS analysis of *Rs-EtOH* was achieved in a single 51 min run and 18 peaks were identified according to their UV, MS and MS/MS spectral data (Figure 3 and Table 1). Chlorophylls *c*₂ and *a*, pheophytin *a* and the carotenoids alloxanthin, monadoxanthin, crocoxanthin and β,ϵ -carotene were the main pigments identified, corroborating previous chemical investigation involving *R. salina* (Kaňa et al., 2012; Serive et al., 2017; Vu et al., 2016). Alloxanthin, monadoxanthin and crocoxanthin are carotenoids of frequent occurrence in the *Rhodomonas* genus, since they have been reported in *R. baltica*, *R. lens* and *R. minuta* (Rodríguezl, 2000; Sanz et al., 2015; Teubner et al., 2003; van Houcke et al., 2017). Chlorophyll *c*₂, chlorophyll *a* and pheophytin *a* derivatives (hydroxyl, methoxylactone and ethoxylactone forms) were also detected. Although these derivatives are naturally occurring in microalgae (Baudeflet et al., 2013; Haguet et al., 2017; Hynninen, 1981; Juin et al., 2015), they may have

originated during the extraction procedure due to the high chlorophyll instability. Chemical structures of the main identified molecules are presented in Figure 4.

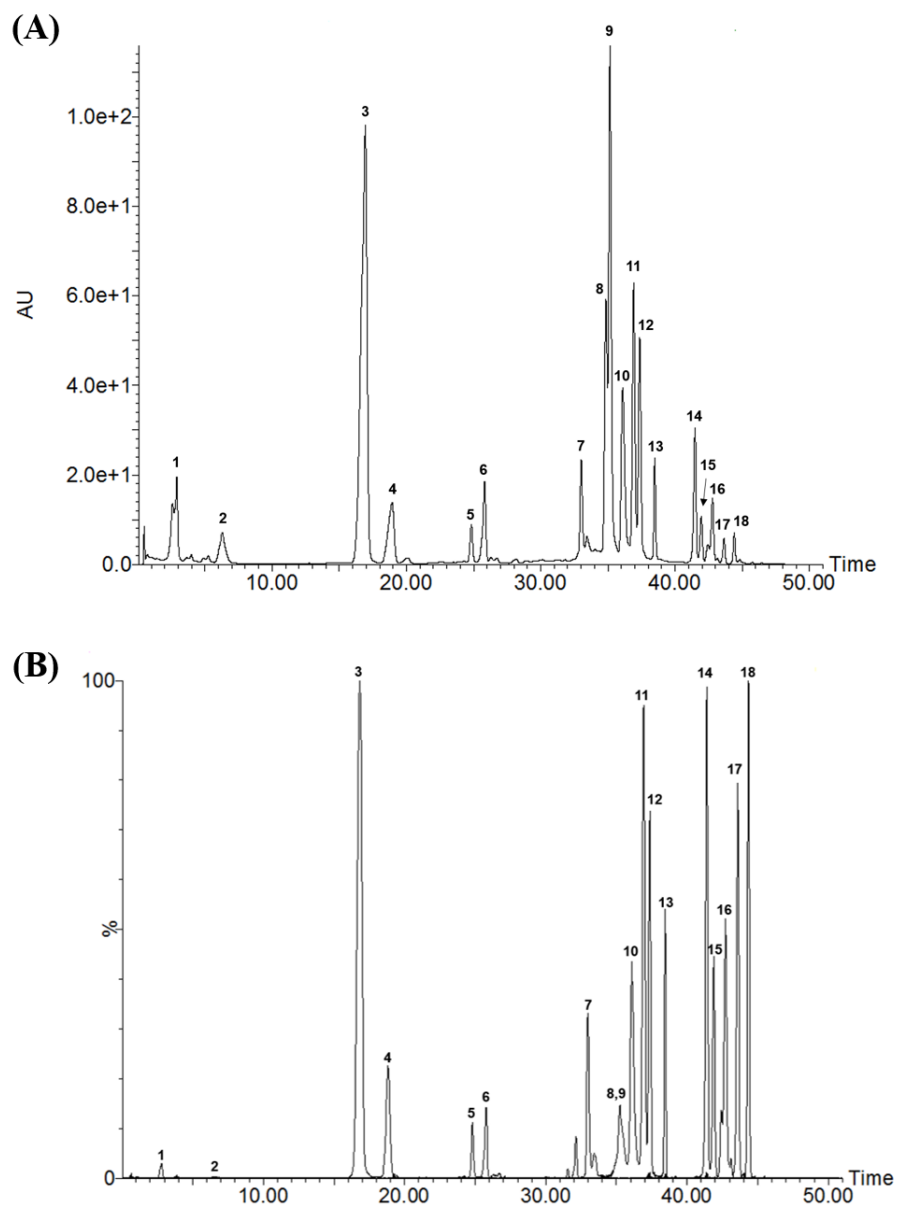


Figure 3. UPLC-DAD (300-800 nm, full scan) (A) and UPLC-ESI-MS(+) (B) chromatograms of Rs-EtOH. Peak characterization is given in Table 1.

Table 1. Identified pigments in Rs-EtOH by UPLC-DAD-MS/MS analysis. Peak number according to Figure 3.

Peak	Pigment	RT (min)	Molecular formula	λ_{\max} (nm)	Band III/II ratio (%)	Experimental m/z (Δ , ppm)			MS ² fragments m/z
						M ⁺	[M+H] ⁺	[M+Na] ⁺	
1	Hydroxy-chlorophyll <i>c</i> ₂	2.81	C ₃₅ H ₂₈ O ₆ N ₄ Mg	452, 584, 634	-	-	-	647.1743 (2.1)	625.1926, 554.1555, 549.1735
2	Chlorophyll <i>c</i> ₂	6.47	C ₃₅ H ₂₈ O ₅ N ₄ Mg	452, 586, 635	-	-	609.1971 (2.8)	631.1799 (2.5)	549.1709
3	Alloxanthin	16.94	C ₄₀ H ₅₂ O ₂	427, 451, 480	48.27	564.3970 (0.5)	-	587.3859 (1.0)	549.3735, 334.2290, 282.1976
4	Monadoxanthin	18.82	C ₄₀ H ₅₄ O ₂	421, 445, 475	65.75	566.4122 (0.3)	-	589.4018 (0.0)	474.3481
5	Alloxanthin isomer	24.83	C ₄₀ H ₅₂ O ₂	427, 451, 480	55.88	564.3970 (0.5)	-	587.3859 (1.0)	-
6	Alloxanthin isomer	25.82	C ₄₀ H ₅₂ O ₂	427, 451, 480	29.00	564.3970 (0.5)	-	587.3859 (1.0)	-
7	Crocoxanthin	33.02	C ₄₀ H ₅₄ O	420, 444, 475	47.50	550.4179 (0.7)	-	-	535.3943, 494.3543, 458.3517, 119.0852
8	Hydroxy-chlorophyll <i>a</i>	34.72	C ₅₅ H ₇₂ O ₆ N ₄ Mg	421, 665	-	908.5294 (0.9)	-	-	630.2322

9	Hydroxy-chlorophyll <i>a</i> epimer	35.08	C ₅₅ H ₇₂ O ₆ N ₄ Mg	421, 665	-	908.5294 (0.9)	-	-	630.2322
10	Methoxylactone chlorophyll <i>a</i>	36.05	C ₅₆ H ₇₄ O ₇ N ₄ Mg	420, 651	-	938.5406 (0.2)	-	-	660.2441
11	Ethoxylactone chlorophyll <i>a</i>	36.93	C ₅₇ H ₇₆ O ₇ N ₄ Mg	421, 651	-	952.5565 (0.1)	-	-	-
12	Chlorophyll <i>a</i>	37.23	C ₅₅ H ₇₂ O ₅ N ₄ Mg	431, 661	-	892.5361 (0.9)	-	-	614.2377
13	Chlorophyll <i>a</i> epimer	38.48	C ₅₅ H ₇₂ O ₅ N ₄ Mg	412, 667	-	892.5340 (1.5)	-	-	614.2380
14	Hydroxy-pheophytin <i>a</i>	41.48	C ₅₅ H ₇₄ O ₆ N ₄	407, 504, 533, 666	-	-	887.5677 (1.1)	-	609.2719
15	Hydroxy-pheophytin <i>a</i> epimer	41.95	C ₅₅ H ₇₄ O ₆ N ₄	407, 504, 533, 666	-	-	887.5686 (0.1)	-	609.2719
16	β,ε-Carotene	42.78	C ₄₀ H ₅₆	421, 441, 472	42.85	536.4390 (1.1)	-	-	444.3748
17	Pheophytin <i>a</i>	43.59	C ₅₅ H ₇₄ O ₅ N ₄	408, 507, 538, 666	-	-	871.5743 (0.7)	-	593.2762
18	Pheophytin <i>a</i> epimer	44.34	C ₅₅ H ₇₄ O ₅ N ₄	408, 507, 538, 666	-	-	871.5751 (1.6)	-	593.2766

RT: retention time.

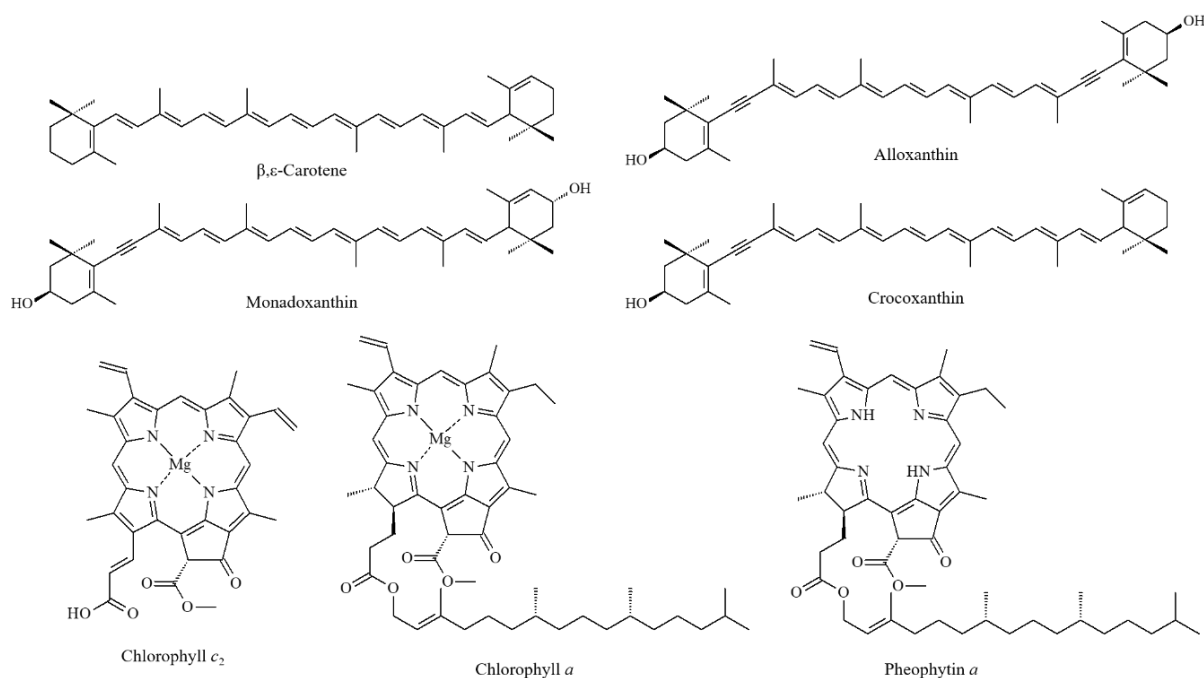


Figure 4. Chemical structures of the main identified pigments in *R. salina* extract (Rs-EtOH).

3.3. Antiproliferative activity of Rs-EtOH

The antiproliferative activity of Rs-EtOH against A2058 cells was also evaluated. Rs-EtOH induced a concentration-dependent reduction of cell viability when compared to the control group, reaching $38.81 \pm 2.70\%$ growth inhibition at the maximum concentration tested ($100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). The IC_{50} estimated to Rs-EtOH was $> 100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, indicating a weak antiproliferative effect (Figure 5). However, the Rs-EtOH composition includes carotenoids unpreviously investigated for their anticancer potential, such as alloxanthin and crocoxanthin. Therefore, we fractionated Rs-EtOH in order to evaluate the antiproliferative effect of its isolated pigments.

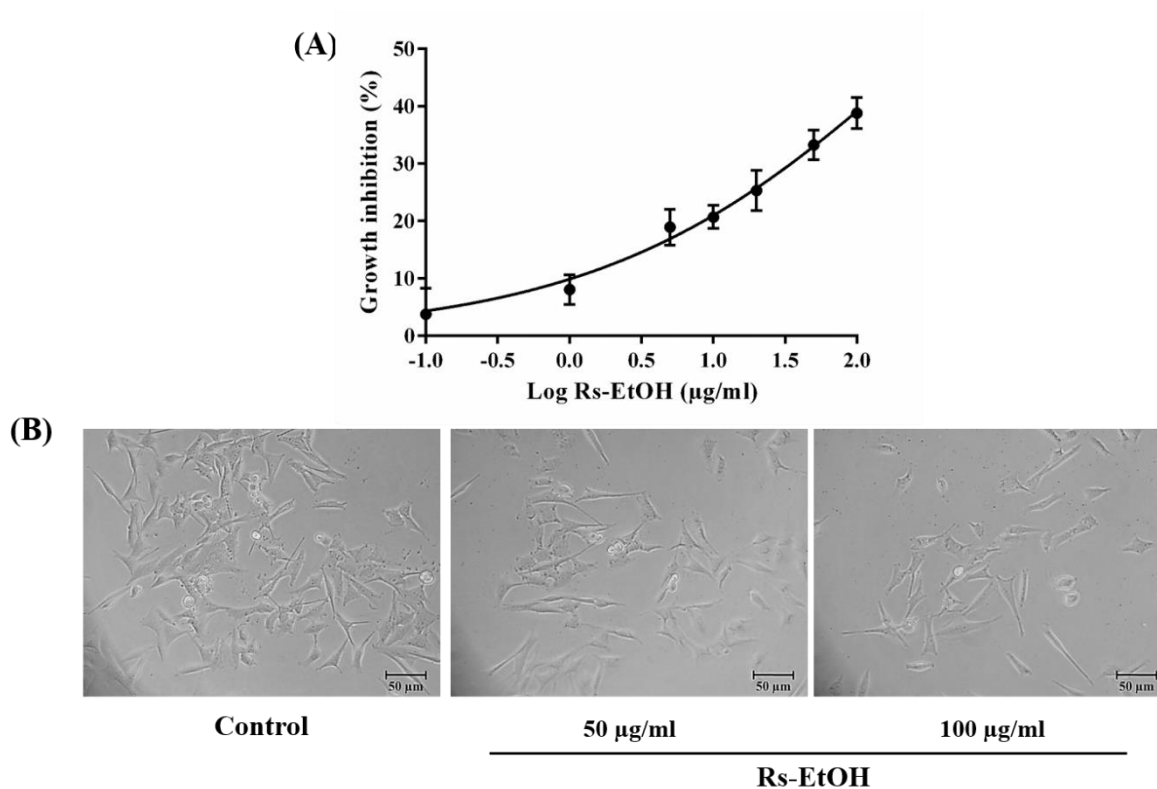


Figure 5. Antiproliferative activity of Rs-EtOH ($1\text{--}100\ \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) against A2058 cells (A). Microphotographs of melanoma cells after a 72 h exposition to a control cell culture medium, or to a medium containing 50 and $100\ \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ Rs-EtOH (B). Results are expressed as mean \pm Standard Error of the Mean (SEM), from at least three independent measurements ($n=3$).

3.4. Purification and characterization of alloxanthin and crocoxanthin

Flash liquid chromatography fractionation of Rs-EtOH (100 mg) led to the achievement of ten fractions (F1-F10), collected according to their UV absorption in a 450 nm-monitored elution (Figure 6). After UPLC-DAD-MS/MS analysis, F5 and F8 were identified as alloxanthin (4.2 mg) and crocoxanthin (1.2 mg), respectively. All experimental spectral data (Table 2) were in accordance with literature (Baudelet et al., 2013; Rodriguezl, 2000; Sanz et al., 2015) and carotenoid purity grade was $> 95\%$ (UPLC-DAD chromatogram, 300-800 nm). Subsequently, we evaluated the antiproliferative activity of alloxanthin and crocoxanthin against melanoma cells.

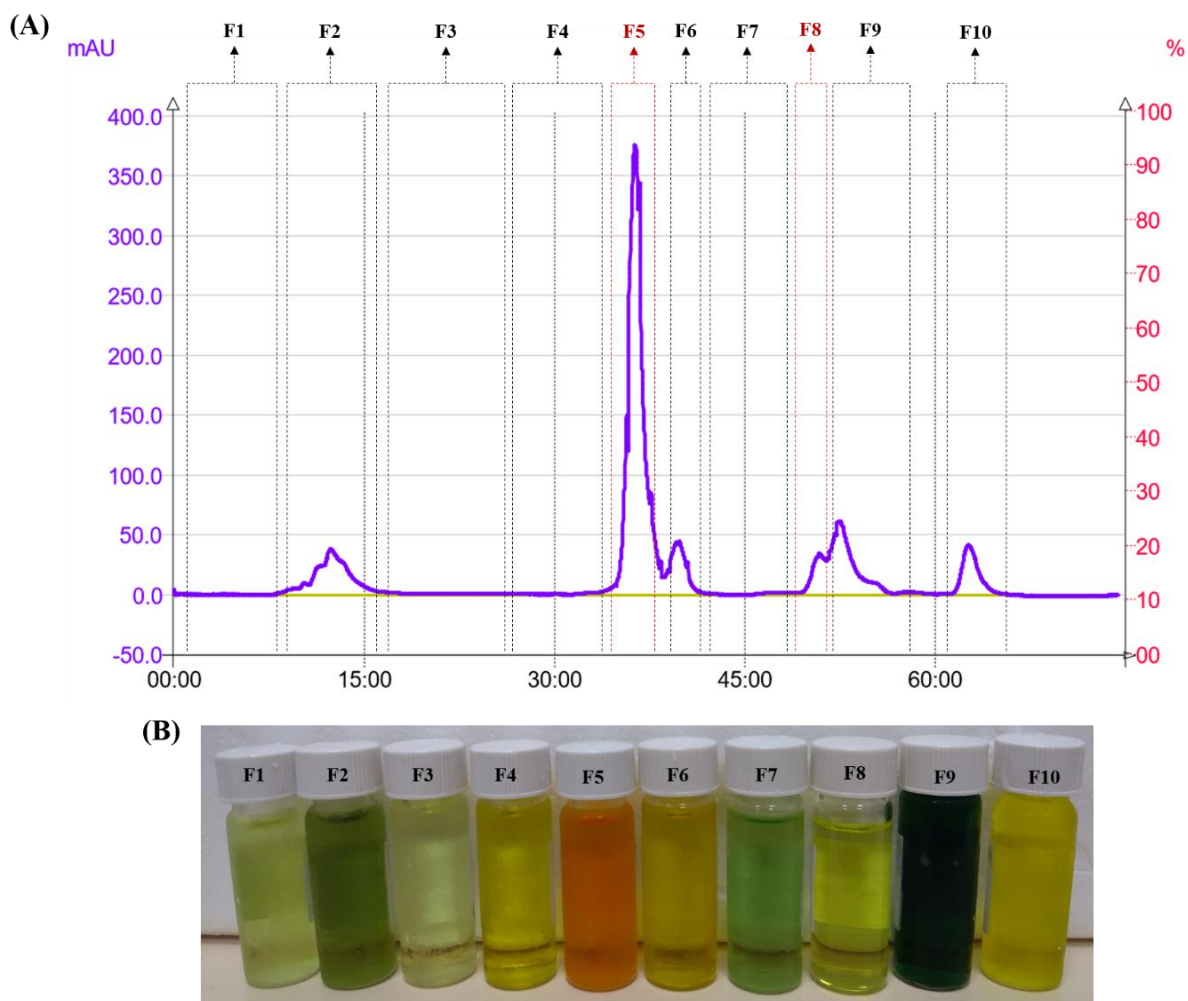


Figure 6. Flash liquid chromatography of Rs-EtOH. Chromatogram of 450 nm-monitored elution with definition of fractions (F1-F10) collected for UPLC-DAD-MS/MS characterization and pharmacological assays (A). Fractions (F1-F10) obtained after elution (B). F5 and F8 represent alloxanthin and crocoxanthin, respectively.

Table 2. UPLC-DAD-MS/MS characterization of F5 (alloxanthin) and F8 (crocoxanthin), purified according to chromatogram presented in Figure 6.

Fraction	RT	Molecular formula	λ_{\max} (nm)	Experimental m/z (Δ , ppm)			Compound
				M ⁺	[M+H] ⁺	[M+Na] ⁺	
F5	18.85	C ₄₀ H ₅₂ O ₂	427, 451, 480	-	564.3963 (0.7)	587.3862 (0.5)	Alloxanthin
F8	33.65	C ₄₀ H ₅₄ O	420, 444, 474	550.4175 (0.2)	-	-	Crocoxanthin

RT: retention time.

3.5. Alloxanthin and crocoxanthin inhibit proliferation of A2058 cells

Alloxanthin and crocoxanthin (1-100 μ M) induced a concentration-dependent reduction in the number of A2058 cells when compared to the control group, showing IC₅₀ of 29 and 50 μ M, respectively (Figure 7). Untreated cells exhibited regular epithelial morphology and became sub-confluent after 72h, indicating a high proliferation rate. In contrast, alloxanthin and crocoxanthin (50 and 100 μ M) treatments induced reduction in cell density, cell shrinkage and appearance of rounding cells (black arrows) (Figure 7).

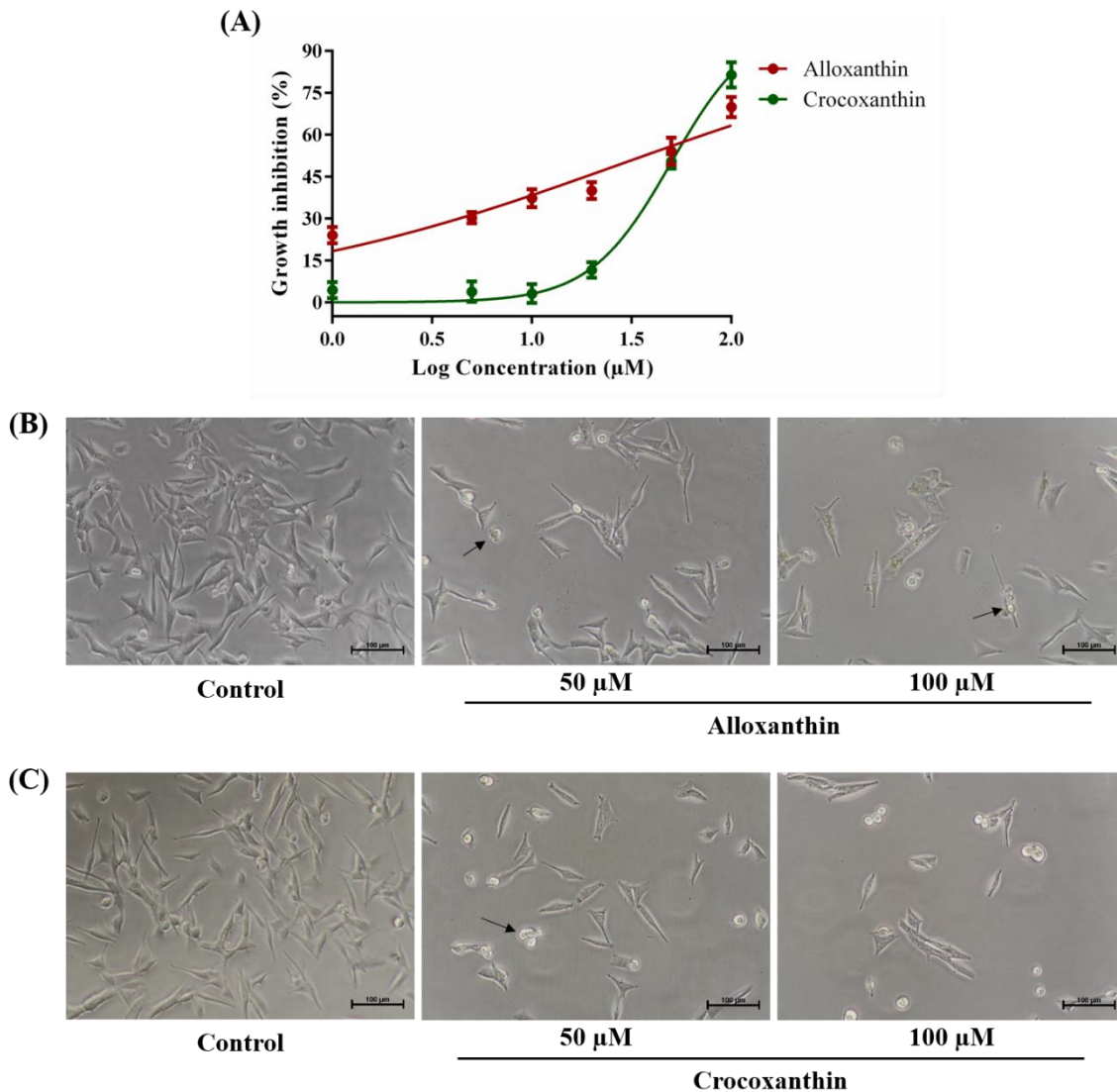


Figure 7. Growth inhibition of A2058 cells after exposure to increasing concentrations (1-100 μM , 72h) of alloxanthin and crocoxanthin (A). Treatments with alloxanthin and crocoxanthin evoked reduction in cell density, cell shrinkage and rounding (black arrows) (B and C). Results are expressed as mean \pm SEM, from at least three independent measurements ($n=3$).

3.6. Alloxanthin inhibits cell migration

In the cell migration assay, alloxanthin (14.5 μM , $\frac{1}{2}\text{IC}_{50}$) decreased cell migration into the zone free of cells (Figure 8) after 24h and 48h of exposure. However, crocoxanthin (25 μM , $\frac{1}{2}\text{IC}_{50}$) did not significantly suppress cell migration compared to control cells.

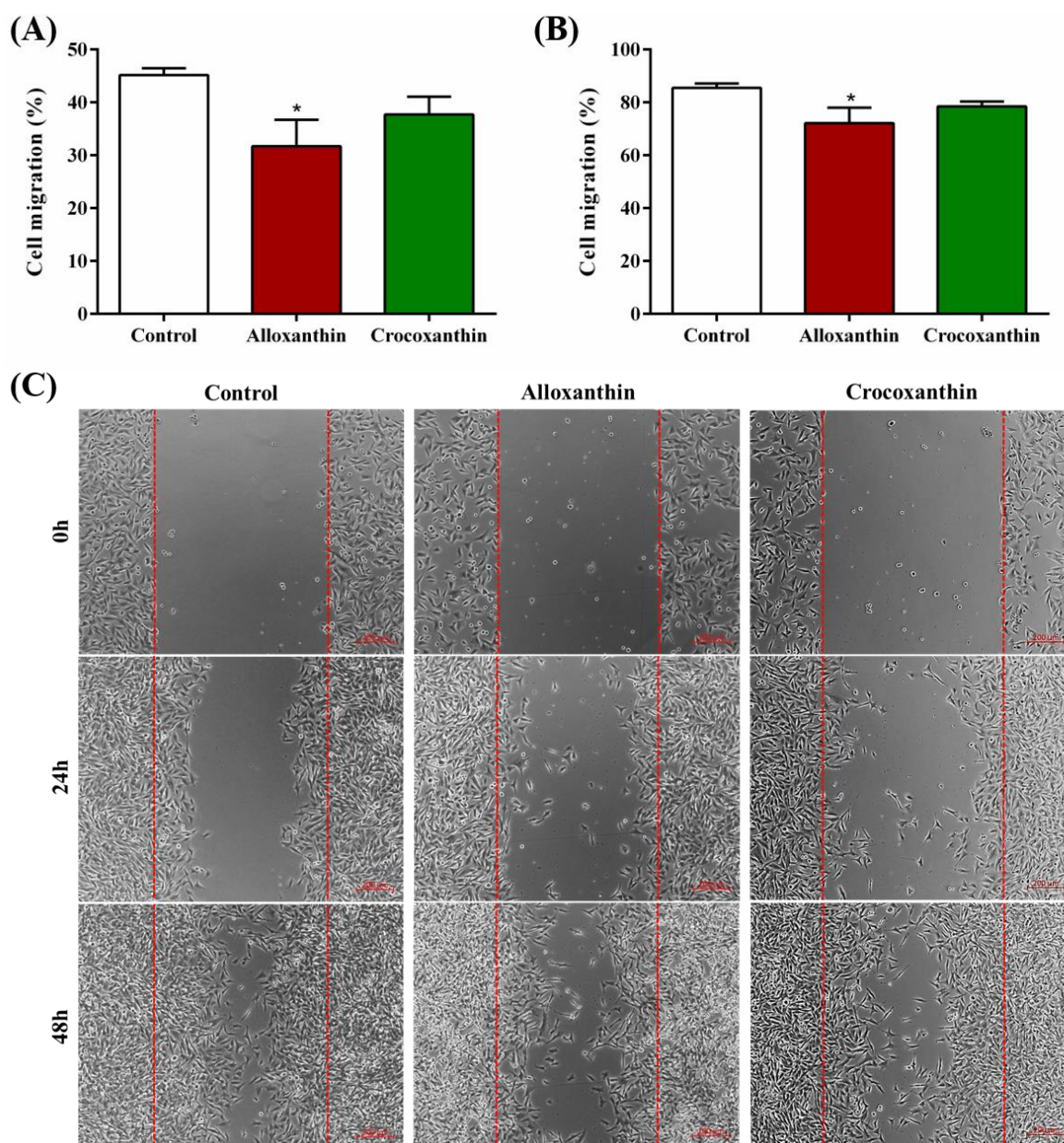


Figure 8. Antimigratory activity of alloxanthin (14.5 μM , $\frac{1}{2}\text{IC}_{50}$) and crocoxanthin (25 μM , $\frac{1}{2}\text{IC}_{50}$) after 24h (A) and 48h (B) of exposure. Photomicrographs represent cell migration into the zone free of cells according to the treatment (C). Data are expressed as mean \pm SEM, $*p < 0.05$ (ANOVA one-way followed by Tukey's post-test), from at least three independent measurements ($n=3$).

3.7. Pro-apoptotic effect of alloxanthin and crocoxanthin

Several *in vitro* and *in vivo* studies have shown that the anticancer activity of carotenoids involves multiple mechanisms, including suppression of cell proliferation and mobility, and induction of apoptosis (Sathasivam and Ki, 2018; Sugawara et al., 2014; Wang et al., 2014). In fact, modulation of pro-apoptotic pathways is a major biochemical response promoted by

carotenoids. Typically, carotenoids up regulate the expression of important pro-apoptotic proteins (e.g. Bad, Bax, Bid, Bim), while decrease the expression of anti-apoptotic targets (e.g. Bcl-xL, Bcl-2), resulting in cell death (Juin et al., 2018; Kumar et al., 2013). In this paper, the pro-apoptotic effect of alloxanthin (29 μM , IC_{50}) and crocoxanthin (50 μM , IC_{50}) on A2058 cells was also investigated. After 72h of exposure, the number of Annexin V and 6-CFDA double-stained cells (early apoptotic cells) was expressively increased for both treatments when compared to untreated cells. In addition, alloxanthin and crocoxanthin-treated cells showed significant morphological changes, such as cell shrinkage and rounding, and tendency to form cell clumps and apoptotic bodies (Figure 9).

