



Caractérisation et études précliniques d'un nouvel inhibiteur naturel de MCL-1

Florian Daressy

► To cite this version:

Florian Daressy. Caractérisation et études précliniques d'un nouvel inhibiteur naturel de MCL-1. Cancer. Université Paris-Saclay, 2020. Français. NNT : 2020UPASL055 . tel-03480903

HAL Id: tel-03480903

<https://theses.hal.science/tel-03480903>

Submitted on 15 Dec 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.

Caractérisation et études précliniques d'un nouvel inhibiteur naturel de MCL-1

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

Ecole doctorale n°582 : cancérologie : biologie - médecine - santé
(CBMS)

Spécialité de doctorat: Sciences de la vie et de la santé

Unité de recherche :

1/ Université Paris-Saclay, CNRS, Institut Gustave Roussy, Aspects métaboliques
et systémiques de l'oncogénèse pour de nouvelles approches thérapeutiques,
94805, Villejuif, France.

2/ Université Paris-Saclay, CNRS, Institut de chimie des substances naturelles
(ICSN), Métabolites de végétaux et endophytes associés : isolement, synthèse et
bioactivité, 91198, Gif-sur-Yvette, France

Référent : Faculté de médecine

Thèse présentée et soutenue à Villejuif, le 14
décembre 2020, par

Florian DARESSY

Composition du Jury

Dr Olivier BERNARD

DR Inserm, UMR1170

Président

Dr Martine AMIOT

DR CNRS, ERL6001

Rapporteuse

Pr Anne-Sophie VOISIN-CHIRET

CNRS, 3038 INC3M

Rapporteuse

Dr Sébastien BANQUET

CTIO Servier

Examinateur

Dr Aude ROBERT

IR Paris-Saclay, UMR1279

Examinatrice

Dr Joëlle WIELS

DREM CNRS, UMR 9018

Directrice de thèse

Dr Fanny ROUSSI

DR CNRS, UPR 2301

Co-directrice de thèse

Remerciements

Je tiens tout d'abord à exprimer mes remerciements aux membres de jury qui ont accepté d'évaluer ce travail. Je remercie sincèrement le Docteur Olivier BERNARD, d'avoir accepté d'être le président de jury. J'adresse également toute ma gratitude au Professeur Anne-Sophie VOISIN-CHIRET et au Docteur Martine AMIOT, pour le temps qu'elles ont consacré à l'examen de ce manuscrit, et pour leurs remarques très pertinentes. Enfin, je remercie chaleureusement le Docteur Sébastien BANQUET qui a accepté d'examiner mon travail, en apportant une vision plus appliquée.

Je remercie les Docteurs Fanny ROUSSI et Joëlle WIELS, de m'avoir donné l'opportunité de réaliser cette thèse au sein de leurs laboratoires respectifs. Merci Joëlle pour tes conseils, et la grande liberté que tu m'as accordé dans ce projet. Encore désolé pour l'orthographe... j'ai fait de mon mieux. Merci également de m'avoir permis de partir en Russie et au Portugal, pour acquérir de l'expérience lors des congrès. Merci Fanny de m'avoir fait découvrir la chimie pas-à-pas, d'avoir été très patiente pour mes débuts, de m'avoir toujours encouragé. Grâce à toi, et à la façon dont tu parles de la chimie, tu m'as fait découvrir et aimer cette discipline.

Un grand merci à Aude ROBERT qui m'a formé pour les différentes techniques de laboratoire, ceci m'a permis de prendre en main ce projet beaucoup plus facilement. Je pense que je retiendrais pour mes futures expériences qu'il ne faut pas jeter mon lait d'anticorps dans l'évier !! Merci pour ta grande aide lors des manipulations *in vivo*, et surtout d'avoir choisi des stagiaires qui ont su me divertir !! Dédiasse aux bons moments passés à Saint-Pétersbourg.

Merci également à Sophia LAHLIL, qui le temps de 6 mois, m'a permis de former un « duo de choc » afin de donner un coup de booste au projet, à un moment où celui-ci était au point mort. J'espère que mon meuble TV se porte bien !

En parlant de duo, je me sens obligé de remercier celui avec qui j'ai formé un duo pendant 2 ans (assortit d'un bonus de 6 mois, puis de 3 mois... enfin bref un duo de 3 ans !!!). J'ai adoré nos petits-dej, nos pauses Pitch, découvrir des thés de tous horizons (j'ai bien dit TOUS horizons), pour que l'on s'imagine tout un tas de théories plus déjantées les unes que les autres (enfin surtout les miennes). Bref, j'ai commencé avec une personne timide qui skouate mon labo, j'ai fini avec un ami (loin d'être timide) pour voyager dans le monde ! Merci Valentin !

Merci à tous les membres des unités 8206 et 9218 : Tram, Aurore, Thai-Hoa, Leslie, Alberto, Mélanie, Sarah, François, Kenza, Camille, Céline, Frank, et bien d'autres ... pour les repas du midi, les pauses café, les pique-niques et les pots, ... Bref tout mais pas la science !

Merci également aux membres de l'UPR 2301, qui m'ont beaucoup (BEAUCOUP) aidé dans un labo dont je ne maîtrisais rien. Merci Cécile pour m'avoir aidé à la purification, merci Alma pour le test de PFA, et merci à Gwen et à Laura, d'avoir toujours été là pour m'aider quand j'en avais besoin. Merci aussi à tout le comité du CEI : Vincent, Oriane, Charlotte et Pauline, avec qui nous avons passé de bons moments. Merci également au Docteur Ewen LESCOPE, qui m'a permis d'intégrer brièvement son équipe, et surtout Florian MALARD pour les bons moments passés à produire des protéines (un peu) et à refaire le monde (beaucoup).

Merci à tous les acteurs qui ont fait des apparitions (plus ou moins ponctuelles) durant mes 3 années ici : Mélanie, Karine, Pascale, Yann et les autres. Vous-avez contribué à ce que tout se passe bien.

Je tiens à remercier également nos collaborateurs du CERMN de Caen, le Docteur Aurélie MALZERT-FREON, le Docteur Anne-Claire GROO et Line SEGUY, qui nous ont accueilli pour nous présenter leurs activités, mais qui nous ont surtout initié à la galénique, étape clef de ce projet.

Merci à tous mes anciens collègues que j'ai continué de voir et qui m'ont aidé, chacun à leur manière : Laurence et Sébastien qui m'ont formé dans cette thématique et à qui je dois beaucoup, le Bench, les Pious et Marianna qui m'ont intégré à mes début Parisiens et qui font que j'aime toujours cette ville !!!

Merci à David ! Cette aventure avait commencé tous les deux il y a 5 ans déjà, en coloc à Poitiers, et nous étions très loin de toutes ces responsabilités que nous avons maintenant. Collègue hors-pair dans le froid de Gastronome, je pense que le destin a bien fait de ne pas nous réunir dans le même labo ... La science ne s'en porte que mieux.

Merci à ma famille qui m'a suivi, supporté, encouragé, pendant tout ce temps ... C'était très sympas de recréer une famille à l'ancienne pendant le confinement, même si de petits nouveaux ont fait leurs apparitions. Vivement que tout ça passe pour pouvoir reprendre nos parties de Molki, de Time's up ... Pressé de tous vous revoir tous pour Noël.

Pour finir, je voudrais remercier ma future femme, ma chérie, ma confidente, mon tout. L'histoire de cette thèse est à la fois une histoire professionnelle, avec la possibilité de décrocher le plus haut diplôme, mais également une histoire personnelle, puisqu'elle m'a permis de rencontrer mon âme sœur. Pour beaucoup, la thèse a détruit toute forme de vie sociale, pour moi elle n'a fait que de la construire. Nous avons traversé cette étape ensemble, ce qui n'a fait que de nous renforcer. Une page se referme donc, mais il ne s'agissait que de la première page d'un livre encore vierge, où tout reste encore à écrire.

PS : désolé si j'oublie quelqu'un, j'ai détesté faire ce chapitre, ceux que je remercie le savent déjà de toutes façons !

Table des matières

Tables des matières

Tables des matières	1
Liste des figures.....	4
Liste des abréviations	5
I. Les hémopathies malignes	8
II. L'apoptose	12
A. Généralités et caractéristiques	12
1) Historique	12
2) Caractéristiques	13
B. Les voies de signalisations de l'apoptose	14
1) La voie extrinsèque.....	15
2) La voie intrinsèque	17
C. Rôle des caspases	18
D. Rôle de la famille BCL-2	19
1) Classification des membres de la famille BCL-2	20
(a) Les protéines anti-apoptotiques	20
(1) Généralités	20
(2) MCL-1, un membre à part	21
(b) Les protéines pro-apoptotiques.....	24
(1) BAX et BAK (et BOK)	24
(2) Les <i>BH3-only</i>	25
2) Régulation de la voie mitochondriale par la famille BCL-2.....	25
(a) Mécanisme d'action.....	25
(b) Régulation de l'activité.....	26
(1) Généralités	26
(2) Le cas de MCL-1	30
III. Dérégulation de l'apoptose, et famille BCL-2 dans les hémopathies malignes.	34
A. Perturbations générales de l'apoptose	34
B. Perturbations liées famille BCL-2	36

1) Les altérations de la famille BCL-2.....	36
2) Notion de dépendance : le BH3-profiling.....	38
IV. Les stratégies thérapeutiques ciblant la famille BCL-2.....	41
A. Historique des stratégies ciblant les membres de la famille BCL-2.....	41
1) Réduction de l'expression des protéines anti-apoptotiques.....	41
2) Antagoniser les protéines anti-apoptotiques en ciblant le domaine BH3.....	42
B. Les petites molécules inhibitrices : BH3-mimétiques.....	42
1) Définition.....	42
2) Les premiers BH3-mimétiques : BCL-xL comme cible privilégiée.....	43
3) Le ciblage de BCL-2 : ABT-199.....	43
(a) La molécule.....	44
(b) Les résistances.....	44
4) Les inhibiteurs de MCL-1 : une cible à la mode.....	45
(a) Rationnel scientifique d'un inhibiteur de MCL-1.....	45
(b) Essais cliniques.....	46
5) Combinaisons et perspectives.....	48
V. Les drimanes comme nouveau candidat.....	50
A. Avantages et inconvénients des molécules naturelles comme sources de médicaments.....	50
1) Avantages.....	50
2) Inconvénients.....	51
B. Les molécules naturelles sur le marché des anti-cancéreux.....	52
1) Une stratégie qui a fait ces preuves.....	52
(a) Généralités.....	52
(b) Le cas du Taxotère.....	52
(c) Une stratégie déjà appliquée pour cibler la famille BCL-2.....	52
2) Stratégie développée à l'ICSN pour l'identification et l'études de molécules naturelles isolées de plantes.....	53
3) Test de screening : le test de polarisation de fluorescence (PFA).....	54
C. Une nouvelle famille de candidats potentiels : les drimanes.....	56

1) Introduction	56
2) Le NA1-115-7 et ses dérivés	57
D. Les limites	57
1) Le problème de solubilité et de stabilité.....	57
2) La solution : les nano-émulsions	58
(a) Intérêts pharmaceutiques	58
(b) Définition et caractéristiques	58
Chapitre II. Contexte et objectifs.....	60
Chapitre III. Résultats	62
I. Article 1	63
II. Article 2.....	64
III. Article 3	65
IV. Données non publiées.....	66
Chapitre IV. Discussion	70
Chapitre V. Bibliographie	81

Liste des figures

Figure 1 : Corrélation de l'âge avec les différentes leucémies	p.8
Figure 2 : Illustration de l'hématopoïèse.	p.8
Figure 3 : Lymphome de Hodgkin <i>versus</i> Lymphome non-hodgkinien	p.10
Figure 4 : Caractéristiques morphologiques d'une cellule apoptotique	p.14
Figure 5 : Description des voies d'activation de l'apoptose extrinsèque et intrinsèque	p.15
Figure 6 : Organisation des caspases humaines	p.18
Figure 7 : Les protéines de la famille BCL-2	p.19
Figure 8 : Structure moléculaire de MCL-1 comparée à BCL-2	p.21
Figure 9 : Régulation de l'apoptose par les protéines BCL-2	p.26
Figure 10 : Interaction entre le BH3-only BIM et l'anti-apoptotique MCL-1	p.28
Figure 11 : Liste des interactions entre les protéines anti-apoptotiques et les protéines pro-apoptotiques.	p.28
Figure 12 : Représentation schématique des fonctions des protéines BH3-only.	p.29
Figure 13 : Test de BH3-profiling.	p.38
Figure 14 : Liste des interactions entre protéines pro-et anti-apoptotiques.	p.38
Figure 15 : Présentation des résultats qui peuvent être obtenus par BH3-profiling.	p.39
Figure 16 : Mécanisme d'action des BH3-mimétiques.	p.42
Figure 17 : Essai clinique de l'ABT-199 en monothérapie (MT) ou en combinaison avec d'autres traitements.	p.44
Figure 18 : Liste des coopérations nationales et internationales qui ont permis à l'ICSN, la formation de l'extractothèques.	p.53
Figure 19 : Principe du test de polarisation de fluorescence (PFA).	p.55
Figure 20 : Présentation du squelette moléculaire du drimane et du polygodial.	p.56
Figure 21 : Structure des différentes molécules isolées et testée pour leur affinité aux protéines de la famille BCL-2, provenant de <i>Zygogynum P.</i>	p.57
Figure 22 : Résultat des études structures/activités menées sur les différents analogues du drimane.	p.57
Figure 23 : Stabilité des molécules de drimanes en conditions acides.	p.58
Figure 24 : Nanoémulsions de type E/H encapsulant le NA1-115-7	p.59
Figure 25 : Description de la réaction de Paal-Knoor d'une molécule de type polygodial avec une protéine présentant une lysine.	p.70
Figure 26 : Liste des inhibiteurs de MCL-1 actuellement en clinique.	p.71
Figure 27 : Liste des inhibiteurs de MCL-1 actuellement développés.	p.71
Figure 28 : Modifications chimiques envisageables	p.72

Liste des abréviations

A

ADC : Antibody drug conjugate
 ADN : Acide déoxyribonucléique
 AIF : Apoptosis inducing factor
 AML : Leucémie myéloïde aiguë
 AMM : autorisation de mise sur le marché
 APAF-1 : Apoptotic protease activating factor
 1

ARC : Association pour la recherche sur le cancer

ARN : Acide ribonucléique messager
 ATP : Adenosine triphosphate
 dATP : deoxyadenosine triphosphate
 AVC : Accident vasculo-cérébrale

B

BAD : BCL-2 antagonist of cell death
 BAK : BCL-2 antagonist killer 1
 BAX : BCL-2-associated X protein
 BCL-2 : B-cell-lymphoma-2
 BCL-xL : B-cell lymphoma extra large
 BCMA : B-cell maturation antigen
 BCR : B cell receptor
 BH : BCL-2 homology
 BID : BCL-2 interacting domain death agonist
 BIM : BCL-2 interacting mediator of apoptosis
 BLA : Burkitt lymphoma associated antigen
 BMF : BCL-2 modifying factor
 BOK : BCL-2 related ovarian killer
 BTK : Burton tyrosin kinase

C

CAD : caspases-3-activated DNase
 CAR : Chimeric antigen receptor

CARD : Caspase activation and recruitment domain

Caspase : Cystein-dependent ASpartate-specific protease

CDK : Cyclin-dependent kinase

Ced : *Coenorhabditis elegans* death

c-FLIP : Cellular FLICE-like inhibitory protein

CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité

CRE : cAMP response element

CSH : Cellule souche hématopoïétique

D

DD : Death domain

DED : Death effector domain

DIABLO : Direct inhibitor of apoptosis binding protein with two pl

DISC : Death-inducing similar complex

DLBCL : Diffuse large B-cell lymphoma

E

EBV : Epstein-Barr virus

EGF : Epidermal growth factor

ERK : Extracellular signal regulated kinase

EU : Etats-Unis

F

FADD : Fas associated death domain

FDA : Food and drug administration

FISH : Fluorescence *in situ* hybridization

FL : Follicular lymphoma

FLT3 : Fms-like tyrosine kinase 3

FRM : Fondation pour la recherche médicale

G

GEP : Gene expression profil

H

HRK : Harakiri

I

IAP : Inhibitor of apoptosis protein

IDH : Isocitrate deshydrogenase

Ig : Immunoglobuline

IV : Intra veinous

J

JNK : c-Jun N-terminal protein kinase

L

LAL : Leucémie aigüe lymphoïde

LAM : Leucémie aigüe myéloïde

LB : Lymphome de Burkitt

LCL : Lignée cellulaire lymphoblastoïde

LH : Lymphome de Hodgkin

LLC : leucémie lymphoïde chronique

LMC : Leucémie myéloïde chronique

LNH : lymphoma non hodgkinien

M

MAPK : Mitogen-activated protein kinases

MCL-1 : Myeloid cell leukemia 1

MDE : Myeloma defining events

MDM2 : Murine double minute 2

MM : Myelome multiple

mTOR : Mechanistic/Mammalian Target of rapamycin

MOMP : Mitochondrial outer membrane permeabilisation

N

NE : Nano-emulsion

NENA : Nano-emulsion chargé de NA1-115-7

NFκB : Nuclear factor-*kappa* B

NGS : Next generation of sequencing

NK : natural kill

NSG : NOD scid gamma

O

OMS : Organisation mondiale de la santé

P

PARP : Poly ADP-ribose polymerase

PBMC : Periperal blood mononuclear cells

PCNA : Proliferating cell nuclear antigen

PCR : Polymerase chain reaction

PDL : Programmed-death ligand

PFA : polarization of fluorescence assay

PI3K : Phosphoinositide 3 kinase

PUMA : p53 upregulated modulator of apoptosis

R

ROS : Reactive oxygen species

RMN : Résonance magnétique nucléaire

S

SHH : Sonic hedgehog

SMAC : Second mitochondria-derived activator of caspases

SMD : Syndrômes myelodysplasiques

SNP : Single nucleotide polymorphisms

SPR : Surface plasmon resonance

STAT : Signal Transducers and activators of transcription

T

TNF : tumor necrosis factor

TK : Tyrosine kinase

TKI : Tyrosine kinase inhibitor

TRADD : TNFRSF1 asociated *via* DD

TRAIL : TNF-related apoptosis inducing
ligand

V

VEGF : Vascular endothelial growth factor

X

XIAP : X-linked inhibitor of apoptosis

Introduction

Type de leucémie	Âge le plus courant au moment du diagnostic	Âge médian au moment du diagnostic
Lymphoblastique aiguë (LLA)	<20 ans	15
Myéloïde aiguë (LMA)	De 65 à 74 ans	67
Lymphoïde chronique (LLC)	De 65 à 74 ans	71
Myéloïde chronique (LMC)	De 65 à 74 ans	64

Figure 1: Corrélation de l'âge avec les différentes leucémies. Les leucémies affectent en générale des personnes âgées (>60ans), exceptées les LAL qui sont majoritairement retrouvées chez de jeunes sujets (environ 15ans).

Tirée du site : <https://www.sllcanada.org/>

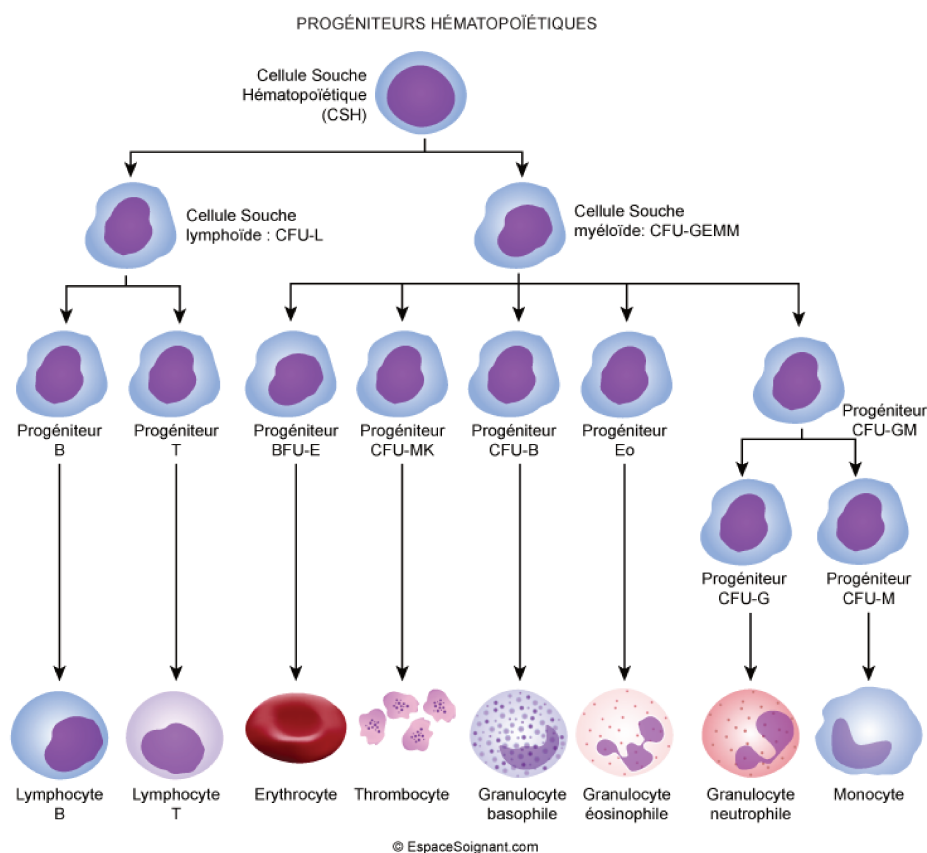


Figure 2 : Illustration de l'hématopoïèse. A partir des cellules souches hématopoïétiques, il existe deux niveaux de différenciations. Niveau 1 : cellule souche lymphoïde / cellule souche myéloïde. Niveau 2 : cellule sanguine fonctionnelle.

Tirée du site : <https://www.soins-infirmiers.com/>

I. Les hémopathies malignes¹

Dans cette partie, je vais présenter des généralités sur les hémopathies malignes dont certaines constituent le modèle d'étude que nous avons utilisé pour le développement pré-clinique d'un inhibiteur de la famille BCL-2. Notre étude s'inscrit dans une tendance plus générale de ce type de travaux qui se fait préférentiellement sur des lignées d'hémopathies malignes. De plus, notre équipe s'est spécialisée depuis de nombreuses années dans la compréhension des mécanismes de pathogénicité et le traitement des lymphomes B, et en particulier le lymphome de Burkitt.