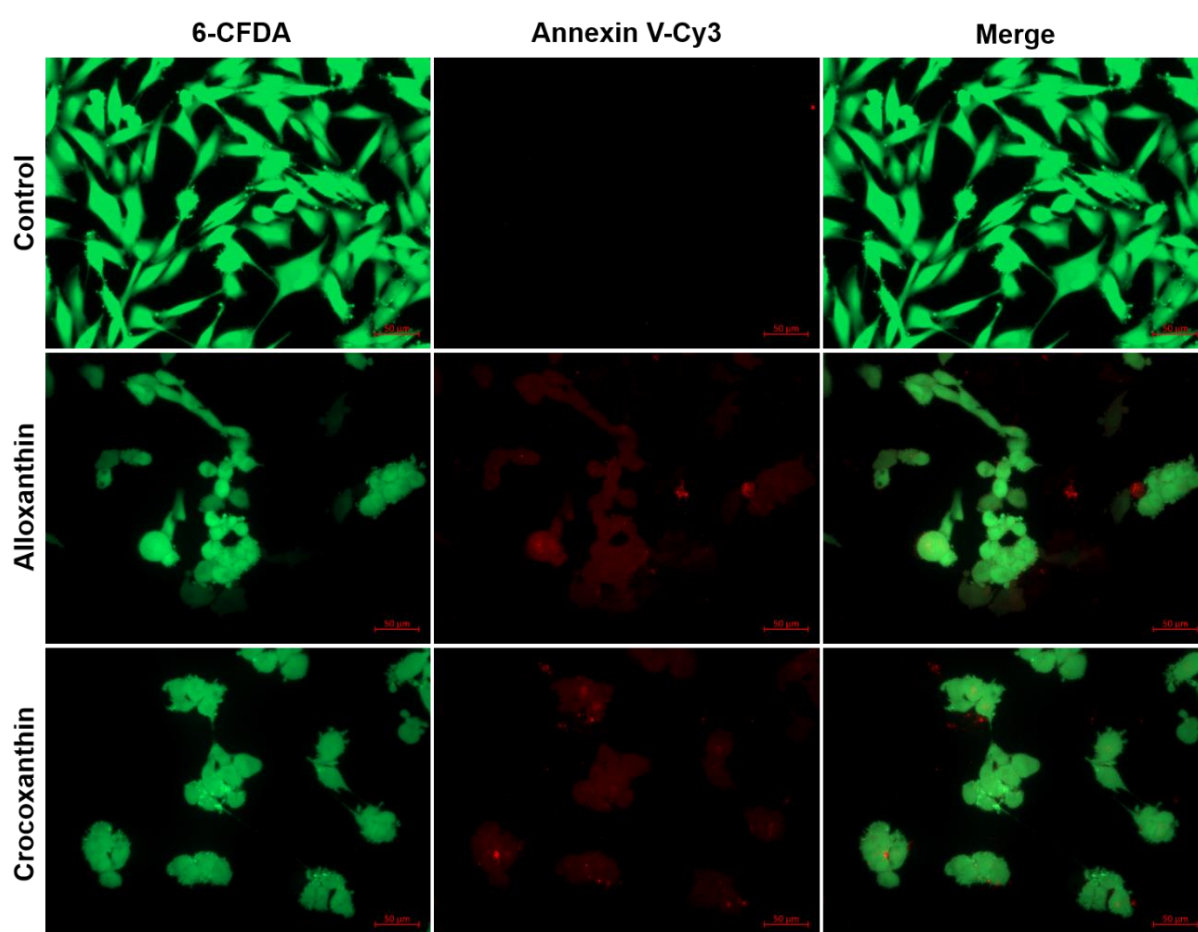


Figure 9. Alloxanthin (29 μM , IC_{50}) and crocoxanthin (50 μM , IC_{50}) induce apoptosis in A2058 cells, after 72h of treatment. Annexin V (red) and 6-CFDA (green) double staining was observed by fluorescence microscopy. Melanoma cells in early apoptosis show both red and green stains, while cells in late apoptosis show only red stain, and untreated cells (control) are stained green only. Treated cells also presented cell shrinkage and rounding, cell clumps and apoptotic bodies formation.

Caspase-3 activation displays an important role in cell death via the intrinsic and extrinsic apoptosis pathways. Caspase-3 is a final executor caspase, responsible for apoptotic chromatin condensation and DNA fragmentation, resulting in cell dismantling and formation of apoptotic bodies (Porter and Ja, 1999). In this context, we evaluated the effect of alloxanthin (29 μM) and crocoxanthin (50 μM) on caspase-3 activity and nuclear fragmentation through enzymatic assay and DAPI staining, respectively. As shown in Figure 10, both carotenoids induced a significant increase in caspase-3 activity after 72h of treatment. In addition, treated cells showed blebbing, DNA condensation and fragmentation (Figure 10) compared to untreated cells, confirming the pro-apoptotic effect of alloxanthin and crocoxanthin in melanoma cells.

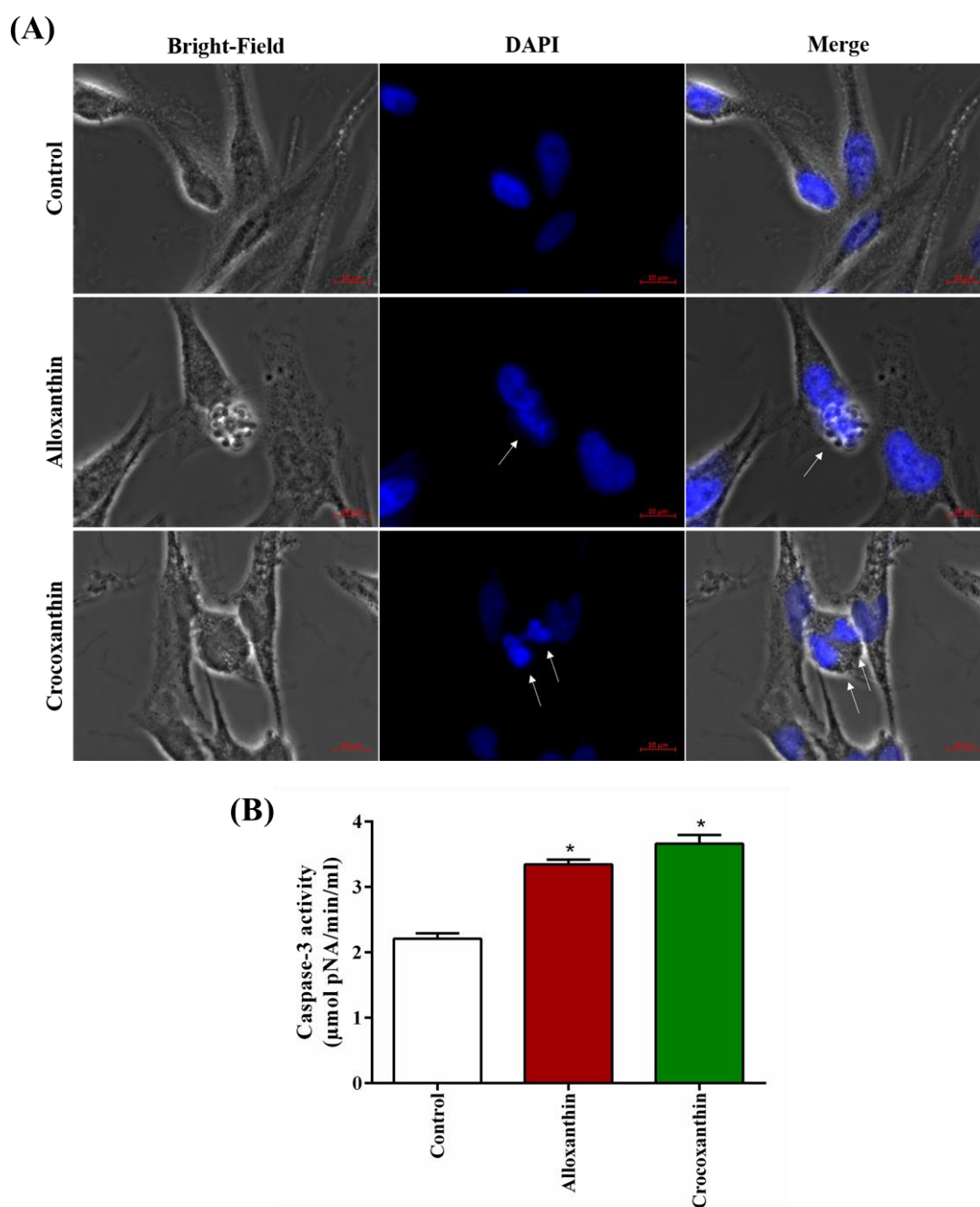


Figure 10. Nuclear fragmentation (A) and caspase-3 activation (B) in A2058 cells exposed to alloxanthin (29 μM , IC_{50}) and crocoxanthin (50 μM , IC_{50}) during 72h of treatment. Arrows point Blebbing, DNA condensation and fragmentation after DAPI staining (A). Enzymatic activity ($\mu\text{mol pNA}/\text{min}/\text{ml}$) is expressed as mean \pm SEM (B), with $*p < 0.05$ (vs. control group), according to ANOVA one-way followed by Tukey's post-test ($n=3$).

3.8. Alloxanthin and crocoxanthin induce accumulation of sub-G1 cells

Flow cytometry analysis revealed a significant increasing in sub-G1 cell population after exposure to alloxanthin (29 μM , IC_{50}) and crocoxanthin (50 μM , IC_{50}), characteristic of dying

cells (Figure 11). Quantitative analysis using BD FACS Diva Software indicated $3.60 \pm 0.44\%$ of control cells were in sub-G1 phase in comparison with 6.30 ± 0.43 and $6.72 \pm 0.43\%$ of alloxanthin and crocoxanthin-treated cells, respectively ($p < 0.05$) (Figure 11). This result corroborates the pro-apoptotic effect observed previously for both molecules, without affecting the other cell cycle phases.

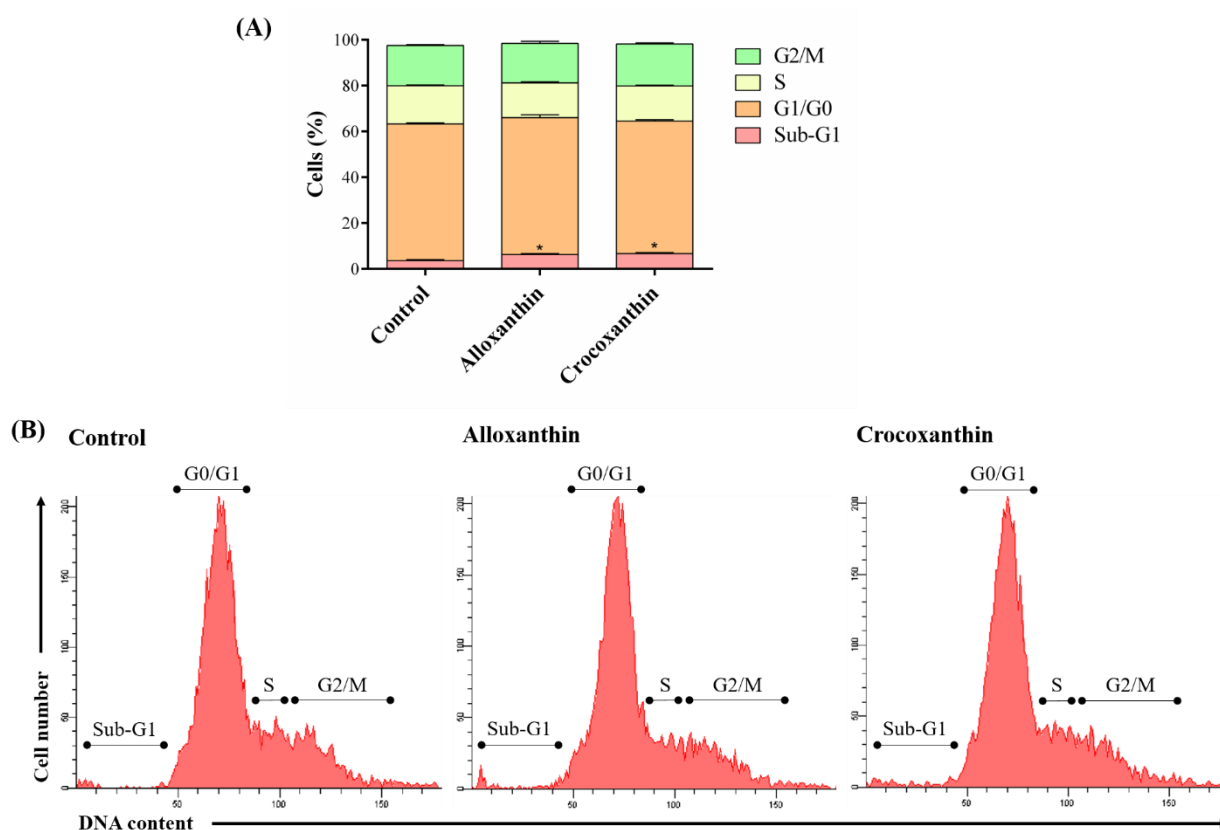


Figure 11. Effect of alloxanthin (29 μM , IC_{50}) and crocoxanthin (50 μM , IC_{50}) on different phases of cell cycle (Sub-G1, G1/G0, S, G2/M). A2058 cells were treated for 72h, stained with propidium iodide and measured by flow cytometry, as shown in the quantitative distribution of cells in different phases of cell cycle (A) and in the representative histograms (B). Data are expressed as mean \pm SEM, $*p < 0.05$ (vs. control group) according to ANOVA one-way followed by Tukey's post-test, from at least three independent measurements ($n=3$).

3.9. Alloxanthin sensitizes A2058 cells to chemotherapy

Due to their metastatic and chemoresistant potential (de Oliveira Júnior et al., 2019), A2058 cells represent a good cell model to evaluate the chemosensitizing effect of cytostatic agents. They express the oncogenic BRAF V600E mutation, present in 40-70% of clinical cases (Flaherty and McArthur, 2010). Although target therapies using BRAF inhibitors (e.g.

vemurafenib) have improved the treatment of metastatic melanoma, most patients develop resistance mechanisms that limit therapeutic efficacy (Chakraborty et al., 2013; Chapman et al., 2011; Tentori et al., 2013). In this sense, we evaluated the chemosensitizing effect of *R. salina* carotenoids using the MTT assay. Alloxanthin and crocoxanthin ($1/2IC_{50}$) were combined with increasing concentrations of vemurafenib (BRAF inhibitor) or dacarbazine (alkylating agent), and tested for 72h. As shown in Figure 12, A2058 cells were sensitive to vemurafenib ($IC_{50} = 11.71 \mu\text{M}$) but resistant to dacarbazine ($IC_{50} > 100 \mu\text{M}$). Crocoxanthin was not able to potentiate the antiproliferative activity of both anticancer drugs. However, alloxanthin enhanced the antiproliferative effect of vemurafenib by reducing its IC_{50} from 11.71 to 2.54 μM . Furthermore, alloxanthin restored the sensitivity of melanoma cells to dacarbazine ($IC_{50} = 28.31 \mu\text{M}$ for combined treatment) (Table 3), reducing significantly cell density compared to monotherapy (Figure 12).

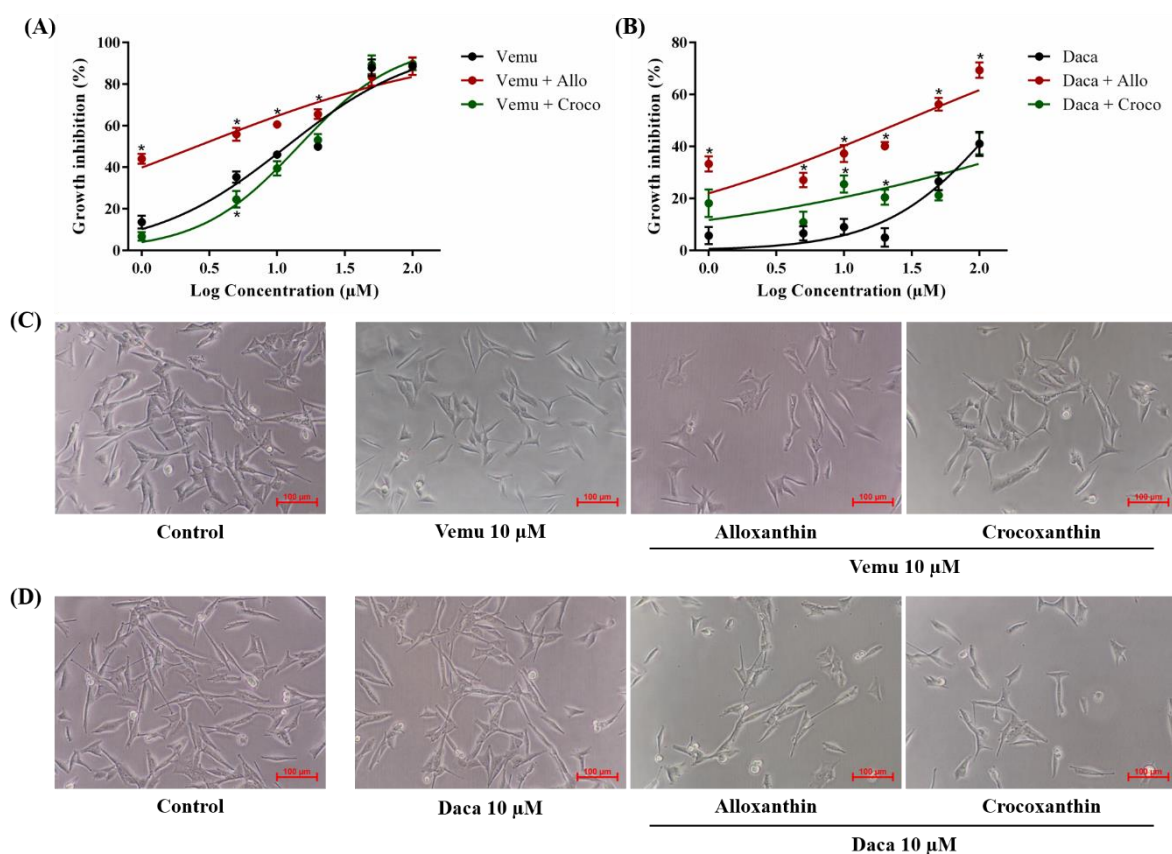


Figure 12. Antiproliferative activity of alloxanthin (allo, 14.5 μM) and crocoxanthin (croco, 25 μM) combined to vemurafenib (vemu) (A) and dacarbazine (daca) (B) in the MTT assay. A2058 cells were grown for 72h with increasing concentrations of the anticancer drugs (1-100 μM) in the presence or absence of the carotenoids ($1/2IC_{50}$). (C) Photomicrographs show reduction of cell density promoted by combined therapies, compared to monotherapies and control groups.

Data are expressed as mean \pm SEM, * $p < 0.05$ according to unpaired Student's t test, from at least three independent measurements ($n=3$).

Table 3. Antiproliferative activity of monotherapies and combined therapies against A2058 cells. Data are presented as IC_{50} values and 95% confidence interval. For combined therapy, increasing concentrations of vemurafenib and dacarbazine (1-100 μ M) were associated to $\frac{1}{2}IC_{50}$ of alloxanthin (14.5 μ M) and crocoxanthin (25 μ M).

Monotherapy	IC_{50} (μ M)	Combined therapy	IC_{50} (μ M)
Allo	29.16 (21.56 – 39.45)	-	-
Croco	49.92 (45.21 – 55.12)	-	-
Vemu	11.71 (10.09 – 13.58)	Vemu + Allo ($\frac{1}{2} IC_{50}$)	2.54 (1.76 – 3.66)
		Vemu + Croco ($\frac{1}{2} IC_{50}$)	14.35 (12.48 – 16.51)
Daca	>100	Daca + Allo ($\frac{1}{2} IC_{50}$)	28.31 (20.62 – 38.86)
		Daca + Croco ($\frac{1}{2} IC_{50}$)	>100

Allo (alloxanthin), croco (crocoxanthin), vemu (vemurafenib), daca (dacarbazine). IC_{50} is defined as the concentration of a compound inhibiting 50% of cell growth, calculated by non-linear regression. $\frac{1}{2}IC_{50}$ correspond to half of the IC_{50} value. Data are expressed as mean (95% confidence intervals), from at least three independent measurements ($n=3$).

In order to better characterize the sensitizing effect of alloxanthin, combination index (CI) was calculated for combined therapies (alloxanthin + vemurafenib and alloxanthin + dacarbazine) using the Chou-Talalay method (Chou and Talalay, 1984). CI values were used to check whether the antiproliferative effect was due to an additive ($CI = 1$), synergistic ($CI < 1$) or antagonistic ($CI > 1$) effect. As shown in Figure 13, alloxanthin + vemurafenib combination resulted in a synergistic effect at 14.5 + 5, 14.5 + 10 and 14.5 + 50 μ M treatments, while alloxanthin + dacarbazine treatment resulted in a synergistic effect at the highest concentrations (14.5 + 50 or 100 μ M, respectively). In this sense, alloxanthin contributes to the antiproliferative effect of vemurafenib and dacarbazine, and may cooperate to reduce resistance in melanoma cells expressing BRAF mutation.

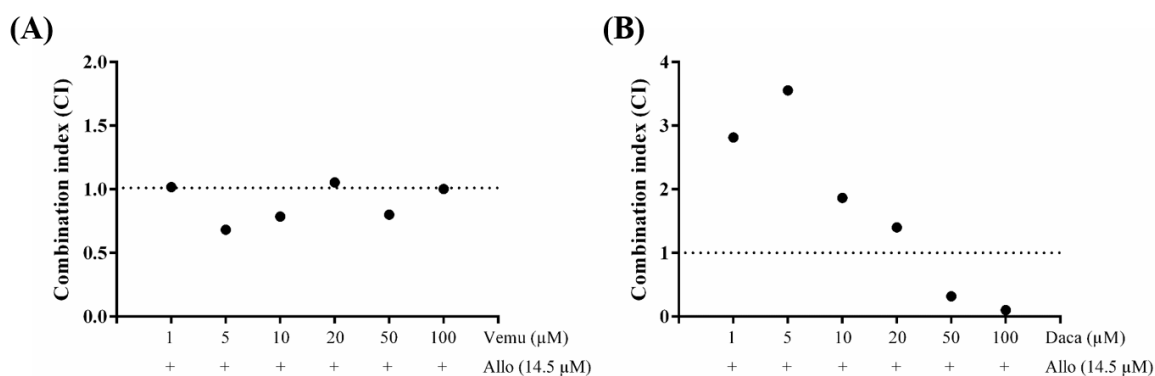


Figure 13. Combination index (CI) for the association of alloxanthin (14.5 μM, $\frac{1}{2}IC_{50}$) with vemurafenib (1-100 μM) (A) or dacarbazine (1-100 μM) (B) in the MTT assay (72h of treatment), calculated according to data shown in Table 3. CI = 1 indicates additive effect, CI < 1 indicates synergism, and CI > 1 indicates antagonism, according to Chou-Talalay method (Chou and Talalay, 1984).

4. Conclusion

This report establishes for the first time a complete pigment profile of *R. salina*, a cryptophyte microalga widely used in aquaculture and possessing an invaluable interest in the pharmaceutical and nutraceutical sectors. Alloxanthin and crocoxanthin were identified as promising antiproliferative molecules against chemoresistant melanoma cells. These carotenoids limit cell growth, reduce cell migration, and induce apoptosis and accumulation of sub-G1 cells. In addition, alloxanthin potentiates the antiproliferative activity of vemurafenib, a BRAF inhibitor, and restores the sensitivity of A2058 cells to dacarbazine, a conventional alkylating agent commonly used for melanoma treatment. Although further and in-depth investigations are needed, the present study demonstrates that marine carotenoids may be used as adjuvants, improving the sensitivity of melanoma cells to chemotherapy.

Funding

This research was financially supported by the INTERREG Atlantic Area European program (Interreg EnhanceMicroAlgae project, EAPA_338/2016), and the French cancer league (Comité 17 de la Ligue Nationale contre le Cancer).

References

Baudelet, P.H., Gagez, A.L., Bérard, J.B., Juin, C., Bridiau, N., Kaas, R., Thiéry, V., Cadoret, J.P., Picot, L., 2013. Antiproliferative activity of *Cyanophora paradoxa* pigments in

- melanoma, breast and lung cancer cells. *Mar. Drugs* 11, 4390–4406. <https://doi.org/10.3390/md11114390>
- Casagrande, T., Cazarin, C.B.B., Roberto, M., Jr, M., Risso, É.M., Amaya-farfan, J., Grimaldi, R., Mercadante, A.Z., Jacob-lobes, E., Zepka, L.Q., 2019. Microalgae biomass intake positively modulates serum lipid profile and antioxidant status. *J. Funct. Foods* 58, 11–20. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.04.047>
- Chakraborty, R., Wieland, C.N., Comfere, N.I., 2013. Molecular targeted therapies in metastatic melanoma. *Pharmgenomics. Pers. Med.* 6, 49–56. <https://doi.org/10.2147/PGPM.S44800>
- Chaloub, R.M., Motta, N.M.S., de Araujo, S.P., de Aguiar, P.F., da Silva, A.F., 2015. Combined effects of irradiance, temperature and nitrate concentration on phycoerythrin content in the microalga *Rhodomonas* sp. (cryptophyceae). *Algal Res.* 8, 89–94. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.01.008>
- Chapman, P.B., Hauschild, A., Robert, C., Haanen, J.B., Ascierto, P., Larkin, J., Dummer, R., 2011. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N Eng J Med* 364, 2507–2516. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1103782>. Improved
- Chou, T., Talalay, P., 1984. Quantitative dose-effect relationships: the combined effects of multiples drugs or enzyme inhibitors. *Adv. Enzyme Regul.* 22, 27–55. [https://doi.org/10.1016/0065-2571\(84\)90007-4](https://doi.org/10.1016/0065-2571(84)90007-4)
- Cisilotto, J., Sandjo, L.P., Faqueti, L.G., Fernandes, H., Joppi, D., Biavatti, M.W., Creczynski-Pasa, T.B., 2018. Cytotoxicity mechanisms in melanoma cells and UPLC-QTOF/MS2 chemical characterization of two Brazilian stingless bee propolis: Uncommon presence of piperidinic alkaloids. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 149, 502–511. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.11.038>
- 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., Picot, L., 2019. Bixin, an apocarotenoid isolated from *Bixa orellana* L., sensitizes human melanoma cells to dacarbazine-induced apoptosis through ROS-mediated cytotoxicity. *Food Chem. Toxicol.* 125, 549–561. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.02.013>
- de Oliveira Júnior, R.G., Christiane Adrielly, A.F., da Silva Almeida, J.R.G., Grougnet, R., Thiéry, V., Picot, L., 2018. Sensitization of tumor cells to chemotherapy by natural products: A systematic review of preclinical data and molecular mechanisms. *Fitoterapia* 129, 383–400. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2018.02.025>
- Flaherty, K.T., McArthur, G., 2010. BRAF, a target in melanoma. *Cancer* 116, 4902–4913.