En France, les hémopathies malignes représentent 1 cancer sur 10, soit plus de 45 000 nouveaux cas rien que pour l'année 2018. Aux Etats-Unis (EU), c'est près de 180 000 nouveaux cas détectés en 2019 avec près d'une personne toutes les 9 minutes, qui meurt d'une hémopathie maligne. Plus de 2/3 des cas sont d'origine lymphoïde. Une étude effectuée entre 1990 et 2018, en France, montre que cette pathologie touche plus fréquemment les hommes que les femmes (environ 55% des nouveaux patients sont des hommes) et survient en générale après 60 ans. Mais ces pathologies affectent différentes populations : par exemple, les leucémies aigues lymphoblastiques (LAL) représentent la première cause de tumeurs malignes chez les enfants, alors que les leucémies aigues myéloïdes touchent plutôt des personnes âgées avec un âge médian de 71 ans (Figure 1). Durant les trente dernières années, certains types de cancers ont vu leur incidence augmenter, comme le myélome multiple (MM), les leucémies aiguës myéloïdes (LAM) et les lymphomes lymphocytiques. Cela semble surtout dû aux changements démographiques, en particulier au vieillissement de la population, mais également à l'augmentation des expositions à certains facteurs environnementaux, comme les rayons ionisants et les pesticides. Les taux de survie ont également beaucoup changé ces vingt dernières années, grâce aux avancées dans le domaine de l'innovation thérapeutique, mais également dans le domaine du diagnostic et de la prise en charge des patients. Par exemple aux EU, les taux de survie des lymphomes non-hodgkiniens, et des leucémies, ont augmenté de plus de 20 ans.

Les lymphomes et les leucémies sont des hémopathies malignes développées à partir des cellules hématopoïétiques à différents stades de différenciation : soit des cellules souches hématopoïétique (CSH), aussi appelées hémocytoblastes, localisées au niveau de la moelle osseuse, soit des cellules plus différenciées localisées dans d'autres organes. Le processus qui permet le passage des cellules souches aux cellules totalement différenciées est une suite d'événements complexes qui s'appelle l'hématopoïèse. Comme le montre la figure 2, sous l'impulsion de facteurs stimulants, les cellules

¹ Dans cette partie, les chiffres fournis proviennent de la fondation ARC, de la FRM, du site de Cancer Research UK, de la Société de Leucémies et de Lymphomes du Canada et de Leukemia & Lymphoma Society (USA).

souches peuvent se diviser par mitose, et se différencier en deux types de progéniteurs (différenciation de niveau 1) :

- Les cellules myéloïdes progénitrices.
- Les cellules lymphoïdes progénitrices.

L'origine de ces cellules pluripotentes est importante dans la classification des hémopathies puisqu'il existera alors les cancers myéloïdes et les cancers lymphoïdes (*Tableau 1*).

Tableau 1 : classification des principales hémopathies malignes

MYELOÏDES	LYMPHOÏDES
LEUCEMIE MYELOÏDE CHRONIQUE	LEUCEMIE LYMPHOÏDE CHRONIQUE
LEUCEMIE MYELOÏDE AIGUE	LEUCEMIE AIGUE LYMPHOBLASTIQUE
SYNDROME MYELOYDYSPLASIQUE	MYELOME MULTIPLE
TROUBLE MYELOPROLIFÉRATIF	LYMPHOMES
LEUCEMIE ERYTHROBLASTIQUE	

Ce sont ces progéniteurs, qui après une nouvelle étape de différenciation (différenciation de niveau 2), vont être capables de former les cellules du sang (Figure 2). D'un côté les précurseurs d'origine myéloïde vont pouvoir subir l'érythropoïèse, qui permet la formation des érythrocytes (hématies ou globules rouges), la thrombocytopoïèse, qui aboutit à la formation des thrombocytes (plaquettes) ou la leucopoïèse, qui donne naissance aux granulocytes neutrophiles, basophiles et éosinophiles, ou encore aux monocytes. Concernant les précurseurs d'origine lymphoïde, ils vont subir la lymphocytopoïèse permettant la formation des lymphocytes T, B ou NK (Pun et al., 2018).

La nature des cellules affectées (myéloïdes ou lymphoïdes) est un facteur essentiel pour classer les pathologies, mais elle n'est pas suffisante. En effet, il est également important de connaître la localisation des cellules cancéreuses :

- Les leucémies se caractérisent par un développement médullaire et un envahissement sanguin. Il y a alors des cellules tumorales circulantes dans le sang ou dans la moelle osseuse (Valent et al., 2020). Initialement, les leucémies se localisent au niveau de la moelle osseuse. Si les cellules cancéreuses sont immatures, ces blastes malins vont s'accumuler uniquement au niveau de la moelle, qui ne pourra alors plus produire les cellules sanguines « normales » comme les globules blancs, les globules rouges ou encore les plaquettes. Les premiers symptômes ne seront donc pas directement liés aux blastes malins mais plutôt à la chute du nombre de cellules sanguines entraînant des anémies, des infections et des saignements. Ces blastes immatures ont la caractéristique de se diviser et donc de proliférer de façon très rapide, ce qui explique le mauvais pronostic de ces leucémies qui sont dites « aiguës » (Formanek jr., 2002). A l'inverse, quand

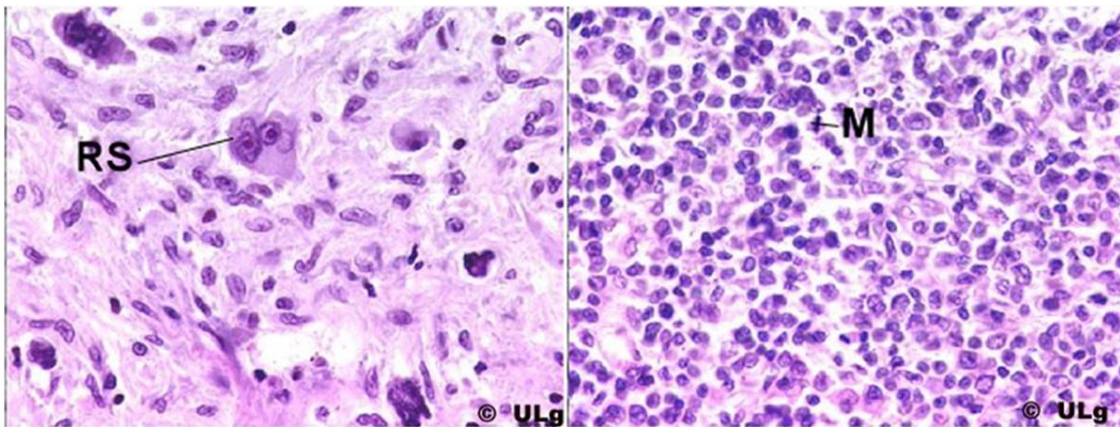


Figure 3 : Lymphome de Hodgkin *versus* Lymphome non-hodgkinien. Les lymphomes sont sous-divisés en 2 groupes majeurs :

- Les lymphomes hodgkiniens qui se traduisent par la présence de cellules B dégénérées, les cellules de Reed-Sternberg (RS), bien visible sur le cliché de gauche.
- Les lymphomes non-hodgkiniens, qui ne présentent pas de cellule de RS, mais plutôt des cellules en mitose (M), visible sur le cliché de droite.

Tirée du site : <http://www.anapatho.ulg.ac.be>

les cellules cancéreuses sont plus matures, elles ne s'accumulent pas au niveau de la moelle osseuse, mais sont libérées dans la circulation sanguine, et peuvent par exemple s'accumuler au niveau de la rate, entraînant son hypertrophie. Le nombre de globules blancs, de globules rouges, et de plaquettes n'est alors pas impacté. En revanche, la production de ces cellules cancéreuses plus matures va demander une grande quantité d'énergie, à l'origine de fatigue et de perte de poids. Dans ce cas les leucémies sont dites « chroniques ».

- Les lymphomes se manifestent la plupart du temps par un mode de développement tumoral dans le système lymphatique (ganglions, rate...) (Sabattini et al., 2010). Les lymphomes sont classés en 2 groupes principaux (Figure 3) :
 - Les lymphomes hodgkiniens (LH), décrits pour la 1ère fois par Thomas Hodgkin en 1832, qui se caractérisent par la présence de cellules de Reed-Sternberg (décrite par Carl von Sternberg en 1898 puis par Dorothy Reed en 1902) et par une certaine hétérogénéité des cellules malignes. Ils constituent environ 15% des cas de lymphomes ;
 - Les lymphomes non-hodgkiniens (LNH) caractérisés par l'absence de cellules de Reed-Sternberg, et présentant des cellules malignes plus homogènes. Ces lymphomes non-hodgkiniens, sont pour la plupart de type B (plus de 80% des cas), les autres étant soit de type T, soit NK. Parmi les lymphomes B, on retrouve principalement le lymphome diffus à grandes cellules B (DLBCL), le lymphome folliculaire (FL), le lymphome du manteau, et le lymphome de Burkitt (BL). Ce dernier constitue depuis de nombreuses années le sujet principal d'étude de notre équipe car il présente différentes caractéristiques intéressantes. C'est par exemple le premier lymphome humain dans lequel le rôle oncogénique d'un Herpesvirus (le virus d'Epstein Barr (EBV)) a été mis en évidence. On sait aujourd'hui qu'il existe différentes formes de LB, plus ou moins associées à EBV, en fonction notamment de leur localisation géographique. L'un de ses marqueurs hautement caractéristique mais non spécifique est la translocation de c-MYC. Différentes translocations placent ce gène au voisinage de gènes impliqués dans la formation d'immunoglobulines : t(8;14) dans 80% des cas (c'est le gène des chaînes lourdes des Ig qui est alors impliqué) et t(2 ;8) et t(8 ;22) (ce sont alors respectivement les gènes des chaînes légères Kappa et Lambda qui sont impliqués). Cela se traduit par une surexpression de c-MYC induisant une activation lymphocytaire, un des événements majeur du développement du LB (Magrath, 1990). D'autres marqueurs ont été identifiés : Ki67 très élevé (>90%) (Harris et al., 1999), des antigènes spécifiques des LB comme CD-19, CD-20, ... ou d'autres marqueurs comme BCL-6, CD-10, CD-43 et BLA/CD77 (Burkitt Lymphoma associated Antigen) découvert par Joëlle Wiels (Wiels *et al.*, 1981). L'une des originalités de ce lymphome est sa forme dite

« endémique » qui est principalement retrouvée en Afrique équatoriale et touche des jeunes enfants. Elle est quasiment toujours associée à EBV. Dans le cadre de cette thèse, il faut noter aussi que l'intérêt du BL est son expression élevée de MCL-1.

Pour revenir sur le lymphome folliculaire (FL), deuxième lymphome le plus présent, il tire son origine des cellules B dérivées du centre germinatif, que ce soit des centrocytes ou des centroblastes. Ce lymphome a joué un rôle important dans la recherche sur l'apoptose puisque 85% des FL présentent la translocation t(14;18), à l'origine de la surexpression de la protéine BCL-2, ce qui a permis de décrire cette protéine pour la première fois.

Il est donc possible d'avoir des leucémies d'origine myéloïde ou d'origine lymphoïde, mais tous les lymphomes sont d'origine lymphoïde, puisque les cellules myéloïdes ne se développent pas dans les tissus lymphatiques. Il se peut en revanche que des lymphomes finissent par envahir la moelle osseuse ou que des leucémies se propagent aux tissus lymphatiques, ce qui fait toute la complexité du diagnostic de ces pathologies.

Dans certains cas, les cellules qui prolifèrent anormalement au sein de la moelle osseuse sont des cellules plasmiques, et par conséquent matures, mais qui n'ont pas la possibilité de quitter la moelle osseuse. Il s'agit dans ce cas précis d'un myélome. Le MM représente 10% des hémopathies malignes, avec une incidence dans les pays occidentaux proche de 10/100 000 habitants et il présente des taux de survie très faible : environ 50% à 5 ans, et 35% à 10 ans. Il est cependant important de noter les progrès qui ont été fait en termes de survie dans cette pathologie ces quarante dernières années, où le taux de survie était alors de 12% à 5 ans et 6% à 10 ans.

II. L'apoptose

A. Généralités et caractéristiques

L'apoptose est un processus très conservé dans l'évolution (Danial and Korsmeyer, 2004; Green and Fitzgerald, 2016), ce qui souligne son importance au sein du monde vivant. Il entre notamment en jeu dans la physiologie de différents mécanismes fondamentaux.

Tout d'abord, l'apoptose joue un rôle dans la gamétogénèse des spermatozoïdes et des ovocytes, en éliminant ceux qui sont mutés ou qui présentent des dommages à l'ADN (Blanco-Rodríguez and Martínez-García, 1998).

Elle joue ensuite un rôle primordial lors du développement embryonnaire (Danial and Korsmeyer, 2004). Elle intervient notamment dans l'étape de post-implantation, pour éliminer les cellules anormales, non fonctionnelles ou mal placées (Jacobson et al., 1997). Plus tard, lors de la formation des mains et de pieds, elle permet l'élimination des cellules interdigitées afin de former des doigts indépendants les uns des autres (Mori et al., 1995).

Tout au long de la vie, ce processus entre en action pour permettre la maintenance de l'homéostasie (Danial and Korsmeyer, 2004). L'une de ses fonctions prépondérante est l'élimination des cellules excédentaires, indésirables (ectopiques, vieilles ou endommagées) ou qui représentent un risque car elles sont mutées (Green and Llamby, 2015). Elle intervient également dans la fonction immunitaire (Fleisher, 1997). Lors de la différenciation des cellules B, par exemple, l'apoptose est en charge de l'élimination des cellules pré-B auto-réactives, ou qui présentent une affinité pour l'antigène faible voire nulle (Howie et al., 1994). Par ailleurs, une fois les antigènes des agents infectieux éradiqués de l'organisme, elle permet l'élimination des nombreux clones lymphocytaires produits. Les lymphocytes T cytotoxiques induisent également ce processus apoptotique au sein de ses cellules cibles, afin de les éliminer de l'organisme (Henkart, 1994; Kagi et al., 1996).

1) Historique

Le terme « apoptose » a été utilisé pour la 1^{ère} fois en 1972, par trois pathologistes de l'université d'Aberdeen (Ecosse) : John Kerr, Andrew Wyllie et Alastair Currie, pour décrire un « mécanisme peu connu de suppression des cellules, qui semble jouer un rôle complémentaire mais opposé à celui de la mitose dans la régulation de la population des cellules animales ». Il provient du grec « apo » qui fait référence à éloignement, et « tose » qui pourrait se traduire par chute, le mot lui-même étant utilisé en grec (αποπτωση) pour désigner la chute des feuilles en automne (Kerr et al., 1972). Dans ce travail, les auteurs associent cette notion avec un ensemble d'événements morphologiques, essentiellement observés par microscopie, comme la formation des corps apoptotiques. Pourtant, bien que ce soit la

première fois que le terme soit apparu, cette notion de mort cellulaire contrôlée est beaucoup plus ancienne. Tout a commencé avec l'établissement de la théorie cellulaire par un botaniste : Matthias Schleiden en 1838, puis par un zoologiste : Theodor Schwann en 1839. Cette théorie a pour principe élémentaire que tous les organismes vivants sont composés d'un ensemble d'unités identiques : les cellules (pour revue, (Ribatti, 2018)). En s'appuyant sur cette théorie, Carl Vogt, un médecin suisse, a peu après décrit (en 1842), le phénomène biologique de mort de ces cellules, qui sera plus tard appelé apoptose. Les connaissances de ce phénomène se sont ensuite approfondies grâce au travail de nombreux chercheurs comme par exemple Walther Flemming (1885), qui améliora les techniques histologiques (fixation, coloration) pour décrire de façon détaillée la mort des cellules épithéliales ovariennes durant l'atrésie folliculaire (pour revue, (Clarke and Clarke, 2012; Maghsoudi et al., 2012)), ou encore Richard Lockshin et Carroll M. Williams qui introduisirent la notion de « programmé », pour parler de ce processus, en décrivant la mort coordonnée des muscles des larves au cours de leur transformation en papillons adultes (Lockshin and Williams, 1965). Pourtant, les travaux les plus importants décrivant ce processus sont assez récents (années 90), avec de nombreuses études menées sur le nématode *Caenorhabditis elegans*. Lors du développement de cette espèce, 1090 cellules somatiques vont être formées, dont 131 meurent *via* le processus apoptotique. Lors de ces études, des larves présentant des défauts d'élimination de ces cellules au cours du développement (à la suite d'une mutagenèse chimique) ont été sélectionnées pour être étudiées. Onze gènes ont été identifiés comme jouant un rôle dans la régulation de l'apoptose chez *C. elegans*. Parmi eux, 2 gènes sont cruciaux pour l'induction de l'apoptose : *ced-3* et *ced-4* (*ced* pour *Caenorhabditis elegans* death). Leurs inactivations par mutation conduit au blocage de l'apoptose dans l'ensemble des cellules de ce vers. A l'inverse, *ced-9*, agit comme un antagoniste de *ced-3* et *ced-4*, puisqu'il permet de promouvoir la survie cellulaire. Une perte partielle de *ced-9* est létale, alors qu'un gain de fonction entraîne un excès cellulaire (Hengartner and Robert Horvitz, 1994). Le clonage des gènes de *C. elegans* a permis de mettre en évidence que des gènes homologues étaient présent chez les mammifères, facilitant ainsi la compréhension du processus de l'apoptose chez de nombreuses espèces, y compris l'humain. Il a ainsi été démontré que *ced-3*, code pour une protéase correspondant chez l'humain aux caspases 3 et 8 (cf. section II-C) (Yuan, 1993). Le gène *ced-4* code quant à lui pour une protéine retrouvée chez les mammifères sous une forme homologue du nom de APAF-1 (cf. section II-C.) (Zou et al., 1997). Pour finir le gène *ced-9*, code pour une protéine homologue de BCL-2 (cf. section II-D) (Hengartner and Horvitz, 1994).

2) Caractéristiques

Aujourd'hui l'apoptose (ou mort cellulaire de type 1) se définit comme un processus physiologique, actif, organisé et conservé, sous le contrôle d'un programme codé génétiquement par la cellule. Elle a un rôle primordial dans divers processus physiologiques et se caractérise principalement, selon le groupe

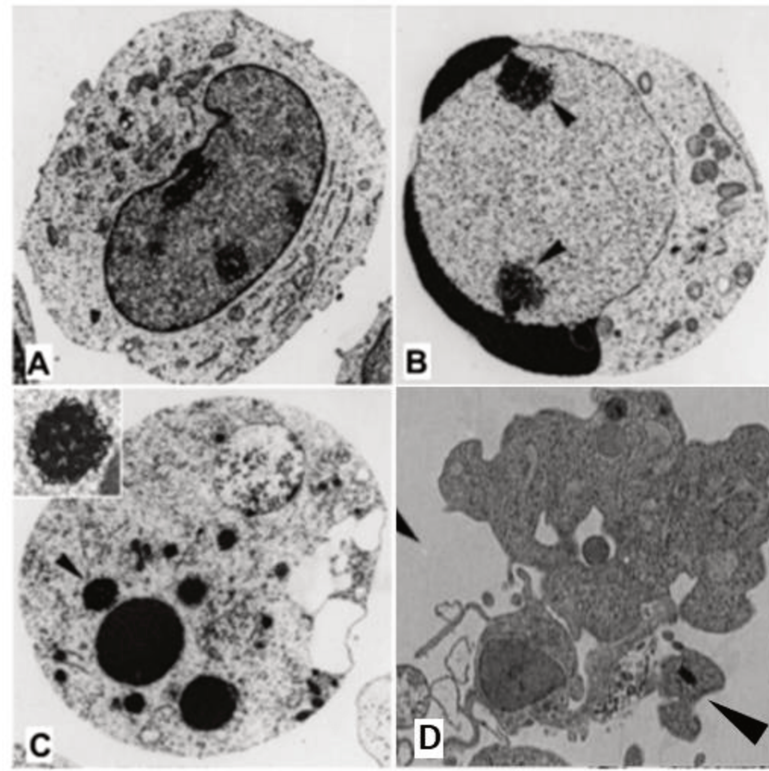


Figure 4 : Caractéristiques morphologiques d'une cellule apoptotique par microscopie électronique à transmission. (A) Cellule de leucémie myéloïde chronique K562 intacte présentant une morphologie normale. (B) et (C) Cellule cultivée pendant 24h en présence d'actinomycine D. (B) Phase précoce de l'apoptose indiquée par la condensation de la chromatine (structure noire le long de la membrane nucléaire). (C) Phase tardive de l'apoptose indiquée par la fragmentation du noyau. Les flèches noires pointent vers les nucléoles. L'encart montre un plus fort grossissement du nucléole restant intact. (D) Cellule traitée 24h avec du 5-FU. Dernière phase de l'apoptose avec la formation des corps apoptotiques indiqués par les flèches noires (échelle : A, C et D = 3 μ m et B = 2 μ m)

Tirée de l'article : Ziegler and Groscurth, 2004

d'expert « Nomenclature Committee on Cell Death », par des critères morphologiques (pour revue : (Galluzzi et al., 2018)), comme cela est illustré sur la figure 4 (Ziegler and Groscurth, 2004):

- Une pycnose nucléaire (ou condensation de la chromatine) dans un premier temps (image B).
- Puis une karyorrhexie (ou fragmentation nucléaire) dans un second temps, qui induit la formation de fragments oligo-nucléosomiques (image C).
- Pour finir, la cellule va subir un rétrécissement et un bourgeonnement jusqu'à la formation de corps apoptotiques, entourés de membranes plasmiques, qui contiennent des organelles cytoplasmiques ou des fragments nucléaires. Ces corps apoptotiques finiront par être phagocytés par les cellules environnantes et dégradés par les lysosomes, sans déclenchement de l'inflammation (image D).

En plus de ces changements morphologiques, la cellule en apoptose va aussi présenter des changements biochimiques. Parmi eux, un clivage de l'ADN double brin va entraîner l'externalisation des phosphatidylsérines membranaires, un phospholipide normalement présent sur la membrane interne des cellules (pour revue, (Lockshin and Zakeri, 2007; Taylor et al., 2008)).

Il existe par ailleurs d'autres formes de morts cellulaires, résumées ci-dessous :

- La mort cellulaire par autophagie (type 2), un processus beaucoup plus lent, caractérisé par une limitation spatiale, où le cytoplasme est tour à tour séquestré dans des vacuoles (à double membrane), puis digéré par des hydrolases lysosomales (Levine, 2005). Ce processus d'autodigestion peut également être impliqué dans survie cellulaire, ou utilisé comme une voie de signalisation alternative de mort cellulaire. Dans ce dernier cas, l'autophagie influence directement et indirectement le processus apoptotique. Le terme de mort autophagique est alors utilisé (Maiuri et al., 2007).
- La mort cellulaire par nécrose (type 3), caractérisée par une rupture de la membrane plasmique dû à une augmentation du volume cellulaire (oncoses), sans pour autant présenter les caractéristiques de l'apoptose (pycnose, karyorrhexie ...), ou de l'autophagie (vacuolisation massive) (Golstein and Kroemer, 2007). La nécrose, contrairement à l'apoptose, génère une réaction inflammatoire de l'organisme.