<https://doi.org/10.1002/cncr.25261>

- Garbe, C., Peris, K., Hauschild, A., Saiag, P., Middleton, M., Bastholt, L., Grob, J., Malvehy, J., 2016. Diagnosis and treatment of melanoma. European consensus-based interdisciplinary guideline - Update 2016. *Eur. J. Cancer* 63, 201–217. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2016.05.005>
- Gille, A., Neumann, U., Louis, S., Bischo, S.C., Briviba, K., 2018. Microalgae as a potential source of carotenoids: Comparative results of an in vitro digestion method and a feeding experiment with C57BL/6J mice. *J. Funct. Foods* 49, 285–294. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.08.039>
- Habashy, N.H., Abu, M.M., Attia, W.E., Abdelgaleil, S.A.M., 2018. Chemical characterization, antioxidant and anti-inflammatory properties of Greek *Thymus vulgaris* extracts and their possible synergism with Egyptian *Chlorella vulgaris*. *J. Funct. Foods* 40, 317–328. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.11.022>
- Haguet, Q., Bonnet, A., Bérard, J.B., Goldberg, J., Joguet, N., Fleury, A., Thiéry, V., Picot, L., 2017. Antimelanoma activity of *Heterocapsa triquetra* pigments. *Algal Res.* 25, 207–215. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.04.034>
- Housman, G., Byler, S., Heerboth, S., Lapinska, K., Longacre, M., Snyder, N., Sarkar, S., 2014. Drug resistance in cancer: An overview. *Cancers (Basel)*. 6, 1769–1792. <https://doi.org/10.3390/cancers6031769>
- Hynninen, P.H., 1981. Mechanism of the Allomerization of Chlorophyll: Inhibition of the Allomerization by Carotenoid Pigments 1016, 1010–1016.
- Jang, S., Atkins, M.B., 2014. Treatment of BRAF-mutant melanoma: The role of vemurafenib and other therapies. *Clin. Pharmacol. Ther.* 95, 24–31. <https://doi.org/10.1038/clpt.2013.197>
- Juin, C., Bonnet, A., Nicolau, E., Bérard, J.B., Devillers, R., Thiéry, V., Cadoret, J.P., Picot, L., 2015. UPLC-MSE profiling of phytoplankton metabolites: Application to the identification of pigments and structural analysis of metabolites in *Porphyridium purpureum*. *Mar. Drugs* 13, 2541–2558. <https://doi.org/10.3390/md13042541>
- Juin, C., Oliveira Junior, R.G. de, Fleury, A., Oudinet, C., Pytowski, L., Bérard, J.B., Nicolau, E., Thiéry, V., Lanneluc, I., Beaugeard, L., Prunier, G., Almeida, J.R.G.D.S., Picot, L., 2018. Zeaxanthin from *Porphyridium purpureum* induces apoptosis in human melanoma cells expressing the oncogenic BRAF V600E mutation and sensitizes them to the BRAF inhibitor vemurafenib. *Brazilian J. Pharmacogn.* 28, 457–467. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2018.05.009>

- Kaňa, R., Kotabová, E., Sobotka, R., Prášil, O., 2012. Non-photochemical quenching in cryptophyte alga *Rhodomonas salina* is located in chlorophyll *a/c* antennae. PLoS One 7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029700>
- Kumar, S.R., Hosokawa, M., Miyashita, K., 2013. Fucoxanthin: A Marine Carotenoid Exerting Anti-Cancer Effects by Affecting Multiple Mechanisms 5130–5147. <https://doi.org/10.3390/md11125130>
- Lopatka, J., Malon, K., Kryk, M., 2018. Hybrid model of radio channels occupancy prediction for dynamic spectrum access. URSI 2018 - Balt. URSI Symp. 2015, 238–241. <https://doi.org/10.23919/URSI.2018.8406694>
- Matthews, N.H., Li, W.-Q., Qureshi, A.A., Weinstock, M.A., Cho, E., 2017. Epidemiology of Melanoma, in: Cutaneous Melanoma: Etiology and Therapy. pp. 3–22. <https://doi.org/10.15586/codon.cutaneoumelanoma.2017.ch1>
- Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. J. Immunol. Methods 65, 55–63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)
- Napolitano, S., Brancaccio, G., Argenziano, G., Martinelli, E., Morgillo, F., Ciardiello, F., 2018. It is finally time for adjuvant therapy in melanoma. Cancer Treat. Rev. 69, 101–111. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2018.06.003>
- Pasquet, V., Morisset, P., Ihammouine, S., Chepied, A., Aumailley, L., Berard, J.B., Serive, B., Kaas, R., Lanneluc, I., Thierry, V., Lafferriere, M., Piot, J.M., Patrice, T., Cadoret, J.P., Picot, L., 2011. Antiproliferative activity of violaxanthin isolated from bioguided fractionation of *Dunaliella tertiolecta* extracts. Mar. Drugs 9, 819–831. <https://doi.org/10.3390/md9050819>
- Porter, A.G., Ja, R.U., 1999. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. Cell Death Differ. 6, 99–104.
- Prado, G., Svoboda, R.M., Rigel, D.S., 2019. What's New in Melanoma. Dermatol. Clin. 37, 159–168. <https://doi.org/10.1016/j.det.2018.12.005>
- Rodriguezl, F., 2000. Spectral determination of chlorophylls and carotenoids.pdf 195, 29–45. <https://doi.org/10.3354/meps195029>
- Ronca, R., Di Salle, E., Giacomini, A., Leali, D., Alessi, P., Coltrini, D., Ravelli, C., Matarazzo, S., Ribatti, D., Vermi, W., Presta, M., 2013. Long Pentraxin-3 Inhibits Epithelial-Mesenchymal Transition in Melanoma Cells. Mol. Cancer Ther. 12, 2760–2771. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-13-0487>
- Roos, W.P., Quiros, S., Krumm, A., Merz, S., Switzeny, O.J., Christmann, M., Loquai, C.,

- Kaina, B., 2014. B-Raf inhibitor vemurafenib in combination with temozolomide and fotemustine in the killing response of malignant melanoma cells. *Oncotarget* 5. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.2610>
- Sanz, N., García-Blanco, A., Gavalás-Olea, A., Loures, P., Garrido, J.L., 2015. Phytoplankton pigment biomarkers: HPLC separation using a pentafluorophenyl octadecyl silica column. *Methods Ecol. Evol.* 6, 1199–1209. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12406>
- Sathasivam, R., Ki, J.S., 2018. A review of the biological activities of microalgal carotenoids and their potential use in healthcare and cosmetic industries. *Mar. Drugs* 16, 1–31. <https://doi.org/10.3390/md16010026>
- Schadendorf, D., Akkooi, A.C.J. Van, Berking, C., Griewank, K.G., Gutzmer, R., Hauschild, A., Stang, A., Roesch, A., 2018. Melanoma. *Lancet* 392, 971–984. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31559-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31559-9)
- Sengupta, S., Koley, H., Dutta, S., Bhowal, J., 2018. Hypocholesterolemic effect of *Spirulina platensis* (SP) fortified functional soy yogurts on diet-induced hypercholesterolemia. *J. Funct. Foods* 48, 54–64. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.07.007>
- Serive, B., Nicolau, E., Bérard, J.B., Kaas, R., Pasquet, V., Picot, L., Cadoret, J.P., 2017. Community analysis of pigment patterns from 37 microalgae strains reveals new carotenoids and porphyrins characteristic of distinct strains and taxonomic groups. *PLoS One* 12, 1–35. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171872>
- Spagnolo, F., Ghiorzo, P., Orgiano, L., Pastorino, L., Picasso, V., Tornari, E., Ottaviano, V., Queirolo, P., 2015. BRAF-mutant melanoma: Treatment approaches, resistance mechanisms, and diagnostic strategies. *Onco. Targets. Ther.* <https://doi.org/10.2147/OTT.S39096>
- Spagnolo, F., Ghiorzo, P., Queirolo, P., 2014. Overcoming resistance to BRAF inhibition in BRAF-mutated metastatic melanoma. *Oncotarget* 5, 10206–21. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.2602>
- Sugawara, T., Ganesan, P., Li, Z., Manabe, Y., Hirata, T., 2014. Siphonaxanthin, a Green Algal Carotenoid, as a Novel Functional Compound 3660–3668. <https://doi.org/10.3390/md12063660>
- Tentori, L., Lacal, P.M., Graziani, G., 2013. Challenging resistance mechanisms to therapies for metastatic melanoma. *Trends Pharmacol. Sci.* 34, 656–666. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2013.10.003>
- Teubner, K., Tolotti, M., Greisberger, S., Morscheid, Heike, Dokulil, M.T., Morscheid, Harald, 2003. Steady state phytoplankton in a deep pre-alpine lake: Species and pigments of

- epilimnetic versus metalimnetic assemblages. *Hydrobiologia* 502, 49–64.
<https://doi.org/10.1023/B:HYDR.0000004269.54705.cb>
- Tracey, E.H., Vij, A., 2019. Updates in Melanoma. *Dermatol. Clin.* 37, 73–82.
<https://doi.org/10.1016/j.det.2018.08.003>
- Tremblay, R., Cartier, S., Miner, P., Pernet, F., Quéré, C., Moal, J., Muzellec, M.L., Mazuret, M., Samain, J.F., 2007. Effect of *Rhodomonas salina* addition to a standard hatchery diet during the early ontogeny of the scallop *Pecten maximus*. *Aquaculture* 262, 410–418.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.10.009>
- van Houcke, J., Medina, I., Maehre, H.K., Cornet, J., Cardinal, M., Linssen, J., Luten, J., 2017. The effect of algae diets (*Skeletonema costatum* and *Rhodomonas baltica*) on the biochemical composition and sensory characteristics of Pacific cupped oysters (*Crassostrea gigas*) during land-based refinement. *Food Res. Int.* 100, 151–160.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.06.041>
- Vinod, B.S., Maliekal, T.T., Anto, R.J., 2013. Phytochemicals As Chemosensitizers: From Molecular Mechanism to Clinical Significance. *Antioxid. Redox Signal.* 18, 1307–1348.
<https://doi.org/10.1089/ars.2012.4573>
- Voskoboynik, M., Arkenau, H.T., 2014. Combination therapies for the treatment of advanced melanoma: A review of current evidence. *Biochem. Res. Int.* 2014.
<https://doi.org/10.1155/2014/307059>
- Vu, M.T.T., Douët, C., Rayner, T.A., Thoisen, C., Nielsen, S.L., Hansen, B.W., 2016. Optimization of photosynthesis, growth, and biochemical composition of the microalga *Rhodomonas salina*—an established diet for live feed copepods in aquaculture. *J. Appl. Phycol.* 28, 1485–1500. <https://doi.org/10.1007/s10811-015-0722-2>
- Walne, P.R., 1970. Studies on food value of nineteen genera of algae to juvenile bivalves of the genera *Ostrea*, *Crassostrea*, *Mercenaria* and *Mytilus*. *Fish Invest L. Ser* 26, 1–62.
- Wang, C., Kim, J., Kim, S., 2014. Carotenoids : New Opportunities and Future Prospects 4810–4832. <https://doi.org/10.3390/md12094810>

CHAPITRE 5

Article soumis dans Algal Research

UPDATED UPLC-DAD-MS/MS PIGMENT COMPOSITION OF *Tisochrysis lutea* AND PURIFICATION OF FUcoxANTHIN USING CENTRIFUGAL PARTITION CHROMATOGRAPHY FOR THE CHEMOSENSITIZATION OF MELANOMA CELLS

Raimundo Gonçalves de Oliveira-Júnior¹, Raphaël Grougnet², Pierre-Edouard Bodet¹, Antoine Bonnet¹, Elodie Nicolau³, Ahlem Jebali², Judith Rumin¹, Laurent Picot^{1*}

¹ LIENSs UMRi CNRS 7266, La Rochelle Université, 17042 La Rochelle, France.

² Equipe Produits Naturels, Analyse, Synthèse, UMR CNRS 8038, Université Paris Descartes, 75006 Paris, France.

³ Laboratoire BRM/PBA, IFREMER, 44311 Nantes, France.

*Corresponding author at: UMRi CNRS 7266 LIENSs, La Rochelle Université, Curie B101 Faculté des Sciences et Technologies, Avenue Michel Crépeau, 17042 La Rochelle, France. E-mail address: laurent.picot@univ-lr.fr (Laurent Picot).

ABSTRACT

Tisochrysis lutea (*T. lutea*, ex *Isochrysis affinis galbana* or *T-Iso*) is a marine haptophyte that was first isolated from Tahiti seawater. Because of its high content in lipids, this tropical species is commonly used in aquaculture to feed fishes, crustaceans and molluscs larvae. It is also considered as a rich source of fucoxanthin with a high potential for nutraceutical, cosmetic and pharmaceutical applications. The purpose of the present study was to detail the pigment composition of *T. lutea* and develop an efficient process to obtain highly purified fucoxanthin from this species for human health applications. Using high-resolution UPLC-DAD-MS/MS, we demonstrated for the first time the presence of echinenone, 3-hydroxy-echinenone and chlorophyll *c*₂-MonoGalactosylDiacylGlycerol [18:4/14:0] in unstressed cultures of *T. lutea*. The chemotaxonomic relevance of this updated pigment composition was discussed in relation to the Haptophyta phylum. A two-step purification of *T. lutea* fucoxanthin was then conducted using centrifugal partition chromatography coupled to flash chromatography. This process allowed the recovery of highly purified fucoxanthin (purity > 99%), that was further assessed as a low-toxicity antineoplastic and chemosensitizing natural product in human chemoresistant melanoma cells. *T. lutea* purified fucoxanthin exerted an antiproliferative activity in A2058 melanoma cells and reversed *in vitro* their chemoresistance to dacarbazine, a DNA-alkylating agent clinically used for the treatment of metastatic melanoma. In conclusion, this study demonstrates that *T. lutea* is a rich source of fucoxanthin, an antineoplastic carotenoid with chemosensitizing activity in human chemoresistant melanoma cells, that can be highly purified using an optimized combination of centrifugal partition chromatography and flash chromatography.

Keywords: carotenoids; centrifugal partition chromatography; pigments; melanoma; multidrug resistance.

1. Introduction

Tisochrysis lutea (*T. lutea*), formerly named *Isochrysis affinis galbana* or T-Iso is a marine brown microalga (Haptophyta) originally isolated from tropical seawater (Tahiti, French Polynesia) [1]. This species is widely used in aquaculture because it contains a high amount of polyunsaturated fatty acids (PUFAs), notably docosahexaenoic acid (DHA). *T. lutea* also presents a promising nutraceutical and pharmaceutical potential [2–4], not only as a rich source of PUFAs but also because of its high content in carotenoids and vitamins [5,6]. Preliminary analyses of *T. lutea* pigment composition by our research group have shown that this species contains a high amount of fucoxanthin and unidentified carotenoids (named Car43 and Car48) that present a chemotaxonomic interest [7].

Fucoxanthin is a marine carotenoid of great commercial value according to its cosmetic, pharmaceutical and nutraceutical applications [8]. Several biological and pharmacological activities have been demonstrated for fucoxanthin, including antioxidant, anti-obesity, anti-diabetic, anti-inflammatory and anticancer effects [9–12]. It is currently sold as a food supplement in nutrition shops, for its anti-obesity activity, and it has no significant oral toxicity according to *in vivo* studies [13,14]. Fucoxanthin has demonstrated a high potential as a natural anticancer compound, as it is able to induce apoptosis in a wide variety of cancer cells *in vitro* and prevent tumor initiation, growth, metastasis and angiogenesis *in vivo* [11,15]. Fucoxanthin also enhanced the cytotoxicity of anticancer drugs in leukaemia, colon, liver, breast and cervical cancer cells, suggesting its potential use as a natural chemosensitizing nutrient in adjuvant therapy in cancer patients [16–19]. However, the pharmaceutical development of fucoxanthin has been slowed by the complexity of its extraction and purification from seaweeds and microalgae, that limits the easy access to high amounts of highly purified pigment. Conventional extractions of fucoxanthin from algae are based on the use of organic solvents such as dimethyl sulfoxide (DMSO) and acetone by simple maceration procedure. Extracts are then subjected to classical purification methods including silica gel column chromatography, preparative thin layer chromatography, or high-performance liquid chromatography (HPLC) [2,20–22]. Although efficient to obtain highly purified carotenoids, these methods are usually time-consuming, require large volumes of toxic organic solvents, may be limited by pigment retention or chemical transformation in the stationary phase, and can only be employed with limited amounts of sample and low recovery yields. To overcome these problems, preparative centrifugal partition chromatography (CPC) systems have been used as a scale-up approach for the purification of bioactive products from complex natural matrices [23], but only few papers have applied this very efficient process to the purification of microalgae pigments [24].

CPC is a liquid-liquid chromatography technique using non-miscible biphasic solvent systems that allow the fast and efficient separation of mixture compounds according to their partition coefficient (K), the ratio of their amounts in the stationary and mobile phases. As CPC is a solid stationary phase-free technique, it allows a faster and inexpensive separation of structurally diverse compounds, with higher sample loading capacity, less solvent use, possibility to recover solvents after purification and complete sample recovery [25,26]. For these reasons, CPC has been widely used for the purification of bioactive compounds from plants [27–29]. In contrast, studies using CPC for the separation of algae metabolites are rare and almost inexistent for microalgae. Only one pioneering investigation studied the β -carotene CPC extraction and purification from *Dunaliella salina* culture medium, with the objective to purify it without damaging microalgae cells, resulting in the recovery of 65% of the total amount of β -carotene with less than 35% cell disruption [24]. CPC has also been described as an efficient method for the purification of fucoxanthin from seaweeds [30], but to date, no report exist about a fucoxanthin purification process based on CPC of a microalgae extract.

In this paper, we analysed in detail the complete pigment composition of *T. lutea* using high-resolution UPLC-DAD-MS/MS and reported the presence of echinenone, 3-hydroxy-echinenone and chlorophyll c_2 -MonoGalactosylDiacylGlycerol, that were previously reported as unidentified carotenoids and chlorophyll derivatives in this species. We then optimized a two-steps purification process based on the coupling of CPC with flash chromatography, that allowed the recovery of highly purified fucoxanthin, with an extraction yield superior to all other reported processes. Finally, we demonstrated that highly purified fucoxanthin from *T. lutea* exerted a moderate antiproliferative activity in chemoresistant human melanoma cells and reverted their chemoresistance to dacarbazine, a DNA-alkylating agent clinically used to treat metastatic melanoma.

2. Materials and methods

2.1. Microalgae culture, harvest and freeze-drying

Tisochrysis lutea CCAP 927/14 (Figure 1) was grown in a commercial 16 L photobioreactor LUCY© (Synoxis algae, Le Cellier, France) containing 0.2 μm filtered and autoclaved seawater enriched with Walne's medium 4 mL.L^{-1} . The culture was realized in batch condition with an increasing irradiance from 74 to 300 $\mu\text{mol photons m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ from day 0 to day 3 in a climate room at 18 °C. A pH 9 regulation was maintained with a regulated CO_2 injection. After 9 days, cells reached a concentration of $4,07 \times 10^7$ cell.mL^{-1} . At this early

stationary phase, 16 L of culture were harvested by centrifugation. The microalgae paste was frozen at -80°C and freeze-dried before extraction.

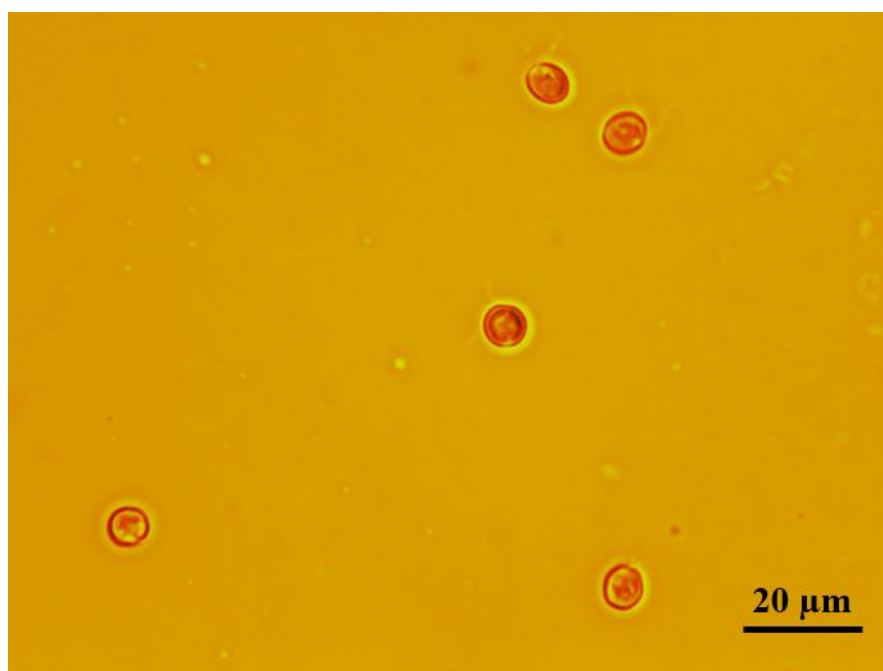


Figure 1. *Tisochrysis lutea* (strain T-Iso CCAP 927/14). ©IFREMER, Nantes, France.

2.2. Sonication-assisted extraction of *T. lutea* pigments

T. lutea lyophilized biomass was subjected to sonication-assisted extraction using absolute ethanol as solvent (2 g of biomass/500 mL of solvent). Extraction was performed using an ultrasonic processor (50W, 30 kHz, UP50H model, Hielscher, Germany), with 100% amplitude and continuous pulse cycle, for 30 min and under constant stirring. In order to limit thermal degradation of pigments by the heat generated at the sonicator tip, the extraction procedure was entirely performed on ice. The pigment extract was filtered through a PVDF 0.22 μm membrane and solvent was evaporated in amber vials (45 °C, vacuum). Five hundred and three mg of *T. lutea* dried ethanol extract (TI-EtOH) were recovered, corresponding to a 25.15% pigment extraction yield (w/w) as compared to the starting biomass. This pigment extraction was carried out iteratively, to obtain grams of TI-EtOH, that were stored at -20 °C until chemical characterization and pharmacological assays.

2.3. Scanning electron microscopy (SEM)

SEM analysis was performed in order to evaluate cell morphology after freeze-drying and sonication-assisted extraction. Cells were placed on a conductive double layer carbon

support and examined in environmental mode without metal coating, using a Philips-FEI Quanta 200 ESEM/FEG microscope, equipped with a FEG canon delivering 1 to 30 kV beam current [31].

2.4. UPLC-DAD-MS/MS analysis

Pigment composition was determined using an Acquity UPLC H-Class (Waters, Milford, USA) coupled to a Waters 2996 photodiode array detector or a Xevo G2 S Q-TOF mass spectrometer, equipped with an electrospray ionization (ESI) source (Waters, Manchester, England). The chromatographic system consisted of a quaternary pump (Quaternary Solvent Manager, Waters) and an automatic injector (Sample Manager-FTN, Waters) equipped with a 10 μL sample loop. TI-EtOH was dissolved in methanol to obtain a 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ solution and 5 or 10 μL (for MS or UV analysis, respectively) were injected in a C18 column (Acquity UPLC BEH C18, Waters) (2.1 x 50 mm, 1.7 μm), using a flow rate of 300 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. The elution gradient was composed of solvents A (0.001% formic acid in water) and B (0.001% formic acid in methanol) as follows: 0 – 1 min, 80% B; 1 – 2 min, 80-81% B; 2 – 5 min, 81% B; 5 – 7 min, 81-81.5% B; 7 – 10 min, 81.5% B; 10 – 11 min, 81.5-83% B; 11 – 14 min, 83% B; 14 – 16 min, 83-85% B; 16 – 20 min, 85% B; 20 – 23 min, 85-90% B; 23 – 27 min, 90% B; 27 – 29 min, 90-95% B; 29 – 35 min, 95% B; 35 – 37 min, 95-98% B; 37 – 43 min, 98% B; 43 – 44 min, 100% B; 44 – 48 min, 100% B; 48 – 48.5 min, 100-20% B; 48.5 – 53 min, 20% B [32,33]. Column and injector were kept at 25 and 7 $^{\circ}\text{C}$, respectively, during all analyses. UV spectra acquisition was performed in a 300-800 nm interval, with a 5 Hz acquisition frequency and 1.2 nm resolution. All MS analyses were performed in the positive ionization mode, with MS^E function in centroid mode. Final ESI conditions were: source temperature 120 $^{\circ}\text{C}$, desolvation temperature 500 $^{\circ}\text{C}$, cone gas flow-rate 50 $\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$, desolvation gas flow-rate 300 $\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$, capillary voltage 3.0 kV, sampling cone voltage 35 V, and source compensation 80 V. The instrument was set to acquire over the m/z 250 – 2000 range with a scan time equal to 0.5 s. Ramp collision energy was from 10 to 30 V and mass spectrometry calibration was performed before analysis using 0.5 mM sodium formate solution. Leucine Enkephalin ($M = 555.62$ Da, 1 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) was used as lock-mass. UPLC-DAD chromatograms were recorded in full scan mode (300-800 nm) and UPLC-MS^E data were collected in positive mode (ESI⁺). Mass error between experimental and theoretical parent or fragment ions was calculated as $[(\text{experimental } m/z - \text{theoretical } m/z) / \text{theoretical } m/z] \times 10^6$. Quantitative analysis of fucoxanthin was performed under the same conditions, using an analytical standard (>99% purity, Sigma Aldrich, France). A calibration curve (0–1000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $R^2 = 0.9994$, UV detection at 450 nm) allowed the determination of the

fucoxanthin content in extracts and fractions. All quantitative analyses were performed in triplicate.

2.5. CPC biphasic solvent system

A biphasic solvent system was optimized and selected for CPC separation using different proportions of CHex/MeOH/H₂O (Table 1). The solvent system was selected according to the determination of the partition coefficient *K* by UPLC-DAD analysis as mentioned above. A set of biphasic systems was tested using the shake-flask method [28]. An aliquot of Tl-EtOH was solubilized in the different solvent systems, transferred into separatory funnels, shaken vigorously, then kept still until complete separation of the two phases. After equilibration, the upper and lower phases were monitored by TLC. *K* values for fucoxanthin were calculated by UPLC-DAD using the area under curve (AUC) values obtained for both phases. Finally, the biphasic solvent system CHex/MeOH/H₂O (6:6:1, v/v/v) was selected for CPC purification, considering that the intermediate *K*-value allowed a good affinity of fucoxanthin for the mobile phase and resolutive separation. The upper phase was defined as the stationary phase and the lower phase as the mobile phase (descending mode).

Table 1. Determination of *K* values for fucoxanthin (Fuco) in different solvent systems, as [Fuco]_{upper} / [Fuco]_{lower}.

Solvent system	<i>K</i> -value (fucoxanthin)
CHex/MeOH/H ₂ O	
5:5:1	0.93
6:6:1	1.20
6:5:1	1.16
7:7:1	1.77
8:8:1	1.30

2.6. CPC pigments separation

CPC was performed on a Spot CPC with a 250 mL rotor containing 1953 twin-cells (Armen Instrument, Saint Avé, France). The CPC system was equipped with a gradient pump and a 6-ways valve 10 mL injection loop. Initially, the rotor was filled in descending mode with the upper stationary phase at 30 mL.min⁻¹ and rotation speed of 1000 rpm. Then, the system was equilibrated with the lower mobile phase at 15 mL.min⁻¹ (1600 rpm), in the same mode. The retention of the stationary phase was calculated as 68% (170 mL retained in the rotor). Tl-

EtOH (750 mg) was solubilized in equal volumes of stationary and mobile phases and manually injected. The entire separation was performed in descending mode, with a flow rate fixed at 10 mL.min⁻¹ and rotation speed kept at 1600 rpm. After 80 min of elution, the extrusion was achieved by pumping the stationary phase at 20 mL.min⁻¹ and 1600 rpm for 30 min. Fractions were collected every 10 and 20 mL during elution and extrusion respectively, and pooled when their TLC profile were similar, leading to pooled fractions enriched in fucoxanthin.

2.7. Flash chromatography purification

CPC fractions enriched in fucoxanthin were transferred to flash liquid chromatography, as previously reported [32]. Fractions were separately solubilized in methanol and added to 3 g of Celite[®] 545 (Sigma Aldrich, France). After manual homogenization and complete solvent evaporation, the mixture was placed in a pre-column, which was coupled on the top of a PF-C18 column (20 g, 15 µm). The purification was performed in an Interchim Puriflash PF430 system, equipped with an automatic collector (10 mL per tube), using a mobile phase composed of a ternary solvent gradient: A (MeOH/H₂O, 80:20, v/v), B (acetonitrile/H₂O, 90:10, v/v) and C (isopropanol). Elution was monitored at 450 nm, using a fixed flow rate (5 mL.min⁻¹) and the following gradient program: 0 – 5 min, 100% A; 5 – 9 min, 100% B; 9 – 45 min, 30% B and 70% C; 45 – 50 min, 100% C; 50 – 55 min, 100% C; 55 – 60 min, 100% B; 60 – 65 min, 100% A; 65 – 70 min, 100% A. Peaks corresponding to fucoxanthin were collected and fucoxanthin content was determined by UPLC-DAD as mentioned above.

2.8. Antimelanoma activity of fucoxanthin purified from *T. lutea*

2.8.1. Antiproliferative activity

The antiproliferative activity of purified fucoxanthin was evaluated on A2058 cells (ATCC[®] CRL-11147TM), expressing the BRAF V600E oncogenic mutation. These are highly invasive and metastatic human melanoma cells, deriving from a lymph node metastasis, tumorigenic at 100% frequency in nude mice and chemoresistant to some anticancer drugs [34]. Cells were grown in 75 cm² flasks containing DMEM culture medium supplemented with 10% foetal calf serum (FCS) and 1% antibiotics (penicillin-streptomycin) (Dominique Dutscher, France). Cells were kept at 37 °C in a 5% CO₂ humidified atmosphere during all experiments. Fucoxanthin was solubilized in DMSO and then diluted in the cell culture medium. Initially, melanoma cells (2000/well) were added into 96-well microplates and treated with increasing concentrations of fucoxanthin (1 – 100 µM) for 72 h. The final DMSO concentration was equal

to or lower than 1% and tested as negative control. After treatment, cell viability was determined by the MTT assay as previously described [31,34] and IC₅₀ value was calculated from at least three independent measurements.

2.8.2. Chemosensitizing effect

In order to evaluate the ability of fucoxanthin to sensitize A2058 cells to chemotherapy, different concentrations (1 – 100 μM) of Vemurafenib (BRAF inhibitor, Selleckchem, France) and Dacarbazine (DNA alkylating agent, Sigma-Aldrich, France) were tested alone or combined to fucoxanthin at its ½IC₅₀ (7.5 μM). After 72h of treatment, cell viability was measured by the MTT assay and results were expressed as IC₅₀. The combination index (CI) were calculated according to the Chou-Talalay method [35], using the free software CompuSyn (version 1.0). Briefly, CI < 1.0 indicates synergism, CI > 1.0 indicates antagonism, and CI ≅ 1.0 indicates an additive effect.

2.9. Statistical analysis

Data were expressed as mean ± standard error of the mean and analysed by unpaired Student's *t* test (n=3 or more) using the software GraphPad Prism 6.0. Values of *p*<0.05 were considered statistically significant. IC₅₀ values were calculated by nonlinear regression analysis.

3. Results and Discussion

3.1. Sonication-assisted extraction of *T. lutea* pigments

Various processes have been developed to extract pigments from microalgae, depending on the cell wall solidity (silicified frustule, calcified coccolithes, cellulosic theca) and potential presence of extracellular structures (EPS, mucus) [31,36,37]. A perfect pigment extraction process should combine simplicity, low cost, high speed, eco-efficiency, reproducibility, possible selectivity based on the biochemical characteristics of the pigment, protection from thermal and photic damage, high yield and scalability to the industrial level. Although *T. lutea* does not contain a hard cell wall, it is covered by a dense layer of thin calcified scales similar to those found in *Isochrysis galbana* [1]. To ensure maximum pigment extraction efficiency, freeze-dried *T. lutea* biomass was subjected to sonication-assisted extraction. SEM observation of *T. lutea* before extraction revealed in fact that most cells were already open following the freeze-dried process of concentrated biomass coming from the photobioreactor (Figure 2A and

B). Probably the freezing step was sufficient to break most cells, whose membranes merged during the water sublimation step. Some salt crystals coming from the algal cell culture medium could also be observed in the freeze-dried microalgae powder. Occasionally, intact cells exhibiting a spherical to ovoid shape, coherent with the expected cell morphology, and a length varying from 4 to 7 μm could be observed, suggesting that the sonication step could improve the pigment extraction yield (Figure 2A and B). After sonication in ethanol, no clear morphological change was observed and fusion or tearing of cell membranes could also be noticed (Figure 2C and D). In conclusion, the combination of freeze-drying and sonication in ethanol allowed to break most *T. lutea* cells and favoured the exposure of the intracellular content to the extraction solvent to achieve an efficient pigment extraction.

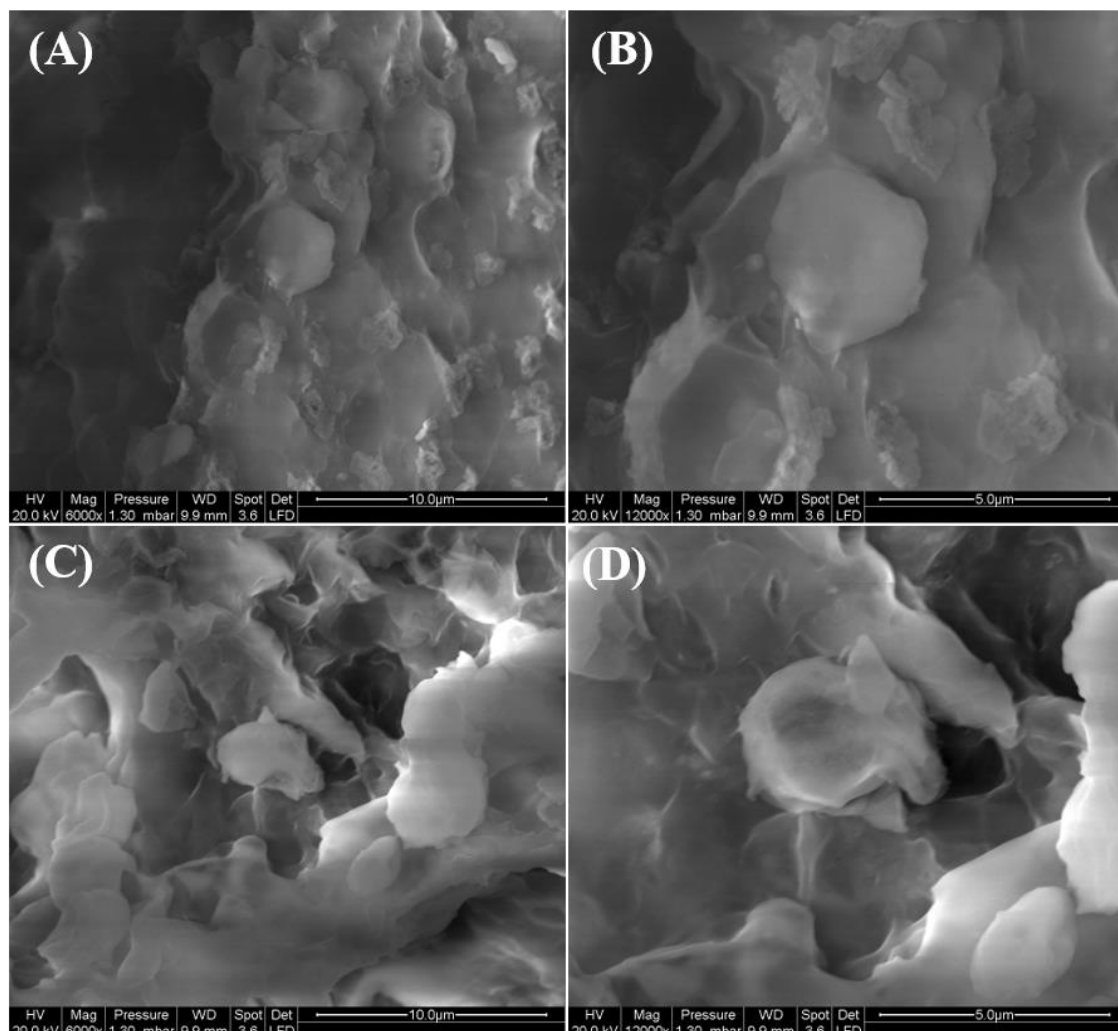


Figure 2. Scanning electron microscopy analysis of freeze-dried *T. lutea* cells before (A and B) and after sonication-assisted extraction (C and D). Magnification $\times 6000$ (A and C) and $\times 12000$ (B and D).