On peut aussi noter que d'autres formes de mort cellulaire (ferroptose, necroptose, pyroptose...), qui présentant des caractéristiques et des mécanismes spécifiques, ont également été décrites ces dernières années.

B. Les voies de signalisations de l'apoptose

L'apoptose n'est pas un processus constitutif, c'est-à-dire qu'elle n'est pas réalisée en permanence. Au contraire, elle intervient uniquement à la suite d'un stimulus, qui peut être de différentes

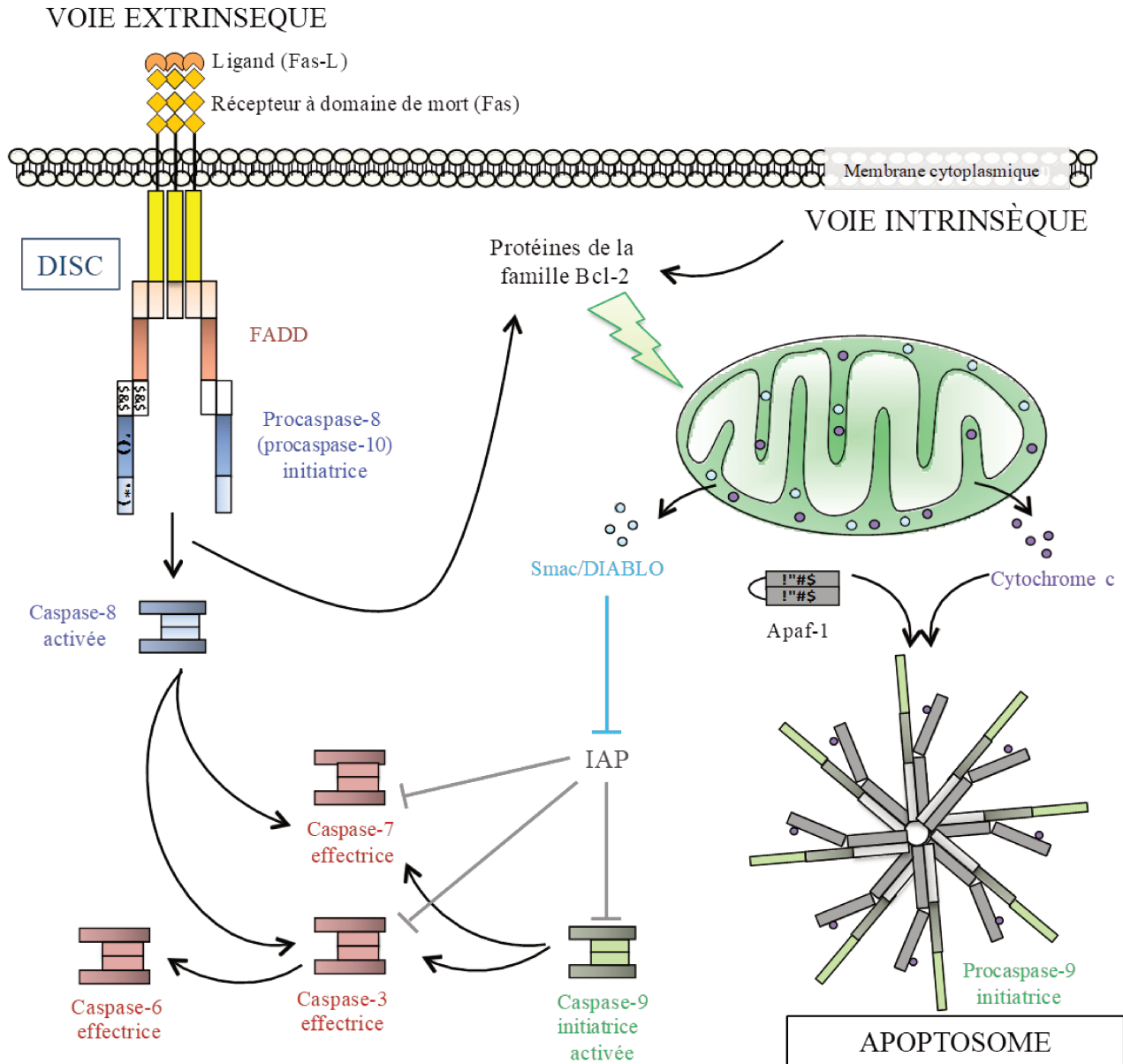


Figure 5 : Description des voies d'activation de l'apoptose extrinsèque (1) et intrinsèque (2). (1) Implication d'un récepteur qui, activé par son ligand va recruter un adaptateur permettant le recrutement de caspases initiateurs. Après s'être auto-activée ces caspases initiateurs vont activer les caspases effectrices, ou déclencher la voie d'apoptose intrinsèque. (2) Face à un signal, l'équilibre entre pro-et anti-apoptotiques va être rompu entraînant la libération et l'activation de BAX et BAK. Ces 2 protéines vont alors être capables de perméabiliser la membrane, permettant la libération de facteurs apoptogènes : cytochrome c et SMAC/DIABLO. Le 1^{er} va permettre avec la protéine APAF1 et la procaspase 9 de former un complexe permettant l'activation de cette dernière. Cette caspase initiateur va alors permettre l'activation des caspases dites effectrices et donc d'induire l'apoptose. SMAC/DIABLO va lever une inhibition exercée par les XIAP sur les caspases permettant de rétablir l'apoptose.

Tirée de la thèse de Justine DEBERNARDI

natures : dommage à l'ADN, environnement trop pauvre en facteurs de croissances, stimulation des récepteurs de morts, irradiation, hypoxie, ... L'un des acteurs majeurs dans le déclenchement de l'apoptose est la protéine P53. En cas de stress cellulaire ou de dommage à l'ADN, celle-ci, grâce à son activité de facteur de transcription, est capable d'induire l'arrêt du cycle cellulaire et la réparation de l'ADN. Cependant, si les dommages sont trop importants, elle favorise l'entrée des cellules en apoptose.

En fonction du stimulus, une des deux voies menant à l'apoptose est activée (Figure 5), ce qui conduit à l'activation des caspases effectrices, à l'origine de la mort de la cellule. Ces deux voies sont dites :

- Extrinsèque quand elle fait intervenir des récepteurs à « domaines de mort ».
- Intrinsèque quand elle est initiée à l'intérieur de la cellule au niveau des mitochondries.

1) *La voie extrinsèque*

La voie extrinsèque de l'apoptose est enclenchée par des perturbations du micro-environnement extracellulaire qui sont détectées par des récepteurs transmembranaires, qui vont alors induire une signalisation conduisant à l'activation des caspases. Cette voie peut impliquer des récepteurs transmembranaires de 2 types :

- Les récepteurs à domaines de mort, dont la simple fixation du ligand entraîne le déclenchement de la voie apoptotique.
- Les récepteurs à dépendance, qui s'activent et induisent l'apoptose lorsque la quantité de ligands fixés tombe sous un certain seuil.

Les récepteurs à domaines de mort

Les récepteurs à domaines de mort, sont des membres de la superfamille du TNF (Tumeur Necrosis Factor), parmi lesquels on trouve le récepteur FAS (FasR/CD95) , le récepteur 1 du TNF (TNFR1), ou encore le « TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor 1 » (TRAILR1/DR4) (Dickens et al., 2012). Dans la plupart des cas, une fois activé par la fixation de son ligand, le récepteur va changer de conformation afin de dévoiler un domaine particulier : le DD (Death Domain). Cela a pour conséquence la formation d'un complexe multiprotéiques appelé DISC (Death-Inducing Signaling Complex). Ce complexe est possible grâce à l'intervention d'un adaptateur : FADD (Fas associated *via* death domain) ou TRADD (TNFRSF1A associated *via* DD) respectivement associé à FasR et TNFR1 ou TRAILR. Ils vont être le lien entre le récepteur et les pro-caspases (Chinnaiyan et al., 1995). En effet, ils possèdent un DD leur permettant d'interagir avec le récepteur de mort et un DED (Death Effector Domain) conduisant à une liaison avec les pro-caspases initiatrices, comme la pro-caspase 8 (ou la pro-caspase 10 dans certains cas) (Dickens et al., 2012a) (cf. section II-C). Le complexe DISC permet de faciliter l'homo-dimérisation des pro-caspases, ce qui induit leur auto-clivage protéolytique qui aboutit à la formation de caspases actives (Dickens et al., 2012b). Ce mécanisme peut être régulé par c-FLIP, un

homologue des pro-caspases 8 et 10, qui interagit à la place de ces deux protéases avec FADD dans le complexe DISC et empêche ainsi leur clivage et donc leur activation en caspases (Scaffidi et al., 1999). L'activation de ces caspases initiateurs déclenche deux voies de signalisation distinctes : dans les cellules de « type I » (les thymocytes et les lymphocytes matures par exemple), les caspases initiateurs clivent directement d'autres caspases (3 et 7) dites « effectrices » (Barnhart et al., 2003) qui induisent alors l'apoptose. Dans les cellules de « type II » (les hépatocytes, les cellules pancréatiques β , et la plupart des cellules cancéreuses), cette activation ne se fait pas, notamment parce que la protéine XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis), appartenant à la famille des IAPs, (Inhibitor of Apoptosis Proteins) se fixe sur les pro-caspases, au niveau de leur site de clivage, inhibant ainsi leur activation (Jost et al., 2009). Dans ce cas, la caspase 8 déclenche la voie d'activation de l'apoptose intrinsèque en clivant BID, une protéine de la famille BCL-2 (Li et al., 1998). Cette forme tronquée de BID (tBID) participe ensuite à la perméabilisation de la membrane mitochondriale (Fischer et al., 2006), permettant de libérer SMAC/DIABLO de l'espace inter-membranaire mitochondriale, une protéine qui va spécifiquement se lier et inhiber XIAP. Cette inhibition permet de rétablir l'activation des pro-caspases 3 et 7 (Gao et al., 2007). A travers le clivage de BID, la voie extrinsèque de l'apoptose permet d'activer de façon tardive, la voie intrinsèque de l'apoptose (section II-B).

Les récepteurs à dépendance

Parmi les récepteurs à dépendance, on peut citer par exemple, les récepteurs de la nétrine 1 (NTR1), les récepteurs de la neutrophine, ou encore les récepteurs de sonic hedgehog (SHH) (Goldschneider and Mehlen, 2010). En condition physiologique, en particulier lorsque leurs ligands sont disponibles, ces récepteurs favorisent la survie cellulaire, la prolifération et la différenciation. En revanche, lorsque la concentration en ligand est trop faible, ils induisent l'apoptose (Goldschneider and Mehlen, 2010; Mehlen and Tauszig-Delamasure, 2014). Ce mécanisme n'est pas encore tout à fait bien élucidé. Chaque famille possède son propre mode d'action, qui se termine par la dimérisation des pro-caspases 9 ou/et 3. Cette dimérisation est à l'origine de l'activation de ces protéases, conduisant à la mort de la cellule.

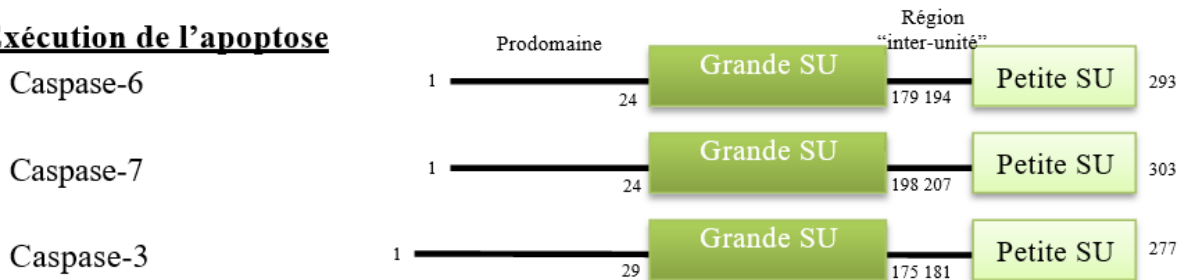
Le fonctionnement de ces récepteurs à dépendance est affecté dans de nombreuses pathologies (Mehlen and Tauszig-Delamasure, 2014). En effet, certaines cellules cancéreuses surexpriment les ligands de ces récepteurs, favorisant ainsi leur survie et leur prolifération. L'expression de ces récepteurs est aussi fréquemment réduite, voire inhibée au sein de ces cellules cancéreuses, suite à des mutations, des modifications épigénétiques ou des modulations de leur transcription ou de leur traduction (Bernet et al., 2007; Fitamant et al., 2008; Grandin et al., 2016). Cependant, jusqu'à maintenant, aucune preuve directe ne permet d'associer cela avec la résistance à l'apoptose extrinsèque, médiée par ces récepteurs à dépendance.

2) La voie intrinsèque

Cette voie de l'apoptose est caractérisée par des perturbations du microenvironnement intra- ou extracellulaire. Elle est principalement déclenchée par la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe (MOMP : mitochondrial outer membrane permeabilization), qui conduit à l'activation des caspases effectrices (en particulier la caspase 3). Les perturbations à l'origine du déclenchement de cette voie intrinsèque peuvent être de différentes natures : un manque de facteur de croissance (Nuñez et al., 1990), des dommages à l'ADN (Grandin et al., 2016), un stress du réticulum endoplasmique (Pihán et al., 2017), une surcharge des espèces réactives à l'oxygène (ROS), un stress de la réplication, une altération du réseau de microtubules ou encore un défaut de mitose. Comme cela vient d'être mentionné, la perméabilisation de la mitochondrie est une étape clef dans ce processus (Galluzzi et al., 2016; Tait and Green, 2010). Elle est conditionnée et régulée par une famille de protéine, la famille BCL-2 (Czabotar et al., 2014) (présentée dans la section II-D), et permet la libération cytosolique de facteurs apoptogènes contenus dans l'espace intermembranaire de la mitochondrie (Tait and Green, 2010). Les deux principaux facteurs apoptogènes sont le cytochrome c (Li et al., 1997), et DIABLO (diablo IAP-binding mitochondrial protein) aussi connu sous le nom de SMAC (second mitochondrial activator of caspases) (Du et al., 2000). Le cytochrome c va se lier à une peptidase (APAF1), ainsi qu'à la procaspase 9. L'activation de la caspase 9 au sein de ce complexe (appelé apoptosome), nécessite de l'énergie, qui est apportée par l'hydrolyse d'une molécule d'ATP en dATP (Li et al., 1997). La caspase 9 catalyse alors l'activation protéolytique des caspases 3 et 7, responsables de la « démolition » intracellulaire (cf. section II-C). La protéine SMAC libérée dans le cytoplasme active quant à elle, l'apoptose d'une manière indirecte, *via* l'inhibition de XIAP, une protéine qui bloque physiquement les caspases (Eckelman and Salvesen, 2006; Eckelman et al., 2006). En effet, SMAC s'associe avec cette protéine XIAP pour empêcher qu'elle joue son rôle et rétablit ainsi la fonction de ces caspases (Verhagen et al., 2000). D'autres facteurs apoptogènes libérés dans le cytoplasme lors de la perméabilisation de la mitochondrie interviennent dans le processus apoptotique de façon indépendante des caspases ou non :

- AIF (apoptosis inducing factor mitochondria associated 1) qui est transloquée au niveau du noyau où elle participe à la fragmentation de l'ADN et la condensation de la chromatine (Wang, 2004). Outre son rôle dans l'apoptose, cette oxydoréductase intervient aussi dans des conditions physiologiques sur l'activité mitochondriale et notamment sur la maintenance des complexes respiratoires.
- L'endonucléase G, qui a montré un rôle similaire (fragmentation de l'ADN et condensation de la chromatine) chez *Saccharomyces cerevisiae*, *Caenorhabditis elegans*, et chez la Drosophile, et dont l'activité chez les mammifères est probablement identique (Li et al., 2001).

Exécution de l'apoptose



Initiation de l'apoptose

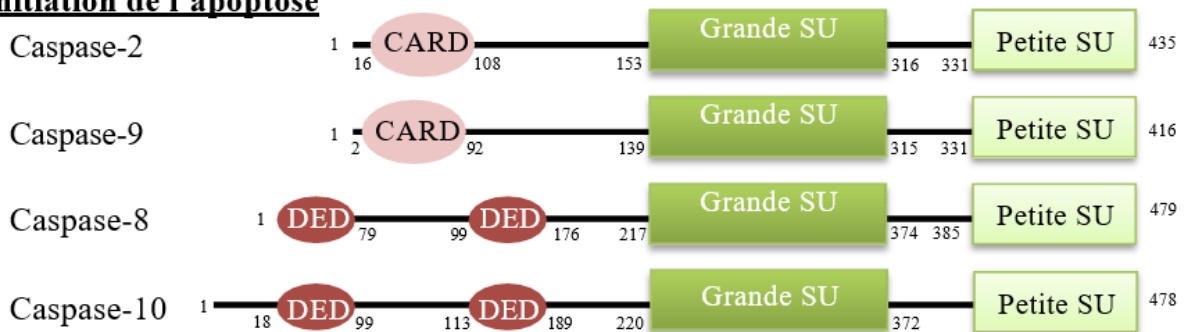


Figure 6 : Organisation des caspases humaines. Les caspases sont regroupées d'après leur fonction. Chaque caspase possède un prodomaine en N-terminale, une grande (p20) et une petite (p10) sous-unités séparées par une région de liaison dite « inter-unité ». Les chiffres au-dessous des domaines des caspases correspondent aux numéros des acides aminés.

(CARD: caspase recruitment domain, DED: death effector domain, SU: sous-unité)

Tirée de l'article : MacKenzie and Clark, 2012

- CAD (caspase-3-activated DNase) : après clivage par la caspase 3 du complexe CAD/iCAD (inhibitor of CAD), CAD, une DNase, va être transloquée au noyau, là aussi pour impacter sur la fragmentation de l'ADN (Sakahira et al., 1998).

C. Rôle des caspases

Quelle que soit la voie de signalisation empruntée, cela conduit toujours à l'activation des caspases. Ces protéines appartiennent à la famille des protéases à cystéine, c'est-à-dire qu'elles possèdent un site catalytique comprenant une cystéine. Pour rappel, leur implication dans le processus apoptotique avait été découvert *via ced-3*, un exécuter de la mort cellulaire du nématode *C. elegans*, présentant de fortes homologies avec la protéine humaine caspase-1 (Ellis, 1986). Ces protéases, anciennement appelées ICE pour Interleukine 1β -Converting Enzyme, sont désormais appelées caspases pour Cysteine-dependent ASpartate-specific proteASE. Les caspases sont synthétisées sous forme de zymogènes immatures, appelés pro-caspases, nécessitant une protéolyse pour être actifs. Les formes actives sont caractérisées par une activité catalytique au niveau d'un résidu acide aspartique (Degterev et al., 2003).

Comme le montre la figure 6, toutes les caspases présentent une structure très conservée (MacKenzie and Clark, 2012) comprenant :

- Un pro-domaine N-terminal de taille variable. Une forme longue est composée d'un domaine DED (Death Effector Domain), ou d'un voire deux domaines CARD (Caspase Activation and Recruitment Domain) permettant les liaisons protéiques.
- Un domaine qui, après clivage, formera la grande sous-unité catalytique L (également appelée p20)
- Un domaine qui, après clivage, formera la petite sous-unité catalytique S (également appelée p10)

Les caspases sont classées selon leur fonction. Parmi les 13 caspases décrites chez l'humain, 7 nous intéressent dans l'induction de l'apoptose ; 4 d'entre elles sont dites initiatrices (caspases 2 ; 8 ; 9 ; 10) et 3 sont dites effectrices (caspases 3 ; 6 ; 7). La caspase 6 est considérée ici comme une caspase effectrice, même si de récentes données indiquent qu'il faudrait plutôt la considérer comme une caspase initiatrice (Julien and Wells, 2017).

Les caspases initiatrices (caspases 2, 8, 9, 10) : Elles se caractérisent par un grand domaine N-ter, dû à la présence des domaines d'interactions DED ou CARD. Les caspases 8 et 10 sont initialement impliquées dans la voie extrinsèque de l'apoptose alors que la caspase 9, quant à elle, est plutôt impliquée dans la voie intrinsèque. Elles sont recrutées grâce à leur domaine d'interaction par des complexes protéiques comme le DISC ou l'apoptosome, facilitant ainsi leur homo-dimérisation, et donc

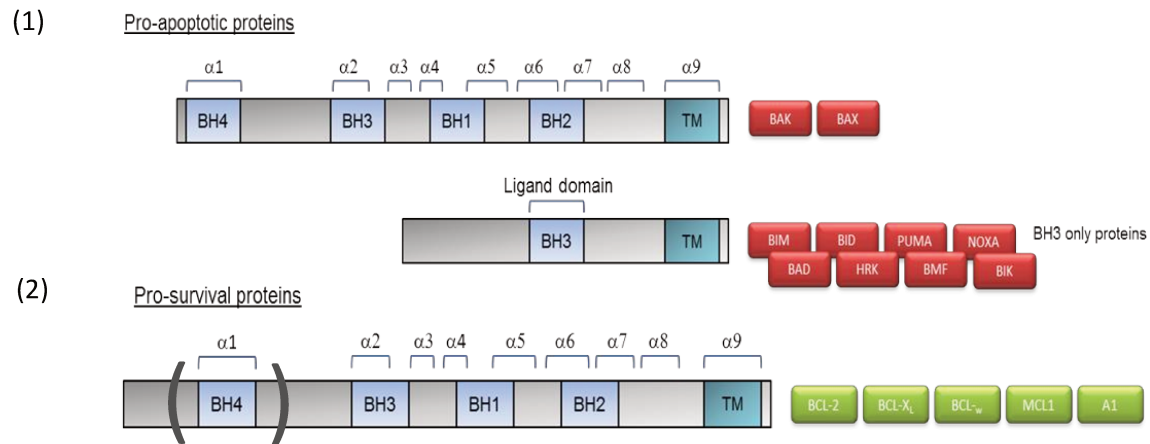


Figure 7 : Les protéines de la famille BCL-2. (1) les membres pro-apoptotiques sont divisés entre les membres effecteurs BAK et BAX, et les BH3-only. (2) les membres anti-apoptotiques présentent quant à eux une structure proche. Tous ont en commun le domaine d'homologie BH3, leur permettant d'interagir entre eux.

leur auto-activation (Dickens et al., 2012b; Li et al., 1997). Une fois activées, ces caspases initiateuses participent directement au clivage et à l'activation des caspases 3 et 7 pour lesquelles elles possèdent une forte affinité (Muzio et al., 1997; Stennicke et al., 1998).