3.2. Pigment composition of *T. lutea*

UPLC-DAD analysis of Tl-EtOH provided a chromatogram containing eighteen peaks (300–800 nm, full scan) (Figure 3). The first pigment eluting as a major peak at 5.51 min was identified as fucoxanthin ($C_{42}H_{58}O_6$), with a maximal absorption wavelength at 453 nm in UPLC solvents and a peak at m/z 681.4131 present in its mass spectrum, identical to the sodium adduct $[M+Na]^+$ expected for this compound (Figure 4). Its high resolution MS/MS spectrum also showed fragment patterns at m/z 641.4222 and 581.4007, corresponding to $[M+H-H_2O]^+$ and $[M+H-H_2O-AcOH]^+$, respectively (Table 2) [38].

In accordance with previous reports, fucoxanthin isomers, diadinoxanthin, diatoxanthin, β,β -carotene, chlorophyll *a*, pheophytin *a* and chlorophylls c_1 and c_2 were also identified in Tl-EtOH [7,39]. Diadinochrome, 3-hydroxy-pheophytin *a* and epimers were also detected but considered as pigment derivatives produced by thermal damage or chemical reaction with ethanol during the sonication step. These derivatives are indeed absent or minority in phytoplankton living cells [31,32].

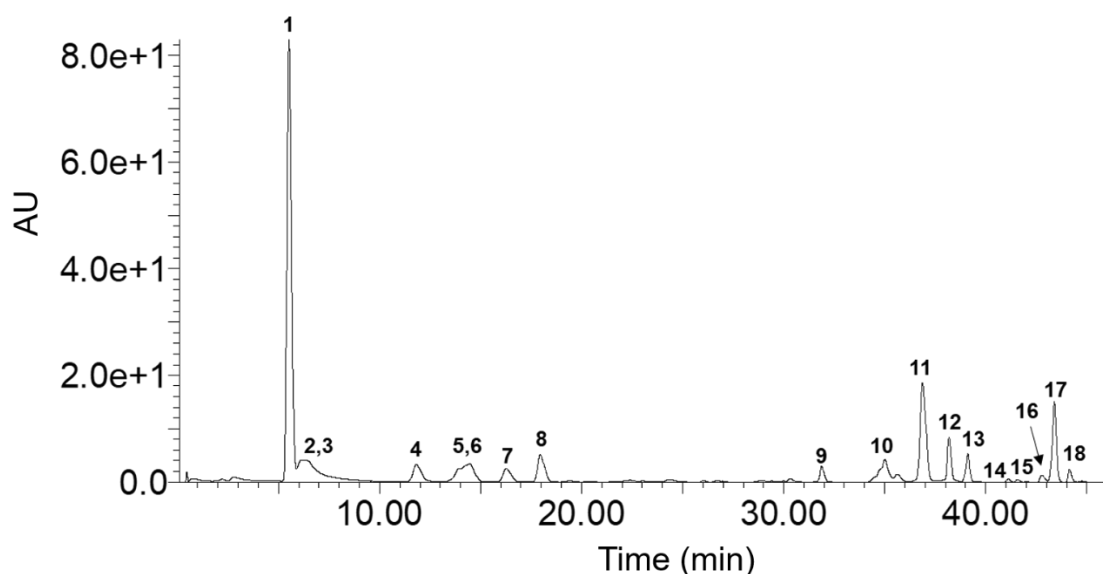


Figure 3. UPLC-DAD chromatogram (full scan, 300-800 nm) of Tl-EtOH. Peak characterization is shown in Table 2.

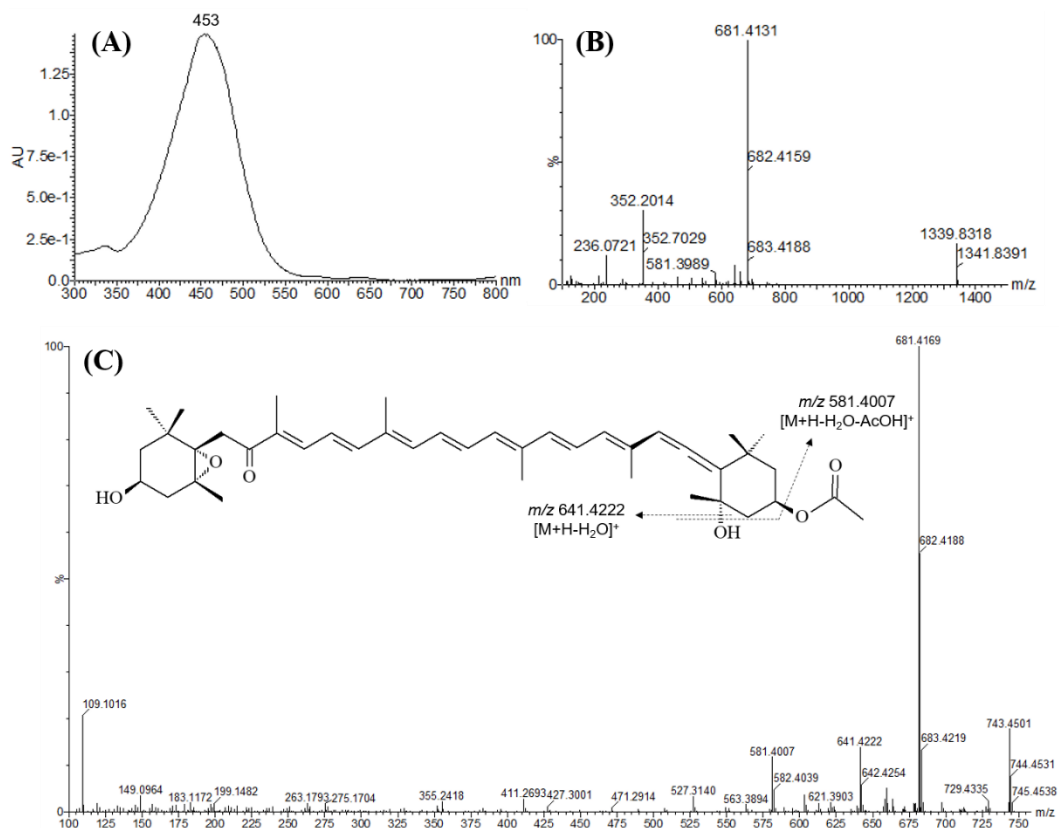


Figure 4. UV, MS (ESI⁺) and MS/MS (ESI⁺) spectra (A, B and C, respectively) of fucoxanthin identified in Tl-EtOH (peak 1, Fig. 3).

Table 2. Pigments identified in Tl-EtOH by UPLC-DAD-MS/MS analysis. Peak number according to Figure 3.

Peak	Pigment	RT (min)	Molecular formula	λ_{\max} (nm)	Band III/II ratio (%)	Experimental m/z (Δ , ppm)			MS ² fragments m/z
						M ⁺	[M+H] ⁺	[M+Na] ⁺	
1	Fucoxanthin	5.51	C ₄₂ H ₅₈ O ₆	453	-	-	-	681.4131 (0.0)	641.4222, 581.4007
2	Chlorophyll <i>c</i> ₂	6.24	C ₃₅ H ₂₈ O ₅ N ₄ Mg	452, 586, 635	-	-	609.1971 (2.8)	631.1799 (2.5)	549.1777
3	Chlorophyll <i>c</i> ₁	6.49	C ₃₅ H ₃₀ O ₅ N ₄ Mg	453, 584, 639	-	-	611.2125 (3.3)	633.1941 (3.6)	551.1903
4	Diadinoxanthin	11.56	C ₄₀ H ₅₄ O ₃	425, 445, 476	61.11	582.4072 (0.2)	-	-	567.3815, 490.3434
5	Diadinochrome	13.52	C ₄₀ H ₅₄ O ₃	408, 429, 456	95.65	582.4074 (0.2)	-	605.3972 (0.2)	502.3440, 221.1538, 181.1233
6	Fucoxanthin isomer	14.4	C ₄₂ H ₅₈ O ₆	453	-	658.4225 (1.2)	-	681.4126 (1.0)	527.3135, 467.2901
7	Diadinochrome isomer	15.99	C ₄₀ H ₅₄ O ₃	408, 429, 456	73.68	582.4073 (0.0)	-	605.3971 (0.0)	502.3439, 221.1540, 181.1221
8	Diatoxanthin	17.85	C ₄₀ H ₅₄ O ₂	427, 451, 480	33.33	566.4128 (0.7)	-	689.4018 (0.0)	474.3496, 119.0862
9	3-hydroxy-echinenone	31.82	C ₄₀ H ₅₄ O ₂	456	-	566.4124 (0.0)	-	589.4020 (0.3)	474.3490, 209.1338, 119.0863
10	Echinenone	34.74	C ₄₀ H ₅₄ O	465	-	550.4179 (0.7)	-	573.4070 (0.4)	458.3551, 203.1428, 119.0852
11	Chlorophyll <i>a</i>	36.49	C ₅₅ H ₇₂ O ₅ N ₄ Mg	431, 665	-	892.5333 (2.2)	-	915.5225 (2.8)	614.2379, 555.2235, 481.1874
12	Chlorophyll <i>a</i> epimer	37.95	C ₅₅ H ₇₂ O ₅ N ₄ Mg	430, 665	-	892.5334 (2.1)	-	-	614.2377, 555.2289, 481.1897

13	Chl <i>c</i> ₂ -MGDG [18:4/14:0]	39.12	C ₇₆ H ₉₆ O ₁₄ N ₄ Mg	458, 590, 635	-	-	1313.6840 (0.9)	-	549.4880
14	Hydroxy-pheophytin <i>a</i>	41.48	C ₅₅ H ₇₄ O ₆ N ₄	405, 508, 534, 663	-	-	887.5660 (3.0)	-	609.2703
15	Hydroxy-pheophytin <i>a</i> epimer	41.95	C ₅₅ H ₇₄ O ₆ N ₄	407, 504, 533, 666	-	-	887.5662 (2.8)	-	609.2719
16	β,β-Carotene	42.60	C ₄₀ H ₅₆	422, 448, 472	46.67	536.4390 (1.5)	-	-	444.3734
17	Pheophytin <i>a</i>	43.16	C ₅₅ H ₇₄ O ₅ N ₄	408, 504, 535, 665	-	-	871.5724 (1.5)	-	593.2762, 533.2554,
18	Pheophytin <i>a</i> epimer	43.98	C ₅₅ H ₇₄ O ₅ N ₄	408, 507, 538, 666	-	-	871.5721 (1.8)	-	593.2762, 533.2554,

RT: retention time. Chl *c*₂-MGDG: chlorophyll *c*₂-monogalactosyldiacylglyceride ester [18:4/14:0].

Echinenone and 3-hydroxy-echinenone were also identified in Tl-EtOH. The retention time of 3-hydroxy-echinenone (peak 9) was significantly lower than that of echinenone (peak 10) in accordance with a gain of polarity due to hydroxylation (Figure 3). After comparing the chromatographic and spectral data, we found that these two pigments corresponded to the unidentified carotenoids Car43 and Car48 respectively, previously described by our research group in the strain *T-Iso* CCAP 927/14 [7].

Interestingly, another non-described pigment for *T. lutea* was detected in the Tl-EtOH chromatogram (Figure 3). Peak 13, eluting at 39.12 min, showed a characteristic chlorophyll *c* UV spectrum, with three maximum absorption bands at 458, 590 and 635 nm. Its retention time was shifted compared to chlorophylls *c*₂ and *c*₁ (6.24 and 6.49 min, respectively), corresponding to a chromatographic behaviour typical of a non-polar chlorophyll *c* derivative [40,41]. Its high-resolution mass spectrum revealed a peak at *m/z* 1313.6840, corresponding to the protonated adduct [M+H]⁺ for the molecular formula C₇₆H₉₆O₁₄N₄Mg (Table 2). The fragmentation pattern at *m/z* 549.4880 indicated a consistent similarity for a chlorophyll *c*₂ derivative. Taken together and in comparison with literature data [42], these findings allowed the identification of peak 13 as Chl *c*₂-MGDG (chlorophyll *c*₂-monogalactosyldiacylglyceride ester [18:4/14:0]).

The chemical structures of the main identified pigments are presented in Figure 5. In the next section, we discuss the physiological and chemotaxonomic relevance of the complete pigment composition determined for *T. lutea*.

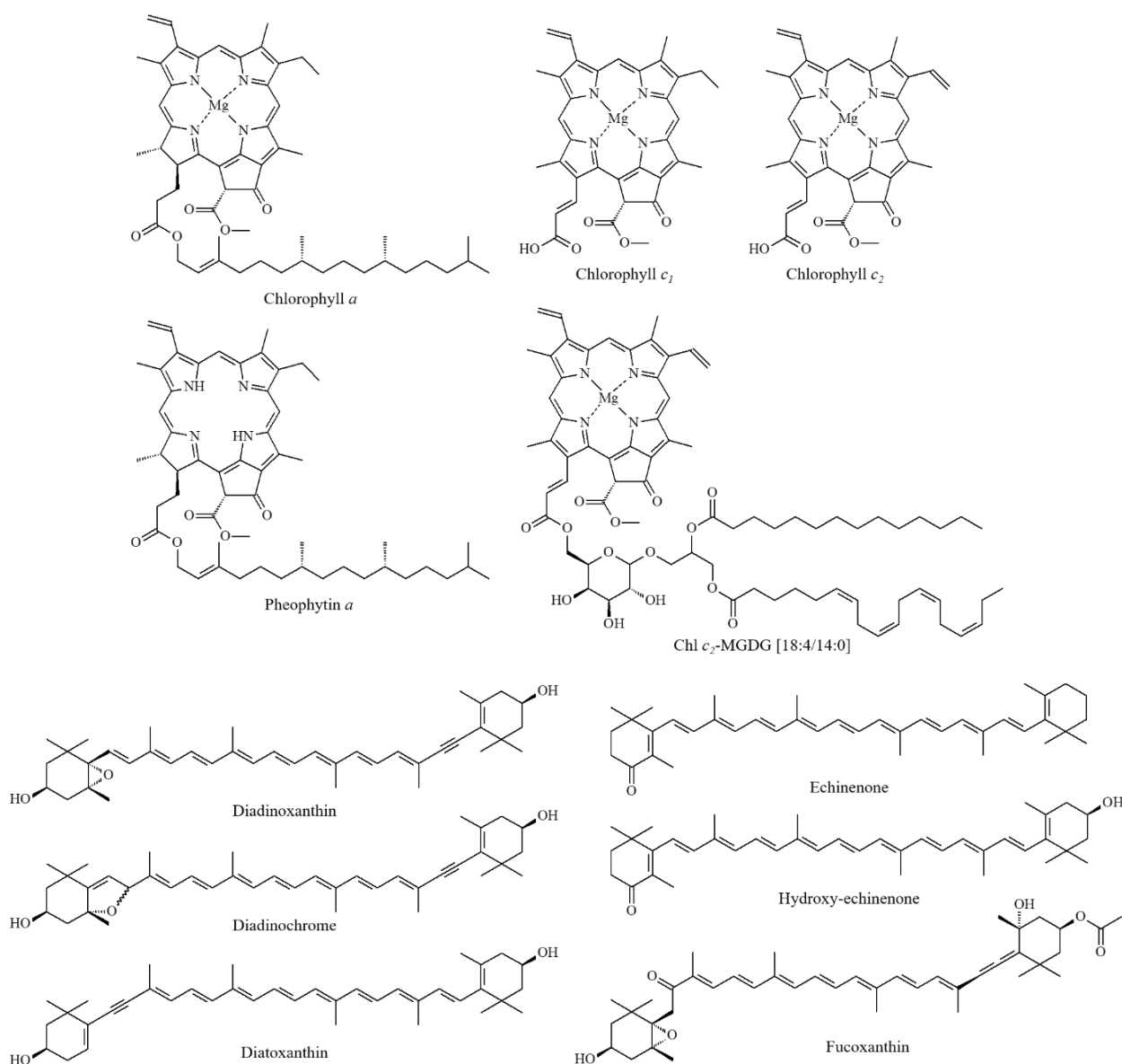


Figure 5. Chemical structures of the main pigments found in Tl-EtOH.

3.3. Physiological and chemotaxonomic relevance of *T. lutea* pigments composition

Previously named *Isochrysis affinis galbana* (T-Iso), *T. lutea* (T-Iso CCAP 927/14) contains chlorophylls *a*, *c*₁ and *c*₂, fucoxanthin and β,β -carotene as light-harvesting pigments for photosynthesis. Diatoxanthin and diadinoxanthin are photoprotective pigments involved in heat dissipation and protection of photosystem from harmful effects of lights [42]. Based on their pigments community, *T. lutea* and *I. galbana* have been grouped in a taxonomic cluster named HAPTO-3 [7,42]. This group is characterized by the presence of common carotenoids (diatoxanthin, diadinoxanthin and fucoxanthin) [7,39]; however two previously unidentified carotenoids were only detected in *T. lutea* (T-Iso CCAP 927/14) [7]. In this paper, we identified these carotenoids, previously named Car43 and Car48, as 3-hydroxy-echinenone and

echinenone, respectively. This result is in line with data reporting the presence of both carotenoids in *T-Iso* cultivated under nitrogen, sulphur and magnesium-limited culture conditions [43]. As echinenone and 3-hydroxy-echinenone are absent from the pigment composition of *I. galbana*, they can be considered as robust chemotaxonomic markers for *T. lutea*, allowing species differentiation through pigment analysis without the need for genetic analysis required by their morphological similarities [1].

In this study, we also describe for the first time the identification of a non-polar chlorophyll c_2 derivative (Chl c_2 -MGDG [18:4/14:0]) in *T. lutea*. Haptophytes may contain different kinds of chlorophyll c , notably chlorophylls c_1 , c_2 and c_3 . Chlorophyll c_2 represents the most common type in haptophytes species and some non-polar derivatives have been reported [41,44,45]. Phytolated chlorophyll c -like pigments have been described in *Emiliania huxleyi*, *Prymnesium parvum* and *Isochrysis galbana* [46,47]. Chlorophyll c_2 -monogalactosyldiacylglyceride pigments are also common in haptophytes. A high-molecular weight chlorophyll c_2 -galactolipid was isolated from *Chrysochromulina polylepis* (now renamed *Prymnesium polylepis* CCMP 286) containing two myristic acid residues (Chl c_2 -MGDG [14:0/14:0]) [41]. Chl c_2 -MGDG [18:4/14:0] containing one octadecatetraenoic acid (18:4) and one myristic acid (14:0) unit was reported as a novel marker pigment in *E. huxleyi* [40], but it was also present in other haptophyte species such as *P. parvum*, *Ochrosphaera neopolitana* and *Phaeocystis antartica* [45]. In the same study, Chl c_2 -MGDG [18:4/14:0] was also identified as a marker of *I. galbana* strains (haptophyte pigment type 3). Our data now prove that this non-polar chlorophyll c_2 derivative is also present in *T. lutea*, confirming its wide distribution in the haptophyte group.

The occurrence of non-polar chlorophyll c derivatives has been used in oceanographic investigations as a chemical indicator for the presence of haptophytes in natural waters [48]. Particularly, the identification of derivatives containing a galactolipid linked to a pigment can be considered as a highly discriminant chemotaxonomic signature for the rapid and accurate identification of species or taxonomic groups within a mix of natural phytoplankton populations [40]. In addition to their chemotaxonomic interest, these molecules also ensure a fundamental biochemical role in microalgae. Chl c_2 -MGDG [18:4/14:0] could indeed have a light-harvesting function, participate to the assembly of light-harvesting complexes [49], and act as a transporter of chlorophyll c_2 from the MGDG-rich lipid bilayer located in the inner chloroplast envelope membrane to its final location in the light-harvesting pigment complexes of the thylakoids [45,50]. A complete taxonomic analysis for pigments found in T1-EtOH is shown in Table 3.

Table 3. Taxonomic analysis of pigments identified in TI-EtOH. HAPTO-3: taxonomic group of haptophytes according to [42] and [7].

Peak	Pigment	Taxonomic coherence	Reference
1	Fucoxanthin	Extensively reported in haptophytes, notably in HAPTO-3	[7,38,41,42,45]
2	Chlorophyll <i>c</i> ₂	Extensively reported in haptophytes	[7,42,45,47]
3	Chlorophyll <i>c</i> ₁	Extensively reported in haptophytes	[7,42,45,47]
4	Diadinoxanthin	Extensively reported in haptophytes, notably in HAPTO-3	[7,41,42,45]
5	Diadinochrome	Produced by diadinoxanthin rearrangement in weakly acid solutions	[7,41,42,45]
6	Fucoxanthin isomer	Isomerization of fucoxanthin	[7,42]
7	Diadinochrome isomer	Isomerization of diadinochrome	[31,42]
8	Diatoxanthin	Extensively reported in haptophytes, notably in HAPTO-3	[7,41,42,45]
9	3-hydroxy-echinenone	Reported in T- <i>Iso</i> under nutrient-depleted conditions; not reported in <i>I. galbana</i>	[43]
10	Echinenone	Reported in T- <i>Iso</i> under nutrient-depleted conditions; not reported in <i>I. galbana</i>	[43]
11	Chlorophyll <i>a</i>	Ubiquitary in photosynthetic algae	[7,31–33,42]
12	Chlorophyll <i>a</i> epimer	Epimerization of Chl <i>a</i>	[31,32,42]
13	Chl <i>c</i> ₂ -MGDG [18:4/14/0]	Reported in haptophytes such as <i>I. galbana</i> , <i>E. huxleyi</i> , <i>P. parvum</i> , <i>O. neopolitana</i> and <i>P. antarctica</i>	[40,42,45]
14	Hydroxy-pheophytin <i>a</i>	Hydroxylation of pheophytin <i>a</i> during extraction	[31,32,42]
15	Hydroxy-pheophytin <i>a</i> epimer	Epimerization of hydroxy-pheophytin <i>a</i>	[31,32,42]
16	β,β-Carotene	Ubiquitary in photosynthetic algae	[31–33,42]
17	Pheophytin <i>a</i>	Pheophytination of Chl <i>a</i> during extraction	[32,42]
18	Pheophytin <i>a</i> epimer	Epimerization of pheophytin <i>a</i>	[31,32,42]

3.4. Fucoxanthin purification by CPC coupled to flash chromatography

Fucoxanthin is a dominant carotenoid found in most algal classes of the red and brown lineages, contributing to more than 10% of all carotenoids production estimated in nature [51]. Currently, fucoxanthin is mainly extracted at industrial scale from brown seaweeds such as *Eisenia bicyclis*, *Laminaria japonica*, *Undaria pinnatifida* and *Sargassum* sp. [51,52]. However, microalgae (particularly diatoms [53] and haptophytes [45]) are progressively being considered an interesting alternative source because of their higher fucoxanthin content [54], growth performance, metabolic plasticity and possible optimization by mutation/selection/transformation to obtain high production yields all along the year. Among these species, *T. lutea* has been highlighted as a promising source of fucoxanthin for commercial purposes [38]. In this paper, we selected CPC as a cost-effective and low environmental impact technology for fucoxanthin separation from *T. lutea* ethanol extract. Figure 6 illustrates the strategy developed to separate and purify this pigment. Initially, Tl-EtOH was submitted to CPC separation using CHex/MeOH/H₂O (6:6:1) as solvent system, in descending mode. Collected fractions were pooled when TLC analysis indicated that they contained similar compounds. As a result, 16 pooled fractions were obtained (F1 to F16). After UPLC-DAD dosage, fucoxanthin-enriched fractions were selected for final refining purification by flash chromatography.

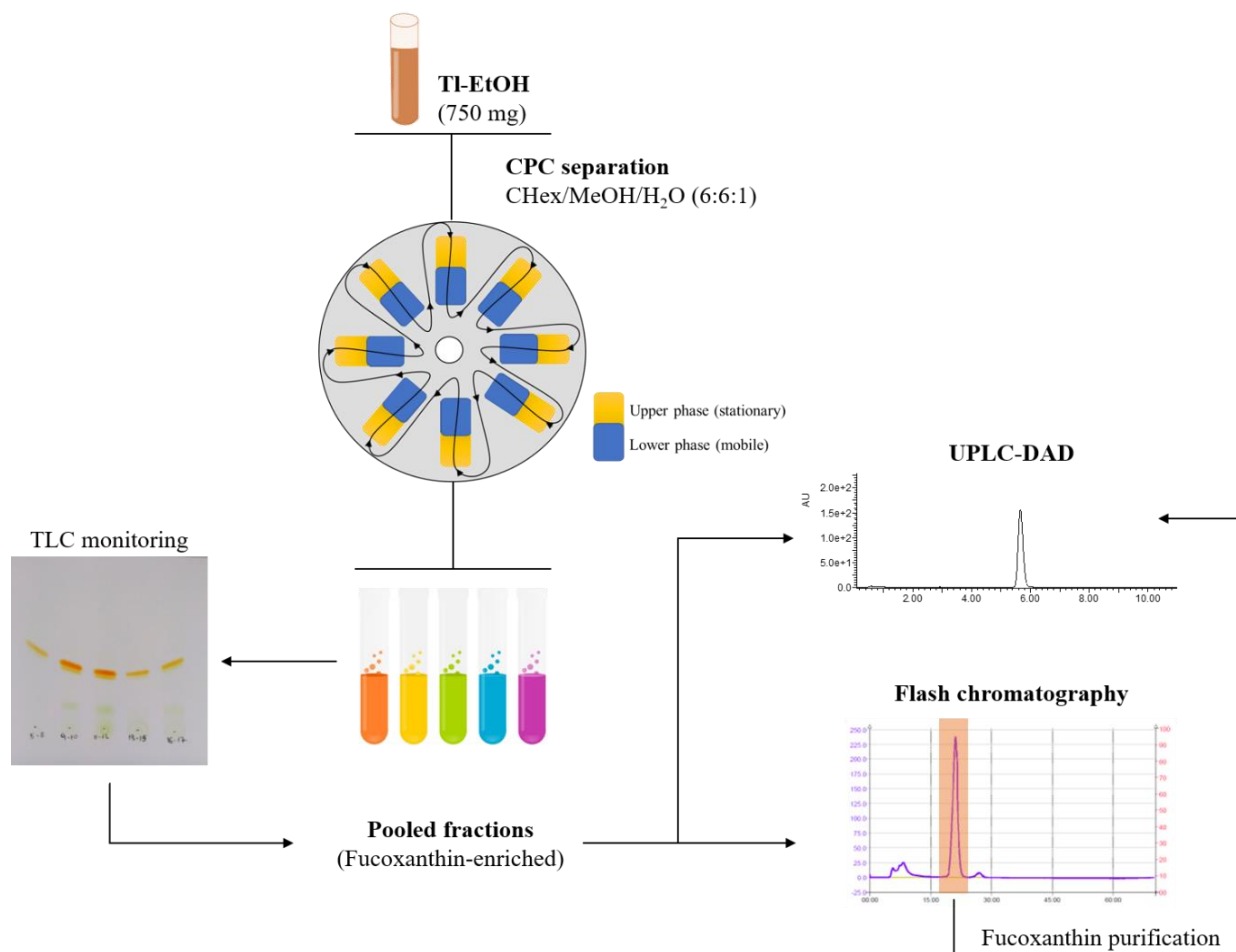


Figure 6. Flowchart of the separation and purification of fucoxanthin from *T. lutea* ethanol extract (Tl-EtOH) using CPC. 750 mg Tl-EtOH were injected into CPC and separated in fractions collected during elution and extrusion. Fractions containing similar composition after TLC monitoring were pooled and dried. Pooled fractions containing fucoxanthin were analysed by UPLC-DAD to determine the fucoxanthin concentration. A final purification step was performed by flash chromatography to obtain highly purified fucoxanthin.

After drying, the first CPC fractions (F1 to F5) looked like an orange amorphous paste, indicating a high content of carotenoids. TLC analysis confirmed that these fractions contained fucoxanthin, whereas the other ones did not and were discarded. After UPLC-DAD analysis, F2 (66.7 mg), F3 (50.7 mg) and F4 (61.6 mg) were found to contain 24.8, 65.7 and 36.1% (w/w) of fucoxanthin, respectively (Table 4, Figure 7). The fucoxanthin content of previous and following fractions decreased abruptly (1.8 and 1.9% for F1 and F5, respectively). The major impurities were identified as chlorophylls *c*₁ and *c*₂. Some fractions also contained minor carotenoids, such as diadinoxanthin, diatoxanthin and diadinochrome. However, non-polar pigments (e.g. chlorophyll *a*, pheophytin *a*, echinenone, 3-hydroxy-echinenone, Chl *c*₂-MGDG [18:4/14/0], β,β-carotene and derivatives) were not detected in fractions F1 to F5, suggesting

that a single CPC run was able to separate polar from non-polar pigments, resulting in fucoxanthin-enriched fractions.

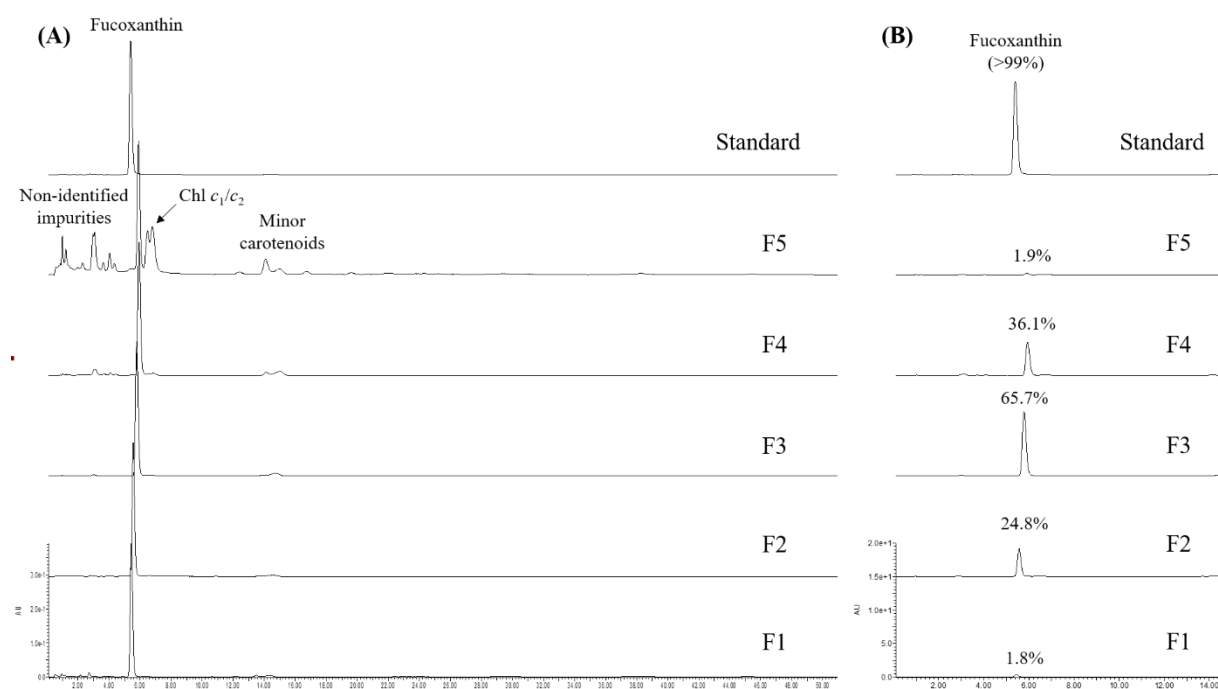


Figure 7. (A) UPLC-DAD chromatograms at 450 nm of fucoxanthin-enriched fractions (F1 to F5) obtained after CPC separation. (B) Fucoxanthin content (% w/w) was calculated after normalization of data vs a calibration curve obtained with standard fucoxanthin (purity >99%, Sigma-Aldrich®). All measurements were performed in triplicate.

In order to improve the purity of fucoxanthin-enriched fractions to a value close to 100%, the pooled fractions (F1 to F5) were subjected to a final refining step by flash chromatography. The chromatographic separation was performed following an optimized method we previously reported for flash chromatography microalgae pigments purification [32]. As shown in Figure 8, chromatograms revealed fucoxanthin as the major compound of fractions F1 to F4. Due to their close polarity, the solvent system employed in the CPC procedure was not able to separate fucoxanthin from chlorophylls c_1 and c_2 . No fucoxanthin peak was detected in fraction F5 where chlorophylls were dominant. For each fraction, the peak corresponding to fucoxanthin was collected for further quantification by UPLC-DAD.

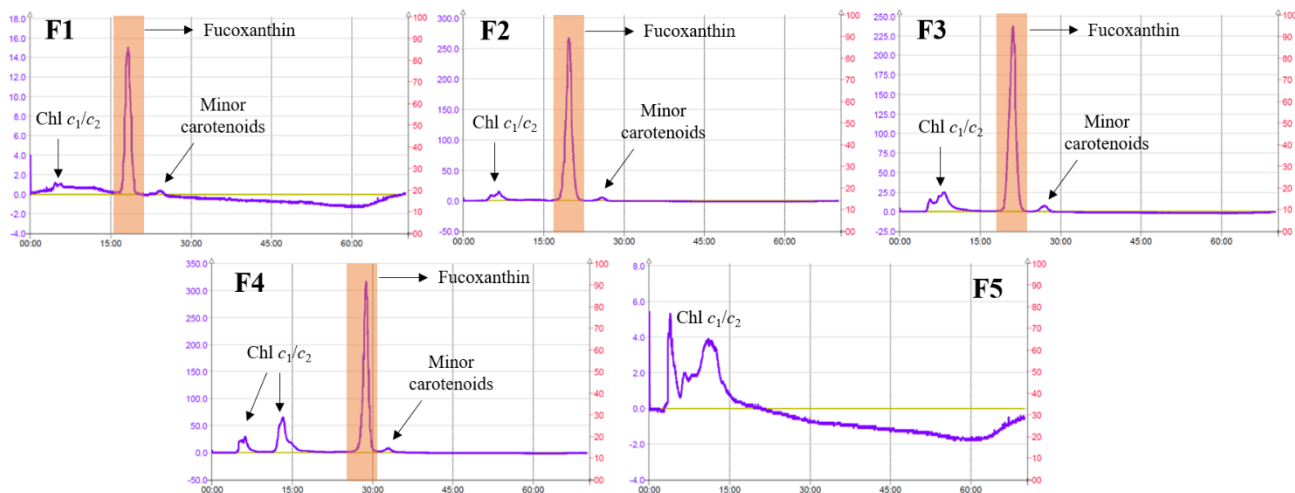


Figure 8. Flash chromatography of fucoxanthin-enriched fractions (F1 to F5). Purification was monitored at 450 nm and the peak corresponding to fucoxanthin (highlighted in orange) was collected for further analysis by UPLC-DAD.

UPLC-DAD dosage indicated that fucoxanthin was recovered from F2, F3 and F4 with high purity (>99%) (Figure 9).

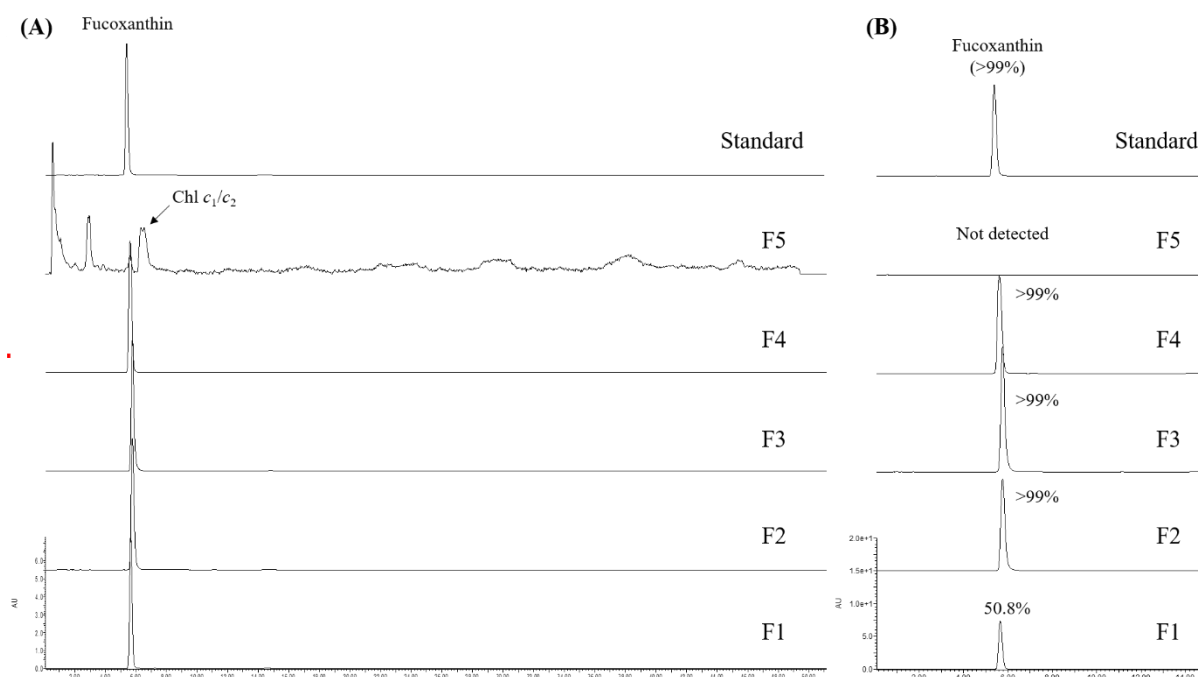


Figure 9. (A) UPLC-DAD chromatograms at 450 nm of fucoxanthin-enriched fractions (F1 to F5) obtained after final flash chromatography of CPC pooled fractions. (B) Fucoxanthin purity (% w/w) was calculated after normalization of data vs a calibration curve obtained with standard fucoxanthin (purity >99%, Sigma-Aldrich®). All measurements were performed in triplicate.

Retention time and UV absorption spectrum were in accordance with those observed for the analytical standard. Recovered fucoxanthin amounts are presented in table 4 and were proportionally higher than those reported in previous studies involving the use of CPC or other liquid-liquid chromatographic techniques (e.g. HSCCC, high-speed countercurrent chromatography) to purify fucoxanthin from macroalgae, such as *L. japonica*, *U. pinnatifida*, *S. fusiforme* and *E. bicyclis* [30,55] (Table 5).

Table 4. Fucoxanthin content (mass and massic percentage) in CPC pooled fractions and after final purification by flash chromatography. Fucoxanthin dosage was performed in triplicate by UPLC-DAD analysis at 450 nm, using commercial fucoxanthin (purity >99%, Sigma-Aldrich®) as standard ($R^2=0.9994$).

CPC separation (injection of 750 mg TI-EtOH)			Flash chromatography purification (fucoxanthin peak collection)			
CPC fraction	Dried mass (mg)	Fucoxanthin content (% , w/w)	Dried mass injected (mg)	Fucoxanthin recovered (mg)	Fucoxanthin purity (% , w/w)	
F1	56.4	1.8	22.6	0.5	50.8	
F2	66.7	24.8	48.7	2.9	>99	
F3	50.7	65.7	35.7	2.7	>99	
F4	61.6	36.1	51.2	3.3	>99	
F5	28.5	1.9	22.9	-	-	

Table 5. Comparison of fucoxanthin extraction yields and purities obtained using various extraction and purification methods starting from seaweeds and microalgae.

Algae	Fucoxanthin extraction solvent (extraction method)	Fucoxanthin purification method	Fucoxanthin extraction yield in mg/100 g extract (Purity Index)	Reference
<i>L. japonica</i>	Ethanol (MAE)	HSCCC	3.05-3.56 (92.2-94.8%)	[55]
<i>U. pinnatifida</i>	Ethanol (MAE)	HSCCC	64.0-74.0 (89.3-94.5%)	[55]
<i>S. fusiforme</i>	Ethanol	HSCCC	1.13-1.33	[55]

	(MAE)		(86.8-90.4%)	
<i>E. bicyclis</i>	Acetone (maceration)	CPC	33.3 (98%)	[30]
<i>T. lutea</i>	Ethanol (sonication)	CPC	1,186.7 (99%)	This study

MAE: microwave-assisted extraction

As a conclusion, CPC coupled to flash chromatography allowed to extract and pre-purify fucoxanthin from *T. lutea* with a yield and purity index superior to the values obtained with other methods using seaweeds or other microalgae. Fucoxanthin is one of the most commercially valuable marine molecules because of its pharmaceutical, cosmetic and nutraceutical applications [10,22,52]. For this reason, several research groups work on the optimization of microalgae culture conditions that favour its production, as well as the development of efficient purification methods, reducing purification costs and limiting the deleterious environmental impact of extraction and purification protocols [39,44,55]. Considering that the separation conditions can be further optimized, these first results validate the rational use of CPC as an efficient eco-friendly method for the high yield extraction and pre-purification of fucoxanthin from microalgae.

3.5. Chemosensitizing activity of *T. lutea* purified fucoxanthin in melanoma cells

A large number of studies performed *in vitro* and *in vivo* have established the high cytotoxic, cytostatic, antimetastatic and antiangiogenic activities of fucoxanthin in various cancer cells and tumor models, including melanoma cells [11,56]. Fucoxanthin was also combined to anticancer drugs to improve their cytotoxicity [18,19]. In coherence with this strategy, we recently highlighted that some carotenoids and apocarotenoids from algae and plants not only induce cytotoxicity in melanoma cells, but also sensitize them to the cytotoxic effect of chemotherapy, improving the effectiveness of anticancer drugs or reversing their chemoresistance [32,34,57]. As fucoxanthin chemosensitizing activity in melanoma cells was never assessed before, we evaluated the ability of purified *T. lutea* fucoxanthin to sensitize A2058 human melanoma cells to the cytotoxic effect of dacarbazine and vemurafenib, two drugs used for the clinical treatment of metastatic melanoma.

As shown in Figure 10A, fucoxanthin induced a concentration-dependent growth inhibition, with an IC₅₀ calculated to 14.67 μM. Photomicrographs of control and treated cells demonstrated a moderate dose-dependent reduction in cell density, confirming an antiproliferative activity of fucoxanthin (Figure 10D).

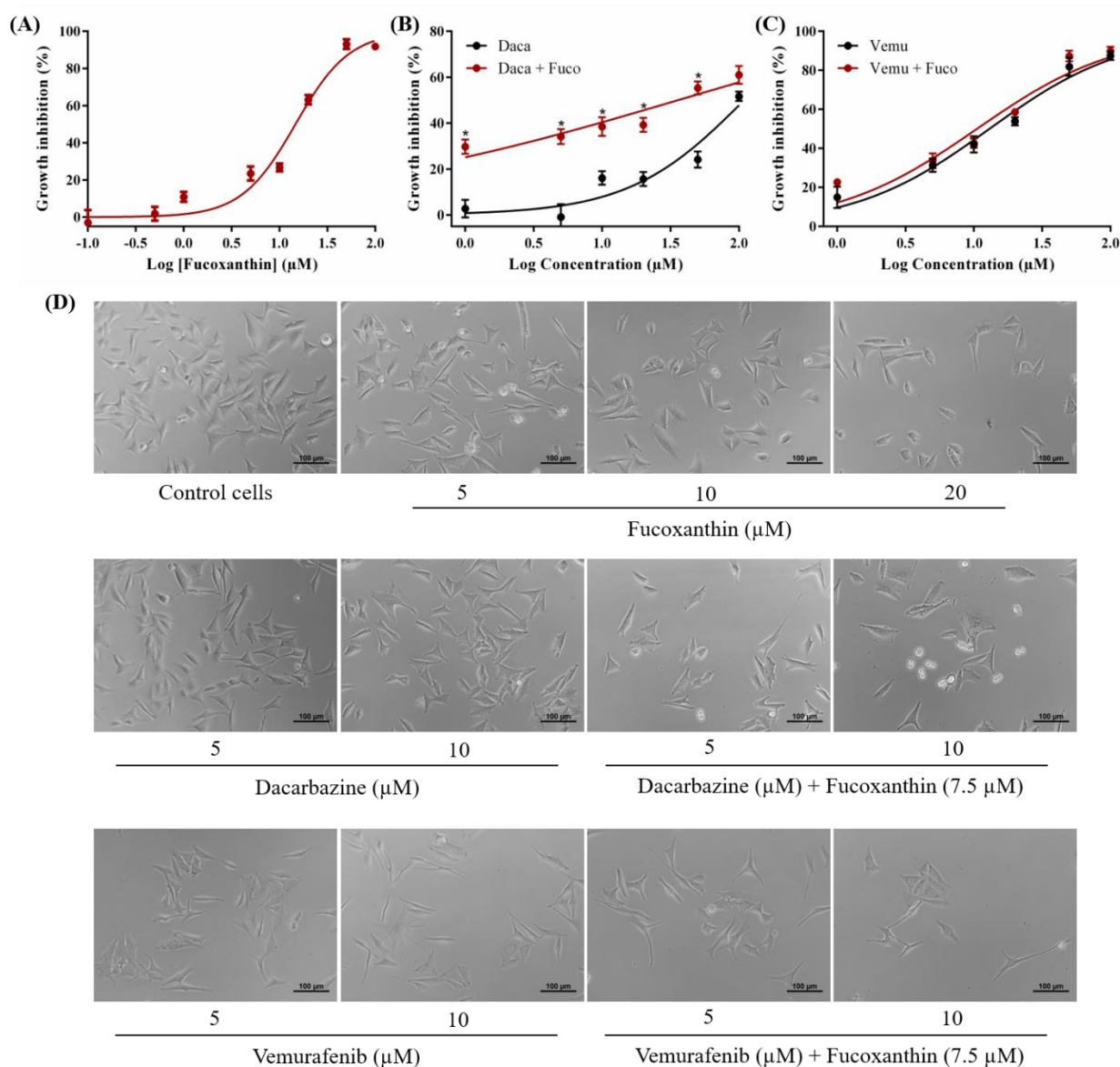


Figure 10. Antiproliferative activity of fucoxanthin (A), dacarbazine (Daca), vemurafenib (Vemu) and the respective combined treatments (B and C) in the MTT assay. A2058 cells were grown for 72h with increasing concentrations of the antimelanoma drugs (1–100 μM) in the absence or presence of fucoxanthin ($1/2IC_{50}$, 7.5 μM). Photomicrographs (D) show reduction of cell density promoted by combined therapies compared to monotherapies and control untreated cells. Data are presented as mean \pm SEM, * $p < 0.05$ according to unpaired Student's *t* test, from at least three measurements.

To evaluate the chemosensitizing potential of fucoxanthin, cells were exposed to fucoxanthin combined to vemurafenib or dacarbazine. Vemurafenib is a BRAF inhibitor introduced in recent years for the targeted therapy of advanced melanoma, while dacarbazine is an alkylating agent classically used in combination with other anticancer drugs for the

treatment of metastatic melanoma. In a first step, cells were treated with increasing concentrations of vemurafenib or dacarbazine (1-100 μM) for 72h and then cell viability was determined by the MTT assay. As presented in Figure 10 and Table 6, A2058 cells were sensitive to vemurafenib ($\text{IC}_{50} = 12.97 \mu\text{M}$), but resistant to dacarbazine ($\text{IC}_{50} > 100 \mu\text{M}$). Then, combined treatments were realized. When associated to dacarbazine, fucoxanthin at its half IC_{50} (7.5 μM) restored cell sensitivity to this alkylating agent, reducing its IC_{50} value to 35.74 μM . Photomicrographs also showed an important decrease in cell density compared to dacarbazine treatment alone and relevant morphological changes induced by combined therapy, such as cell shrinkage and rounding. In contrast, no significant enhanced antiproliferative effect was observed with the combination of fucoxanthin and vemurafenib (Table 6).

Table 6. Antiproliferative activity of fucoxanthin (Fuco), vemurafenib (Vemu), dacarbazine (Daca) and combined treatments (Vemu + Fuco and Daca + Fuco). Data are expressed as IC_{50} values and 95% confidence interval, from at least three measurements ($n=3$). For combined treatments, increasing concentrations of vemurafenib or dacarbazine (1–100 μM) were associated to $\frac{1}{2}\text{IC}_{50}$ of fucoxanthin (7.5 μM).

Monotreatment	IC_{50} (μM)	Combined treatment	IC_{50} (μM)
Fuco	14.67 (12.78 – 16.84)	-	-
Vemu	12.97 (10.66 – 15.78)	Vemu + Fuco	10.51 (8.24 – 12.52)
Daca	> 100	Daca + Fuco	35.74 (22.47 – 56.83)

Combination indexes (CI) were calculated using the Chou-Talalay method in order to characterize the chemosensitizing effect of fucoxanthin [35]. CI values were used to determine whether fucoxanthin induced an additive ($\text{CI} = 1$), synergistic ($\text{CI} < 1$) or antagonistic ($\text{CI} > 1$) influence on the antiproliferative activity of vemurafenib and dacarbazine. As shown in Figure 11, Fuco + Daca treatment resulted in an additive effect at 10 and 20 μM dacarbazine, and synergistic behaviour at 50 and 100 μM dacarbazine. In contrast, Fuco + Vemu association promoted antagonistic effects in almost all doses, except at 50 and 100 μM vemurafenib where the effect was considered as synergistic. These data suggest that fucoxanthin reversion of dacarbazine chemoresistance in A2058 melanoma cells may be linked to the facilitation of dacarbazine access to the intracellular environment that could stimulate dacarbazine-induced DNA-alkylation. For example, an integration of fucoxanthin in the cytoplasmic membrane [58] may facilitate the penetration of dacarbazine. These data are coherent with the previously reported chemosensitizing activity of fucoxanthin in other tumor cell lines [18,19].

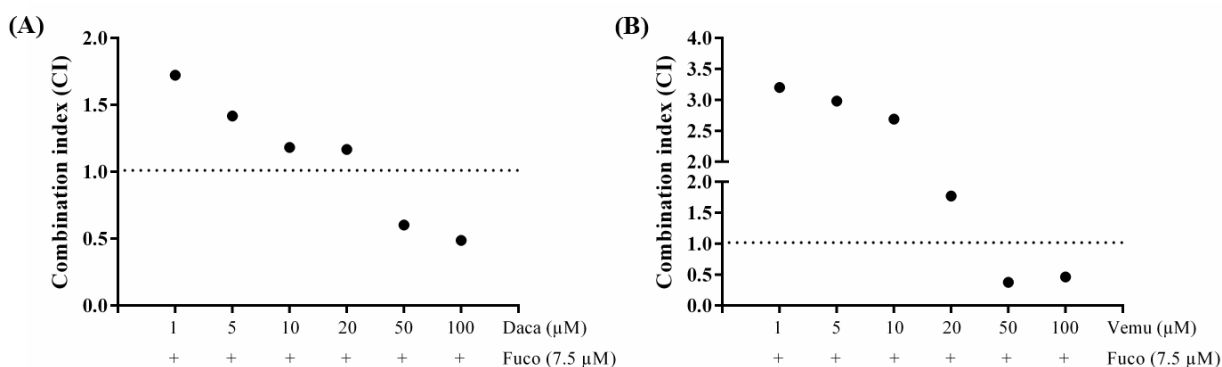


Figure 11. Combination index (CI) calculated for the association of fucoxanthin (Fuco) with dacarbazine (Daca, A) and vemurafenib (Vemu, B) in the MTT assay. CI = 1 indicates additive effect, CI < 1 indicates synergistic effect, while CI > 1 indicates antagonistic effect according to Chou-Talalay method [35].

4. Conclusion

The work described here demonstrates that *T. lutea* contains echinenone and 3-hydroxy-echinenone that can be used as important chemotaxonomic markers to distinguish this species from *I. galbana*. A nonpolar chlorophyll c_2 derivative (Chl c_2 -MGDG [18:4/14:0]) was also identified for the first time in *T. lutea*, confirming the wide distribution of this molecule in the Haptophyta phylum. An efficient method coupling CPC to flash chromatography was developed to purify fucoxanthin with high yield and very high purity from *T. lutea*. These data validate CPC as a method of choice for the extraction and purification of microalgae carotenoids and open the way for further optimization to purify carotenoids at industrial scale using a single CPC step. We also report for the first time the ability of purified fucoxanthin to reverse *in vitro* the chemoresistance of human metastatic melanoma cells to dacarbazine, a DNA-alkylating agent used in melanoma therapy.

Acknowledgements and conflicts of interest

This work was funded by the Interreg Atlantic Area European regional development fund, project Enhance Microalgae EAPA_338/2016. RGDOJ 's PhD grant was supported by the French Ministry for Superior Education and Research. We are grateful to the French cancer league (Comité 17 de la Ligue Nationale contre le Cancer) for financial support and thank the "Cancéropôle Grand Ouest, axis Marine Molecules, metabolism and cancer" for scientific support. The authors also thank the Platform for the High Resolution Analysis of Biomolecules

(PAHRB, La Rochelle Université) for the scientific and technical contribution to this paper. The authors declare no conflict of interest.

References

- [1] E.M. Bendif, I. Probert, D.C. Schroeder, C. de Vargas, On the description of *Tisochrysis lutea* gen. nov. sp. nov. and *Isochrysis nuda* sp. nov. in the Isochrysidales, and the transfer of Dicrateria to the Prymnesiales (Haptophyta), *J. Appl. Phycol.* 25 (2013) 1763–1776. doi:10.1007/s10811-013-0037-0.
- [2] E. Bigagli, L. Cinci, A. Niccolai, N. Biondi, L. Rodolfi, M. D'Ottavio, M. D'Ambrosio, M. Lodovici, M.R. Tredici, C. Luceri, Preliminary data on the dietary safety, tolerability and effects on lipid metabolism of the marine microalga *Tisochrysis lutea*, *Algal Res.* 34 (2018) 244–249. doi:10.1016/j.algal.2018.08.008.
- [3] T. Tato, R. Beiras, The Use of the Marine Microalga *Tisochrysis lutea* (T-iso) in Standard Toxicity Tests; Comparative Sensitivity With Other Test Species, *Front. Mar. Sci.* 6 (2019) 1–10. doi:10.3389/fmars.2019.00488.
- [4] G. Carrier, C. Baroukh, C. Rouxel, L. Duboscq-Bidot, N. Schreiber, G. Bougaran, Draft genomes and phenotypic characterization of *Tisochrysis lutea* strains. Toward the production of domesticated strains with high added value, *Algal Res.* 29 (2018) 1–11. doi:10.1016/j.algal.2017.10.017.
- [5] B. Huang, J. Marchand, S. Thiriet-Rupert, G. Carrier, B. Saint-Jean, E. Lukomska, B. Moreau, A. Morant-Manceau, G. Bougaran, V. Mimouni, Betaine lipid and neutral lipid production under nitrogen or phosphorus limitation in the marine microalga *Tisochrysis lutea* (Haptophyta), *Algal Res.* 40 (2019) 101506. doi:10.1016/j.algal.2019.101506.
- [6] M. Garnier, G. Bougaran, M. Pavlovic, J.B. Berard, G. Carrier, A. Charrier, F. Le Grand, E. Lukomska, C. Rouxel, N. Schreiber, J.P. Cadoret, H. Rogniaux, B. Saint-Jean, Use of a lipid rich strain reveals mechanisms of nitrogen limitation and carbon partitioning in the haptophyte *Tisochrysis lutea*, *Algal Res.* 20 (2016) 229–248. doi:10.1016/j.algal.2016.10.017.
- [7] B. Serive, E. Nicolau, J.B. Bérard, R. Kaas, V. Pasquet, L. Picot, J.P. Cadoret, Community analysis of pigment patterns from 37 microalgae strains reveals new carotenoids and porphyrins characteristic of distinct strains and taxonomic groups, *PLoS One.* 12 (2017) 1–35. doi:10.1371/journal.pone.0171872.
- [8] R. Sathasivam, J.S. Ki, A review of the biological activities of microalgal carotenoids and their potential use in healthcare and cosmetic industries, *Mar. Drugs.* 16 (2018) 1–31. doi:10.3390/md16010026.

- [9] S.J. Heo, W.J. Yoon, K.N. Kim, G.N. Ahn, S.M. Kang, D.H. Kang, A. affan, C. Oh, W.K. Jung, Y.J. Jeon, Evaluation of anti-inflammatory effect of fucoxanthin isolated from brown algae in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages, *Food Chem. Toxicol.* 48 (2010) 2045–2051. doi:10.1016/j.fct.2010.05.003.
- [10] M.A. Gammone, N. D’Orazio, Anti-obesity activity of the marine carotenoid fucoxanthin, *Mar. Drugs.* 13 (2015) 2196–2214. doi:10.3390/md13042196.
- [11] T.W. Chung, H.J. Choi, J.Y. Lee, H.S. Jeong, C.H. Kim, M. Joo, J.Y. Choi, C.W. Han, S.Y. Kim, J.S. Choi, K.T. Ha, Marine algal fucoxanthin inhibits the metastatic potential of cancer cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 439 (2013) 580–585. doi:10.1016/j.bbrc.2013.09.019.
- [12] H.A. Jung, M.N. Islam, C.M. Lee, H.O. Jeong, H.Y. Chung, H.C. Woo, J.S. Choi, Promising antidiabetic potential of fucoxanthin isolated from the edible brown algae *Eisenia bicyclis* and *Undaria pinnatifida*, *Fish. Sci.* 78 (2012) 1321–1329. doi:10.1007/s12562-012-0552-y.
- [13] F. Beppu, Y. Niwano, T. Tsukui, M. Hosokawa, K. Miyashita, Single and repeated oral dose toxicity study of fucoxanthin (FX), a marine carotenoid, in mice, *J. Toxicol. Sci.* 34 (2009) 501–510. doi:10.2131/jts.34.501.
- [14] Y. Niwano, F. Beppu, Part III. Biological Properties of Molecules Derived from Seaweeds, in: S.-K. Kim (Ed.), *Handb. Mar. Macroalgae Biotechnol. Appl. Phycol.*, John Wiley, John Wiley & Sons, Ltd, 2012: pp. 321–328.
- [15] S. Zorofchian Moghadamtousi, H. Karimian, R. Khanabdali, M. Razavi, M. Firoozinia, K. Zandi, H. Abdul Kadir, Anticancer and antitumor potential of fucoidan and fucoxanthin, two main metabolites isolated from brown algae, *Sci. World J.* 2014 (2014). doi:10.1155/2014/768323.
- [16] S.R. Kumar, M. Hosokawa, K. Miyashita, Fucoxanthin: A Marine Carotenoid Exerting Anti-Cancer Effects by Affecting Multiple Mechanisms, (2013) 5130–5147. doi:10.3390/md11125130.
- [17] E. Lopes-Costa, M. Abreu, D. Gargiulo, E. Rocha, A.A. Ramos, Anticancer effects of seaweed compounds fucoxanthin and phloroglucinol, alone and in combination with 5-fluorouracil in colon cells, *J. Toxicol. Environ. Heal. - Part A Curr. Issues.* 80 (2017) 776–787. doi:10.1080/15287394.2017.1357297.
- [18] C.L. Liu, Y.P. Lim, M.L. Hu, Fucoxanthin enhances cisplatin-induced cytotoxicity via NFκB-mediated pathway and downregulates DNA repair gene expression in human hepatoma HepG2 cells, *Mar. Drugs.* 11 (2013) 50–66. doi:10.3390/md11010050.
- [19] Z. Wang, H. Li, M. Dong, P. Zhu, Y. Cai, The anticancer effects and mechanisms of

- fucoxanthin combined with other drugs, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 145 (2019) 293–301. doi:10.1007/s00432-019-02841-2.
- [20] I. Jaswir, D. Noviendri, H.M. Salleh, M. Taher, K. Miyashita, N. Ramli, Analysis of fucoxanthin content and purification of all-trans-fucoxanthin from *turbinaria turbinata* and *sargassum plagyophyllum* by SiO₂ open column chromatography and reversed phase-HPLC, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 36 (2013) 1340–1354. doi:10.1080/10826076.2012.691435.
- [21] G. Rajauria, N. Abu-Ghannam, Isolation and partial characterization of bioactive fucoxanthin from *himanthalia elongata* brown seaweed: A TLC-based approach, *Int. J. Anal. Chem.* 2013 (2013) 802573. doi:10.1155/2013/802573.
- [22] S. Xia, K. Wang, L. Wan, A. Li, Q. Hu, C. Zhang, Production, characterization, and antioxidant activity of fucoxanthin from the marine diatom *odontella aurita*, *Mar. Drugs.* 11 (2013) 2667–2681. doi:10.3390/md11072667.
- [23] J.H.P.M. Santos, M.R. Almeida, C.I.R. Martins, A.C.R.V. Dias, M.G. Freire, J.A.P. Coutinho, S.P.M. Ventura, Separation of phenolic compounds by centrifugal partition chromatography, *Green Chem.* 20 (2018) 1906–1916. doi:10.1039/c8gc00179k.
- [24] L. Marchal, M. Mojaat-Guemir, A. Foucault, J. Pruvost, Centrifugal partition extraction of β -carotene from *Dunaliella salina* for efficient and biocompatible recovery of metabolites, *Bioresour. Technol.* 134 (2013) 396–400. doi:10.1016/j.biortech.2013.02.019.
- [25] Q.W. Zhang, L.G. Lin, W.C. Ye, Techniques for extraction and isolation of natural products: A comprehensive review, *Chinese Med. (United Kingdom)*. 13 (2018) 1–26. doi:10.1186/s13020-018-0177-x.
- [26] J.B. Friesen, J.B. McAlpine, S.N. Chen, G.F. Pauli, Countercurrent Separation of Natural Products: An Update, *J. Nat. Prod.* 78 (2015) 1765–1796. doi:10.1021/np501065h.
- [27] T. Mandova, G. Audo, S. Michel, R. Grougnet, Assessment of two centrifugal partition chromatography devices. Application to the purification of *Centaurium erythraea* methanolic extract, *Phytochem. Lett.* 20 (2017) 401–405. doi:10.1016/j.phytol.2017.04.033.
- [28] C. Remeur, E. Le Borgne, L. Gauthier, R. Grougnet, B. Deguin, C. Poullain, M. Litaudon, HPLC-ELSD Quantification and Centrifugal Partition Chromatography Isolation of 8-O-Acetylharpagide from *Oxera coronata* (Lamiaceae), *Phytochem. Anal.* 28 (2017) 242–246. doi:10.1002/pca.2667.
- [29] L. Azevedo, L. Faqueti, M. Kritsanida, A. Efstathiou, D. Smirlis, G.C. Franchi, G. Genta-Jouve, S. Michel, L.P. Sandjo, R. Grougnet, M.W. Biavatti, Three new trixane glycosides