Les caspases effectrices (caspases 3, 6 et 7) : Elles se caractérisent par un court domaine N-Ter. Souvent activées directement par les caspases initiateuses, elles sont responsables de la mort des cellules *via* une implication dans différents mécanismes : la fragmentation de l'ADN (Nagata, 2005), l'exposition des phosphatidylsérines à la surface externe des cellules (Naito et al., 1997), et la formation des corps apoptotiques (Sebbagh et al., 2001). Pour cela, ces caspases possèdent de nombreuses cibles du cycle cellulaire (MDM2, p21, p27), du métabolisme de l'ADN (PARP, topoisomérase I) et de l'ARN, des facteurs de transcription (NF- κ B, I κ B- α), des protéines du cytosquelette (Actine, β -caténine, fodrine), des kinases (Akt/PKB, MEKK1, PKC) et phosphatases (PP2A), ... Ces caspases sont également capables de former une boucle d'amplification de l'apoptose, puisqu'elles peuvent cliver les protéines anti-apoptotiques de la famille BCL-2 pour les convertir en des facteurs pro-apoptotiques (Cheng, 1997; Kirsch et al., 1999).

Comme cela a été évoqué précédemment, les caspases sont étroitement régulées par des protéines inhibitrices de l'apoptose : les IAPs (Inhibitor of Apoptosis Proteins), comprenant notamment XIAP, la protéine la mieux caractérisée de cette famille (Salvesen and Duckett, 2002). Tant que la cellule n'émet pas de signal pro-apoptotique, les IAPs sont liées aux caspases les empêchant d'induire l'apoptose. Lors de l'activation de l'apoptose, différentes protéines sont libérées dans le cytosol pour se lier aux IAPs et libérer les caspases. Parmi elles, SMAC, mentionnée précédemment, est la plus connue.

D. Rôle de la famille BCL-2

Comme nous venons de le voir dans le chapitre sur la voie intrinsèque de l'apoptose, la famille BCL-2 semble jouer un rôle majeur dans la régulation de ce processus. Historiquement, le premier membre découvert de cette famille fut l'onco-protéine BCL-2 (B-cell lymphoma-2), ce qui explique pourquoi elle a donné le nom à toute la famille. Elle a été identifiée lors de l'étude moléculaire de la translocation chromosomale t(14 ; 18) du lymphome folliculaire de type B (Tsujimoto et al., 1985). Depuis, une vingtaine de membres ont pu être identifiés. Dans cette thèse, nous allons nous intéresser plus précisément à un membre de cette famille : la protéine anti-apoptotique MCL-1, pour Myeloid Cell Leukemia sequence 1 (anciennement appelé BCL2L3). Elle a été découverte dans la lignée myéloïde ML-1 (Myeloid Leukemia-1) comme facteur oncogène (Kozopas et al., 1993). Cette protéine, bien que membre à part entière de cette famille, n'en reste pas moins assez particulière sur de nombreux aspects. Même si elles ne sont pas systématiquement localisées dans la mitochondrie, c'est très majoritairement au niveau de cet organelle que les protéines de la famille BCL-2 agissent.

1) *Classification des membres de la famille BCL-2*

Comme le montre la figure 7, toutes ces protéines sont caractérisées par la présence d'au moins un domaine BH (pour BCL-2 Homology). Ce domaine hautement conservé, se décline sous 4 versions différentes (BH-1/-2/-3/-4) (Reed et al., 1996). Parmi ces domaines BH, le domaine BH-3 est particulièrement intéressant puisqu'il est retrouvé sur l'ensemble des protéines de la famille BCL-2. C'est lui qui permet aux différents membres d'interagir entre eux pour former des hétérodimères, indispensables pour la régulation de l'apoptose, et des homodimères pour perméabiliser la membrane mitochondriale (Vander Heiden and Thompson, 1999).

En plus de ce domaine commun, la plupart des membres de cette famille présentent également une queue C-Ter hydrophobe et transmembranaire (domaine TM), leurs permettant une localisation membranaire au niveau des mitochondries (Green and John C. Reed, 1998). Ce domaine permet également à ces protéines de s'ancrer sur d'autres organites, telles que le réticulum endoplasmique (RE) ou le noyau (Vander Heiden and Thompson, 1999).

Les protéines de la famille BCL-2 sont classées selon leur fonction : anti-apoptotique et pro-apoptotique. Au sein de cette dernière sous-famille, elles sont distinguées en fonction du nombre de domaine BH qu'elles contiennent.

(a) *Les protéines anti-apoptotiques*

(1) *Généralités*

Ce groupe comprend les protéines : BCL-2, BCL-xL (B-cell Lymphoma extra-large), BCL-W (BCL-2-like protein 2), MCL-1 (Myeloid cell leukemia sequence 1), BCL2A1 (Bcl-2 related protein A1), et BCL-B (BCL-2 like protein 10). Une des particularités des membres de cette sous-famille est la présence des quatre domaines BH (BH-1/-2/-3/-4), exception faite pour MCL-1 qui ne présente pas le BH-4 (Day et al., 2005). Ces protéines sont composées de neuf hélices α , mais seules huit d'entre elles participent à la formation d'un repliement caractéristique. Ce repliement génère la formation d'un faisceau hélicoïdal entourant une poche hydrophobe (ou sillon hydrophobe). Ce sillon est composé des hélices α_2 , α_3 , α_4 et α_5 et permet les interactions avec le domaine BH-3 des protéines pro-apoptotiques. La majorité de ces hélices sont amphiphiles, exceptées les hélices α_5 et α_9 qui sont hydrophobes. L'hélice α_9 participe d'ailleurs à la formation du domaine TM (Birkinshaw and Czabotar, 2017).

Bien que souvent évoquées pour leur participation au processus tumoral en inhibant l'apoptose, ces protéines sont également très importantes en conditions physiologiques. Ainsi, BCL-xL, joue un rôle crucial dans la survie des plaquettes (Mason et al., 2007) et BCL-2 est impliqué dans le système immunitaire (Veis et al., 1993).

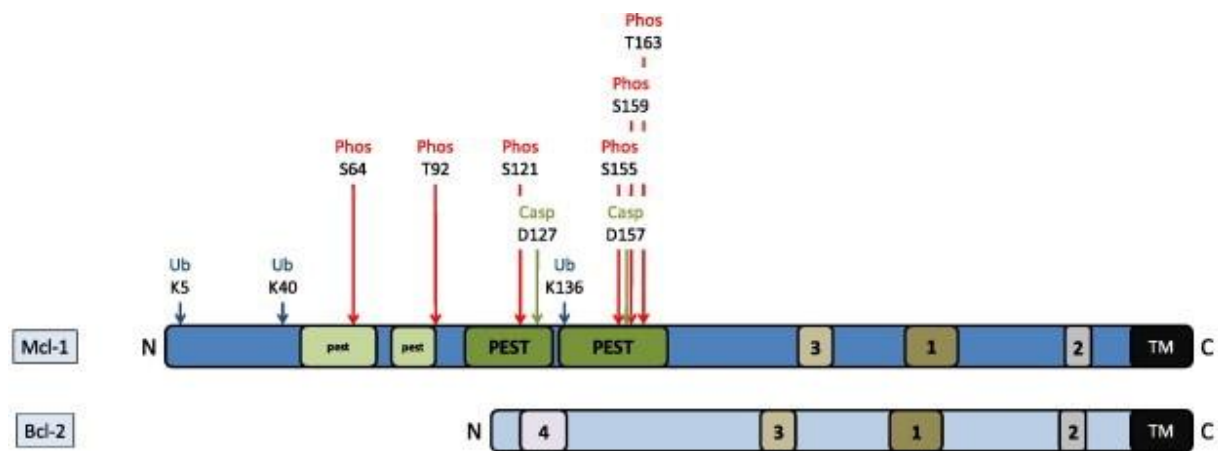


Figure 8 : Structure moléculaire de MCL-1 comparée à celle de BCL-2, un autre anti-apoptotique de la famille BCL-2.

D'après : Thomas et al., 2010

En plus de leur rôle de régulateur du processus apoptotique, ces protéines anti-apoptotiques préviennent également d'autres phénomènes. Par exemple, elles jouent un rôle de prévention dans le gonflement de la matrice mitochondriale, dans les dommages liés aux espèces réactives à l'oxygène, et dans la perturbation des échanges ATP/ADP, entre la matrice mitochondriale et le cytosol (Harris and Thompson, 2000).

(2) MCL-1, un membre à part

(i) Structure

Issue d'un gène situé sur le bras long du chromosome 1 (1q21.2), cette protéine peut se retrouver sous forme de deux isoformes différentes, à la suite d'un épissage alternatif. L'isoforme longue (MCL-1L) est celle qui va concentrer toutes nos recherches et sera appelée MCL-1. La forme courte de cette protéine (MCL-1S), issue de la perte de l'exon 2, est tronquée au niveau C-Terminal (C-ter). Elle ne contient pas les domaines BH1 et BH2 ainsi que la région TM, ce qui va impacter sa localisation (Akgul et al., 2000a). Une autre forme de MCL-1 (MCL-1ES), issue de la perte de l'exon 1, est tronquée en N-terminal au niveau de la région PEST, mais présente les trois domaines BH et la région TM. Ces formes courtes ne peuvent pas interagir avec les protéines pro-apoptotiques de la famille BCL-2. Elles ne seraient donc pas directement associées à la voie de régulation intrinsèque de l'apoptose. En revanche, il a été montré que MCL-1S et MCL-1ES ont la capacité de co-précipiter avec MCL-1L dans des cellules de mammifères, et que leur surexpression induit l'apoptose. Il se peut donc qu'elles agissent dans cette voie d'induction de l'apoptose, en tant que membre pro-apoptotique de type *BH3-only*. La régulation du gène de MCL-1, à travers son épissage, serait donc une plaque tournante de la régulation de l'apoptose (Bae et al., 2000; Kim et al., 2009b). Plus récemment, une autre isoforme de MCL-1 a pu être identifiée (Perciavalle et al., 2012). Tronquée au niveau des acides aminés N-ter nécessaires pour sa localisation dans la matrice et la membrane interne mitochondriale, cette isoforme va être impliquée dans de nombreuses fonctions (voir ci-après) qui jusqu'ici n'étaient pas associées à cette protéine. Cette isoforme serait due à une traduction non-canonique, ne passant pas par le site d'initiation classique (Shore and Warr, 2008).

Ainsi, même si elle appartient aux membres anti-apoptotiques de la famille BCL-2, MCL-1 présente de nombreuses particularités. Tout d'abord, sa région N-Terminale (N-ter) est beaucoup plus grande (350 résidus) que celles de BCL-2 (239 résidus) et BCL-xL (233 résidus) (Figure 8). Ce sont les résidus compris entre 170 et 300 qui sont structurellement proches de ceux de BCL-2 et BCL-xL, même si elle ne présente que trois domaines BH, (Lutz, 2000). Les résidus compris entre 1 et 170, prédisent une faible complexité structurale, mais contiennent de nombreux sites de régulation. Cette région N-ter est très riche en proline (P), en acide glutamique (E), en sérine (S) et en thréonine (T), sous forme de domaines, appelés les domaines PEST (Figure 8) (Delbridge and Strasser, 2015). Or il est connu que ces domaines, ainsi que les paires d'arginine (A), présentes à quatre endroits distincts, sont directement

impliqués dans la régulation de MCL-1, en promouvant notamment sa dégradation ou alors sa stabilisation. Au sein de cette région N-ter, certains résidus jouent un rôle particulier :

- S64, T92, S121, S155, S159, et T163 = site de phosphorylation
- D127 et D157 = site de clivage par les caspases
- K5, K40, K136 = site d'ubiquitinylation

La localisation mitochondriale de MCL-1 est importante dans la régulation de l'apoptose. Celle-ci est possible grâce à la présence au sein de la protéine MCL-1, de plusieurs sites : une séquence comprenant les résidus 1 à 79 (mécanisme non élucidé) (Germain and Duronio, 2007), une séquence comprenant les résidu E-E-L-D (placés entre les résidus 124-127) qui permet une interaction avec le récepteur TOM-70, impliqué dans l'adressage à la mitochondrie (Chou et al., 2006) et à la région TM situé en C-ter.

(ii) Localisation tissulaire et cellulaire

MCL-1 est, comme les autres membres anti-apoptotiques, largement exprimée au sein des tissus, mais elle possède sa propre distribution (Krajewski et al., 1995). On la retrouve en abondance dans les cellules épithéliales de nombreux tissus comme la prostate, le sein, le tractus intestinal. Contrairement à ses homologues, elle est retrouvée en plus grande quantité dans les cellules plus différenciées des couches supérieures de ces épidermes. Elle est également largement présente au niveau des cellules cardiaques, où elle joue un rôle crucial dans leur fonctionnement (voir ci-après) (Wang, 2015).

Au niveau intracellulaire, elle est localisée au niveau de nombreuses membranes y compris la membrane mitochondriale (Akgul et al., 2000a), et l'enveloppe nucléaire (Leuenroth et al., 2000). Cependant, elle est également fortement localisée au sein du cytosol (probablement sous forme d'un hétérodimère avec BAX) et parfois en intranucléaire (Thomas et al., 2010). Plus récemment, MCL-1 a aussi été observée au niveau de la matrice mitochondriale (Perciavalle et al., 2012), là où sont également retrouvées les ribosomes, le matériel génétique et l'ensemble de la machinerie enzymatique.

(iii) Fonctions

MCL-1 est connue pour son implication dans de nombreux processus de l'organisme, tout au long de la vie. Tout d'abord, la survie de nombreux types cellulaires est dépendante de l'expression de MCL-1, en particulier lors du développement. Une délétion de MCL-1 est létale chez les embryons de souris (Rinkenberger et al., 2000), ce qui n'est pas le cas des autres protéines anti-apoptotiques. MCL-1 est également requise dans le développement et la maintenance des lymphocytes T et B (Opferman et al., 2003). En réalité c'est dans tout le système hématopoïétique que MCL-1 est impliquée, puisqu'elle est essentielle pour la survie des cellules souches hématopoïétiques (Opferman, 2005), en particulier les neutrophiles et les macrophages (Edwards et al., 2004; Steimer et al., 2009). Moins connu mais tout aussi important, la protéine MCL-1 est impliquée dans le développement neural (Arbour et al., 2008),

et permet la survie des fibroblastes synoviaux (Liu et al., 2005). De plus, le rôle anti-apoptotique de MCL-1 est essentiel pour permettre de conserver une fonction cardiaque normale. En effet, la perte de MCL-1 dans les cellules cardiaques mène à un dysfonctionnement rapide et létal de la fonction cardiaque, caractérisée par un manque de contractilité, une fibrose interstitielle et des anomalies structurales des fibres musculaires. Ces dysfonctionnements sont totalement abolis en cas de co-délétion de MCL-1 avec BAK et BAX, démontrant que ces effets sont dépendants de la voie mitochondriale de l'apoptose (Wang et al., 2013). Cependant, une autre étude a montré que la perte de MCL-1 dans les cellules cardiaques de l'adulte induit aussi un dysfonctionnement de la mitochondrie lié à un défaut du processus d'autophagie (Thomas et al., 2013a).

En plus de son implication dans la survie et la régulation de l'apoptose, MCL-1 est impliquée dans le cycle cellulaire. En interagissant avec CDK-1 (cyclin dependent kinase 1), un fragment de MCL-1, snMCL-1, peut retarder la progression du cycle (Jamil et al., 2005). Cette fonction est aussi possible grâce aux interactions de MCL-1 avec PCNA (proliferating cell nuclear antigen), une protéine qui joue un rôle important dans la réplication de l'ADN, mais également dans la régulation du cycle cellulaire, et dont MCL-1 possède le motif de liaison (Fujise et al., 2000). Par ailleurs, snMCL-1 peut aussi interagir avec CHK-1 (checkpoint 1-protein), un régulateur des réponses aux dommages à l'ADN (Jamil et al., 2008). MCL-1 permet également de faire un lien entre apoptose et autophagie, puisque en interagissant avec Beclin-1, dont la structure se rapproche de celle des *BH3-only*, elle va être liée à l'inhibition du processus d'autophagie (Erlich et al., 2007).

D'autres fonctions de MCL-1 ont été mises en lumière récemment. En effet, il a été démontré que MCL-1 était capable d'interagir avec DRP1 (dynamin-related protein-1), une protéine impliquée dans la fission mitochondriale, afin d'induire ce processus en réponse soit à la surexpression de MCL-1 soit à différentes contraintes (carence en nutriment, hypoxie) connues pour perturber la morphologie de ces organites (Moyzis et al., 2020). Cela permet notamment de lutter contre la mort cellulaire associée à un manque de nutriment, et ce, à travers un mécanisme totalement indépendant de l'implication du domaine BH3.

Les principales fonctions connues de MCL-1 détaillées ci-dessus sont toutes associées à une localisation sur la membrane externe des mitochondries. Mais comme nous l'avons vu précédemment, MCL-1 peut également se localiser à d'autres endroits que la membrane externe des mitochondries, comme par exemple dans la matrice des mitochondries. Là, elle est notamment impliquée dans de nombreuses fonctions non-canoniques, telles que le maintien de la structure des mitochondries, et notamment de sa membrane interne, dans la fission mitochondriale (rôle qu'elle partage avec la protéine MCL-1 entière localisée à la membrane externe des mitochondries) et dans la maintenance des réseaux réticulés des mitochondries (Perciavalle et al., 2012). La perte de MCL-1 localisée au niveau de la matrice semble

également impliquée dans la production d'énergie, à travers la régulation de l'assemblage des oligomères d'ATP-synthétase et du processus de phosphorylation oxydative (Perciavalle et al., 2012). L'implication de MCL-1 dans le processus de phosphorylation oxydative s'explique probablement par le fait que MCL-1 participe au maintien du potentiel de la membrane interne des mitochondries, élément indispensable pour former un gradient de protons, facteur clef de la synthèse d'ATP. En plus de son rôle important dans la phosphorylation oxydative, il semblerait que MCL-1 puisse aussi moduler la formation de superoxyde (Perciavalle et al., 2012), des radicaux pouvant être très toxiques pour la cellule. Pour finir, cette localisation de MCL-1 permettrait une interaction, *via* son hélice- α , avec VLCAD (very long-chain acyl-CoA dehydrogenase), une enzyme clef dans la voie d'oxydation mitochondriale des acides gras- β . Cela aurait pour conséquences de pouvoir réguler le métabolisme des lipides, en réponse à un manque de nutriments (Escudero et al., 2018).

En plus de sa fonction dans la régulation apoptotique, il apparaît donc que MCL-1 joue également un rôle dans le métabolisme mitochondrial en intervenant à différents niveaux : le maintien structural de la mitochondrie, la respiration mitochondriale, et le métabolisme des lipides. Le rôle de MCL-1 dans le métabolisme représente une fonction à part-entière de cette protéine, très différente du rôle qui lui est d'habitude attribué, mais tout aussi importante. En effet, il semblerait que la survie des neurones (Anilkumar et al., 2020), et des cellules cardiaques (Moyzis et al., 2020), en soit dépendante en cas de stress.

(b) Les protéines pro-apoptotiques

Comme indiqué sur la figure 7, les protéines de ce groupe peuvent être subdivisées en deux sous-familles : les pro-apoptotiques effectrices BAX et BAK (et BOK) et les *BH3-only*.

(1) BAX et BAK (et BOK)

Parmi les pro-apoptotiques, BAX et BAK, des protéines pro-apoptotiques effectrices, présentent une structure différente : elles possèdent les 4 domaines d'homologie BH. A l'état physiologique BAK réside sur la membrane des mitochondries grâce à son hélice $\alpha 9$, mais également grâce à d'autres domaines indépendants de cette hélice $\alpha 9$ (Landeta et al., 2011). Au contraire, BAX est présent dans le cytoplasme, car son hélice $\alpha 9$ est masquée par son sillon hydrophobe (Suzuki et al., 2000). Il apparaîtrait également que BAX possède deux sites d'activation : un site homologue à ceux présentés par les protéines anti-apoptotiques (sous forme de sillon hydrophobe) (Czabotar et al., 2013), et un autre sur le côté opposé à ce sillon, appelé « rear site » (Gavathiotis et al., 2008). La protéine BAK ne présenterait quant à elle qu'un seul site d'activation, dans le sillon hydrophobe (Griffiths et al., 1999). En ce qui concerne BOK, peu de certitude existe. Nous savons seulement qu'elle présente des séquences similaires à BAX et BAK, mais son fonctionnement n'est pas encore très bien compris (Birkinshaw and Czabotar,

2017). La fonction principale de ces protéines, comme on le verra par la suite, est de former des pores dans la membrane mitochondriale qui permettent la sortie des protéines pro-apoptogènes.

(2) Les *BH3-only*

L'autre sous-famille des pro-apoptotiques est appelée « *BH3-only* » car les protéines qui le composent ne présentent que le domaine d'homologie BH3. Il existe huit *BH3-only*: BAD, BID, BIK (BLK), BIM, BMF, HRK (DP5), NOXA et PUMA. En fonction des interactions qu'elles vont avoir, toutes ne vont pas avoir la même fonction (développé ultérieurement). En conditions physiologiques, ces *BH3-only* sont impliquées dans de nombreux processus : BIM joue un rôle dans l'élimination des cellules T et B auto-réactives (Bouillet et al., 2002), alors que PUMA et NOXA sont respectivement impliquées dans l'apoptose induite par les radiations γ et UV (Naik et al., 2007).

2) Régulation de la voie mitochondriale par la famille BCL-2

(a) Mécanisme d'action

Avant d'exposer en détail la manière dont les protéines de la famille BCL-2 régulent cette voie d'apoptose, l'enchaînement des événements à l'origine de la survie ou de la mort de la cellule est présentée ci-dessous.