- obtained from the leaves of *Jungia sellowii* Less. using centrifugal partition chromatography, *Beilstein J. Org. Chem.* 12 (2016) 674–683. doi:10.3762/bjoc.12.68.
- [30] S.M. Kim, Y.F. Shang, B.H. Um, A preparative method for isolation of fucoxanthin from *Eisenia bicyclis* by centrifugal partition chromatography, *Phytochem. Anal.* 22 (2011) 322–329. doi:10.1002/pca.1283.
- [31] Q. Haguët, A. Bonnet, J.B. Bérard, J. Goldberg, N. Joguet, A. Fleury, V. Thiéry, L. Picot, Antimelanoma activity of *Heterocapsa triquetra* pigments, *Algal Res.* 25 (2017) 207–215. doi:10.1016/j.algal.2017.04.034.
- [32] P.H. Baudelet, A.L. Gagez, J.B. Bérard, C. Juin, N. Bridiau, R. Kaas, V. Thiéry, J.P. Cadoret, L. Picot, Antiproliferative activity of *Cyanophora paradoxa* pigments in melanoma, breast and lung cancer cells, *Mar. Drugs.* 11 (2013) 4390–4406. doi:10.3390/md11114390.
- [33] C. Juin, A. Bonnet, E. Nicolau, J.B. Bérard, R. Devillers, V. Thiéry, J.P. Cadoret, L. Picot, UPLC-MSE profiling of phytoplankton metabolites: Application to the identification of pigments and structural analysis of metabolites in *Porphyridium purpureum*, *Mar. Drugs.* 13 (2015) 2541–2558. doi:10.3390/md13042541.
- [34] C. Juin, R.G. de Oliveira Junior, A. Fleury, C. Oudinet, L. Pytowski, J.-B. Bérard, E. Nicolau, V. Thiéry, I. Lanneluc, L. Beaugeard, G. Prunier, J.R.G.D.S. Almeida, L. Picot, Zeaxanthin from *Porphyridium purpureum* induces apoptosis in human melanoma cells expressing the oncogenic BRAF V600E mutation and sensitizes them to the BRAF inhibitor vemurafenib, *Rev. Bras. Farmacogn.* 28 (2018) 457–467. doi:10.1016/j.bjp.2018.05.009.
- [35] T. Chou, P. Talalay, Quantitative dose-effect relationships: the combined effects of multiples drugs or enzyme inhibitors, *Adv. Enzyme Regul.* 22 (1984) 27–55. doi:10.1016/0065-2571(84)90007-4.
- [36] V. Pasquet, J.R. Chérouvrier, F. Farhat, V. Thiéry, J.M. Piot, J.B. Bérard, R. Kaas, B. Serive, T. Patrice, J.P. Cadoret, L. Picot, Study on the microalgal pigments extraction process: Performance of microwave assisted extraction, *Process Biochem.* 46 (2011) 59–67. doi:10.1016/j.procbio.2010.07.009.
- [37] C. Juin, J.R. Chérouvrier, V. Thiéry, A.L. Gagez, J.B. Bérard, N. Joguet, R. Kaas, J.P. Cadoret, L. Picot, Microwave-assisted extraction of phycobiliproteins from *Porphyridium purpureum*, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 175 (2015) 1–15. doi:10.1007/s12010-014-1250-2.
- [38] S.M. Kim, S.W. Kang, O.N. Kwon, D. Chung, C.H. Pan, Fucoxanthin as a major carotenoid in *Isochrysis* aff. *galbana*: Characterization of extraction for commercial

- application, J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem. 55 (2012) 477–483. doi:10.1007/s13765-012-2108-3.
- [39] G. Di Lena, I. Casini, M. Lucarini, G. Lombardi-Boccia, Carotenoid profiling of five microalgae species from large-scale production, Food Res. Int. 120 (2019) 810–818. doi:10.1016/j.foodres.2018.11.043.
- [40] J.L. Garrido, J. Otero, M.A. Maestro, M. Zapata, The main nonpolar chlorophyll c from *Emiliana huxleyi* (Prymnesiophyceae) is a chlorophyll c2-monogalactosyldiacylglyceride ester: A mass spectrometry study, J. Phycol. 36 (2000) 497–505. doi:10.1046/j.1529-8817.2000.99135.x.
- [41] M. Zapata, B. Edvardsen, F. Rodríguez, M.A. Maestro, J.L. Garrido, Chlorophyll c2 monogalactosyldiacylglyceride ester (chl c2-MGDG). A novel marker pigment for *Chrysochromulina* species (Haptophyta), Mar. Ecol. Prog. Ser. 219 (2001) 85–98. doi:10.3354/meps219085.
- [42] S. Roy, C. Llewellyn, E. Egeland, G. Johnsen, Phytoplankton pigments: Characterization, Chemotaxonomy and Applications in Oceanography, Cambridge University Press, Cambridge, 2011. doi:10.1017/CBO9780511732263.
- [43] K.J.M. Mulders, Y. Weesepeel, P.P. Lamers, J.P. Vincken, D.E. Martens, R.H. Wijffels, Growth and pigment accumulation in nutrient-depleted *Isochrysis* aff. *galbana* T-ISO, J. Appl. Phycol. 25 (2013) 1421–1430. doi:10.1007/s10811-012-9954-6.
- [44] J.L. Garrido, C. Brunet, F. Rodríguez, Pigment variations in *Emiliana huxleyi* (CCMP370) as a response to changes in light intensity or quality, Environ. Microbiol. 18 (2016) 4412–4425. doi:10.1111/1462-2920.13373.
- [45] M. Zapata, S.W. Jeffrey, S.W. Wright, F. Rodríguez, J.L. Garrido, L. Clementson, Photosynthetic pigments in 37 species (65 strains) of Haptophyta: Implications for oceanography and chemotaxonomy, Mar. Ecol. Prog. Ser. 270 (2004) 83–102. doi:10.3354/meps270083.
- [46] J.L. Garrido, M. Zapata, S. Muñiz, Spectral Characterization of New Chlorophyll C Pigments Isolated From *Emiliana Huxleyi* (Prymnesiophyceae) By High-Performance Liquid Chromatography, J. Phycol. 31 (1995) 761–768. doi:10.1111/j.0022-3646.1995.00761.x.
- [47] M. Zapata, J.L. Garrido, Occurrence of phytylated chlorophyll c in *Isochrysis galbana* and *Isochrysis* sp. (clone T-ISO) (Prymnesiophyceae), J. Phycol. 33 (1997) 209–214. doi:10.1111/j.0022-3646.1997.00209.x.
- [48] R.G. Barlow, R.F.C. Mantoura, M.A. Gough, T.W. Fileman, Pigment signatures of the phytoplankton composition in the northeastern Atlantic during the 1990 spring bloom,

- Deep. Res. 40 (1993) 459–477.
- [49] J.K. Hooper, L.L. Eggink, A potential role of chlorophylls b and c in assembly of light-harvesting complexes, *FEBS Lett.* 489 (2001) 1–3. doi:10.1016/S0014-5793(00)02410-8.
- [50] S.W. Jeffrey, J.M. Anderson, *Emiliana huxleyi* (Haptophyta) holds promising insights for photosynthesis, *J. Phycol.* 36 (2000) 449–452. doi:10.1046/j.1529-8817.2000.00ag3.x.
- [51] J. Peng, J.P. Yuan, C.F. Wu, J.H. Wang, Fucoxanthin, a marine carotenoid present in brown seaweeds and diatoms: Metabolism and bioactivities relevant to human health, *Mar. Drugs.* 9 (2011) 1806–1828. doi:10.3390/md9101806.
- [52] K. Miyashita, S. Nishikawa, F. Beppu, T. Tsukui, M. Abe, M. Hosokawa, The allenic carotenoid fucoxanthin, a novel marine nutraceutical from brown seaweeds, *J. Sci. Food Agric.* 91 (2011) 1166–1174. doi:10.1002/jsfa.4353.
- [53] B. Guo, B. Liu, B. Yang, P. Sun, X. Lu, J. Liu, F. Chen, Screening of diatom strains and characterization of *Cyclotella cryptica* as a potential fucoxanthin producer, *Mar. Drugs.* 14 (2016). doi:10.3390/md14070125.
- [54] S.M. Kim, Y. Jung, O. Kwon, A Potential Commercial Source of Fucoxanthin Extracted from the Microalga *Phaeodactylum tricornutum*, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 166 (2012) 1843–1855. doi:10.1007/s12010-012-9602-2.
- [55] X. Xiao, X. Si, Z. Yuan, X. Xu, G. Li, Isolation of fucoxanthin from edible brown algae by microwave-assisted extraction coupled with high-speed countercurrent chromatography, *J. Sep. Sci.* 35 (2012) 2313–2317. doi:10.1002/jssc.201200231.
- [56] K.N. Kim, G. Ahn, S.J. Heo, S.M. Kang, M.C. Kang, H.M. Yang, D. Kim, S.W. Roh, S.K. Kim, B.T. Jeon, P.J. Park, W.K. Jung, Y.J. Jeon, Inhibition of tumor growth in vitro and in vivo by fucoxanthin against melanoma B16F10 cells, *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 35 (2013) 39–46. doi:10.1016/j.etap.2012.10.002.
- [57] R.G. de Oliveira Júnior, A. Bonnet, E. Braconnier, H. Groult, G. Prunier, L. Beaugeard, R. Grougnet, J.R.G. da Silva Almeida, C.A.A. Ferraz, L. Picot, Bixin, an apocarotenoid isolated from *Bixa orellana* L., sensitizes human melanoma cells to dacarbazine-induced apoptosis through ROS-mediated cytotoxicity, *Food Chem. Toxicol.* 125 (2019) 549–561. doi:10.1016/j.fct.2019.02.013.
- [58] O.-J. Rg, Sergent O, Picot L, Could Fucoxanthin Interaction with Lipid Rafts Mediate its Cytotoxicity in Cancer Cells?, 2016.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

6. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Ce travail de thèse s'inscrit dans la validation d'une stratégie thérapeutique innovante pour le traitement du mélanome métastatique: la chimiosensibilisation aux anticancéreux par des molécules naturelles. Cette étude a permis l'identification, au sein de plantes et de microalgues marines, de molécules naturelles peu toxiques, cytostatiques à des concentrations non toxiques et permettant d'améliorer l'efficacité des molécules anticancéreuses utilisées en chimiothérapie, en particulier le vemurafenib et la dacarbazine.

Une revue systématique approfondie de la littérature, présentée dans la partie A, a permis de mieux comprendre les mécanismes de chimiorésistance des cellules cancéreuses et d'identifier des molécules naturelles capables de reverser les principaux mécanismes impliqués dans la résistance innée et/ou adaptative aux agents cytotoxiques. Les données extraites des articles sélectionnés nous ont permis de qualifier cette stratégie thérapeutique comme étant à la fois récente et pouvant être appliquée à une grande variété de lignées tumorales. Les composés phénoliques, en particulier les flavonoïdes, figurent parmi les principales classes de métabolites secondaires utilisées en sensibilisation tumorale.

Après avoir déterminé les principaux aspects liés à la sensibilisation tumorale par les produits naturels, nous nous sommes dédiés à la purification et à l'identification de substances issues d'extraits de plantes et de microalgues et ayant un potentiel antimélanome. Dans la partie B, nous avons ainsi présenté une série de flavonoïdes semi-synthétisés ou directement purifiés de *Gardenia oudiepe*, une plante endémique de Nouvelle-Calédonie, ainsi que le profil pigmentaire de *Bixa orellana*, une plante médicinale du Brésil. Deux apocaroténoïdes jamais décrits dans la littérature ont été identifiés à partir des graines de *B. orellana*, les acides 6,8'-diapocarotène-6,8'-dioïque et 6,7'-diapocarotène-6,7'-dioïque. Nous avons également identifié des métabolites connus mais jusqu'alors non décrits dans cette espèce (la naringénine et l'acide β -12'-apocaroténoïque). Le criblage pharmacologique de tous les composés a été réalisé à l'aide d'un test de prolifération cellulaire au MTT, en utilisant la lignée cellulaire A2058. Cette lignée de mélanome humain porte la mutation BRAF^{V600E} et présente un fort potentiel invasif, métastatique et chimiorésistant. Ce criblage a permis de sélectionner trois molécules antiprolifératives pour les tests effectués par la suite: la Z-bixine (bixine), l'apocaroténoïde majeur contenu dans les graines de *B. orellana*; les polyméthoxyflavones 5,7-dihydroxy-3,6,4'-triméthoxyflavone et 5,7,5'-trihydroxy-3,6,3',4'-tetraméthoxyflavone (PMFs 2 et 3, respectivement), isolés de *G. oudiepe*.

Ces molécules présentent une activité cytostatique, mais ont également démontré des activités d'inhibition de migration cellulaire, d'induction de l'apoptose et de blocage des

cellules de mélanome dans la phase sub-G1 du cycle cellulaire. Par des approches d'immunofluorescence et de *docking* moléculaire, nous avons montré que les flavonoïdes induisent des perturbations de la dynamique du cytosquelette après 24 heures de traitement, en particulier une dépolymérisation des microtubules comme observée avec le nocodazole et une perturbation de l'assemblage des microfilaments d'actine. Afin d'évaluer leur effet chimiosensibilisant, les molécules sélectionnées ont été combinées au vemurafenib (inhibiteur de la forme mutée de BRAF) ou à la dacarbazine (agent alkylant de l'ADN). Nous avons mis en évidence que la lignée A2058 est sensible *in vitro* au vemurafenib, mais résistante à la dacarbazine. Lorsque la PMF 2 est associée à la dacarbazine à une concentration peu toxique ($1/2IC_{50}$), elle est capable de sensibiliser les cellules tumorales à cet agent alkylant, améliorant son effet antiprolifératif.

L'implication du stress oxydatif dans l'effet antiprolifératif de la bixine a également été analysé. Classiquement, les caroténoïdes sont décrits comme des molécules antioxydantes prévenant l'apparition des tumeurs dans les tissus sains en limitant l'inflammation pro-tumorale. A l'inverse, dans des conditions d'inflammation tissulaire importante, comme décrites dans le microenvironnement tumoral, les caroténoïdes peuvent s'oxyder en produits cytotoxiques, qui à leur tour oxydent des molécules environnantes et augmentent la concentration en espèces réactifs de l'oxygène (ROS) dans le milieu intracellulaire, ce qui peut conduire à la mort des cellules tumorales. Après un traitement de 24 heures, la bixine à une concentration cytotatique augmente la production de ROS intracellulaire et induit des dommages à la membrane cellulaire, comme le montre le dosage du malondialdéhyde, un marqueur de peroxidation des lipides membranaires. Ce résultat corrobore l'hypothèse selon laquelle l'effet antiprolifératif et chimiosensibilisant de la bixine peut être relié à l'augmentation du stress oxydatif intracellulaire. Lorsque la dacarbazine est combinée à la bixine, son activité antiproliférative est significativement augmentée et un stress oxydatif plus important qu'avec la dacarbazine seule est mis en évidence. Cette molécule a donc restauré la sensibilité des cellules à la dacarbazine et l'induction d'un stress oxydatif peut participer à son effet chimiosensibilisant.

Dans la dernière partie de la thèse (partie C), nous nous sommes concentrés sur l'étude de la composition pigmentaire de deux espèces de microalgues marines, *Rhodomonas salina* et *Tisochrysis lutea*, ainsi que sur l'évaluation de leur potentiel antimélanome. Ces espèces ont été sélectionnées en raison de leur importance commerciale, notamment en aquaculture et en industries nutraceutique et pharmaceutique, en plus de l'originalité de leurs pigments encore inconnus pour certains. Dans un premier temps, nous avons déterminé la composition

pigmentaire complète de l'extrait de *R. salina* en utilisant une méthode d'analyse, seule et simple, par UPLC-DAD-MS/MS. Cette méthode a permis d'identifier 18 composés, parmi lesquels les principaux pigments étaient les caroténoïdes alloxanthine, crocoxanthine, monadoxanthine et β,ϵ -carotène; et les chlorophylles *a* et *c*₂. Après avoir caractérisé la composition chimique de l'extrait, nous avons procédé à la purification de deux caroténoïdes, l'alloxanthine et la crocoxanthine, par chromatographie flash. Il existe très peu d'études concernant les propriétés pharmacologiques de ces composés qui sont quasiment inexplorés en cancérologie. Afin de les valoriser, nous avons donc évalué leur potentiel antiprolifératif et chimiosensibilisant sur les cellules A2058. Des essais pharmacologiques ont montré que les deux caroténoïdes ont limité la croissance cellulaire, réduit la migration cellulaire et induit l'apoptose et l'accumulation de cellules en phase sub-G1 du cycle cellulaire. De plus, l'alloxanthine a potentialisé l'activité antiproliférative du vemurafenib et a restauré la sensibilité des cellules de mélanome à la dacarbazine, ce qui démontre son potentiel en tant qu'agent chimiosensibilisant prometteur.

Enfin, nous avons étudié la composition chimique de *T. lutea*, une microalgue originaire de Tahiti et anciennement connue sous le nom *Isochrysis affinis galbana*. Malgré les similarités morphologiques et biochimiques, des analyses génétiques ont déterminé que *T. lutea* et *I. galbana* appartiennent à des espèces différentes. Dans ce travail, nous avons mis en évidence que seule l'espèce *T. lutea* contient de l'échinénone et de la 3-hydroxy-échinénone, ces pigments pouvant donc être utilisés comme marqueurs chimiotaxonomiques importants pour la distinguer de l'espèce *I. galbana*. A partir des analyses par UPLC-DAD-MS/MS à haute résolution, nous avons également démontré pour la première fois la présence de la chlorophylle *c*₂-monogalactosyldiacylglycérol (Chl *c*₂-MGDG [18:4/14:0]) chez *T. lutea*, un autre pigment ayant une pertinence chimiotaxonomique pour les haptophytes. Quinze autres pigments ont été identifiés dans cet extrait, parmi lesquels la fucoxanthine s'est présentée comme le constituant majoritaire.

La fucoxanthine est un caroténoïde majoritaire dans la plupart des classes d'algues des lignées rouge et brune, contribuant à plus de 10% de la production totale de caroténoïdes estimée dans la nature. Ce caroténoïde a plusieurs applications dans les domaines nutraceutique, cosmétique et pharmaceutique et est identifié comme une molécule à haute valeur ajoutée. Toutefois, plusieurs facteurs limitent son utilisation commerciale, tels que la complexité des processus d'extraction et de purification, son faible rendement et l'utilisation de grandes quantités de solvants organiques toxiques. Dans ce travail, nous avons mis au point un protocole de purification de la fucoxanthine de l'extrait brut de *T. lutea* par chromatographie de partage

centrifuge (CPC), une technique de séparation liquide-liquide ayant un impact limité sur l'environnement et offrant un meilleur rendement des produits d'intérêt. La purification de la fucoxanthine a été réalisée en deux étapes, initialement par CPC pour l'obtention de fractions enrichies en fucoxanthine, puis couplée à une étape finale de purification par chromatographie flash. Ce procédé a permis de récupérer de la fucoxanthine hautement purifiée (pureté > 99%), qui a ensuite été évaluée sur les cellules de mélanome. Ce composé a montré une activité antiproliférative sur les cellules A2058 et a inversé leur chimiorésistance à la dacarbazine en faible concentration ($1/2IC_{50}$).

Les résultats présentés dans cette thèse ont ainsi contribué de manière significative à la connaissance chimique, pharmacologique et taxonomique des plantes du Brésil et de la Nouvelle-Calédonie, ainsi qu'à celle des microalgues marines. L'identification de composés inédits ou décrits pour la première fois dans les espèces étudiées et l'utilisation de la CPC pour la purification de la fucoxanthine sont parmi les principaux aspects innovants abordés dans ce travail. Il est aussi important de souligner que les travaux de thèse ont également contribué à la valorisation de ces espèces et de leurs substances purifiées en cancérologie. Après avoir testé 14 molécules extraites de plantes et de microalgues, dont dix flavonoïdes et quatre caroténoïdes, nous avons trouvé six substances ayant une activité antiproliférative sur des cellules de mélanome chimiorésistantes, dont quatre se sont avérées efficaces en tant que chimiosensibilisants (PMF 2, bixine, alloxanthine et fucoxanthine). Dans ce contexte, ce travail apporte comme perspectives:

- Continuer à étudier la chimiodiversité des plantes et des microalgues marines pour l'identification de nouvelles molécules à potentiel chimiosensibilisant;
- Poursuivre la caractérisation pharmacologique des caroténoïdes, alloxanthine et fucoxanthine, en termes de sensibilisation tumorale sur les cellules de mélanome;
- Optimiser la méthode de purification de la fucoxanthine par CPC, en une seule étape, et l'appliquer à la purification d'autres caroténoïdes d'intérêt pharmacologique;
- Développer des méthodes de purification (en CPC, par exemple) pour obtenir les molécules bioactives en quantité suffisante pour réaliser des tests précliniques;
- Valider les effets antimélanome et chimiosensibilisant des molécules sélectionnées (PMF 2, bixine, alloxanthine et fucoxanthine) sur des modèles *in vivo*;
- Étudier le métabolisme et la toxicité des molécules sélectionnées et des traitements combinés sur des modèles *in vivo*.

RÉFÉRENCES

RÉFÉRENCES

- Abbaszadeh Z., Çeşmeli S., Biray-Avcı Ç. Crucial Players in Glycolysis: Cancer Progress. *Gene*. 2019. (In press): 144158.
- Abdel-Wahab A. F., Mahmoud W., Al-Harizy R. M. Targeting glucose metabolism to suppress cancer progression: prospective of anti-glycolytic cancer therapy. *Pharmacological Research*. 2019. 150: 104511.
- Aguissa-Touré A. H., Li G. Genetic alterations of PTEN in human melanoma. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2012. 69 (9): 1475-1491.
- Aharoni A., Galili G. Metabolic engineering of the plant primary-secondary metabolism interface. *Current Opinion in Biotechnology*. 2011. 22 (2): 239-244.
- Al-Lazikani B., Banerji U., Workman P. Combinatorial drug therapy for cancer in the post-genomic era. *Nature Biotechnology*. 2012. 30 (7): 679-692.
- Albagli O. Protéger et sévir: p53, métabolisme et suppression tumorale. *Medecine/Sciences*. 2015. 31 (10): 869-880.
- Van Allen E. M., Wagle N., Sucker A., Treacy D. J., Johannessen C. M., Goetz E. M., Place C. S., Taylor-Weiner A., Whittaker S., Kryukov G. V., Hodis E., Rosenberg M., Mckenna A., Cibulskis K., Farlow D., Zimmer L., Hillen U., Gutzmer R., Goldinger S. M., Ugure S., Gogas H. J., Egberts F., Berking C., Trefzer U., Loquai C., Weide B., Hasse J. C., Gabriele S. B., Carter S. L., Getz G., Garraway L. A., Schadendorf D. The genetic landscape of clinical resistance to RAF inhibition in metastatic melanoma. *Cancer Discovery*. 2014. 4 (1): 94-109.
- AlQathamaa A., Prieto J. M. Natural products with therapeutic potential in melanoma metastasis. *Natural Product Reports*. 2015. 32 (8): 1170-1182.
- Anantharaman A., Hemachandran H., Mohan S., Manikoth Ayyathan D., Kumar D. T., George Priya Doss C., Siva R. Induction of apoptosis by apocarotenoids in B16 melanoma cells through ROS-mediated mitochondrial-dependent pathway. *Journal of Functional Foods*. 2016. 20: 346-357.
- Andrade K. A. M., Lauritano C., Romano G., Ianora A. Marine microalgae with anti-cancer properties. *Marine Drugs*. 2018. 16 (5): 1-17.

Andrisic L., Dudzik D., Barbas C., Milkovic L., Grune T., Zarkovic N. Short overview on metabolomics approach to study pathophysiology of oxidative stress in cancer. *Redox Biology*. 2018. 14: 47-58.

Arisi M., Zane C., Caravello S., Rovati C., Zanca A., Venturini M., Calzavara-Pinton P. Sun exposure and melanoma, certainties and weaknesses of the present knowledge. *Frontiers in Medicine*. 2018. 5: 1-8.

Arrangoiz R. Melanoma Review: Epidemiology, Risk Factors, Diagnosis and Staging. *Journal of Cancer Treatment and Research*. 2016. 4 (1): 1.

Ascierto P. A., Schadendorf D., Berking C., Agarwala S. S., Van Herpen C. M. L., Queirolo P., Blank C. U., Hauschild A., Beck J. T., St-Pierre A., Niazi F., Wandel S., Peters M., Zube A., Dummer R. MEK162 for patients with advanced melanoma harbouring NRAS or Val600 BRAF mutations: A non-randomised, open-label phase 2 study. *The Lancet Oncology*. 2013. 14 (3): 249-256.

Balch C. M., Soong S., Gershenwald J. E., Thompson J. F., Reintgen D. S., Cascinelli N., Urist M., McMasters K. M., Ross M. I., Kirkwood J. M., Atkins M. B., Thompson J. A., Coit D. G., Byrd D., Desmond R., Zhang Y., Liu P., Lyman G. H., Morabito A. Prognostic Factors Analysis of 17,600 Melanoma Patients: Validation of the American Joint Committee on Cancer Melanoma Staging System. *Journal of Clinical Oncology*. 2001. 19 (16): 3622-3634.

Balch C. M., Gershenwald J. E., Soong S. J., Thompson J. F., Atkins M. B., Byrd D. R., Buzaid A. C., Cochran A. J., Coit D. G., Ding S., Eggermont A. M., Flaherty K. T., Gimotty P. A., Kirkwood J. M., McMasters K. M., Mihm M. C., Morton D. L., Ross M. I., Sober A. J., Sondak V. K. Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *Journal of Clinical Oncology*. 2009. 27 (36): 6199-6206.

Barbera-Guillem E., Nyhus J. K., Wolford C. C., Friece C. R., Sampsel J. W. Vascular endothelial growth factor secretion by tumor-infiltrating macrophages essentially supports tumor angiogenesis, and IgG immune complexes potentiate the process. *Cancer Research*. 2002. 62 (23): 7042-7049.

Barreiro E. J. What is hidden in the biodiversity? The role of natural products and medicinal chemistry in the drug discovery process. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias*. 2019. 91: 1-6.

Barrera G. Oxidative Stress and Lipid Peroxidation Products in Cancer Progression and Therapy. *ISRN Oncology*. 2012. 2012: 1-21.

Barzkar N., Jahromi S. T., Poorsaheli H. B., Vianello F. Metabolites from Marine Microorganisms, Micro, and Macroalgae: Immense Scope for Pharmacology. *Marine Drugs*. 2019. 17 (464): 1-29.

Berini J. L., Brockman S. A., Hegeman A. D., Reich P. B., Muthukrishnan R., Montgomery R. A., Forester J. D. Combinations of abiotic factors differentially alter production of plant secondary metabolites in five woody plant species in the boreal-temperate transition zone. *Frontiers in Plant Science*. 2018. 9: 1257-.

Bhattacharya S., Darjatmoko S. R., Polans A. S. Resveratrol modulates the malignant properties of cutaneous melanoma through changes in the activation and attenuation of the antiapoptotic protooncogenic protein Akt/PKB. *Melanoma Research*. 2011. 21 (3): 180-187.

Billo M., Cabalion P., Waikedre J., Fourneau C., Bouttier S., Hocquemiller R., Fournet A. Screening of some New Caledonian and Vanuatu medicinal plants for antimycobacterial activity. *Journal of Ethnopharmacology*. 2005. 96 (1-2): 195-200.

Billo M., Fournet A., Cabalion P., Waikedre J., Bories C., Loiseau P., Prina E., Rojas De Arias A., Yaluff G., Fourneau C., Hocquemiller R. Screening of New Caledonian and Vanuatu medicinal plants for antiprotozoal activity. *Journal of Ethnopharmacology*. 2005. 96 (3): 569-575.

Birchmeier C., Birchmeier W., Gherardi E., Vande Woude G. F. Met, metastasis, motility and more. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2003. 4 (12): 915-925.

Bolzani V. da S., Valli M., Pivatto M., Viegas C. Natural products from Brazilian biodiversity as a source of new models for medicinal chemistry. *Pure and Applied Chemistry*. 2012. 84 (9): 1837-1846.

Bottazzi B., Riboli E., Mantovani A. Aging, inflammation and cancer. *Seminars in Immunology*. 2018. 40: 74-82.

Bougnoux P., Hajjaji N., Ferrasson M. N., Giraudeau B., Couet C., Le Floch O. Improving outcome of chemotherapy of metastatic breast cancer by docosahexaenoic acid: A phase II trial. *British Journal of Cancer*. 2009. 101 (12): 1978-1985.

- Bougnoux P., Hajjaji N., Maheo K., Couet C., Chevalier S. Fatty acids and breast cancer: Sensitization to treatments and prevention of metastatic re-growth. *Progress in Lipid Research*. 2010. 49 (1): 76-86.
- Bourgougnon N., Stiger-Pouvreau V. Chemodiversity and Bioactivity within Red and Brown Macroalgae Along the French coasts, Metropole and Overseas Departements and Territories. In : Kim SK (éd.). *Handbook of Marine Macroalgae: Biotechnology and Applied Phycology*. [s.l.] : John Wiley and Sons, 2011. p. 58-105.
- Bouvier F., Dogbo O., Camara B. Biosynthesis of the food and cosmetic plant pigment bixin (annatto). *Science*. 2003. 300 (5628): 2089-2091.
- Britton G. Biosynthesis of carotenoids. In : *Carotenoids in photosynthesis*. [s.l.] : Springer, Dordrecht, 1993. p. 96-126.
- Buommino E., Baroni A., Canozo N., Petrazzuolo M., Nicoletti R., Vozza A., Tufano M. A. Artemisinin reduces human melanoma cell migration by down-regulating $\alpha v\beta 3$ integrin and reducing metalloproteinase 2 production. *Investigational New Drugs*. 2009. 27 (5): 412-418.
- Buhrmann C., Shayan P., Kraeche P., Popper B., Goel A., Shakibaei M. Resveratrol induces chemosensitization to 5-fluorouracil through up-regulation of intercellular junctions, Epithelial-to-mesenchymal transition and apoptosis in colorectal cancer. *Biochemical Pharmacology*. 2015. 98 (1): 51-58.
- Buzaid A. C. Management of metastatic cutaneous melanoma. *Oncology*. 2004. 18 (11): 1443-1450.
- Cao H. H., Cheng C. Y., Su T., Fu X. Q., Guo H., Li T., Tse A. K. W., Kwan H. Y., Yu H., Yu Z. L. Quercetin inhibits HGF/c-Met signaling and HGFstimulated melanoma cell migration and invasion. *Molecular Cancer*. 2015. 14 (1): 1-12.
- Cao H. H., Chu J. H., Kwan H. Y., Su T., Yu H., Cheng C. Y., Fu X. Q., Guo H., Li T., Tse A. K. W., Chou G. X., Mo H. B., Yu Z. L. Inhibition of the STAT3 signaling pathway contributes to apigenin-mediated anti-metastatic effect in melanoma. *Scientific Reports*. 2016. 6: 1-12.
- Cao H. H., Tse A. K. W., Kwan H. Y., Yu H., Cheng C. Y., Su T., Fong W. F., Yu Z. L. Quercetin exerts anti-melanoma activities and inhibits STAT3 signaling. *Biochemical Pharmacology*. 2014. 87 (3): 424-434.

Chakraborty R., Wieland C. N., Comfere N. I. Molecular targeted therapies in metastatic melanoma. *Pharmacogenomics and Personalized Medicine*. 2013. 6 (1): 49-56.

Chan K. S., Koh C. G., Li H. Y. Mitosis-targeted anti-cancer therapies: Where they stand. *Cell Death and Disease*. 2012. 3 (10): e411.

Chapman P. B., Hauschild A., Robert C., Haanen J. B., Ascierto P., Larkin J., Dummer R., Garbe C., Testori A., Maio M., Hogg D., Lorigan P., Lebbe C., Jouary T., Schadendorf D., Ribas A., O'Day S. J., Sosman J. A., Kirkwood J. M., Eggermont A. M. M., Dreno B., Nolop K., Li J., Nelson B., Hou J., Lee R. J., Flaherty K. T., McArthur G. A. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *New England Journal of Medicine*. 2011. 364 (26): 2507-2516.

Chen C., Xiao W., Huang L., Yu G., Ni J., Yang L., Wan R., Hu G. Y. Shikonin induces apoptosis and necroptosis in pancreatic cancer via regulating the expression of RIP1/RIP3 and synergizes the activity of gemcitabine. *American Journal of Translational Research*. 2017. 9 (12): 5507-5517.

Chen G., Davies M. A. Targeted Therapy Resistance Mechanisms and Therapeutic Implications in Melanoma. *Hematology/Oncology Clinics of North America*. 2014. 28 (3): 523-536.

Chen M., Schliep M., Willows R. D., Cai Z. L., Neilan B. A., Scheer H. A red-shifted chlorophyll. *Science*. 2010. 329 (5997): 1318-1319.

Chen Y. T., Kao C. J., Huang H. Y., Huang S. Y., Chen C. Y., Lin Y. S., Wen Z. H., Wang H. M. D. Astaxanthin reduces MMP expressions, suppresses cancer cell migrations, and triggers apoptotic caspases of in vitro and in vivo models in melanoma. *Journal of Functional Foods*. 2017. 31: 20-31.

Cheng Y., Zhang G., Li G. Targeting MAPK pathway in melanoma therapy. *Cancer and Metastasis Reviews*. 2013. 32 (3-4): 567-584.

Chigira M., Noda K., Watanabe H. Autonomy in tumor cell proliferation. *Medical Hypotheses*. 1990. 32 (4): 249-254.

Chinembiri T. N., Du Plessis L. H., Gerber M., Hamman J. H., Du Plessis J. *Review of natural compounds for potential skin cancer treatment* [En ligne]. [s.l.] : [s.n.], 2014. p. 11679-11721

Clark W. H. J., Ainsworth A. M., Bernardino E. A., Yang C. H., Mihm C. M. J., Reed R. J. The developmental biology of primary human malignant melanomas. *Seminars in Oncology*. 1975. 2 (2): 83-103.

Clark W. H. J., Elder D. E., Guerry D., Epstein M. N., Greene M. H., Van Horn M. A study of tumor progression: The precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma. *Human Pathology*. 1984. 15 (12): 1147-1165.

Conti C. J. Tumor progression. In : McQueen CA (éd.). *Comprehensive Toxicology*. Auburn, AL, USA : Elsevier Science, 2010. p. 335-347.

Corina D., Codruta S., Diana A., Popescu A., Ghiulai R., Pavel I. Z., Avram S., Daliana M., Dehelean C. An Update On Natural Compounds and Their Modern Formulations for the Management of Malignant Melanoma. In : Badria FA (éd.). *Natural Products and Cancer Drug Discovery*. [s.l.] : [s.n.], 2017. p. 211-253.

Costes N., Le Deit H. L., Michel S., Tillequin F., Koch M., Pfeiffer B., Renard P., Léonce S., Guilbaud N., Kraus-Berthier L., Pierré A., Atassi G. Synthesis and cytotoxic and antitumor activity of benzo[b]pyrano[3,2- h]acridin-7-one analogues of acronycine. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2000. 43 (12): 2395-2402.

Cragg G. M., Pezzuto J. M. Natural Products as a Vital Source for the Discovery of Cancer Chemotherapeutic and Chemopreventive Agents. *Medical Principles and Practice*. 2016. 25 (2): 41-59.

Curtin J. A., Fridlyand J., Kageshita T., Patel H. N., Busam K. J., Kutzner H., Cho K. H., Aiba S., Bröcker E. B., LeBoit P. E., Pinkel D., Bastian B. C. Distinct sets of genetic alterations in melanoma. *New England Journal of Medicine*. 2005. 353 (20): 2135-2147.

Delwiche C. F. Tracing the thread of plastid diversity through the tapestry of life. *American Naturalist*. 1999. 154: 164-177.

Desrivot J., Waikedre J., Cabalion P., Herrenknecht C., Bories C., Hocquemiller R., Fournet A. Antiparasitic activity of some New Caledonian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*. 2007. 112 (1): 7-12.

Dhillon A. S., Hagan S., Rath O., Kolch W. MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene*. 2007. 26 (22): 3279-3290.

Domingues B., Lopes J. M., Soares P., Pópulo H. Melanoma treatment in review. *ImmunoTargets and Therapy*. 2018. 7: 35-49.

Dummer R., Schadendorf D., Ascierto P. A., Arance A., Dutriaux C., Di Giacomo A. M., Rutkowski P., Del Vecchio M., Gutzmer R., Mandalà M., Thomas L., Demidov L., Garbe C., Hogg D., Liszkay G., Queirolo P., Wasserman E., Ford J., Weill M., Sirulnik L. A., Jehl V., Bozón V., Long G. V., Flaherty K. Binimetinib versus dacarbazine in patients with advanced NRAS-mutant melanoma (NEMO): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 trial. *The Lancet Oncology*. 2017. 18 (4): 435-445.

Dyshlovoy S. A., Honecker F. Marine compounds and cancer: 2017 updates. *Marine Drugs*. 2018. 16 (2): 2017-2019.

Ells G. W., Chisholm K. A., Simmons V. A., Horrobin D. F. Vitamin E blocks the cytotoxic effect of gamma-linolenic acid when administered as late as the time of onset of cell death--insight into the mechanism of fatty acid induced cytotoxicity. *Cancer Letters*. 1996. 98 (2): 207-211.

EMBRAPA. *Plantas Mediciniais nos Biomas Brasileiros*. Brasília : [s.n.], 2010. p. 16

EMBRAPA. *Plantas medicinais do Bioma Pampa no cuidado em saúde* [En ligne]. Brasília, DF : [s.n.], 2017. p. 156

ENDEMIAS. Faune et Flore de la Nouvelle-Calédonie. [s.l.] : [s.n.], 2020. Disponible sur : < <https://www.endemia.nc/> > (consulté le 10 janvier 2020)

Erstad D. J., Cusack J. C. Targeting the NF- κ B Pathway in Cancer Therapy. *Surgical Oncology Clinics of North America*. 2013. 22 (4): 705-746.

Falcone Ferreyra M. L., Rius S. P., Casati P. Flavonoids: Biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. *Frontiers in Plant Science*. 2012. 3: 1-15.

Ferrer P., Asensi M., Segarra R., Ortega A., Benlloch M., Obrador E., Varea M. T., Asensio G., Jordá L., Estrela J. M. Association between pterostilbene and quercetin inhibits metastatic activity of B16 melanoma. *Neoplasia*. 2005. 7 (1): 37-47.

Flaherty K. T., Robert C., Hersey P., Nathan P., Garbe C., Milhem M., Demidov L. V, Hassel J. C., Rutkowski P., Mohr P., Dummer R., Trefzer U., Larkin J. M., Utikal J., Dreno B., Nyakas M., Middleton M. R., Becker J. C., Casey M., Sherman L. J., Wu F. S., Ouellet D., Martin A.

M., Patel K., Schadendorf D. Improved survival with MEK inhibition in BRAF-mutated melanoma. *The New England Journal of Medicine*. 2012. 367 (2): 107-114.

Forzza R. A maior diversidade de plantas do mundo. In : *Pesquisa FAPESP*. [s.l.] : [s.n.], 2016. Disponible sur : < <https://revistapesquisa.fapesp.br/2016/03/21/a-maior-diversidade-de-plantas-do-mundo/> > (consulté le 7 janvier 2020)

Foster J. R. Introduction to Neoplasia. In : McQueen CA (éd.). *Comprehensive Toxicology*. Auburn, AL, USA : Elsevier Science, 2010. p. 1-10.

Fouad Y. A., Aanei C. Revisiting the hallmarks of cancer. *American Journal of Cancer Research*. 2017. 7 (5): 1016-1036.

Franco P. I. R., Rodrigues A. P., De Menezes L. B., Pacheco Miguel M. Tumor microenvironment components: Allies of cancer progression. *Pathology - Research and Practice*. 2019. (In press): 152729.

Freeman G. J., Long A. J., Iwai Y., Bourque K., Chernova T., Nishimura H., Fitz L. J., Malenkovich N., Okazaki T., Byrne M. C., Horton H. F., Fouser L., Carter L., Ling V., Bowman M. R., Carreno B. M., Collins M., Wood C. R., Honjo T. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *Journal of Experimental Medicine*. 2000. 192 (7): 1027-1034.

Fruman D. A., Rommel C. PI3K and cancer: Lessons, challenges and opportunities. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2014. 13 (2): 140-156.

Fujimura T., Fujisawa Y., Kambayashi Y., Aiba S. Significance of BRAF kinase inhibitors for melanoma treatment: From bench to bedside. *Cancers*. 2019. 11 (9): 1-14.

Garcia-Diaz A., Shin D. S., Moreno B. H., Saco J., Escuin-Ordinas H., Rodriguez G. A., Zaretsky J. M., Sun L., Hugo W., Wang X., Parisi G., Saus C. P., Torrejon D. Y., Graeber T. G., Comin-Anduix B., Hu-Lieskovan S., Damoiseaux R., Lo R. S., Ribas A. Interferon Receptor Signaling Pathways Regulating PD-L1 and PD-L2 Expression. *Cell Reports*. 2017. 19 (6): 1189-1201.

Garrido J. L., Zapata M., Muñiz S. Spectral Characterization of New Chlorophyll C Pigments Isolated From *Emiliana Huxleyi* (Prymnesiophyceae) By High-Performance Liquid Chromatography. *Journal of Phycology*. 1995. 31 (5): 761-768.

Van Geel R., Elez E., Bendell J. C., Faris J. E., Lolkema M. P. J. K., Spreafico F. E. A., Kavan P., Delord J. P., Schuler M. H., Wainberg Z. A., Yamada Y., Yoshino T., Demuth T., Avsar E., Chatterjee A., Zhu P., Bernardis R., Tabernero J., Schellens J. H. M. Phase I study of the selective BRAFV600 inhibitor encorafenib (LGX818) combined with cetuximab and with or without the α -specific PI3K inhibitor BYL719 in patients with advanced BRAF-mutant colorectal cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2017. 23 (18): 5339-5348.

George V. C., Kumar D. R. N., Suresh P. K., Kumar S., Kumar R. A. Comparative studies to evaluate relative in vitro potency of luteolin in inducing cell cycle arrest and apoptosis in HaCat and A375 cells. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 2013. 14 (2): 631-637.

Germann U. A., Furey B. F., Markland W., Hoover R. R., Aronov A. M., Roix J. J., Hale M., Boucher D. M., Sorrell D. A., Martinez-Botella G., Fitzgibbon M., Shapiro P., Wick M. J., Samadani R., Meshaw K., Groover A., DeCrescenzo G., Namchuk M., Emery C. M., Saha S., Welsch D. J. Targeting the MAPK signaling pathway in cancer: Promising preclinical activity with the novel selective ERK1/2 inhibitor BVD-523 (ulixertinib). *Molecular Cancer Therapeutics*. 2017. 16 (11): 2351-2363.

Ghiringhelli F. Surveillance immune antitumorale et échappement. *Correspondances en Onco-Théranostic*. 2013. 2 (1): 6-10.

Girotti M. R., Pedersen M., Sanchez-Laorden B., Viros A., Turajlic S., Niculescu-Duvaz D., Zambon A., Sinclair J., Hayes A., Gore M., Lorigan P., Springer C., Larkin J., Jorgensen C., Marais R. Inhibiting EGF receptor or SRC family kinase signaling overcomes BRAF inhibitor resistance in melanoma. *Cancer Discovery*. 2013. 3 (2): 158-167.

Gonzalez H., Hagerling C., Werb Z. Roles of the immune system in cancer: From tumor initiation to metastatic progression. *Genes and Development*. 2018. 32 (19-20): 1267-1284.

Grizzi F., Di Ieva A., Russo C., Frezza E. E., Cobos E., Muzzio P. C., Chiriva-Internati M. Cancer initiation and progression: An unsimplifiable complexity. *Theoretical Biology and Medical Modelling*. 2006. 3: 1-6.

Guéritte-Voegelein F., Sévenet T., Pusset J., Adeline M. T., Gillet B., Beloeil J. C., Guénard D., Potier P., Rasolonjanahary R., Kordon C. Alkaloids from *Psychotria oleoides* with activity on growth hormone release. *Journal of Natural Products*. 1992. 55 (7): 923-930.

Guéritte F., Dumontet V., Poullain C., Litaudon M., Sévenet T. Plantes de Nouvelle-Calédonie d'intérêt biologique: de la création du «laboratoire des Plantes médicinales» (ICSN-CNRS) à nouméa aux recherches actuelles. *Ethnopharmacologia*. 2010. 45: 41-13.

Guruvayoorappan C., Kuttan G. β -Carotene down-regulates inducible nitric oxide synthase gene expression and induces apoptosis by suppressing bcl-2 expression and activating caspase-3 and p53 genes in B16F-10 melanoma cells. *Nutrition Research*. 2007. 27 (6): 336-342.

Haguet Q., Bonnet A., Bérard J. B., Goldberg J., Joguet N., Fleury A., Thiéry V., Picot L. Antimelanoma activity of *Heterocapsa triquetra* pigments. *Algal Research*. 2017. 25: 207-215.

Hajjaji N., Bougnoux P. Selective sensitization of tumors to chemotherapy by marine-derived lipids: A review. *Cancer Treatment Reviews*. 2013. 39 (5): 473-488.

Hamsa T. P., Kuttan G. Berberine inhibits pulmonary metastasis through down-regulation of MMP in metastatic B16F-10 melanoma cells. *Phytotherapy Research*. 2012. 26 (4): 568-578.

Hamsa T. P., Kuttan G. Studies on Anti-metastatic and Anti-invasive Effects of Harmine Using Highly Metastatic Murine B16F-10 Melanoma Cells. *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology*. 2011. 30 (2): 123-137.

Hanahan D., Robert W. A. Biological Hallmarks of cancer. *Holland-Frei Cancer Medicine*. 2017. 1-10.

Hanahan D., Weinberg R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*. 2011. 144 (5): 646-674.

Hashimoto H., Urugami C., Cogdell R. J. Carotenoids and photosynthesis. *Carotenoids in nature*. 2016. 79 (1): 377-414.

Hasnat M. A., Pervin M., Lim J. H., Lim B. O. Apigenin attenuates melanoma cell migration by inducing anoikis through integrin and focal adhesion kinase inhibition. *Molecules*. 2015. 20 (12): 21157-21166.

Hassan M., Watari H., Abualmaaty A., Ohba Y., Sakuragi N. Apoptosis and molecular targeting therapy in cancer. *BioMed Research International*. 2014. 150845.

Hauschild A., Grob J. J., Demidov L. V., Jouary T., Gutzmer R., Millward M., Rutkowski P., Blank C. U., Miller W. H., Kaempgen E., Martín-Algarra S., Karaszewska B., Mauch C., Chiarion-Sileni V., Martin A. M., Swann S., Haney P., Mirakhur B., Guckert M. E., Goodman

V., Chapman P. B. Dabrafenib in BRAF-mutated metastatic melanoma: A multicentre, open-label, phase 3 randomised controlled trial. *The Lancet*. 2012. 380 (9839): 358-365.

Heinzerling L., Eigentler T. K., Fluck M., Hassel J. C., Heller-Schenck D., Leipe J., Pauschinger M., Vogel A., Zimmer L., Gutzmer R. Tolerability of BRAF/MEK inhibitor combinations: Adverse event evaluation and management. *ESMO Open*. 2019. 4 (3): e000491.

Helfinger V., Schröder K. Redox control in cancer development and progression. *Molecular Aspects of Medicine*. 2018. 63: 88-98.

Hooper J. K., Eggink L. L., Chen M. Chlorophylls, ligands and assembly of light-harvesting complexes in chloroplasts. *Photosynthesis Research*. 2007. 94 (2-3): 387-400.

Horiot J. C., Lipinski F., Schraub S., Maulard-Durdux C., Bensadoun R. J., Ardiet J. M., Bolla M., Coscas Y., Baillet F., Coche-Dequéant B., Urbajtel M., Montbarbon X., Bourdin S., Wibault P., Alfonsi M., Calais G., Desprez P., Pene F., Lapeyre M., Vinke J., Maral J. Post-radiation severe xerostomia relieved by pilocarpine: A prospective French cooperative study. *Radiotherapy and Oncology*. 2000. 55 (3): 233-239.

Housman G., Byler S., Heerboth S., Lapinska K., Longacre M., Snyder N., Sarkar S. Drug resistance in cancer: An overview. *Cancers*. 2014. 6 (3): 1769-1792.

Ikehata H., Ono T. The Mechanisms of UV Mutagenesis. *Journal of Radiation Research*. 2011. 52 (2): 115-125.

INCa. *Les traitements du mélanome de la peau*. 1^{re} éd. Paris : INCa, 2010. p. 1-80

INCa. Epidémiologie des cancers cutanés. In : *Institut National du Cancer*. [s.l.] : [s.n.], 2019. Disponible sur : < <https://www.e-cancer.fr/Professionnels-de-sante/Depistage-et-detection-precoce/Detection-precoce-des-cancers-de-la-peau/Epidemiologie> > (consulté le 11 novembre 2019)

Iwai Y., Terawaki S., Honjo T. PD-1 blockade inhibits hematogenous spread of poorly immunogenic tumor cells by enhanced recruitment of effector T cells. *International Immunology*. 2005. 17 (2): 133-144.

Jan R., Chaudhry G.-S. Understanding Apoptosis and Apoptotic Pathways Targeted Cancer Therapeutics. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*. 2019. 9 (2): 205-218.

Jimenez P. C., Wilke D. V., Costa-Lotufo L. V. Marine drugs for cancer: Surfacing biotechnological innovations from the oceans. *Clinics*. 2018. 73: 1-7.

Joly C. A., Haddad C. F. B., Verdade L. M., Oliveira M. C. De, Bolzani V. D. S., Berlinck R. G. S. Diagnóstico da pesquisa em biodiversidade no Brasil. *Revista USP*. 2011. 0 (89): 114.

Joshi S., Durden D. L. Combinatorial Approach to Improve Cancer Immunotherapy: Rational Drug Design Strategy to Simultaneously Hit Multiple Targets to Kill Tumor Cells and to Activate the Immune System. *Journal of Oncology*. 2019. 2019: 5245034.

Juin C., Oliveira Junior R. G. De, Fleury A., Oudinet C., Pytowski L., Bérard J. B., Nicolau E., Thiéry V., Lanneluc I., Beaugeard L., Prunier G., Almeida J. R. G. D. S., Picot L. Zeaxanthin from *Porphyridium purpureum* induces apoptosis in human melanoma cells expressing the oncogenic BRAF V600E mutation and sensitizes them to the BRAF inhibitor vemurafenib. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. 2018. 28 (4): 457-467.

Kalal B. S., Upadhy D., Pai V. R. Chemotherapy resistance mechanisms in advanced skin cancer. *Oncology Reviews*. 2017. 11 (1): 19-25.

Kalimutho M., Nones K., Srihari S., Duijf P. H. G., Waddell N., Khanna K. K. Patterns of Genomic Instability in Breast Cancer. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2019. 40 (3): 198-211.

Kalos M., Levine B. L., Porter D. L., Katz S., Grupp S. A., Bagg A., June C. H. T cells with chimeric antigen receptors have potent antitumor effects and can establish memory in patients with advanced leukemia. *Science Translational Medicine*. 2011. 3 (95): 95ra73.

Kansal V. K., Potier P. The biogenetic, synthetic and biochemical aspects of ellipticine, an antitumor alkaloid. *Tetrahedron*. 1986. 42 (9): 2389-2408.

Kawata A., Murakami Y., Suzuki S., Fujisawa S. Anti-inflammatory activity of β -carotene, lycopene and tri-n-butylborane, a scavenger of reactive oxygen species. *In Vivo*. 2018. 32 (2): 255-264.

Khan M. I., Shin J. H., Kim J. D. The promising future of microalgae: current status, challenges, and optimization of a sustainable and renewable industry for biofuels, feed, and other products. *Microbial Cell Factories*. 2018. 17 (1): 1-21.

Kim H. S., Kim M. J., Kim E. J., Yang Y., Lee M. S., Lim J. S. Berberine-induced AMPK activation inhibits the metastatic potential of melanoma cells via reduction of ERK activity and COX-2 protein expression. *Biochemical Pharmacology*. 2012. 83 (3): 385-394.

Kim J. K., Kang K. A., Ryu Y. S., Piao M. J., Han X., Oh M. C., Boo S. J., Jeong S. U., Jeong Y. J., Chae S., Na S. Y., Hyun J. W. Induction of endoplasmic reticulum stress via reactive oxygen species mediated by luteolin in melanoma cells. *Anticancer Research*. 2016. 36 (5): 2281-2289.

Kim J. Y., Lee J. Y. Targeting tumor adaption to chronic hypoxia: Implications for drug resistance, and how it can be overcome. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017. 18 (9): 1854.

Kim K. N., Ahn G., Heo S. J., Kang S. M., Kang M. C., Yang H. M., Kim D., Roh S. W., Kim S. K., Jeon B. T., Park P. J., Jung W. K., Jeon Y. J. Inhibition of tumor growth in vitro and in vivo by fucoxanthin against melanoma B16F10 cells. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2013. 35 (1): 39-46.

Kitamura H., Iwakabe K., Yahata T., Nishimura S. I., Ohta A., Ohmi Y., Sato M., Takeda K., Okumura K., Van Kaer L., Kawano T., Taniguchi M., Nishimura T. The natural killer T (NKT) cell ligand α -galactosylceramide demonstrates its immunopotentiating effect by inducing interleukin (IL)-12 production by dendritic cells and IL-12 receptor expression on NKT cells. *Journal of Experimental Medicine*. 1999. 189 (7): 1121-1127.

Kornienko A., Mathieu V., Rastogi S. K., Lefranc F., Kiss R. Therapeutic agents triggering nonapoptotic cancer cell death. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2013. 56 (12): 4823-4839.

Kornprobst J. M. *Substances naturelles d'origine marine*. 1^{re} éd.[s.l.] : Tec&Doc Lavoisier, 2005. p. 1830

Kozar I., Margue C., Rothengatter S., Haan C., Kreis S. Many ways to resistance: How melanoma cells evade targeted therapies. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*. 2019. 1871 (2): 313-322.

Krajnović T., Kalucrossed D, Signerović G. N., Wessjohann L. A., Mijatović S., Maksimović-Ivanić D. Versatile antitumor potential of isoxanthohumol: Enhancement of paclitaxel activity in vivo. *Pharmacological Research*. 2016. 105: 62-73.

- Kulesz-Martin M., Gallegos J. R., Liu Y. Multistage Carcinogenesis: Cell and Animal Models. In : McQueen CA (éd.). *Comprehensive Toxicology*. Auburn, AL, USA : Elsevier Science, 2010. p. 11-33.
- Kumar Y., Phaniendra A., Periyasamy L. Bixin Triggers Apoptosis of Human Hep3B Hepatocellular Carcinoma Cells: An Insight to Molecular and IN SILICO Approach. *Nutrition and Cancer*. 2018. 70 (6): 971-983.
- Leach D. R., Krummel M. F., Allison J. P. Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. *Science*. 1996. 271 (5256): 1734-1736.
- Leary M., Heerboth S., Lapinska K., Sarkar S. Sensitization of drug resistant cancer cells: A matter of combination therapy. *Cancers*. 2018. 10 (12): 1-18.
- Letai A. Apoptosis and cancer. *Annual Review of Cancer Biology*. 2017. 1: 15.1-15.20.
- Leung D. W., Cachianes G., Kuang W. J., Goeddel D. V., Ferrara N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science*. 1989. 246 (4935): 1306-1309.
- Levy J. M. M., Towers C. G., Thorburn A. Targeting autophagy in cancer. *Nature Reviews Cancer*. 2017. 17 (9): 528-542.
- Li J., Cao F., Yin H. liang, Huang Z. jian, Lin Z. tao, Mao N., Sun B., Wang G. Ferroptosis: past, present and future. *Cell Death and Disease*. 2020. 11 (2).
- Li J., Chen F., Cona M. M., Feng Y., Himmelreich U., Oyen R., Verbruggen A., Ni Y. A review on various targeted anticancer therapies. *Targeted Oncology*. 2012. 7 (1): 69-85.
- Lopez-Bergami P., Fitchman B., Ronai Z. Understanding signaling cascades in melanoma. *Photochemistry and Photobiology*. 2008. 84 (2): 289-306.
- Low K. C., Tergaonkar V. Telomerase: Central regulator of all of the hallmarks of cancer. *Trends in Biochemical Sciences*. 2013. 38 (9): 426-434.
- Lugowska I., Teterycz P., Rutkowski P. Immunotherapy of melanoma. *Contemporary Oncology*. 2018. 22 (1A): 61-67.
- Lupo G., Caporarello N., Olivieri M., Cristaldi M., Motta C., Bramanti V., Avola R., Salmeri M., Nicoletti F., Anfuso C. D. Anti-angiogenic therapy in cancer: Downsides and new pivots for precision medicine. *Frontiers in Pharmacology*. 2017. 7: 1-9.

MacKie R. M., Hauschild A., Eggermont A. M. M. Epidemiology of invasive cutaneous melanoma. *Annals of Oncology*. 2009. 20 (suppl 6): vi1-vi7.

Mackiewicz J., Mackiewicz A. BRAF and MEK inhibitors in the era of immunotherapy in melanoma patients. *Wspolczesna Onkologia*. 2017. 2 (1A): 68-72.

Maertens O., Johnson B., Hollstein P., Frederick D. T., Cooper Z. A., Messiaen L., Bronson R. T., McMahon M., Granter S., Flaherty K., Wargo J. A., Marais R., Cichowski K. Elucidating distinct roles for NF1 in melanomagenesis. *Cancer Discovery*. 2013. 3 (3): 339-349.

Mai L. H., Chabot G. G., Grellier P., Quentin L., Dumontet V., Poulain C., Espindola L. S., Michel S., Vo H. T. B., Deguin B., Grougnet R. Antivascular and anti-parasite activities of natural and hemisynthetic flavonoids from New Caledonian *Gardenia* species (Rubiaceae). *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2015. 93: 93-100.

Mansoori B., Mohammadi A., Davudian S., Shirjang S., Baradaran B. The different mechanisms of cancer drug resistance: A brief review. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*. 2017. 7 (3): 339-348.

Maoka T. Carotenoids as natural functional pigments. *Journal of Natural Medicines*. 2019. 74 (1): 1-16.

Matthews N. H., Li W.-Q., Qureshi A. A., Weinstock M. A., Cho E. Epidemiology of Melanoma. In : *Cutaneous Melanoma: Etiology and Therapy*. [s.l.] : [s.n.], 2017. p. 3-22.

McArthur G. A., Chapman P. B., Robert C., Larkin J., Haanen J. B., Dummer R., Ribas A., Hogg D., Hamid O., Ascierto P. A., Garbe C., Testori A., Maio M., Lorigan P., Lebbé C., Jouary T., Schadendorf D., O'Day S. J., Kirkwood J. M., Eggermont A. M., Dréno B., Sosman J. A., Flaherty K. T., Yin M., Caro I., Cheng S., Trunzer K., Hauschild A. Safety and efficacy of vemurafenib in BRAFV600E and BRAFV600K mutation-positive melanoma (BRIM-3): Extended follow-up of a phase 3, randomised, open-label study. *The Lancet Oncology*. 2014. 15 (3): 323-332.

McCartney A., Migliaccio I., Bonechi M., Biagioni C., Romagnoli D., De Luca F., Galardi F., Risi E., De Santo I., Benelli M., Malorni L., Di Leo A. Mechanisms of Resistance to CDK4/6 Inhibitors: Potential Implications and Biomarkers for Clinical Practice. *Frontiers in Oncology*. 2019. 9: 2-9.

- McCourt C., Dolan O., Gormley G. Malignant melanoma: A pictorial review. *Ulster Medical Journal*. 2014. 83 (2): 103-110.
- Menon L. G., Kuttan R., Kuttan G. Anti-metastatic activity of curcumin and catechin. *Cancer Letters*. 1999. 141 (1-2): 159-165.
- Menter T., Tzankov A. Mechanisms of immune evasion and immune modulation by lymphoma cells. *Frontiers in Oncology*. 2018. 8: 1-11.
- Middleton M. R., Grob J. J., Aaronson N., Fierlbeck G., Tilgen W., Seiter S., Gore M., Aamdal S., Cebon J., Coates A., Dreno B., Henz M., Schadendorf D., Kapp A., Weiss J., Fraass U., Statkevich P., Muller M., Thatcher N. Randomized phase III study of temozolomide versus dacarbazine in the treatment of patients with advanced metastatic malignant melanoma. *Journal of Clinical Oncology*. 2000. 18 (1): 158-166.
- Mobin S., Alam F. Some Promising Microalgal Species for Commercial Applications: A review. *Energy Procedia*. 2017. 110: 510-517.
- Mobin S. M. A., Chowdhury H., Alam F. Commercially important bioproducts from microalgae and their current applications-A review. *Energy Procedia*. 2019. 160 (2018): 752-760.
- Mohr R., Vo B., Schliep M., Kurz T., Maldener I., Adams D. G., Larkum A. D. W., Chen M., Hess W. R. A new chlorophyll d-containing cyanobacterium: Evidence for niche adaptation in the genus *Acaryochloris*. *ISME Journal*. 2010. 4 (11): 1456-1469.
- Mokhtari R. B., Homayouni T. S., Baluch N., Morgatskaya E., Kumar S., Das B., Yeger H. Combination therapy in combating cancer. *Oncotarget*. 2017. 8 (23): 38022-38043.
- Mora C., Tittensor D. P., Adl S., Simpson A. G. B., Worm B. How many species are there on earth and in the ocean?. *PLoS Biology*. 2011. 9 (8): 1-8.
- Moreira R. B., Schmerling R. A., Buzaid A. C. Algoritmo de manejo do melanoma cutâneo metastático. *Revista Brasileira de Oncologia Clínica*. 2014. 10 (37): 108-115.
- Nag S., Qin J., Srivenugopal K. S., Wang M., Zhang R. The MDM2-p53 pathway revisited. *Journal of Biomedical Research*. 2013. 27 (4): 254-271.
- Nathanson K. L., Martin A. M., Wubbenhorst B., Greshock J., Letrero R., D'Andrea K., O'Day S., Infante J. R., Falchook G. S., Arkenau H. T., Millward M., Brown M. P., Pavlick A., Davies M. A., Ma B., Gagnon R., Curtis M., Lebowitz P. F., Kefford R., Long G. V. Tumor genetic

analyses of patients with metastatic melanoma treated with the BRAF inhibitor dabrafenib (GSK2118436). *Clinical Cancer Research*. 2013. 19 (17): 4868-4878.

Newman D. J., Cragg G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *Journal of Natural Products*. 2012. 75 (3): 311-335.

Newman D. J., Cragg G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. *Journal of Natural Products*. 2016. 79 (3): 629-661.

Nicholas C., Lesinski G. B. Immunomodulatory cytokines as therapeutic agents for melanoma. *Immunotherapy*. 2011. 3 (5): 673-690.

Niezgoda A., Niezgoda P., Czajkowski R. Novel approaches to treatment of advanced melanoma: A review on targeted therapy and immunotherapy. *BioMed Research International*. 2015. 2015: 851387.