Lorsque la cellule ne reçoit aucun signal de type pro-apoptotique, les protéines anti-apoptotiques sont présentes au niveau de la membrane externe des mitochondries, et les protéines pro-apoptotiques effectrices BAX et BAK ne sont pas actives. BAX, comme cela a été présenté, a une hélice $\alpha 9$ masquée, ce qui lui confère une localisation cytoplasmique. Pour jouer son rôle pro-apoptique BAX doit être relocalisée vers la membrane mitochondriale externe. Cela est possible grâce à un changement de conformation qui permet notamment de démasquer l'hélice $\alpha 9$. *In vitro*, plusieurs événements ont pu être identifiés comme jouant un rôle dans cette relocalisation tels que des détergents comme le Triton-X100 ou le NP40 (Hsu and Youle, 1998), la température (une heure à 43 °C) (Pagliari et al., 2005), un pH élevé (supérieur à 7,6 ou 8,2) (Khaled et al., 1999), ou très bas (inférieur à 6). Ces événements, lorsqu'ils sont associés à un stress cellulaire temporaire, entraînent une relocalisation de BAX à la membrane. Cependant, ces événements seuls (conduisant à la relocalisation de BAX à la membrane) n'est pas suffisant pour induire la mort cellulaire. En effet, une fois à la membrane, si elle n'est pas activée par un *BH3-only*, comme tBID par exemple, BAX peut être séquestrée par un anti-apoptotique, voir même rétro-transloquée vers le cytoplasme, par un mécanisme dépendant de la protéine BCL-xL (Edlich, 2015; Edlich et al., 2011). Or les *BH3-only* (sensibilisateurs et activateurs), elles, ne peuvent pas jouer leur rôle puisque certaines ne sont pas exprimées, d'autres sont séquestrées par les anti-apoptotiques, ou encore localisées au niveau du cytoplasme (c'est le cas de BID). Bien que majoritairement localisée au niveau de la mitochondrie, une fraction de BAK est également cytoplasmique, et cela grâce à un processus de retro-translocation permanent (Edlich, 2015). Tout cela

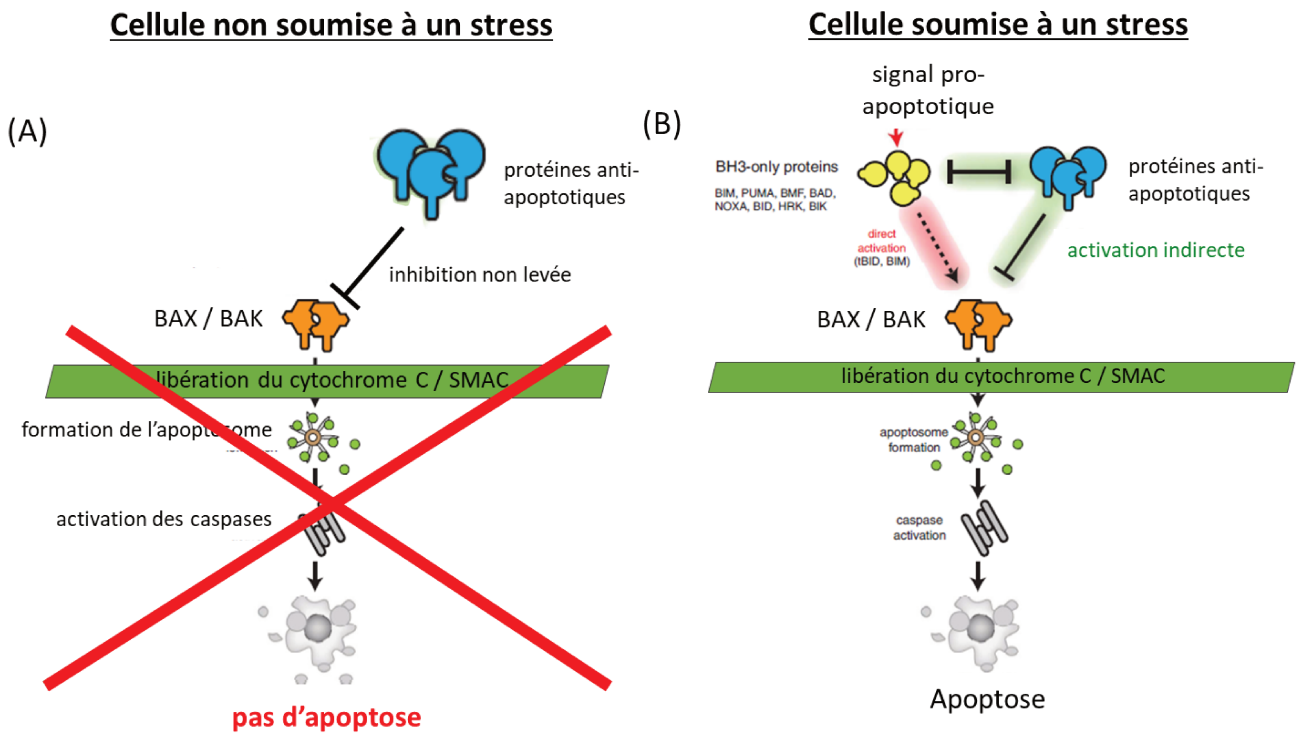


Figure 9 : Régulation de l'apoptose par les protéines BCL-2. (A) si la cellule ne subit aucun stress, la balance penche en faveur des protéines anti-apoptotiques permettant la survie de la cellule. (B) En cas de stress, l'expression des BH3-only va être augmentée. Les anti-apoptotiques vont être saturées. BAK et BAX vont pouvoir être libérés et activés conduisant à la mort de la cellule.

D'après : Delbridge and Strasser, 2015

combiné, rends alors impossible la formation de canaux dans la membrane mitochondriale et la cellule est donc orientée vers sa survie (Figure 9A).

Par contre, lors de l'apparition d'un stress important la cellule va subir des changements de ces paramètres, et notamment la stœchiométrie des membres pro-apoptotiques. Cette augmentation de l'expression de certaines *BH3-only* va être l'élément déclencheur (Bouillet, 1999; Galluzzi et al., 2014; Villunger, 2003), notamment celles qui sont induites par la protéine P53. Par ailleurs, certains acteurs importants comme BAX et BID, sont relocalisés au niveau de la membrane des mitochondries. BID subit notamment un clivage par des protéases permettant à la forme tronquée (tBID) de s'insérer au niveau de la membrane des mitochondries. Les *BH3-only* sensibilisatrices forment alors des complexes avec les protéines anti-apoptotiques, permettant aux pro-apoptotiques effectrices BAX et BAK, et aux *BH3-only* activatrices, d'évoluer sous forme libre. Activées directement par les *BH3-only* activatrices (Kim et al., 2006; Letai et al., 2002), BAK et BAX changent de conformation afin de former un canal au niveau de la membrane externe des mitochondries (Czabotar et al., 2014). Des protéines de tailles supérieures à 100 kDa peuvent alors s'échapper vers le cytosol (Tait and Green, 2010), dont les facteurs apoptogènes. Ils sont à l'origine de manière directe ou indirecte de l'activation des caspases, entraînant la mort des cellules (Figure 9B). Un dogme stipule que la formation de ce canal est irréversible (point de non-retour). Cependant, de plus en plus de travaux visent à nuancer ce dogme, en prenant notamment en compte l'hétérogénéité intracellulaire (Oberst et al., 2016). De même, la façon dont les oligomères de BAK et BAX perforent la membrane externe des mitochondries n'est pas encore tout à fait résolue (Cosentino and García-Sáez, 2017; Czabotar et al., 2014). La forme que prend ce pore, sa composition (notamment la présence de lipides), et même le nombre de protéines BAK ou BAX impliquées, ne sont pour le moment pas établis avec certitudes (Debernardi et al., 2018; Uren et al., 2017).

(b) Régulation de l'activité

Les membres de la famille BCL-2 interviennent dans la régulation du processus apoptotique, au niveau de la voie mitochondriale. Afin de pouvoir réguler cette voie, ils sont eux même sujets à de nombreuses régulations, à différents niveaux : contrôle de leur expression (induction/dégradation), modifications post traductionnelles, interactions. Parmi les membres de cette famille, MCL-1 est soumis à une régulation encore plus fine, qui sera présentée en détails.

(1) Généralités

Dans cette partie, la régulation des différents membres de la famille BCL-2 va être abordée à ces différents niveaux.

(i) Par induction de leur expression

Tout d'abord, ce processus est régulé au niveau de l'expression des différents acteurs. Les protéines anti-apoptotiques sont exprimées de manière constitutive par la cellule, mais dans certains cas il est

important que leur niveau d'expression augmente pour empêcher la mort cellulaire. Certaines voies de signalisation ont cette capacité. C'est le cas de la voie JAK-STAT, qui lorsqu'elle est activée, *via* l'un de ces facteurs de transcription, permet d'induire l'expression de la protéine BCL-xL (Grad et al., 2000).

En ce qui concerne les protéines pro-apoptotiques, elles ne sont pas toujours exprimées de façon constitutive, mais dès que la cellule subit un stress, leur expression est induite, pour que le processus apoptotique s'enclenche. C'est notamment le cas lorsque l'ADN subit un dommage. Dans ce cas, comme indiqué précédemment, la protéine P53, est activée et va induire l'expression de BAX, NOXA et PUMA (Nakano and Vousden, 2001; Oda, 2000a; Toshiyuki and Reed, 1995). De même, lorsque la cellule est confrontée à un manque de facteurs de croissance, le facteur de transcription FOXO3A (O forkhead box transcription factor-3A) est activé et il induit l'expression de BIM (Dijkers et al., 2000). BIM est aussi activée à la suite d'un stress du RE, puisque son expression est également sous la dépendance de deux facteurs de transcriptions : CEBP α (CCAAT-enhancer binding protein- α) et CHOP (CEBP homologous protein), sensibles à ce type de stress (Puthalakath et al., 2007).

(ii) *Par modification post-traductionnelle*

D'autres pro-apoptotiques sont exprimés de façon constitutive. Pour autant, ils ne sont pas forcément sous leur forme active, mais doivent subir une modification post-traductionnelle. C'est notamment le cas de BAD qui possède de nombreux sites de phosphorylation pouvant être phosphorylés par JNK, PKA et AKT (Donovan et al., 2002; Peso, 1997). Ainsi lorsque BAD est phosphorylée, elle est séquestrée par la protéine 14-3-3, ce qui favorise la survie de la cellule. Par contre en cas de stress du RE, la protéine BAD est déphosphorylée sur un ou plusieurs sites ce qui entraîne son activation, et par conséquence, favorise l'induction de l'apoptose (Zha et al., 1996).

BIM, peut également être régulée de façon post-traductionnelle. Cette protéine peut en effet être associée avec le microtubule, et plus précisément à la dynéine. Cependant sa phosphorylation par la kinase JNK (Lei and Davis, 2003), ou une déstabilisation du complexe moteur de la dynéine (Puthalakath et al., 1999), entraînant son relargage et sa relocalisation à la membrane des mitochondries. BIM peut également être activée à la suite de l'extinction de la voie ERK (extracellular signal regulated kinase) (Ley et al., 2005).

L'activation de BID, passe aussi généralement par une modification post-traductionnelle. En effet, lors de l'activation de la voie extrinsèque, la caspase 8 clive BID qui se retrouve alors sous sa forme tronquée (tBID), qui est également sa forme active (Luo et al., 1998). Le même processus est à l'origine de son activation, lorsque BID est clivée par la caspase 2, induite à la suite d'un stress du RE (Upton et al., 2008), ou par la cathepsine, les calpaïnes et le granzyme B. Cependant, il arrive que BID subisse une phosphorylation à proximité de son site de clivage, ce qui empêche l'action de ces protéases et favorise donc la survie (Esposti et al., 2003).

BIM BH3 domain binding to MCL1

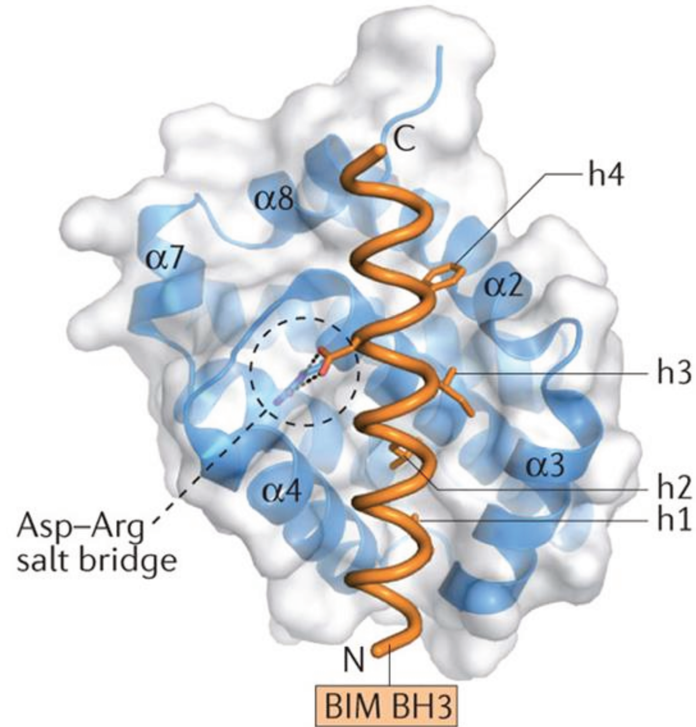


Figure 10 : Interaction entre le BH3-only BIM et l'anti-apoptotique MCL-1. Le domaine BH3 de BIM vient se placer au niveau du sillon hydrophobe de MCL-1. Les 4 résidus hydrophobes du BH3 permettant l'interaction avec le sillon sont indiqués par h1, h2, h3, et h4.

Tirée de l'article : Czabotar et al., 2014

Protéines anti-apoptotiques	Protéines anti-apoptotiques se lient à :		
	BAX/BAK	BH3-only	
		Activateur	Sensibilisateur
BCL-2	BAX	BIM, PUMA, BID	BMF, BAD
BCL-xL	BAX, BAK	BIM, PUMA, BID	BMF, BAD, BIK, HRK
BCL-w	BAX, BAK	BIM, PUMA, BID	BMF, BAD, BIK, HRK
MCL-1	BAK	BIM, PUMA, BID	NOXA, HRK
A1	BAK	BIM, PUMA, BID	NOXA, BIK, HRK

Figure 11 : Liste des interactions entre les protéines anti-apoptotiques et les protéines pro-apoptotiques.

Tirée de l'article : Shamas-Din et al., 2013

(iii) *Par dimérisation*

Pour comprendre comment les membres de cette famille de protéines régulent l'apoptose, il faut aussi comprendre comment ils interagissent entre eux (pour former des homo- ou des hétérodimères), et avec d'autres protéines.

Interaction entre pro- et anti-apoptotiques :

Comme cela a déjà été décrit, ces interactions sont possibles grâce à la présence du sillon hydrophobe qui peut interagir avec le domaine BH3 des protéines *BH3-only* ou de BAX et BAK. L'interaction se fait par l'insertion de 4 résidus hydrophobes (h1-4) du domaine BH3 des pro-apoptotiques, dont une leucine (Leu) particulièrement bien conservée (Fogha et al., 2017), dans le sillon hydrophobe des anti-apoptotiques, et par une interaction ionique (permettant la formation d'un pont salin) entre un aspartate (Asp) très conservé du domaine BH3, et une arginine (Arg) très conservée du domaine BH1 (Czabotar et al., 2014; Liu et al., 2003). Cette interaction est illustrée sur la figure 10 avec l'exemple de la fixation du pro-apoptotique BIM sur l'anti-apoptotique MCL-1. Les interactions entre les protéines anti-apoptotiques et les protéines pro-apoptotiques effectrices BAX et BAK sont sensiblement identiques (Sattler et al., 1997).

Il existe des différences subtiles entre les domaines BH3 des différentes protéines pro-apoptotiques. De la même façon, les protéines anti-apoptotiques ne présentent pas exactement le même sillon hydrophobe. Celui-ci possède d'ailleurs une certaine plasticité, ce qui lui permet de lier plusieurs pro-apoptotiques différentes (Smits et al., 2008). Cela conduit à des spécificités d'interactions (Figure 11) : toutes les anti-apoptotiques ne lient pas toutes les pro-apoptotiques. C'est d'ailleurs le fondement même du test de *BH3-profiling*, décrit ultérieurement (section III-B) (Shamas-Din et al., 2013).

La fonction principale des protéines anti-apoptotiques est de piéger les protéines pro-apoptotiques pour inhiber la voie intrinsèque d'induction de l'apoptose. Elles piègent soit directement les pro-apoptotiques, capables de former des pores perméabilisant la membrane (BAX ou BAK) (mode 2), soit les pro-apoptotiques ayant pour fonction d'activer (directement ou non) BAX ou BAK (mode 1) (Birkinshaw and Czabotar, 2017). Il a d'ailleurs été démontré que le mode 2 était plus efficace et plus compliqué à déstabiliser pour induire l'apoptose (Llambi et al., 2011).

Une partie des *BH3-only* se lie exclusivement avec les protéines anti-apoptotiques. Il s'agit de BAD, BIK, BMF, et HRK. Leur rôle est de sensibiliser les protéines anti-apoptotiques (d'où leur nom de «*BH3-only* sensibilisatrices »). En se fixant sur ces protéines, elles ont pour vocation d'empêcher la formation des complexes entre ces protéines anti-apoptotiques, et BAX/BAK ou les *BH3-only* activatrices (cf. ci-dessous), comme illustré sur la figure 12 (modèle de sensibilisation) par Elkholi et al. (Elkholi et al., 2011). Si ceux-ci sont déjà formés, ils peuvent les rompre (Figure 12 : modèle de dé-

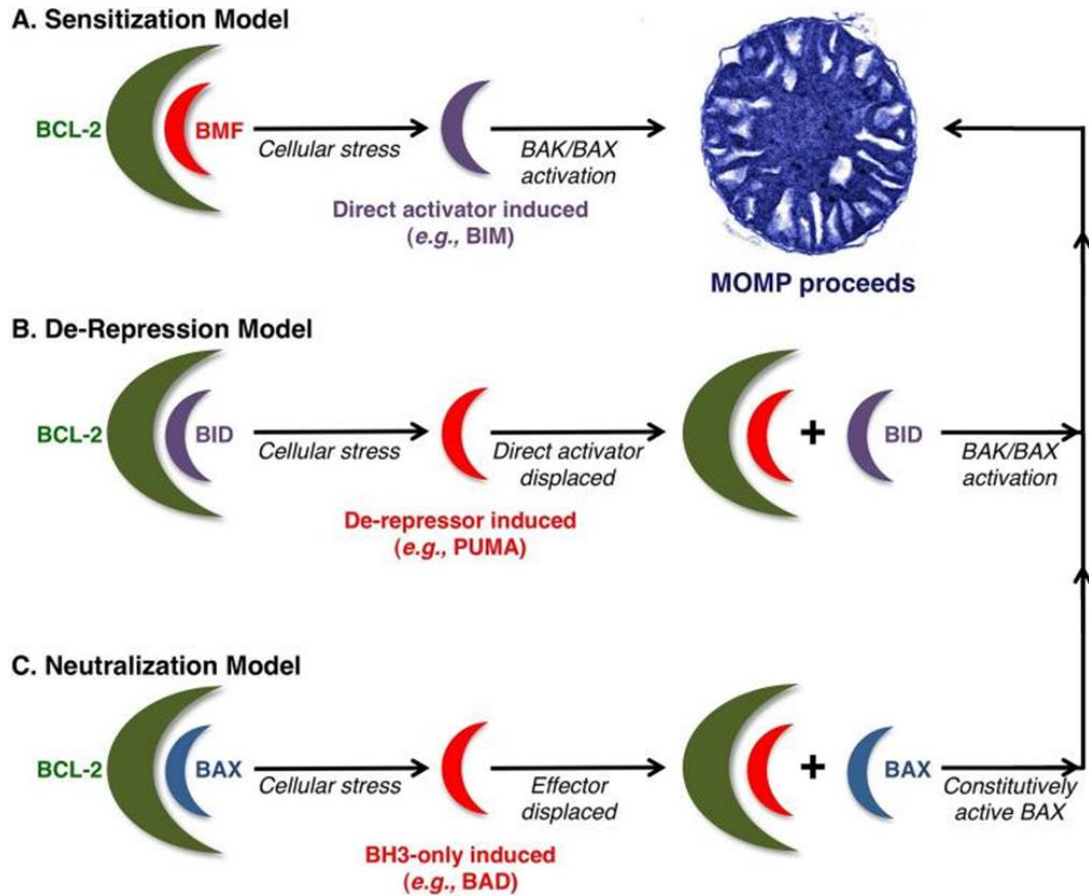


Figure 12 : Représentation schématique des fonctions des protéines BH3-only. (A) Les BH3-only peuvent avoir un rôle de sensibilisateur afin saturer les anti-apoptotiques. Dans ce cas, les BH3-only effecteurs BAX et BAK sont sous forme libre et peuvent donc être activés pour induire l'apoptose. (B) Les BH3-only sensibilisateurs vont venir se fixer sur les anti-apoptotiques permettant de libérer les BH3-only activateurs. Ces derniers pourront alors activer BAX et BAK pour induire l'apoptose. (C) Comme (B) mais libère cette fois-ci les BH3-only effecteurs.

Tirée de l'article : Elkholi et al., 2011

répression ou de neutralisation), permettant à BAX et BAK d'être libérées puis activées pour former des pores (Birkinshaw and Czabotar, 2017). Il existe donc un système de coopération entre les protéines pro-apoptotiques, pour la fixation des protéines anti-apoptotiques.

Interaction entre pro-apoptotiques :

Les interactions entre pro- et anti-apoptotiques ne sont pas les seules réguler l'apoptose. Il existe également des interactions entre pro-apoptotiques. En effet, BAK et BAX, quand elles sont localisées au niveau des mitochondries, nécessitent d'être activées par certains *BH3-only* qui ont la capacité d'interagir directement avec eux. Elles sont appelées « *BH3-only* activatrices ». BIM, BID sous sa forme tronquée (tBID), PUMA et NOXA font partie de ce groupe (Kim et al., 2009a; Vela et al., 2013). Bien que longtemps présentée comme simple « sensibilisatrice », NOXA possède bien la capacité d'activer directement les pro-apoptotiques effecteurs (Du et al., 2011). La différence entre les *BH3-only* « activatrices » et les « sensibilisatrices » viendrait d'un design un peu différent de leur domaine BH3 (Czabotar et al., 2013).