Nihal M., Ahmad N., Mukhtar H., Wood G. S. Anti-proliferative and proapoptotic effects of (-)-epigallocatechin-3-gallate on human melanoma: Possible implications for the chemoprevention of melanoma. *International Journal of Cancer*. 2005. 114 (4): 513-521.

Nikolaou M., Pavlopoulou A., Georgakilas A. G., Kyrodimos E. The challenge of drug resistance in cancer treatment: a current overview. *Clinical and Experimental Metastasis*. 2018. 35 (4): 309-318.

Nurgali K., Jagoe R. T., Abalo R. Editorial: Adverse effects of cancer chemotherapy: Anything new to improve tolerance and reduce sequelae?. *Frontiers in Pharmacology*. 2018. 9: 1-3.

Ognjanovic S., Hainaut P. Inflammation in carcinogenesis. In : McQueen CA (éd.). *Comprehensive Toxicology*. Auburn, AL, USA : Elsevier Science, 2010. p. 401-415.

Ohga N., Hida K., Hida Y., Muraki C., Tsuchiya K., Matsuda K., Ohiro Y., Totsuka Y., Shindoh M. Inhibitory effects of epigallocatechin-3 gallate, a polyphenol in green tea, on tumor-associated endothelial cells and endothelial progenitor cells. *Cancer Science*. 2009. 100 (10): 1963-1970.

Oliveira-Junior R. G., Thiery V., Sergent O., Chevanne M., Picot L. Could Fucoxanthin Interaction with Lipid Rafts Mediate its Cytotoxicity in Cancer Cells?. *Journal of Oceanography and Marine Research*. 2016. 4 (1): 1-4.

Oliveira Júnior R. G. De, Ferraz C. A. A., Silva M. G., Lavor E. M. De, Rolim L. A., Lima J. T. De, Fleury A., Picot L., Siqueira-Quintans J. de S., Quintans Júnior L. J., Almeida. Flavonoids: Promising Natural Products for Treatment of Skin Cancer (Melanoma). In : Badria FA (éd.). *Natural Products and Cancer Drug Discovery*. [s.l.] : IntechOpen, 2017. p. 161-2010.

Palozza P., Maggiano N., Calviello G., Lanza P., Piccioni E., Ranelletti F. O., Bartoli G. M. Canthaxanthin induces apoptosis in human cancer cell lines. *Carcinogenesis*. 1998. 19 (2): 373-376.

Palumbo M. O., Kavan P., Miller W. H., Panasci L., Assouline S., Johnson N., Cohen V., Patenaude F., Pollak M., Jagoe R. T., Batist G. Systemic cancer therapy: Achievements and challenges that lie ahead. *Frontiers in Pharmacology*. 2013. 4: 1-9.

Paluncic J., Kovacevic Z., Jansson P. J., Kalinowski D., Merlot A. M., Huang M. L. H., Lok H. C., Sahni S., Lane D. J. R., Richardson D. R. Roads to melanoma: Key pathways and emerging players in melanoma progression and oncogenic signaling. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2016. 1863 (4): 770-784.

Panche A. N., Diwan A. D., Chandra S. R. Flavonoids: An overview. *Journal of Nutritional Science*. 2016. 5: 1-15.

Park E. J., Min K. J., Lee T. J., Yoo Y. H., Kim Y. S., Kwon T. K. β -Lapachone induces programmed necrosis through the RIP1-PARP-AIF-dependent pathway in human hepatocellular carcinoma SK-Hep1 cells. *Cell Death and Disease*. 2014. 5 (5): 1-10.

Park H.-Y., Wakefield L. M., Mamura M. Regulation of Tumor Immune Surveillance and Tumor Immune Subversion by TGF- β . *Immune Network*. 2009. 9 (4): 122.

Pavlova N. N., Thompson C. B. The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism. *Cell Metabolism*. 2016. 23 (1): 27-47.

Pérez-Hernández M., Arias A., Martínez-García D., Pérez-Tomás R., Quesada R., Soto-Cerrato V. Targeting Autophagy for Cancer Treatment and Tumor Chemosensitization. *Cancers*. 2019. 11 (10): 1599.

Pfeffer C. M., Singh A. T. K. Apoptosis: A target for anticancer therapy. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018. 19 (2): 19020448.

Picot L. Lutter contre les cancers grâce aux pigments de microalgues. *Biofutur*. 2014. 33 (360): 40-43.

Pilleux E., Li M., Cosson J. P., Guenard D., Sevenet T., Potier P. *Depigmentation composition containing arbutoside derivatives*. EP0524109A1. 1992.

Platz A., Egyhazi S., Ringborg U., Hansson J. Human cutaneous melanoma: a review of NRAS and BRAF mutation frequencies in relation to histogenetic subclass and body site. *Molecular Oncology*. 2008. 1 (4): 395-405.

Potier P., Mathe G., Hayat M., Chenu E. Oncostatic Effects of Alangium vitiense Extracts (ICIG-EORTC 1131,1186, and 1207) on Lymphoid Murine Tumors. *Cancer Research*. 1978. 38 (5): 1465-1467.

Potrony M., Badenas C., Aguilera P., Puig-Butille J. A., Carrera C., Malveyh J., Puig S. Update in genetic susceptibility in melanoma. *Annals of Translational Medicine*. 2015. 3 (15): 1-12.

Poulikakos P. I., Persaud Y., Janakiraman M., Kong X., Ng C., Moriceau G., Shi H., Atefi M., Titz B., Gabay M. T., Salton M., Dahlman K. B., Tadi M., Wargo J. A., Flaherty K. T., Kelley M. C., Misteli T., Chapman P. B., Sosman J. A., Graeber T. G., Ribas A., Lo R. S., Rosen N., Solit D. B. RAF inhibitor resistance is mediated by dimerization of aberrantly spliced BRAF(V600E). *Nature*. 2011. 480 (7377): 387-390.

Pradhan S. J., Mishra R., Sharma P., Kundu G. C. Quercetin and sulforaphane in combination suppress the progression of melanoma through the down-regulation of matrix metalloproteinase-9. *Experimental and Therapeutic Medicine*. 2010. 1 (6): 915-920.

Prado G., Svoboda R. M., Rigel D. S. What's New in Melanoma. *Dermatologic Clinics*. 2019. 37 (2): 159-168.

Rabinowitch E. I., Govindjee. The Role of Chlorophyll in Photosynthesis. *Scientific American*. 1965. 213: 74-83.

Raddatz-Mota D., Pérez-Flores L. J., Carrari F., Mendoza-Espinoza J. A., De León-Sánchez F. D., Pinzón-López L. L., Godoy-Hernández G., Rivera-Cabrera F. Achiote (Bixa orellana L.): a natural source of pigment and vitamin E. *Journal of Food Science and Technology*. 2017. 54 (6): 1729-1741.

Ralhan R., Kaur J. Alkylating agents and cancer therapy. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*. 2007. 17 (9): 1061-1075.

Rani A., Dasgupta P., Murphy J. J. Prostate Cancer: The Role of Inflammation and Chemokines. *American Journal of Pathology*. 2019. 189 (11): 2119-2137.

Ravishankar D., Rajora A. K., Greco F., Osborn H. M. I. Flavonoids as prospective compounds for anti-cancer therapy. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2013. 45 (12): 2821-2831.

Robert C., Karaszewska B., Schachter J., Rutkowski P., Mackiewicz A., Stroiakovski D., Lichinitser M., Dummer R., Grange F., Mortier L., Chiarion-Sileni V., Drucis K., Krajsova I., Hauschild A., Lorigan P., Wolter P., Long G. V., Flaherty K., Nathan P., Ribas A., Martin A. M., Sun P., Crist W., Legos J., Rubin S. D., Little S. M., Schadendorf D. Improved overall survival in melanoma with combined dabrafenib and trametinib. *New England Journal of Medicine*. 2015. 372 (1): 30-39.

Robert C., Ribas A., Wolchok J. D., Hodi F. S., Hamid O., Kefford R., Weber J. S., Joshua A. M., Hwu W. J., Gangadhar T. C., Patnaik A., Dronca R., Zarour H., Joseph R. W., Boasberg P., Chmielowski B., Mateus C., Postow M. A., Gergich K., Ellassaiss-Schaap J., Li X. N., Iannone R., Ebbinghaus S. W., Kang S. P., Daud A. Anti-programmed-death-receptor-1 treatment with pembrolizumab in ipilimumab-refractory advanced melanoma: A randomised dose-comparison cohort of a phase 1 trial. *The Lancet*. 2014. 384 (9948): 1109-1117.

Robert C., Thomas L., Bondarenko I., O'Day S., Weber J., Garbe C., Lebbe C., Baurain J. F., Testori A., Grob J. J., Davidson N., Richards J., Maio M., Hauschild A., Miller W. H., Gascon P., Lotem M., Harmankaya K., Ibrahim R., Francis S., Chen T. T., Humphrey R., Hoos A., Wolchok J. D. Ipilimumab plus dacarbazine for previously untreated metastatic melanoma. *New England Journal of Medicine*. 2011. 364 (26): 2517-2526.

Roy S., Llewellyn C., Egeland E., Johnsen G. *Phytoplankton pigments: Characterization, Chemotaxonomy and Applications in Oceanography* [En ligne]. Cambridge : Cambridge University Press, 2011. p. 690-691

Ruan J. S., Liu Y. P., Zhang L., Yan L. G., Fan F. T., Shen C. S., Wang A. Y., Zheng S. Z., Wang S. M., Lu Y. Luteolin reduces the invasive potential of malignant melanoma cells by targeting $\beta 3$ integrin and the epithelial-mesenchymal transition. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2012. 33 (10): 1325-1331.

Rumin J., Nicolau E., Oliveira Junior R. G. De, Fuentes-Grünwald C., Flynn K. J., Picot L. *A Bibliometric Analysis of Microalgae Research in the World, Europe, and the European Atlantic Area* [En ligne]. [s.l.] : [s.n.], 2020. p. md18020079

Samadani A. A., Norollahi S. E., Rashidy-Pour A., Mansour-Ghanaei F., Nemati S., Joukar F., Afshar A. M., Ghazanfari S., Safizadeh M., Rostami P., Gatei M. Cancer signaling pathways with a therapeutic approach: An overview in epigenetic regulations of cancer stem cells. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 2018. 108 (September): 590-599.

Santi M. D., Bouzidi C., Gorod N. S., Puiatti M., Michel S., Grougnet R., Ortega M. G. In vitro biological evaluation and molecular docking studies of natural and semisynthetic flavones from *Gardenia oudiepe* (Rubiaceae) as tyrosinase inhibitors. *Bioorganic Chemistry*. 2019. 82: 241-245.

Santi M. D., Paulino Zunini M., Vera B., Bouzidi C., Dumontet V., Abin-Carriquiry A., Grougnet R., Ortega M. G. Xanthine oxidase inhibitory activity of natural and hemisynthetic flavonoids from *Gardenia oudiepe* (Rubiaceae) in vitro and molecular docking studies. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2018. 143: 577-582.

Santos G., Almeida M., Antunes L., Bianchi M. Effect of bixin on DNA damage and cell death induced by doxorubicin in HL60 cell line. *Human & Experimental Toxicology*. 2016. 35 (12): 1319-1327.

Schadendorf D., Akkooi A. C. J. Van, Berking C., Griewank K. G., Gutzmer R., Hauschild A., Stang A., Roesch A. Melanoma. *The Lancet*. 2018. 392 (10151): 971-984.

Schadendorf D., Van Akkooi A. C. J., Berking C., Griewank K. G., Gutzmer R., Hauschild A., Stang A., Roesch A., Ugurel S. Melanoma. *The Lancet*. 2018. 392 (10151): 971-984.

Schepisi G., Cursano M. C., Casadei C., Menna C., Altavilla A., Lolli C., Cerchione C., Paganelli G., Santini D., Tonini G., Martinelli G., De Giorgi U. CAR-T cell therapy: A potential new strategy against prostate cancer. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*. 2019. 7 (1): 1-11.

Schvartsman G., Taranto P., Glitza I. C., Agarwala S. S., Atkins M. B., Buzaid A. C. Management of metastatic cutaneous melanoma: updates in clinical practice. *Therapeutic Advances in Medical Oncology*. 2019. 11: 1-19.

Serive B., Nicolau E., Bérard J. B., Kaas R., Pasquet V., Picot L., Cadoret J. P. Community analysis of pigment patterns from 37 microalgae strains reveals new carotenoids and porphyrins characteristic of distinct strains and taxonomic groups. *PLoS ONE*. 2017. 12 (2): 1-35.

- Serrone L., Zeuli M., Sega F. M., Cognetti F. Dacarbazine-based chemotherapy for metastatic melanoma: Thirty-year experience overview. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*. 2000. 19 (1): 21-34.
- Shannan B., Watters A., Chen Q., Mollin S., Dörr M., Meggers E., Xu X., Gimotty P. A., Perego M., Li L., Benci J., Krepler C., Brafford P., Zhang J., Wei Z., Zhang G., Liu Q., Yin X., Nathanson K. L., Herlyn M., Vultur A. PIM kinases as therapeutic targets against advanced melanoma. *Oncotarget*. 2016. 7 (34): 54897-54912.
- Sharma P., Sharma N. Industrial and Biotechnological Applications of Algae: A Review. *Journal of Advances in Plant Biology*. 2017. 1 (1): 1-25.
- Sherr C. J. Principles of Tumor Suppression. *Cell*. 2004. 116 (2): 235-246.
- Sherr C. J., McCormick F. The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer Cell*. 2002. 2 (2): 103-112.
- Shi H., Hugo W., Kong X., Hong A., Koya R. C., Moriceau G., Chodon T., Guo R., Johnson D. B., Dahlman K. B., Kelley M. C., Kefford R. F., Chmielowski B., Glaspy J. A., Sosman J. A., Van Baren N., Long G. V., Ribas A., Lo R. S. Acquired resistance and clonal evolution in melanoma during BRAF inhibitor therapy. *Cancer Discovery*. 2014. 4 (1): 80-93.
- Shi H., Moriceau G., Kong X., Lee M. K., Lee H., Koya R. C., Ng C., Chodon T., Scolyer R. A., Dahlman K. B., Sosman J. A., Kefford R. F., Long G. V., Nelson S. F., Ribas A., Lo R. S. Melanoma whole-exome sequencing identifies V600E B-RAF amplification-mediated acquired B-RAF inhibitor resistance. *Nature Communications*. 2012. 3 (724): 1-8.
- Shibuya M. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Its Receptor (VEGFR) Signaling in Angiogenesis: A Crucial Target for Anti- and Pro-Angiogenic Therapies. *Genes and Cancer*. 2011. 2 (12): 1097-1105.
- Shin D. H., Kim O. H., Jun H. S., Kang M. K. Inhibitory effect of capsaicin on B16-F10 melanoma cell migration via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/Rac1 signal pathway. *Experimental and Molecular Medicine*. 2008. 40 (5): 486-494.
- Soura E., Eliades P., Shannon K., Stratigos A., Tsao H. Hereditary Melanoma: Update on Syndromes and Management - Genetics of familial atypical multiple mole melanoma syndrome. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2016. 74 (3): 395-407.

Spoerlein C., Mahal K., Schmidt H., Schobert R. Effects of chrysin, apigenin, genistein and their homoleptic copper(II) complexes on the growth and metastatic potential of cancer cells. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 2013. 127: 107-115.

Sporn M. B., Roberts A. B. Autocrine growth factors and cancer. *Nature*. 1985. 313 (6005): 745-747.

Sprangers B., Nair V., Launay-Vacher V., Riella L. V., Jhaveri K. D. Risk factors associated with post-kidney transplant malignancies: An article from the Cancer-Kidney International Network. *Clinical Kidney Journal*. 2018. 11 (3): 315-329.

Syed D. N., Afaq F., Maddodi N., Johnson J. J., Sarfaraz S., Ahmad A., Setaluri V., Mukhtar H. Inhibition of human melanoma cell growth by the dietary flavonoid fisetin is associated with disruption of Wnt/ β -catenin signaling and decreased mitf levels. *Journal of Investigative Dermatology*. 2011. 131 (6): 1291-1299.

Syed D. N., Chamcheu J. C., Khan M. I., Sechi M., Lall R. K., Adhami V. M., Mukhtar H. Fisetin inhibits human melanoma cell growth through direct binding to p70S6K and mTOR: Findings from 3-D melanoma skin equivalents and computational modeling. *Biochemical Pharmacology*. 2014. 89 (3): 349-360.

Talib W. H., Abukhader M. M. Combinatorial effects of thymoquinone on the anticancer activity and hepatotoxicity of the prodrug CB 1954. *Scientia Pharmaceutica*. 2013. 81 (2): 519-530.

Takaichi S. Carotenoids in algae: Distributions, biosyntheses and functions. *Marine Drugs*. 2011. 9 (6): 1101-1118.

Tentori L., Lacial P. M., Graziani G. Challenging resistance mechanisms to therapies for metastatic melanoma. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2013. 34 (12): 656-666.

Thakur C., Chen F. Connections between metabolism and epigenetics in cancers. *Seminars in Cancer Biology*. 2019. 57: 52-58.

Tian M., Neil J. R., Schiemann W. P. Transforming growth factor- β and the hallmarks of cancer. *Cellular Signalling*. 2011. 23 (6): 951-962.

Tibodeau J. D., Isham C. R., Bible K. C. Annatto constituent cis-bixin has selective antimyeloma effects mediated by oxidative stress and associated with inhibition of thioredoxin and thioredoxin reductase. *Antioxidants and Redox Signaling*. 2010. 13 (7): 987-997.

Topalian S. L., Drake C. G., Pardoll D. M. Immune checkpoint blockade: A common denominator approach to cancer therapy. *Cancer Cell*. 2015. 27 (4): 450-461.

Tracey E. H., Vij A. Updates in Melanoma. *Dermatologic Clinics*. 2019. 37 (1): 73-82.

Trunzer K., Pavlick A. C., Schuchter L., Gonzalez R., McArthur G. A., Hutson T. E., Moschos S. J., Flaherty K. T., Kim K. B., Weber J. S., Hersey P., Long G. V., Lawrence D., Ott P. A., Amaravadi R. K., Lewis K. D., Puzanov I., Lo R. S., Koehler A., Kockx M., Spleiss O., Schell-Steven A., Gilbert H. N., Cockey L., Bollag G., Lee R. J., Joe A. K., Sosman J. A., Ribas A. Pharmacodynamic effects and mechanisms of resistance to vemurafenib in patients with metastatic melanoma. *Journal of Clinical Oncology*. 2013. 31 (14): 1767-1774.

Tsao H., Atkins M. B., Sober A. J. Management of cutaneous melanoma. *New England Journal of Medicine*. 2004. 351 (10): 998-1012.

Umansky V., Sevko A. Melanoma-induced immunosuppression and its neutralization. *Seminars in Cancer Biology*. 2012. 22 (4): 319-326.

Valli M., Pivatto M., Danuello A., Castro-Gamboa I., Silva D. H. S., Cavalheiro A. J., Araújo Â. R., Furlan M., Lopes M. N., Da Silva Bolzani V. Tropical biodiversity: Has it been a potential source of secondary metabolites useful for medicinal chemistry?. *Quimica Nova*. 2012. 35 (11): 2278-2287.

Valli M., Russo H. M., Bolzani V. da S. The potential contribution of the natural products from Brazilian biodiversity to bioeconomy. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias*. 2018. 90 (1): 763-778.

Valli M., Dos Santos R. N., Figueira L. D., Nakajima C. H., Castro-Gamboa I., Andricopulo A. D., Bolzani V. S. Development of a natural products database from the biodiversity of Brazil. *Journal of Natural Products*. 2013. 76 (3): 439-444.

Vasianovich Y., Wellinger R. J. Life and Death of Yeast Telomerase RNA. *Journal of Molecular Biology*. 2017. 429 (21): 3242-3254.

Vijayaraghavan S., Moulder S., Keyomarsi K., Layman R. M. Inhibiting CDK in Cancer Therapy: Current Evidence and Future Directions. *Targeted Oncology*. 2018. 13 (1): 21-38.

Villanueva J., Infante J. R., Krepler C., Reyes-uribe P., Chen H., Li B., Swoboda R. K., Wilson M., Vultur A., Fukunaba-kalabis M., Wubbenhorst B., Chen T. Y., Liu Q., Demarini D. J., Gilmer T. M., Martin A., Schultz D. C., Speicher D. W., Karakousis G. C., Xu W., Amaravadi

R. K., Xu X., Schuchter L. M., Herlyn M., Nathanson L. Concurrent MEK2 mutation and BRAF amplification confer resistance to BRAF and MEK inhibitors in melanoma. *Cell Reports*. 2013. 4 (6): 1090-1099.

Villanueva J., Vultur A., Lee J. T., Somasundaram R., Fukunaga-Kalabis M., Cipolla A. K., Wubbenhorst B., Xu X., Gimotty P. A., Kee D., Santiago-Walker A. E., Letrero R., D'Andrea K., Pushparajan A., Hayden J. E., Brown K. D., Laquerre S., McArthur G. A., Sosman J. A., Nathanson K. L., Herlyn M. Acquired Resistance to BRAF Inhibitors Mediated by a RAF Kinase Switch in Melanoma Can Be Overcome by Cotargeting MEK and IGF-1R/PI3K. *Cancer Cell*. 2010. 18 (6): 683-695.

Vinay D. S., Ryan E. P., Pawelec G., Talib W. H., Stagg J., Elkord E., Lichter T., Decker W. K., Whelan R. L., Kumara H. M. C. S., Signori E., Honoki K., Georgakilas A. G., Amin A., Helferich W. G., Boosani C. S., Guha G., Ciriolo M. R., Chen S., Mohammed S. I., Azmi A. S., Keith W. N., Bilsland A., Bhakta D., Halicka D., Fujii H., Aquilano K., Ashraf S. S., Nowsheen S., Yang X., Choi B. K., Kwon B. S. Immune evasion in cancer: Mechanistic basis and therapeutic strategies. *Seminars in Cancer Biology*. 2015. 35: S185-S198.

Vinod B. S., Maliekal T. T., Anto R. J. Phytochemicals As Chemosensitizers: From Molecular Mechanism to Clinical Significance. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2013. 18 (11): 1307-1348.

Viratelle J. *La biodiversité de la Nouvelle-Calédonie*. 1^{re} éd. Paris : Maison de la Nouvelle-Calédonie, 2016. p. 46

Wagle N., Emery C., Berger M. F., Davis M. J., Sawyer A., Pochanard P., Kehoe S. M., Johannessen C. M., MacConaill L. E., Hahn W. C., Meyerson M., Garraway L. A. Dissecting therapeutic resistance to RAF inhibition in melanoma by tumor genomic profiling. *Journal of Clinical Oncology*. 2011. 29 (22): 3085-3096.

Wainstein A. J. A., Belfort F. A. Conduta para o melanoma cutâneo. *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões*. 2004. 31 (3): 204-214.

Wang L., Shen Y., Song R., Sun Y., Xu J., Xu Q. An anticancer effect of curcumin mediated by down-regulating phosphatase of regenerating liver-3 expression on highly metastatic melanoma cells. *Molecular Pharmacology*. 2009. 76 (6): 1238-1245.

Wang X., Zhang H., Chen X. Drug resistance and combating drug resistance in cancer. *Cancer Drug Resistance*. 2019. 2: 141-160.

- Wang Y., Feigon J. Structural biology of telomerase and its interaction at telomeres. *Current Opinion in Structural Biology*. 2017. 47: 77-87.
- Weber J. S., D'Angelo S. P., Minor D., Hodi F. S., Gutzmer R., Neyns B., Hoeller C., Khushalani N. I., Miller W. H., Lao C. D., Linette G. P., Thomas L., Lorigan P., Grossmann K. F., Hassel J. C., Maio M., Sznol M., Ascierto P. A., Mohr P., Chmielowski B., Bryce A., Svane I. M., Grob J. J., Krackhardt A. M., Horak C., Lambert A., Yang A. S., Larkin J. Nivolumab versus chemotherapy in patients with advanced melanoma who progressed after anti-CTLA-4 treatment (CheckMate 037): A randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *The Lancet Oncology*. 2015. 16 (4): 375-384.
- Wesbuer S., Lanvers-Kaminsky C., Duran-Seuberth I., Bölling T., Schäfer K. L., Braun Y., Willich N., Greve B. Association of telomerase activity with radio- and chemosensitivity of neuroblastomas. *Radiation Oncology*. 2010. 5 (1): 1-8.
- Weyers W., Euler M., Diaz-Cascajo C., Schill W. B., Bonczkowitz M. Classification of cutaneous malignant melanoma: A reassessment of histopathologic criteria for the distinction of different types. *Cancer*. 1999. 86 (2): 288-299.
- Whittaker S. R., Theurillat J. P., Van Allen E., Wagle N., Hsiao J., Cowley G. S., Schadendorf D., Root D. E., Garraway L. A. A genome-scale RNA interference screen implicates NF1 loss in resistance to RAF inhibition. *Cancer Discovery*. 2013. 3 (3): 351-362.
- Yixin Y., Wei D. Genomic Instability and Cancer. *Journal of Carcinogenesis & Mutagenesis*. 2014. 5: 1-3.
- Yvon E., Del Vecchio M., Savoldo B., Hoyos V., Dutour A., Anichini A., Dotti G., Brenner M. K. Immunotherapy of metastatic melanoma using genetically engineered GD2-specific T cells. *Clinical Cancer Research*. 2009. 15 (18): 5852-5860.
- Zaidi M. R., Day C. P., Merlino G. From UVs to metastases: Modeling melanoma initiation and progression in the mouse. *Journal of Investigative Dermatology*. 2008. 128 (10): 2381-2391.
- Zapata M., Jeffrey S. W., Wright S. W., Rodríguez F., Garrido J. L., Clementson L. Photosynthetic pigments in 37 species (65 strains) of Haptophyta: Implications for oceanography and chemotaxonomy. *Marine Ecology Progress Series*. 2004. 270: 83-102.

Zhang J., Lei Z., Huang Z., Zhang X., Zhou Y., Luo Z., Zeng W., Su J., Peng C., Chen X. Epigallocatechin-3-gallate(EGCG) suppresses melanoma cell growth and metastasis by targeting TRAF6 activity. *Oncotarget*. 2016. 7 (48): 79557-79571.

Zhang S., Yu D. Targeting Src family kinases in anti-cancer therapies: Turning promise into triumph. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2012. 33 (3): 122-128.

Zhang W., Lan Y., Huang Q., Hua Z. Galangin induces B16F10 melanoma cell apoptosis via mitochondrial pathway and sustained activation of p38 MAPK. *Cytotechnology*. 2013. 65 (3): 447-455.

Zhang W., Tang B., Huang Q., Hua Z. Galangin inhibits tumor growth and metastasis of B16F10 melanoma. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2013. 114 (1): 152-161.

Zhang X., Zhao W. E., Hu L., Zhao L., Huang J. Carotenoids inhibit proliferation and regulate expression of peroxisome proliferators-activated receptor gamma (PPAR γ) in K562 cancer cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2011. 512 (1): 96-106.

Zhang Y., Springfield R., Chen S., Li X., Feng X., Moshirian R., Yang R., Yuan W. α -GalCer and iNKT cell-based cancer immunotherapy: Realizing the therapeutic potentials. *Frontiers in Immunology*. 2019. 10: 11-15.

Zitvogel L., Tesniere A., Kroemer G. Cancer despite immunosurveillance: Immunoselection and immunosubversion. *Nature Reviews Immunology*. 2006. 6 (10): 715-727.

Zugazagoitia J., Guedes C., Ponce S., Ferrer I., Molina-Pinelo S., Paz-Ares L. Current Challenges in Cancer Treatment. *Clinical Therapeutics*. 2016. 38 (7): 1551-1566.

Sensibilisation de cellules de mélanome à la chimiothérapie par des flavonoïdes et caroténoïdes extraits de plantes du Brésil, de Nouvelle-Calédonie et de microalgues marines

Résumé: Le mélanome métastatique est une forme agressive de cancer évoluant rapidement du fait de résistances aux anticancéreux. Cette thèse étudie l'hypothèse que des molécules purifiées de plantes ou microalgues marines peuvent améliorer l'efficacité de médicaments anti-mélanome en sensibilisant les cellules cancéreuses à la chimiothérapie. Après une revue des études consacrées à la chimiosensibilisation par des molécules naturelles, nous avons sélectionné des plantes du Brésil et de Nouvelle-Calédonie (*Bixa orellana* et *Gardenia oudiepe*) ainsi que des microalgues marines (*Rhodomonas salina* et *Tisochrysis lutea*) pour purifier des flavonoïdes et des caroténoïdes originaux et évaluer leur potentiel de chimiosensibilisation dans un modèle cellulaire de mélanome traité par la dacarbazine et le vemurafenib. Nos travaux sur les graines de *B. orellana* ont permis de détailler leur composition phytochimique, d'identifier deux nouveaux apocaroténoïdes et de démontrer le potentiel chimiosensibilisant de la Z-bixine par génération de ROS. Nous montrons également que la 5,7-dihydroxy-3,6,4'-triméthoxyflavone purifiée de *G. oudiepe* sensibilise les cellules de mélanome à la dacarbazine en perturbant le cytosquelette. Après avoir redéfini le profil pigmentaire de *R. salina* et *T. lutea*, nous avons développé un procédé de purification de la fucoxanthine par CPC et démontré son potentiel chimiosensibilisant ainsi que celui de l'alloxanthine. Ces résultats valident *in vitro* le concept de sensibilisation à la chimiothérapie par des caroténoïdes et flavonoïdes cyostatiques et contribuent à la compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans cette chimiosensibilisation.

Mots clés: cancer, chimiorésistance, produits naturels, pigments, polyméthoxyflavones, apocaroténoïdes, apoptose, stress oxydatif, cytosquelette.

Sensitization of melanoma cells to chemotherapy by flavonoids and carotenoids extracted from Brazilian and New Caledonian plants and marine microalgae

Summary: Metastatic melanoma is an aggressive form of cancer that progresses rapidly due to resistance to anti-cancer drugs. This thesis studies the hypothesis that molecules purified from plants or marine microalgae can improve the efficacy of anti-melanoma drugs by sensitizing cancer cells to chemotherapy. After a review of studies devoted to chemosensitization by natural molecules, we selected plants from Brazil and New Caledonia (*Bixa orellana* and *Gardenia oudiepe*) as well as marine microalgae (*Rhodomonas salina* and *Tisochrysis lutea*) to purify original flavonoids and carotenoids and evaluate their chemosensitization potential in a melanoma cell model treated with dacarbazine and vemurafenib. Our work on *B. orellana* seeds allowed us to detail their phytochemical composition, to identify two novel apocarotenoids and to demonstrate the chemosensitizing potential of Z-bixin by ROS generation. We also show that 5,7-dihydroxy-3,6,4'-trimethoxyflavone, purified from *G. oudiepe*, sensitizes melanoma cells to dacarbazine by inducing cytoskeleton disruption. After redefining the pigment profile of *R. salina* and *T. lutea*, we developed a process for the purification of fucoxanthin by CPC and demonstrated its chemosensitizing potential as well as that of alloxanthin. These results validate *in vitro* the concept of sensitization to chemotherapy by cytostatic carotenoids and flavonoids and contribute to the understanding of the cellular and molecular mechanisms involved in this chemosensitization.

Keywords: cancer, chemoresistance, natural products, pigments, polymethoxyflavones, apocarotenoids, apoptosis, oxidative stress, cytoskeleton.



LIENSs (Littoral, Environnement et Sociétés, UMR 7266)
Bâtiment Marie Curie | Avenue Michel Crépeau
17042 LA ROCHELLE CEDEX