L'activation des protéines effectrices BAK et BAX par les *BH3-only* s'effectue *via* leur sillon hydrophobe, de manière semblable à la fixation des *BH3-only* sur les protéines anti-apoptotiques (Leshchiner et al., 2013 ; Czabotar et al., 2014). Cependant BAX est un cas particulier puisqu'elle présente un second site d'interaction avec un domaine BH3 (cf. section II-D). Ce dernier pourrait lui aussi lier certains *BH3-only*, et jouerait un rôle dans l'initiation de l'activation de BAX (Gavathiotis et al., 2008), sans pour autant être essentiel (Peng et al., 2013). Dans tous les cas, l'activation de BAK et BAX par des *BH3-only* activatrices induit un changement de conformation, à l'origine de l'ouverture du sillon hydrophobe. Cela a pour conséquence le relargage du *BH3-only* qui pourra alors aller activer une autre protéine BAX ou BAK, formant ainsi une chaîne d'amplification du signal appelée « kiss and run » (Cosentino and García-Sáez, 2017). Cela facilite également l'homo-dimérisation des protéines BAX ou BAK qui constitue la première étape de la formation des pores de perméabilisation de la membrane mitochondriale. La suite est constituée de l'oligomérisation de ces homodimères (soit BAX, soit BAK) pour former ces pores. Cependant, la compréhension de ce processus est encore limitée et concentre actuellement l'attention de nombreuses équipes de recherche. Certains suggèrent que les pores sont formés d'un mixte entre des dimères de BAX et des dimères de BAK, d'autres évoquent l'existence d'hétérodimères BAX/BAK (Debernardi et al., 2018; Dewson et al., 2012). D'ailleurs, une récente étude suggère que BAX activée est capable de former des hétéro-complexes avec BAK. Ces complexes sont retrouvés dans des cellules capables d'induire l'apoptose par la voie mitochondriale, et sont absentes des cellules résistantes à cette voie, ce qui indique donc leur importance dans ce système (Seiller et al., 2020).

Il s'agit donc là de deux types d'interactions entre pro-apoptotiques qui favorisent la perméabilisation de la mitochondrie, à l'origine de l'entrée en apoptose de la cellule.

La protéine *BH3-only* activatrice BID joue également un autre rôle : elle interagit avec BAX cytosolique afin de changer sa configuration, étape nécessaire pour sa relocalisation au niveau des mitochondries (Eskes et al., 2000).

Interaction avec des membres externes à la famille BCL-2 :

Les interactions entre membres de la famille BCL-2 ne sont pas les seules impliquées dans la régulation du processus apoptotique. D'autres acteurs peuvent être évoqués tels que la protéine 14-3-3, qui est connue pour interagir avec BAD mais qui peut également séquestrer BAX dans le cytosol *via* une interaction impliquant son extrémité C-terminale. L'interaction est levée lors du clivage de 14-3-3 par les caspases ou encore par d'autres mécanismes, encore mal connus, indépendants des caspases qui reste à caractériser (Nomura et al., 2003). Contrairement à BAD, cette liaison n'est pas dépendante de l'état de phosphorylation de BAX.

Le facteur de réparation de l'ADN, Ku70, impliqué dans la réparation des cassures double-brin a également été identifié comme partenaire cytosolique de BAX. Lorsque Ku70 est acétylé sur son extrémité C-terminale cette interaction est rompue et BAX peut alors être relocalisée à la mitochondrie (Cohen et al., 2004).

(2) Le cas de MCL-1

MCL-1 est connue pour sa faible durée de $\frac{1}{2}$ vie, entre 1 et 4h (Yang-Yen, 2006), bien loin des valeurs de $\frac{1}{2}$ vie des autres membres de cette famille BCL-2. Même si, cette valeur reste sujette à certaines incertitudes, dû à certains facteurs comme l'état de la cellule, ou le type cellulaire, cette protéine est très finement régulée. La régulation, se fait à la fois au niveau du promoteur de son gène, de l'ARNm, et de la protéine :

(i) *L'induction de son expression*

L'expression de MCL-1 est dans de nombreux cas dépendante de facteurs de croissance. En effet, il a été démontré qu'un grand nombre d'entre eux était capable d'induire une surexpression de MCL-1. Il s'agit : des interleukines (Huang et al., 2000; Jourdan et al., 2000; Wang et al., 1999), de l'EGF (epidermal growth factor) (Leu et al., 2000), du VEGF (vascular endothelial growth factor) (Le Gouill et al., 2004), et de HIF-1 α (hypoxia inductible factor 1 α) (Liu et al., 2006). Ces facteurs induisent des voies de signalisations qui permettent l'activation de protéines qui peuvent se lier au niveau du promoteur du gène de MCL-1, de séquences consensus pour STAT, d'un site CRE (cAMP response element), ou d'un site de liaison à NF- κ B (nuclear factor kappa-B) (Akgul et al., 2000b). A l'inverse, lorsque ces facteurs de croissance ne sont pas présents, l'expression de MCL-1 est inhibée. De même,

l'activation du facteur de transcription E2-F1, activé en réponse à l'activation de la P53 inhibe l'expression de MCL-1 puisque son promoteur dispose aussi d'un site de fixation à ce facteur (Croxtton et al., 2002).

Il est également nécessaire de considérer l'épissage alternatif de MCL-1 comme un mécanisme de régulation puisque celui-ci va donner naissance à différentes formes de MCL-1 : MCL-1S, MCL-1ES, et MCL-1L, possédant des fonctions différentes (*vide supra*). Des études récentes se sont intéressées au mécanisme de cet épissage, et ont notamment permis de mettre en avant l'implication de deux membres de la famille des protéines SR : SRSF1 et SRSF3 (Gautrey and Tyson-Capper, 2012), des protéines impliquées plus généralement dans la régulation de l'épissage de tous les ARN. Plus récemment encore, une autre famille de protéines a été identifiée. Il s'agit des protéines hnRNP, qui en modulant l'épissage de MCL-1, joue sur la régulation de l'apoptose (Tyson-Capper and Gautrey, 2018). Il a d'ailleurs été proposé de jouer sur cet épissage alternatif pour rétablir l'apoptose afin de lutter contre la prolifération tumorale (Li et al., 2020).

(ii) *Les modifications post-transcriptionnelles*

Des événements post-transcriptionnels peuvent aussi réguler l'expression de MCL-1. La $\frac{1}{2}$ vie de l'ARNm de MCL-1 est également très courte. En effet, la fixation d'un miRNA inhibiteur, RNA29b (Mott et al., 2007), et d'une protéine, CUGBP2 (Subramaniam et al., 2008) sont à l'origine de la neutralisation de l'ARNm codant pour MCL-1. Il a également été démontré que les voies de signalisation mTORC1 et eIF2 α étaient capables de moduler la traduction de l'ARNm codant pour MCL-1 (Fritsch et al., 2007; Mills et al., 2008).

(iii) *Les modifications post-traductionnelles*

Comme indiqué précédemment, la protéine MCL-1 contient deux régions PEST, des régions qui, en coopération avec d'autres motifs, participent activement à une régulation post-traductionnelle fine. Elles sont de différentes natures :

La phosphorylation

MCL-1 possède de nombreux sites potentiels de phosphorylation au niveau des régions PEST. Chaque phosphorylation sur l'un de ces sites a des conséquences différentes. Par exemple, la phosphorylation de S64 par CDK1 et 2 (cyclin-dependent kinase) ou par JNK (C-Jun N-ter-kinase) permet de favoriser sa dimérisation avec les pro-apoptotiques de la famille BCL-2, et donc son rôle anti-apoptotique (Kobayashi et al., 2007). La phosphorylation du résidu T163 a quant à elle, des conséquences variées en fonction des autres résidus phosphorylés avec lui. Ainsi lorsque ERK-1 (extracellular regulated protein kinase-1) phosphoryle le résidu T163 avec le résidu T92, cela conduit à la stabilisation de MCL-1 (Ding et al., 2008) et donc à l'augmentation de sa fonction anti-apoptotique. A l'inverse, lorsque GSK-

3 (Glycogen Synthase Kinase 3) phosphoryle le résidu T163 avec les résidus S155 et S159, cela conduit à une inhibition de sa fonction anti-apoptotique (Ding et al., 2007). De la même façon, lorsque le résidu T163 est phosphorylé avec S121 par JNK, cela conduit à une inactivation de sa fonction anti-apoptotique (Inoshita et al., 2002).

L'ubiquitylation

MCL-1, de par la présence des 3 lysines K5, K40 et K126, est également soumis à une dégradation par le protéasome dépendante de l'ubiquitylation, en cas d'exposition de la cellule aux UV, par exemple (Nijhawan, 2003). Ce processus est possible grâce à une ubiquitine ligase E3, appelée MULE (MCL-1 ubiquitin ligase E3), qui possède une région similaire au domaine BH3, lui permettant d'interagir avec MCL-1. Cette protéine est d'ailleurs suffisante pour expliquer la dégradation de MCL-1 par ubiquitylation (Zhong et al., 2005). Cependant, une autre ubiquitine ligase E3, β -TrCP (beta transducin-containing protein), interagit mais elle intervient uniquement à la suite d'une phosphorylation de MCL-1 par GSK-3 (Ding et al., 2007). Par ailleurs, il a récemment été démontré que MCL-1 était également régulée par une desubiquitine ligase appelée USP9X, qui va protéger MCL-1 de toute ubiquitylation et donc permettre de la stabiliser (Schwickart et al., 2010).

Le clivage

Pour finir MCL-1 est également soumise à une dégradation indépendante du protéasome. En effet, elle est soumise à des clivages dépendant des caspases sur deux sites distincts de la région N-ter (Figure 8) (Clohessy et al., 2004). Ces deux sites, ainsi qu'un autre site, sont également utilisés par une autre protéase, le granzyme B (GrB) afin de cliver MCL-1 (Han et al., 2004). Ces clivages représentent en réalité des boucles d'amplification qui permettent en cas d'activation de l'apoptose, d'éliminer un acteur impliqué dans la survie, en empêchant sa dimérisation avec les pro-apoptotiques. Cela va même plus loin puisqu'il a été démontré que les clivages sur ces sites permettaient de convertir MCL-1 en une protéine pro-apoptotique (Herrant et al., 2004), même si ces résultats sont controversés (Clohessy et al., 2004).

(iv) Ses dimérisations

Quelle que soit sa forme, la régulation fine de MCL-1 reste un élément clef dans la régulation de l'apoptose, car elle lui permet de former ou non des dimères avec les protéines pro-apoptotiques.

MCL-1 est connue pour lier fortement le pro-apoptotique NOXA, et faiblement BAD, à la différence de BCL-2 et BCL-xL. De plus, comme les autres anti-apoptotiques, MCL-1 va également lier BIM et PUMA (Figure 11). Il est également décrit que MCL-1 lie et inhibe la protéine pro-apoptotique effectrice BAK. Par contre, des données récentes montrent que cette protéine est également capable d'inhiber BAX, sans pour autant interagir directement avec lui, ce qui va à l'encontre des hypothèses habituelles

(Germain et al., 2008). D'autres résultats suggèrent même que cette fixation à des pro-apoptotiques peut-être à l'origine d'une sorte de régulation de MCL-1. Il a en effet été démontré que la fixation de NOXA par MCL-1 entraînait la dégradation de ce dernier par le protéasome, alors que la fixation de BIM était plutôt associée à sa stabilisation (Czabotar et al., 2007).

Pour finir, une équipe s'est intéressée à une autre voie de signalisation, dépendante de BOK, impliquant son interaction avec MCL-1, et plus précisément avec son domaine transmembranaire (TMD) (Lucendo et al., 2020). Ils suggèrent que cette voie de signalisation permettrait de réguler l'apoptose, sans impliquer le domaine BH3. En effet, l'interaction entre le TMD de MCL-1 et le TMD de BOK induirait un changement de localisation subcellulaire de BOK, du RE vers les mitochondries (par fusion des membranes de ces organelles), favorisant ainsi l'induction de l'apoptose. A l'inverse, au niveau de la membrane externe mitochondriale, la forme entière de MCL-1 (MCL-1L), permettrait, quant à elle, une stabilisation de BOK sous une forme inactive. Il existerait donc une compétition entre le TMD de MCL-1 et MCL-1L dans la régulation de l'apoptose.

III. Dérégulation de l'apoptose, et famille BCL-2 dans les hémopathies malignes.

Les défauts de régulation de l'apoptose sont impliqués dans de nombreuses maladies humaines. Ainsi, en cas d'infections, virus et bactéries produisent des molécules capables de contrôler l'apoptose dans les cellules hôtes (Favaloro et al., 2012; Sly et al., 2003). Ces molécules sont capables d'inhiber l'apoptose dans un premier temps, pour que les agents pathogènes puissent « profiter » au maximum du métabolisme de la cellule. Puis dans un second temps, ces molécules induisent l'apoptose afin de propager l'infection. Dans le cas des dégénérescences ou des « accidents » de l'apoptose, ce processus peut advenir dans des cellules saines. C'est le cas des maladies neurodégénératives comme Alzheimer (Behl, 2000) ou Parkinson (Venderova and Park, 2012), des pathologies cardiaques (Whelan et al., 2010) et des AVC (accidents vasculaires cérébraux) (Yuan, 2009; Benchoua et al., 2001). A l'inverse, un défaut d'apoptose joue un rôle important dans certaines maladies. C'est le cas des maladies auto-immunes, souvent causées par un défaut d'apoptose dans les lymphocytes T et B auto-réactifs au moment de leur développement (Nagata, 2005). C'est également le cas des cancers, où la résistance à l'apoptose est considérée comme une caractéristique des cellules cancéreuses (Hanahan and Weinberg, 2011). Ce sont d'ailleurs les cancers, et plus précisément ceux d'origines hématologiques, qui vont nous intéresser dans la suite de cet exposé.

A. Perturbations générales de l'apoptose

Sachant que l'apoptose permet le maintien de l'homéostasie tissulaire, il n'est pas étonnant que ce processus joue un rôle important dans le développement tumoral (Wong, 2011). De plus l'apoptose est également directement liée à la résistance aux traitements anti-cancéreux (Gimenez-Bonafe et al., 2009). Les causes de ces perturbations de l'apoptose, conduisant à un cancer hématologique, peuvent être de diverses.

Signe de son importance dans l'homéostasie cellulaire, P53, connue pour son rôle de suppresseur de tumeur (cf section II-B) est mutée dans plus de 50% des cancers. Elle peut également être délétée dans certains cancers. C'est notamment le cas de patients souffrants d'une LLC qui peuvent être porteurs d'une délétion du bras court du chromosome 17 (de 10% à 50% des patients) (Nguyen-Khac et al., 2016), le même chromosome où se trouve le gène codant pour la P53. P53 est également régulée par MDM2, une ubiquitine-ligase E3 qui favorise sa dégradation par le protéasome (Honda et al., 1997). Or la protéine MDM2 est surexprimée dans le cas de leucémies ou de lymphomes (Capoulade et al., 1998;

Watanabe et al., 1996). Pour finir, P53 peut être régulée au niveau de la transcription, par des mi-RNA qui se lient sur des régions non transcrites de son gène, empêchant ainsi son expression. Il est notamment possible de citer le miR-504 (Hu et al., 2010) qui est amplifié dans le cas de LNH, et le miR-33 (Herrera-Merchan et al., 2010) dérégulé dans le cas d'ALL (Yeh et al., 2016). Dans de très nombreux cancers, l'activité de P53 est donc altérée. Bien que cette protéine soit impliquée directement dans la régulation la voie intrinsèque et de la famille BCL-2 (cf. section IIIB), elle est également impliquée dans la régulation de la voie extrinsèque. Par exemple Fas, qui permet l'induction de cette voie *via* FasR (CD95), est induit par P53. De plus P53 semble faciliter le transport de FasR de l'appareille de Golgi vers la membrane (Bennett, 1998). Quand P53 est mutée, l'apoptose médiée par la voie extrinsèque impliquant Fas/CD95, est donc impactée, en particulier dans les maladies lymphoïdes (Xu-Monette et al., 2012). Il en est de même avec le récepteur TRAIL-2 (DR5), un autre récepteur à domaine de mort, dont l'expression est également sous le contrôle de P53 (Takimoto and El-Deiry, 2000).

A propos de ces récepteurs à domaine de mort, ils sont fortement associés aux résistances de l'apoptose dans les cancers. Par exemple, une faible expression membranaire ou la surexpression de récepteurs leurres ont été décrites dans de nombreux cancers hématologiques (Fulda, 2010). Leur expression peut d'ailleurs être réprimée *via* une méthylation des îlots CpG de l'ADN, comme retrouvé dans certaines leucémies (Hervouet et al., 2013). Pour compléter les altérations de cette voie extrinsèque, il est aussi possible de mentionner la surexpression de c-FLIP, un antagoniste de la caspase 8 pour la fixation de l'adaptateur recruté par le récepteur à domaine de mort, dans certains cancers (Micheau, 2003). Cette surexpression empêche l'activation des caspases et donc de l'apoptose. Mêmes conséquences, lorsque FADD, l'adaptateur de CD95, n'est plus exprimé, ce qui est le cas dans certains DLBCL (Favaloro et al., 2012).

Hormis les récepteurs à domaine de mort, APAF-1 joue également un rôle important, en perturbant la formation de l'apoptosome, et donc l'activation des caspases. En effet, la protéine APAF-1 est souvent inhibée ou inactivée, dans les hémopathies malignes, *via* différents processus :

- Dans les leucémies, une modification épigénétique faisant intervenir la méthylation de l'ADN, est à l'origine de la non-expression de APAF-1 (Fu et al., 2003).
- Dans les DLBCL, APAF-1, qui est normalement une protéine cytosolique, est séquestrée au niveau de radeaux lipidiques, empêchant la formation du complexe (Hirpara et al., 2016)
- Certains auteurs suggèrent la présence d'un inhibiteur d'APAF-1, même si cela reste encore à démontrer (Favaloro et al., 2012).

Pour finir, les caspases étant les effectrices finales de l'apoptose, il est donc attendu qu'une perturbation de ces protéines soit associée à un caractère tumorigène et soit retrouvée dans un certain nombre de cancers. Ainsi une surexpression des IAP aboutissant à l'inhibition des caspases a été observée dans certains cancers (Favaloro et al., 2012). Par ailleurs, les caspases peuvent dans certains cancers, subir

des mutations qui vont directement impacter sur leur activité, en empêchant leur dimérisation, comme c'est le cas de la caspase 8 dans les LAM (Li et al., 2018).

B. Perturbations liées famille BCL-2

1) *Les altérations de la famille BCL-2*

Bien sûr, la famille BCL-2 est un acteur incontournable du processus tumorigénique à cause de son rôle central dans la régulation de la voie intrinsèque de l'apoptose. Des événements de différentes natures conduisent au déséquilibre entre les pro- et les anti-apoptotiques qui est à l'origine des résistances à l'apoptose. Ces événements peuvent concerner le nombre de copie d'un gène, la régulation de sa transcription (*via* des translocations ou des promoteurs), sa traduction, ou même encore intervenir après sa traduction.

Les lymphocytes subissent, en plus des phénomènes classiquement retrouvés dans les cellules, des processus spécifiques pouvant conduire à des mutations (*vide supra*). Parmi-eux, on retrouve le phénomène d'hypermutations somatiques permettant de créer une grande diversité d'Ig, ou encore la commutation isotypique permettant de changer le type d'Ig produit. Ces deux phénomènes sont dépendants de l'enzyme AID (activation induced cytidine deaminase). Ils sont en grande partie responsables de la translocation t(14;18) qui provoque un rapprochement entre le gène (non tronqué) codant pour la protéine anti-apoptotique BCL-2, et un promoteur des chaînes lourdes des Ig, ce qui *in fine*, conduit à la surexpression de BCL-2. Cette translocation est retrouvée dans plus de 90% des lymphomes folliculaires (FL) (Leich et al., 2009) et dans 20% des lymphomes diffus à grandes cellules B (DLBCL). En plus de cette translocation canonique, d'autres mutations peuvent entraîner la surexpression de ces protéines anti-apoptotiques de la famille BCL-2, peut-être due à une amplification du gène codant pour BCL-2, MCL-1, ou encore BCL-xL. D'ailleurs, MCL-1 est l'un des gènes les plus amplifiés dans les cancers (Zack et al., 2013). Il est également possible de modifier l'expression de ces protéines de manière indirecte. Par exemple, pour la protéine BCL-2 il existe une délétion, d(13q14), d'une région codant les micro-ARN 15 et 16, qui sont impliqués dans la fixation et la dégradation de l'ARNm codant pour BCL-2. Cette délétion est présente dans plus de 50% des cas de CLL, où elle est corrélée avec la surexpression de BCL-2 (Degheidy et al., 2013).

Dans tous ces cas, la surexpression est directe, et ne fait pas intervenir d'autres acteurs. Cependant, la surexpression des protéines anti-apoptotiques de la famille BCL-2 peut aussi être indirecte en faisant intervenir d'autres voies de signalisation.

On peut mentionner tout d'abord la voie de signalisation du facteur de transcription P53. Comme abordé précédemment, P53 est altérée chez de nombreux patients (cf. section III-A). Or ce facteur de transcription contrôle directement l'expression de PUMA (Nakano and Vousden, 2001), et de NOXA

(Oda, 2000b), des *BH3-only* ayant une fonction pro-apoptotique. Une inactivation ou une diminution d'activité est donc directement associée à une diminution de l'expression de ces deux protéines, favorisant ainsi la résistance à l'apoptose. Il en va de même pour BAX, l'une des cibles historiques de P53 (Toshiyuki and Reed, 1995). Une diminution de l'expression de P53, est donc là encore, corrélée avec une diminution de l'expression de BAX, inhibant le déclenchement du processus apoptotique. L'équilibre entre les pro- et les anti-apoptotiques est donc rompu *via* la dérégulation de P53, ce qui favorise la survie des cellules malignes.

Cependant la dérégulation de P53 n'est pas la seule voie de signalisation affectant la famille BCL-2. Ainsi la voie de STAT3 est également liée à l'expression des protéines de la famille BCL-2, et en particulier celle de BCL-xL (Turkson and Jove, 2000). Il s'avère que cette voie de signalisation est perturbée dans de nombreuses hémopathies malignes, comme dans les DLBCL (Zhao et al., 2018), mais aussi dans les lignées cellulaires de LAM (Chakraborty et al., 1996) et de LCM (Mencalha et al., 2012). La surexpression de STAT3 induisant une augmentation de l'expression de BCL-xL, elle confère aux cellules une résistance à l'apoptose (Lee et al., 2006). La fixation d'un CD40 avec un lymphocyte malin peut également être à l'origine de l'activation d'une voie de signalisation spécifique, induisant la surexpression de BCL-xL (Fang et al., 1997).

La voie PI3K *via* AKT est également capable de réguler l'expression des protéines de la famille BCL-2, au niveau transcriptionnel, traductionnel et post-traductionnel. Pour cela, différents acteurs sont impliqués tels que : mTOR, GSK3, FOXO, et NF- κ B (Choudhary et al., 2015). Cette voie de PI3K est largement dérégulée dans bon nombre de pathologies, en particulier dans les CLL (Okkenhaug and Burger, 2015).

Mise à part les amplifications génétiques, la surexpression de MCL-1 n'est pas toujours très bien comprise (Schwickart et al., 2010). Plusieurs pistes existent cependant pour expliquer sa forte présence dans certains cancers. Au niveau transcriptionnel, une corrélation entre l'oncogène BCR-ABL et l'expression constitutive de l'ARNm codant pour MCL-1, a été rapportée, et pourrait donc expliquer la surexpression de MCL-1 dans les LMC (Aichberger et al., 2005), et dans les LLC (Koss et al., 2013). La voie JAK/STAT a déjà été mentionnée pour expliquer la surexpression de BCL-xL, et pourrait également expliquer celle de MCL-1, qui possède un site de fixation à STAT3 au niveau de son promoteur (Isomoto et al., 2005). Les facteurs de transcriptions inductibles par l'hypoxie (HIFs) pourraient eux aussi être impliqués dans la surexpression de MCL-1 (Piret et al., 2005). Au niveau traductionnel, on peut mentionner le miR-29 (Mott et al., 2007), un micro-ARN qui inhibe l'expression de MCL-1 dans les cellules saines, dont l'expression est largement diminuée dans les cellules malignes (Kwon et al., 2019). Enfin, des événements post-traductionnels peuvent aussi expliquer cette surexpression. Dans la partie IID-2, nous avons décrit le rôle de la protéine USP9X dans la stabilisation

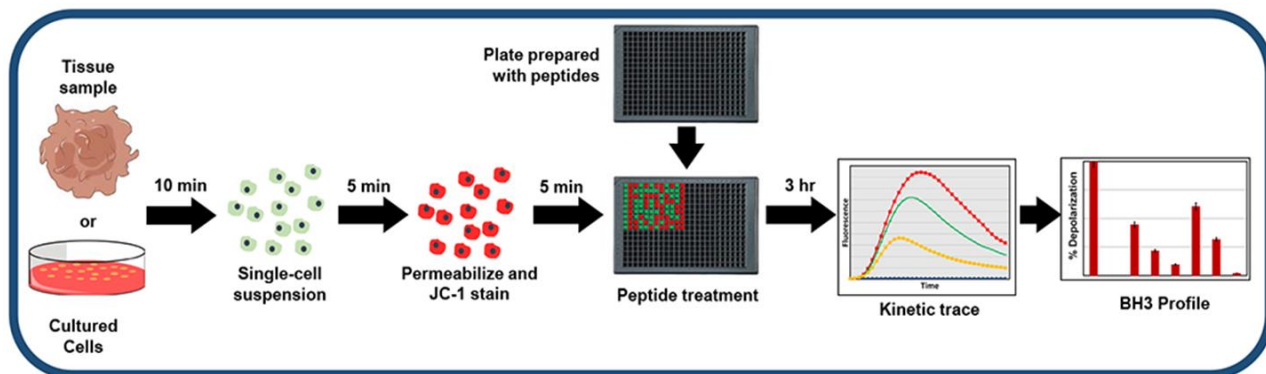


Figure 13 : Test de BH3-profiling. Les cellules sont perméabilisées, puis traitées avec les différents peptides. Après traitement, et un marquage du cytochrome C, les cellules sont analysées par cytométrie afin de déterminer le % de cytochrome C libéré par le traitement. Cette information permettra de déterminer la dépendance de la cellule.

Tirée de l'article : Fraser et al., 2019

		Activators		Sensitizers					
Protein or BH3 Peptide →		BIM	BID	BAD	N/A	NOXA	MS1 (syn)	HRK	PUMA
Drug (BH3 Mimetic) →				ABT-263	ABT-199	S63845	S63845	WEHI-539	
Pro-Survival	BCL-2	Strong Inhibition	Strong Inhibition	Strong Inhibition	Weak/No Inhibition	Weak/No Inhibition	Weak/No Inhibition	Strong Inhibition	Strong Inhibition
	BCL-XL	Strong Inhibition	Strong Inhibition	Strong Inhibition	Weak/No Inhibition	Weak/No Inhibition	Weak/No Inhibition	Strong Inhibition	Strong Inhibition
	BCL-w	Strong Inhibition	Strong Inhibition	Strong Inhibition	Weak/No Inhibition	Weak/No Inhibition	Weak/No Inhibition	Strong Inhibition	Strong Inhibition
	MCL-1	Strong Inhibition	Strong Inhibition	Weak/No Inhibition	Weak/No Inhibition	Strong Inhibition	Strong Inhibition	Weak/No Inhibition	Strong Inhibition
	BFL-1	Strong Inhibition	Strong Inhibition	Weak/No Inhibition	Weak/No Inhibition	Weak/No Inhibition	Weak/No Inhibition	Weak/No Inhibition	Strong Inhibition
Pro-Apoptotic, Pore-Forming	BAX	Moderate Activation	Moderate Activation	No Direct Activation	No Direct Activation	No Direct Activation	No Direct Activation	No Direct Activation	No Direct Activation
	BAK	Strong Activation	Strong Activation	No Direct Activation	No Direct Activation	No Direct Activation	No Direct Activation	No Direct Activation	No Direct Activation

Figure 14 : Liste des interactions entre protéines pro-et anti-apoptotiques. BAD, NOXA et HRK sont utilisés comme test puisqu'ils inhibent de façon spécifique, respectivement, BCL-2, MCL-1 et BCL-xL. PUMA est utilisé comme contrôle positif puisqu'il inhibe de façon aspécifique l'ensemble de ces anti-apoptotiques. BIM est également un contrôle positif ayant la possibilité d'activer BAX afin de vérifier que la cellule possède la capacité d'induire la formation du canal formé par BAK et/ou BAX.

Tirée de l'article : Fraser et al., 2019

de MCL-1. Cette ubiquitinase est surexprimée dans les FL et les DLBCL, évitant ainsi la dégradation de MCL-1 par le protéasome (Trivigno et al., 2012).

Pour finir, les protéines anti-apoptotiques ne sont pas les seules à être dérégulées dans ces pathologies. En plus de PUMA, NOXA et BAX qui sont contrôlées par P53, il est également possible de citer BIM, un autre pro-apoptotique, dont l'expression est dérégulée dans certains lymphomes du manteau (MCL). En cause une aberration génomique : la délétion de la région du chromosome 12 d(12q13), qui contient le gène codant pour BIM et qui est retrouvée dans 20 à 30% des MCL (Tagawa et al., 2005). Dans le lymphome de Burkitt (LB), BIM est également inhibée mais cette fois par une régulation épigénétique (hyper-méthylation de son promoteur) (Richter-Larrea et al., 2010).

L'expression de ces protéines de la famille BCL-2 est donc dérégulée soit en jouant directement sur le génome, soit à travers la dérégulation d'autres voies de signalisation. Le cas du DLBCL illustre parfaitement cela avec le « double hit » et le « double expresseur » (Riedell and Smith, 2018). En effet, le double hit fait référence à un phénomène peu commun : le réarrangement génomique de MYC avec celui de BCL-2 (et BCL-6 dans le cas des triples hits), retrouvé dans 5 à 7% des DLBCL et qui conduit à une surexpression de ces deux protéines. Le double expresseur fait référence, quant à lui, au fait que 20 à 30% des patients atteints de DLBCL surexpriment également les protéines MYC ou BCL-2, mais cela, indépendamment de réarrangements chromosomiques.

2) *Notion de dépendance : le BH3-profiling*

La sensibilité des cellules à la mort par apoptose est donc impactée par les perturbations qui touchent les membres de la famille BCL-2. Cependant, le lien entre la surexpression d'un ou plusieurs membres anti-apoptotiques de la famille BCL-2 et la résistance à l'apoptose n'est pas forcément direct, ce qui a conduit l'équipe d'Anthony Letai du Dana Farber Institute (Boston, USA) à proposer la notion de « dépendance », et à mettre au point un test permettant de la mesurer : le BH3-profiling (Letai, 2017). Ce test permettrait de déterminer si la cellule utilise une ou plusieurs protéines anti-apoptotiques pour bloquer l'apoptose, *via* un traitement avec des peptides spécifiques qui simulent les *BH3-only* sensibilisateurs, puis une mesure de la libération du cytochrome c.

Comme le montre la figure 13, ce test met en jeu des cellules entières, perméabilisées, qui sont traitées avec différents peptides. Ces peptides spécifiques vont mimer les protéines *BH3-only* sensibilisatrices, qui sont à l'origine de l'inhibition spécifique d'une protéine anti-apoptotique (Figure 14). HRK et NOXA inhibent spécifiquement BCL-xL et MCL-1 respectivement. BAD quant à elle inhibe à la fois BCL-2 et BCL-xL. On pourra cependant déterminer la dépendance à BCL-2 par comparaison avec les résultats obtenus avec HRK. PUMA est utilisée comme témoin positif puisqu'elle inhibe l'ensemble des protéines anti-apoptotiques. Comme PUMA, BIM inhibe elle aussi toutes les anti-apoptotiques, mais elle est également capable d'activer directement BAX, ce qui permet de vérifier que la cellule est apte à former des pores et donc à libérer le cytochrome c. Lors de ce test, l'inhibition des protéines anti-

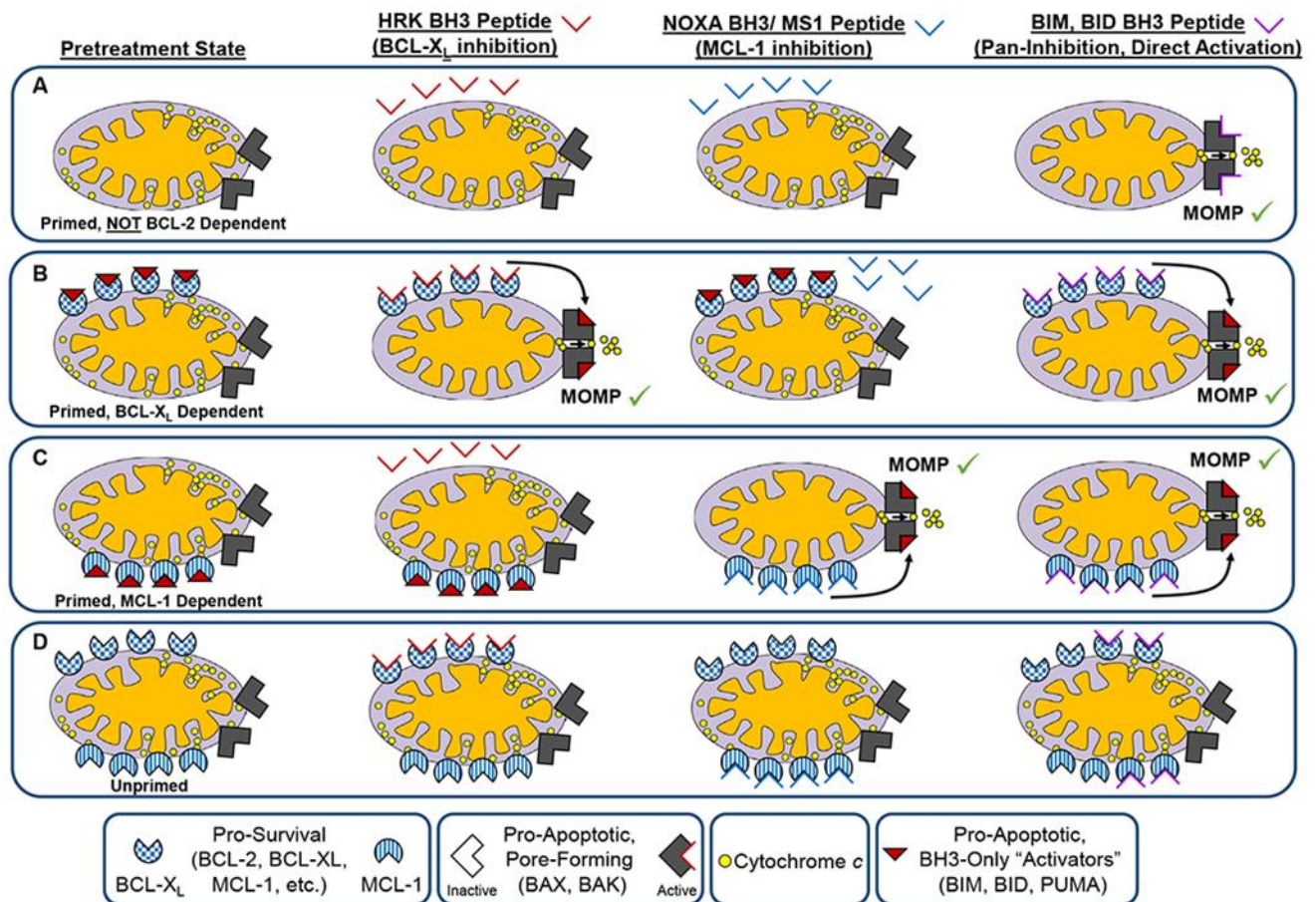


Figure 15 : Présentation des résultats qui peuvent être obtenus par BH3-profiling. A- Cellule dont la résistance n'est pas médiée par une surexpression des protéines anti-apoptotiques. B- Cellules dépendantes de BCL-xL. C- Cellules dépendantes de MCL-1. D- Cellules non amorcée pour l'apoptose (anti-apoptotiques non sensibilisées).

Tirée de l'article : Fraser et al., 2019

apoptotiques par ces peptides induit la libération de BIM et BID, qui vont activer BAX et BAK pour leur permettre de former des pores, à l'origine de la sortie du cytochrome c, qui est mesurée par cytométrie. Ce test permettrait donc de déterminer la dépendance dans différents cas (Figure 15) :

- (A) Le traitement avec HRK et NOXA n'entraîne pas de libération du cytochrome c, à la différence du traitement avec BIM. Les protéines anti-apoptotique BCL-xL et MCL-1 ne seraient donc pas responsables de la résistance à l'apoptose. Celle-ci est pourrait-être due à un défaut d'expression des *BH3-only* activatrices par exemple. Dans ce cas il serait inutile de traiter le patient avec des inhibiteurs de BCL-xL ou de MCL-1.
- (B) Le traitement HRK induit la libération du cytochrome c, à l'inverse de celui avec NOXA. La résistance à l'apoptose semble donc être dépendante de BCL-xL. Un traitement avec un inhibiteur de BCL-xL pourrait donc être proposé à ce patient.
- (C) Le traitement NOXA induit la libération du cytochrome c, à l'inverse de celui avec HRK. La résistance à l'apoptose serait donc dépendante de MCL-1. Un inhibiteur de MCL-1 pourrait alors être proposé au patient.
- (D) Aucun traitement n'a d'effet. Dans ce cas, il est possible que les protéines anti-apoptotiques ne soient pas « primées » ou « sensibilisées ». Une augmentation de la concentration du traitement devrait permettre d'induire l'apoptose. Il s'agit là d'une autre donnée que nous fournirait ce test : le *priming*, c'est-à-dire la sensibilité des protéines anti-apoptotiques à entrer en apoptose. Les cellules non sensibilisées, c'est-à-dire présentant des protéines anti-apoptotiques non saturées, sont moins disposées à réagir à un stress cellulaire ou à des dommages à l'ADN (Fraser et al., 2019). Cette donnée est importante lorsque ce test est utilisé pour déterminer l'efficacité d'un traitement, et potentiellement, comment le rendre plus efficace (sensibiliser les cellules avec un agoniste des protéines pro-apoptotiques avant une éventuelle chimiothérapie). Dans ce cas, un premier traitement d'initiation avec un inhibiteur de MCL-1 ou BCL-xL permettrait de sensibiliser (saturer) les cellules avant de les traiter, dans un second temps, avec une chimiothérapie. La non-expression des protéines pro-apoptotiques effectrices (BAK et BAX) pourrait être une autre situation qui expliquerait ce type de résultats (non présenté sur la figure).

Ce test a déjà été utilisé en clinique et aurait permis de montrer certaines tendances au sein de chaque maladie. Les CLL par exemple sont assez homogènes et présenterait une dépendance à BCL-2 (Del Gaizo Moore et al., 2007). Dans le cas des LAM, les dépendances seraient plus hétérogènes avec certains patients dépendant de MCL-1 et d'autres de BCL-xL (Pan et al., 2014; Parikh et al., 2010). Le cas du MM serait encore plus compliqué avec une dépendance très hétérogène selon les patients et qui impliquerait souvent plusieurs membres anti-apoptotiques (Touzeau et al., 2016).

Ce test serait donc un formidable outils puisqu'il permettrait de mieux comprendre la résistance à l'apoptose dans les cellules malignes et par conséquent, de trouver la ou les cibles qui offriraient la

meilleure réponse possible. Lors des études pré-cliniques il permettrait de caractériser au mieux les modèles d'études. Même si ce test ne fait pas l'unanimité, il a été proposé en clinique comme un biomarqueur prédictif de réponse (Montero and Letai, 2016; Montero et al., 2015). Il permettrait notamment, pour les cellules qui sont résistantes à l'apoptose (comme dans le dernier cas décrit (D)), de ne pas proposer une chimiothérapie seule, ni d'inhibiteurs d'anti-apoptotiques de la famille BCL-2, qui seraient tous les deux sans effet, mais plutôt un premier traitement de sensibilisation puis une combinaison entre un inhibiteur d'anti-apoptotiques et une chimiothérapie classique.

IV. Les stratégies thérapeutiques ciblant la famille BCL-2

Dans les hémopathies malignes, la famille de BCL-2 joue un rôle central dans la résistance de l'apoptose, médiée par la voie mitochondriale. Découvert dans les années 80, cette famille a très vite été proposée comme une cible thérapeutique contre ces pathologies, et différentes stratégies ont été développées.

A. Historique des stratégies ciblant les membres de la famille BCL-2

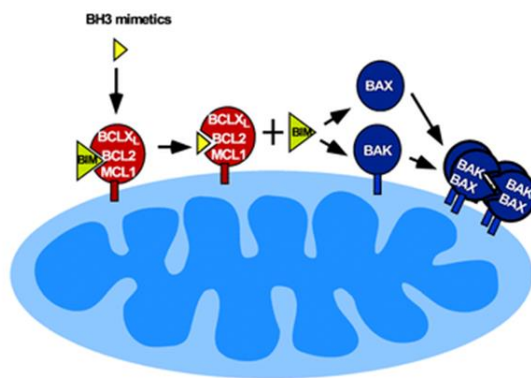
1) Réduction de l'expression des protéines anti-apoptotiques

La première approche pour cibler les protéines de la famille BCL-2 a été le développement d'oligonucléotides-antisens. Oblimersen sodium (aussi appelé G3139, Genasense), un oligonucléotide antisens qui cible l'ARNm de BCL-2, a été produit par Genta Inc., dès la fin des années 90. Après de beaux résultats *in vitro/in vivo* (Cotter et al., 1994), G3139 a été testé, dans un premier temps, en agent seul chez des patients atteints de LLC, où il a montré des résultats peu concluants (O'Brien et al., 2005). Il a ensuite été testé en combinaison avec des chimiothérapies classiques dans différentes hémopathies malignes. Tout d'abord dans les LLC en combinaison avec la fludarabine et le cyclophosphamide (O'Brien et al., 2007), où il a donné de très bons résultats. Puis dans les LAM (Marcucci et al., 2007) et les MM (Chanan-Khan et al., 2009), sans résultats intéressants. Malgré plusieurs demandes, notamment dans le cas de LLC en combinaison avec les chimiothérapies standards, la société n'a pas obtenu d'autorisation auprès de la FDA (Food and Drug Administration). Ceci est en partie dû à des effets secondaires graves, en particulier le déclenchement du syndrome de libération des cytokines, qui pourrait être la conséquence de l'interaction entre l'oblimersen et le TLR-9 (toll like receptor 9) (Kang and Reynolds, 2009; O'Brien et al., 2005).

Un autre oligonucléotide antisens ciblant BCL-xL a également été développé peu de temps après (Heere-Reess et al., 2002). Mais là encore, les résultats en monothérapie ont été peu concluants. Malgré des innovations apportées (oligonucléotides antisens bispécifiques BCL-2/BCL-xL (Zangemeister-Wittke et al., 2000)), ou le ciblage de nouvelles protéines d'intérêt telle que MCL-1 (Sieghart et al., 2006), cette stratégie a été peu à peu délaissée. Elle souffre du manque de stabilité des oligonucléotides dans les liquides biologiques (Sun et al., 2017).

En parallèle de cette approche, d'autres stratégies ont été envisagées. La première d'entre elles est le développement d'un anticorps ciblant BCL-2 (Piché et al., 1998). Cet anticorps, qui avait pour but de cibler BCL-2 pour réduire son niveau d'expression, n'a pas été évalué en clinique. Un ribozyme ciblant BCL-2 a également été mis au point (Luzi et al., 2003). Ces petites molécules synthétiques d'ARN catalytiques ciblent l'ARNm de BCL-2 afin d'inhiber son expression. Malgré de bons résultats *in vitro*, aucun essai clinique ne semble avoir été réalisé, sûrement à cause de problèmes de stabilité.

Model 1



Model 2

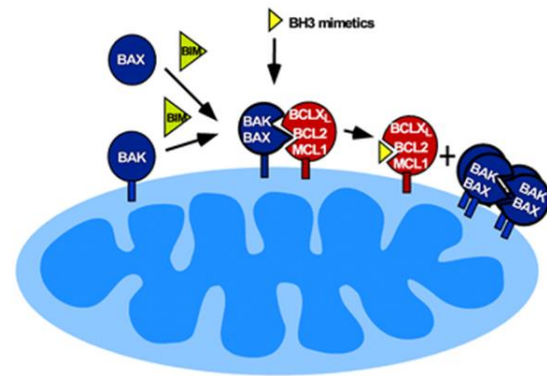


Figure 16 : Mécanisme d'action des BH3-mimétiques. Modèle 1 : le BH3-mimétique permet la libération des BH3-only activateurs piégés des anti-apoptotiques, qui pourront alors jouer leur rôle en activant BAX et BAK. Modèle 2 : Le BH3-mimétique libère BAX et BAK du complexe qu'ils formaient avec l'anti-apoptotique afin de pouvoir se dimériser et former un canal.

D'après : Dai et al., 2016

Tout comme les oligonucléotides antisens, ces deux stratégies, ont probablement été confrontées à un manque de stabilité, ce qui n'a pas permis d'obtenir des résultats *in vivo* concluants (Thomas et al., 2013b).

2) Antagoniser les protéines anti-apoptotiques en ciblant le domaine BH3

Devant les résultats limités de ces différentes stratégies, une nouvelle approche a été proposée : développer des antagonistes des protéines anti-apoptotiques. Ainsi, un peptide dérivé de BAD auquel un acide gras a été greffé (le cpm-1285) a été utilisé pour moduler l'activité anti-apoptotique de BCL-2 (Wang et al., 2000). Malgré des résultats encourageant *in vitro* et *in vivo* dans des modèles animaux, aucune étude clinique n'a été publiée avec ce composé. Cette molécule, a cependant permis de valider la stratégie consistant à antagoniser les protéines anti-apoptotiques en entrant en compétition avec les pro-apoptotique au niveau de leur sillon hydrophobe. Malgré le développement de plusieurs autres BH3-peptides (Denicourt, 2004), ceux-ci vont être délaissés au profit de petite molécules appelées BH3-mimétiques.

B. Les petites molécules inhibitrices : BH3-mimétiques

Ces dernières années ont vu l'avènement de petites molécules inhibitrices dites BH3-mimétiques. Contrairement aux peptides ou autres oligonucléotides antisens, ces petites molécules, de masse inférieure à 750 Daltons, possèdent un coût de production peu élevé ce qui les rend plus attractives (Thomas et al., 2013b). Ces molécules dont le rôle est de perturber les interactions entre les pro- et les anti-apoptotiques sont identifiées par différentes méthodes incluant le screening virtuel, ou le criblage à haut débit de molécules naturelles ou de synthèse.

1) Définition

Les BH3-mimétiques sont une nouvelle classe de petites molécules qui peuvent induire l'apoptose en se fixant sur les protéines anti-apoptotiques avec une forte affinité, permettant la libération des acteurs de l'apoptose. Pour qu'une petite molécule soit considérée comme un BH3-mimétique, elle doit se lier au niveau du sillon hydrophobe des anti-apoptotiques, le même qui permet à ces protéines de lier les protéines pro-apoptotiques, induisant ainsi la rupture du complexe entre pro- et anti-apoptotiques (Dai et al., 2016; Letai et al., 2002) (Figure 16). De la même façon que les protéines *BH3-only*, ces BH3-mimétiques induisent l'oligomérisation de BAX et BAK (Kuwana et al., 2005), la perméabilisation de la membrane mitochondriale (Kuwana et al., 2005), la sortie du cytochrome c, et *in fine*, l'activation des caspases (Broecker-Preuss et al., 2016). L'action de ces molécules est rapide, et elles induisent l'apoptose en 10h environ (S. Soderquist and Eastman, 2016). L'un des critères importants pour l'appellation « BH3-mimétique » est que l'apoptose induite soit être dépendante de l'activation de BAX et BAK. Ainsi, beaucoup de molécules, présentées comme des BH3-mimétiques, mais capables d'induire l'apoptose dans des cellules déficientes pour BAX et BAK ont dû être reclassifiées (van Delft et al., 2006). C'est le cas par exemple de l'Obatoclax, un pan-inhibiteur (qui cible BCL-2, BCL-xL et

MCL-1) développé par Gemin X (Nguyen et al., 2007; Or et al., 2016) dont l'effet anti-apoptotique ne dépendant pas uniquement de l'activation de BAX et BAK (Konopleva et al., 2008). Cet inhibiteur a d'ailleurs été abandonné pour des raisons de toxicité (Hwang et al., 2010). Certains vont même plus loin dans la classification des BH3-mimétiques, en excluant les composés à l'origine d'une augmentation de NOXA, qui signifierait que la molécule induit l'apoptose *via* un stress du RE (S. Soderquist and Eastman, 2016).

2) *Les premiers BH3-mimétiques : BCL-xL comme cible privilégiée*

Les « vrais » BH3-mimétiques sont donc rares. La première molécule reconnue comme telle est l'ABT-737 développée par les laboratoires Abbott. Elle mime le domaine BH3 de BAD, qui inhibe spécifiquement BCL-2, BCL-xL et BCL-w avec une très forte affinité (de l'ordre du nM) (Oltersdorf et al., 2005). Bien que développé pour des modèles de tumeurs solides, son efficacité dans les hémopathies malignes, a très vite été démontrée (Chauhan et al., 2007; Del Gaizo Moore et al., 2007; Konopleva et al., 2006). Cependant, ce composé présente une faible biodisponibilité orale (Tse et al., 2008) car il est très lipophile, et présente une solubilité aqueuse inférieure à 1 µg/mL (Brown, 2012). Un dérivé de cette molécule permettant une administration orale, l'ABT-263, a donc été développé (Park et al., 2008; Tse et al., 2008). Malgré de bons résultats en clinique avec une régression tumorale effective chez les patients atteints de LAL, cette molécule a dû être écartée car elle induit une diminution conséquente du nombre de plaquettes chez les patients (thrombopénie) (Tse et al., 2008). Ce phénomène qui avait déjà été décrit avec l'ABT-737 (Oltersdorf et al., 2005) et est dû au fait que BCL-xL joue un rôle crucial dans la survie des plaquettes (Zhang et al., 2007). En plus des plaquettes, ce sont également les LT et LB immatures et d'autres cellules dont la survie est médiée par BCL-xL qui sont affectées (Mérino et al., 2012). Les BH3-mimétiques ciblant BCL-xL suscitent toujours un certain intérêt dans la communauté scientifique. Ainsi, deux composés, le WEHI-539 par le Walter and Eliza Hall Institut (Lessene et al., 2013), et de A-1155463 (Tao et al., 2014) ont été développés par la suite. Tout l'intérêt désormais serait de mettre en place une stratégie pour prévenir les thrombopénies associées à ces molécules.

3) *Le ciblage de BCL-2 : ABT-199*

Les recherches se sont ensuite orientées vers des inhibiteurs plus spécifiques de BCL-2. Deux laboratoires pharmaceutiques, Servier et Abbott, ont respectivement développé le S55746 (Casara et al., 2018) et l'ABT-199 (Davids and Letai, 2013). Le premier, après avoir montré des résultats prometteurs en pré-clinique, a été testé en monothérapie chez des patients, dans le cadre de trois études cliniques : patients atteints de LCL et de LNH (NCT02920697), patients atteints de LAM et de MDS (NCT02920541), et patients atteints de LF et MCL (NCT02603445). Aucun résultat de ces études n'est pour le moment publié. Le second est devenu une référence dans le traitement de certaines hémopathies malignes, comme décrit ci-dessous.

Essai clinique	Combinaison	Pathologie	Réponse
Phase I	MT	R/R LLC	ORR—79 %
Phase Ia	MT	R/R NHL	ORR—48 %
Phase II	MT	R/R LAM	ORR—15 %
		nouvelle LAM	
Phase Ib	V + R	R/R CLL	ORR—88 %
			CR/CRi—32 %
			PR—56 %
Phase I	V + BR	R/R NHL	ORR—61.5 %
Phase Ib	V + BR	R/R CLL	Non reporté
		Untreated CLL	
Phase Ib	V + O	R/R CLL	Non reporté

Figure 17 : Essai clinique de l'ABT-199 en monothérapie (MT) ou en combinaison avec d'autres traitements.

(R/R : résistant ou en rechute / ORR : taux de réponse global / V : Venetoclax / R : Rituximab / B : bentamustine / O : obinutuzumab)

D'après : Cang et al., 2015

(a) La molécule

ABT-199, est un inhibiteur spécifique de BCL-2 qui préserve l'intégrité des plaquettes (Souers et al., 2013), contrairement aux molécules précédemment développées qui ciblaient aussi BCL-xL. Cette molécule développée par AbbVie (anciennement Abbott), en collaboration avec Genentech et le WEHI (Walter and Eliza Hall Institute) a permis de créer un véritable espoir autour de ces BH3-mimétiques. Les résultats pré-cliniques étaient très prometteurs :

- Spécificité de BCL-2 (Souers et al., 2013).
- Affinité pour BCL-2 au niveau sub-nanomolaire (Cang et al., 2015).
- Induction de l'apoptose rapide et spécifique (S. Soderquist and Eastman, 2016).
- Dépendance à BAX et BAK (van Delft et al., 2006).
- Effets antitumoraux *in vitro* sur différentes pathologies : LNH (Souers et al., 2013) ; LLC (Vogler et al., 2013) ; et LAM (Pan et al., 2014).
- Effets antitumoraux *in vivo* dans les lymphomes (Vandenberg and Cory, 2013) et les leucémies (Peirs et al., 2014).

Une multitude d'essais clinique a été initiée (Figure 17) en monothérapie, avec des résultats prometteurs, puis en combinaison (Cang et al., 2015). Cette molécule, désormais commercialisée en France sous le nom de Venetoclax®, a obtenu une autorisation de mise sur le marché par la FDA, en 2016, en monothérapie pour les patients atteints de LLC présentant la délétion (17p), et plus récemment (2020) en combinaison (avec de l'azacitidine, decitabine, ou de faibles doses de cytarabine) pour des patients atteints de LAM.

(b) Les résistances

Malgré l'enthousiasme qu'a suscité cette molécule, certaines données ont mis en évidence ses limites.

Ainsi, plusieurs études ont montré que l'ensemble des tumeurs ne sont pas sensibles au Venetoclax®. Par exemple, les LF présentant la translocation t(14;18) activent certaines voies de signalisations qui conduisent à une diminution de BCL-2 et de BIM, à l'origine de résistances au Venetoclax® (Bodo et al., 2016). Dans d'autres lymphomes, une mutation de BCL-2 au niveau de son domaine BH3, ou de BAX au niveau des régions permettant son ancrage à la mitochondrie, peuvent aussi entraîner des résistances (Fresquet et al., 2014).

D'autre part, des travaux ont permis de mettre en évidence l'acquisition de résistances au Venetoclax® après une exposition chronique. Ces résistances sont d'ailleurs souvent associées à une augmentation de l'expression de MCL-1 et de BCL-xL, qui seraient responsables de cette résistance. Celle-ci serait d'ailleurs levée en cas de co-traitement avec un inhibiteur de MCL-1 ou de BCL-xL (Phillips et al., 2015; Tahir et al., 2017). Ces résultats *in vitro* ont été confirmés et complétés par l'utilisation du test de BH3-profiling. Il a permis de montrer que l'augmentation de MCL-1 et de BCL-xL, était bien associée

à une dépendance acquise de ces cellules pour ces deux protéines, dans le processus de résistance au Venetoclax® (Lin et al., 2016). La surexpression de MCL-1 pourrait notamment s'expliquer par l'activation des voies de signalisation impliquant la voie mTOR/PI3K/AKT (Choudhary et al., 2015).

Les études cliniques portant sur le Venetoclax® administré en monothérapie à des patients atteints de LAM, confirment que certains patients ont des prédispositions pour résister au traitement (Konopleva et al., 2016) et que d'autres acquièrent des résistances au cours du traitement (Dousset et al., 2017). Les résistances les plus retrouvées sont portées par les protéines anti-apoptotiques MCL-1 et BCL-xL. Ces résultats sont loin d'être surprenants puisque le même type d'observation avait déjà été retrouvées lors du développement de l'ABT-737, où MCL-1 était associé en grande partie à la résistance de cette molécule (van Delft et al., 2006; Vogler et al., 2009).

4) *Les inhibiteurs de MCL-1 : une cible à la mode*

Le Venetoclax® est donc une molécule très intéressante, mais en monothérapie, elle est confrontée à des problèmes de résistances portés par les protéines anti-apoptotique MCL-1 et BCL-xL. Il est donc nécessaire de trouver des protocoles de traitement permettant de la combiner avec d'autres molécules. La première stratégie a consisté à combiner cette molécules avec des chimiothérapies classiques comme des agents hypométhylants ou la cytarabine (Gaut et al., 2020). La combinaison entre le Venetoclax® et l'azacitidine, ou la decitabine, ou la cytarabine a même été autorisée par la FDA en 2018 (Juárez-Salcedo et al., 2019). L'autre stratégie est de combiner le Venetoclax® avec des molécules ciblant MCL-1 et BCL-xL, deux protéines impliquées dans les résistances à ce composé (Li et al., 2019). C'est donc pour cette raison qu'il est essentiel de développer des inhibiteurs spécifiques de ces deux protéines. Le développement des inhibiteurs de BCL-xL s'étant heurté à des problèmes de toxicité au niveau des plaquettes (cf. section IV-B), les espoirs se sont donc tout naturellement portés sur les inhibiteurs de MCL-1.

(a) *Rationnel scientifique d'un inhibiteur de MCL-1*

Le rôle de MCL-1 dans la résistance aux traitements ne se limite pas à son implication dans la résistance au Venetoclax® et à l'ABT-737. De façon générale, MCL-1 est très impliquée dans le processus cancéreux. D'ailleurs, il s'agit de l'un des gènes les plus amplifié dans les cancers (Beroukhim et al., 2010; Zack et al., 2013), et sa surexpression est d'ailleurs directement associée à la tumorigénèse (Campbell et al., 2010). Cela est d'autant plus vrai dans les cancers hématologiques, où les patients avec un mauvais pronostic présentent fréquemment un niveau important de MCL-1 (Wei et al., 2020). Par exemple une surexpression de MCL-1 accélère *in vivo* la lymphomagenèse c-Myc-dépendante (Campbell et al., 2010; Kelly et al., 2014). Son implication dans la croissance tumorale a aussi été démontrée dans les LAL exprimant la protéine recombinante BCR-ABL ou dans les lymphomes B (Koss et al., 2013), les lymphomes T (Spinner et al., 2016), et les MM (Gong et al., 2016). Son rôle dans les LAM (Glaser et al., 2012), dans les MM (Slomp and Peperzak, 2018) et certains lymphomes (Souers et

al., 2013) est encore plus important puisque elle permet, seule, de maintenir le caractère tumoral de ces cellules, ce qui n'est pas le cas des autres membres anti-apoptotiques BCL-xL et BCL-2. En plus de son rôle dans la survie et le maintien des cellules malignes, MCL-1 est également impliquée dans les rechutes comme cela a été démontré dans le MM (Wuillème-Toumi et al., 2005). De la même façon que la surexpression de la protéine MCL-1 est impliquée dans la résistance aux BH3-mimétiques ciblant BCL-2 et/ou BCL-xL, elle est également associée à la résistance aux radiothérapies (Trivigno et al., 2012) et aux chimiothérapies, comme le cisplatine (Michels et al., 2014), les drogues ciblant la tubuline (Wertz et al., 2011), ou le cyclophosphamide (Campbell et al., 2010). Pour finir, la suppression de l'expression de MCL-1 par une délétion inductible de son gène, ou en utilisant des ARNs interférants par exemple, permet de contourner les résistances acquises liées à cette protéine (Glaser et al., 2012; Kelly et al., 2014; Koss et al., 2013).

Tous ces arguments renforcent l'idée qu'il est intéressant de développer un inhibiteur spécifique de MCL-1.

(b) Essais cliniques

Bien que le développement d'inhibiteur de MCL-1 soit compliqué, du fait de son sillon hydrophobe peu profond et assez rigide comparé à celui de BCL-2 et BCL-xL, de nombreuses molécules ciblant MCL-1 ont déjà été décrites (Wei et al., 2020). Il est possible de citer notamment le Gossypol (Kitada et al., 2003) ou A-1210477 (Hird and Tron, 2019). Sur le critère de l'apoptose dépendante de BAK et de BAX, peu sont de « vraies » BH3-mimétiques. Le Gossypol par exemple est capable d'induire l'apoptose dans des cellules KO pour BAK et BAX, (van Delft et al., 2006). Encore moins de molécules ont passé le cap du développement pré-clinique : A-1210477 par exemple, qui malgré des résultats *in vitro* intéressants, n'a pas présenté d'activité *in vivo* (Hird and Tron, 2019). En réalité, seuls 3 composés sont actuellement testés chez l'Homme :

- Le premier composé qui a été publié dans la littérature est celui développé par Servier, en partenariat avec Novartis, le S63845 (Kotschy et al., 2016). Ce composé qui a montré une activité sur des lignées de lymphomes, de leucémies et de MM, possède une très forte affinité pour MCL-1, avec un *K_d* déterminé par résonance plasmatique de surface (SPR), de 0.19 nM. Il se lie spécifiquement au niveau du sillon hydrophobe de MCL-1, est capable de rompre le complexe formé entre MCL-1 et BAK et d'activer l'apoptose de façon dépendante de BAK et de BAX, ce qui en fait un vrai BH3-mimétique. *In vivo*, il montre de bons effets à 25 mg/kg injecté en intraveineux (IV) (1x/jour pendant cinq jours), sans affecter les tissus sains, mais en réduisant légèrement le nombre de leucocytes. Cependant, ce composé n'a pas été testé chez l'Homme. En revanche S64315, un composé très proche dont l'étude préclinique a été publiée ces derniers jours (Szlavik et al., 2020), est actuellement évalué cliniquement, chez des patients réfractaires ou en rechutes de lymphomes ou de MM dans l'étude NCT02992483 (statut : en

cours), et chez des patients atteints de LAM ou de SMD dans l'étude NCT02979366 (statut : terminé). Les résultats de ces études ne sont pour le moment pas connus.

Plus récemment, deux autres composés ont été décrits : un composé développé par AstraZeneca, et un développé par Amgen.

- Le composé AZD5991 (AstraZeneca) (Tron et al., 2018) est une molécule polycyclique ayant une bonne affinité pour MCL-1 avec un K_d de 17 nM (en SPR). Lui aussi se lie au niveau du sillon hydrophobe, et induit l'apoptose de façon dépendante de BAK et BAX ce qui en fait également un vrai inhibiteur BH3-mimétique. Ce composé permet de rompre le complexe MCL-1/BAK. *In vitro*, il présente une efficacité intéressante contre les tumeurs hématologiques (MM ; LAM ; LNH). Ces données sont retrouvées *in vivo*, où il présente une activité antitumorale en monothérapie entraînant une régression complète à 100 mg/kg (IV : 1 injection), dose qui semble bien tolérée par la souris. Cette molécule est actuellement testée chez des patients réfractaires ou en rechutes de différentes hémopathies malignes (LLC ; MM ; LAM ; SMD) dans le cadre de l'étude NCT03218683 (statut : en cours). Là encore, il est trop tôt pour avoir des résultats.
- Pour finir, le composé macrocyclique AMG-176 (Amgen) (Caenepeel et al., 2018), présente lui aussi une très bonne affinité pour MCL-1 avec un K_i déterminé par TR-FRET (Time-Resolved Förster Resonance Energy Transfer) de 0.06 nM. Les études pré-cliniques *in vitro* ont été réalisées avec AMG-8621, un analogue de AMG-176. Elles ont montré que sa fixation au niveau du domaine BH3 induisait une apoptose dépendante de la voie mitochondriale (vrai BH3-mimétique) et qu'il est capable de rompre les complexes MCL-1/BAK et MCL-1/BIM. Son efficacité a été démontrée de façon homogène sur les lignées de MM, mais de façon plus hétérogène sur les lignées de LAM et de DLBCL. Concernant l'étude préclinique *vivo*, réalisée avec AMG-176, celle-ci montre une régression tumorale avec un traitement de 60 mg/kg administré par voie orale (1x/jour). Une étude clinique est actuellement en cours chez des patients réfractaires ou en rechute de MM ou de LAM : NCT02675452 (statut : en cours). Aucun résultat n'est pour l'instant publié, mais il est intéressant de noter que dans l'étude clinique AMG-176 est administré en IV alors que dans les études précliniques, l'administration était *Per os*. Un autre inhibiteur de MCL-1 développé par Amgen est également en essai clinique : il s'agit du AMG-397, une petite molécule administrée par voie orale, et dont les données précliniques sont quasi-inexistantes. Cette étude est menée sur des patients atteints de MM, LNH, LAM, et DLBCL et référencée sous le nom : NCT03465540 (statut : en pause). Elle a notamment pour objectif de mesurer les toxicités cardiaques du produit.

Les résultats des premiers essais de ces molécules chez l'humain vont être intéressants puisque même si ces composés sont bien tolérés par les souris, il ne faut pas oublier qu'ils sont beaucoup moins affins pour le MCL-1 murin que celui humain (Caenepeel et al., 2018; Kotschy et al., 2016; Tron et al., 2018), et pourraient induire d'éventuelles toxicités chez l'humain (Wei et al., 2020). Pour anticiper ces données, le WEHI a développé une souris exprimant MCL-1 humain (Brennan et al., 2018). Ce modèle a d'ailleurs été utilisé par Amgen pour l'évaluation *in vivo* de AMG-176 (Caenepeel et al., 2018), et par Servier pour S63845 (Kotschy et al., 2016). Amgen a observé que son composé entraînait une diminution des cellules B, des monocytes et des neutrophiles, et Servier, que la dose maximum tolérée était de 12.5 mg/kg (Wei et al., 2020).

Pour résumer, on peut dire que même si les données pré-cliniques associées à ces molécules sont très prometteuses, aucun résultat de leur évaluation clinique n'a pour le moment été rendu publique. Certaines de ces études sont même actuellement (ou ont récemment été) en pause, suggèrent que les industriels font face à quelques difficultés, probablement liées à une éventuelle toxicité des composés.

5) *Combinaisons et perspectives*

Bien que les BH3-mimétiques aient été développés pour une utilisation en monothérapie, une utilisation en combinaison pourrait constituer une alternative thérapeutique intéressante. Ainsi, au vu des résultats obtenus avec le Venetoclax® (*i.e.*, développement d'une résistance acquise liée à une surexpression de BCL-xL et de MCL-1 (Tahir et al., 2017) ou insensibilité des cellules ayant un niveau constitutif élevé de BCL-xL et MCL-1 (Choudhary et al., 2015)), une combinaison de deux BH3-mimétiques pourrait notamment être envisagée. Ce genre de combinaison serait d'autant plus intéressante, qu'à l'inverse, les cellules qui deviennent résistantes à MCL-1, affichent une dépendance accrue à BCL-2 (Ramsey et al., 2018). Des études précliniques associant un inhibiteur de BCL-2 (Venetoclax®) et un inhibiteur de MCL-1 : S63845 (Algarín et al., 2020; Prukova et al., 2019), AMG-8621 (Caenepeel et al., 2018), ou AZD-5991 (Siu et al., 2019; Tron et al., 2018) ont d'ailleurs permis de montrer l'effet synergique de l'utilisation simultanée de ces deux types d'inhibiteurs. Le même type de résultats est obtenu en combinant le S55746 et le S63845 (Moujalled et al., 2019). Une autre étude, réalisée *ex vivo* sur des cellules dépendantes de BCL-xL et résistante au Venetoclax®, souligne l'efficacité de la combinaison entre un inhibiteur de MCL-1 et un inhibiteur de BCL-2, alors capable de rétablir l'apoptose dans ce modèle (Seiller et al., 2020). Il est aussi important de souligner que ces combinaisons entre deux BH3-mimétiques ciblant MCL-1 et BCL-2, induisent une apoptose dépendante de BAX et de BAK (Moujalled et al., 2019). Ce type de combinaison pourrait aussi permettre de contourner la toxicité qui est associée aux inhibiteurs de MCL-1. Ainsi une très bonne efficacité antitumorale a été montrée si on utilise un inhibiteurs de MCL-1 (à une dose non efficace en monothérapie), en combinaison avec un inhibiteur de BCL-2 (Seiller et al., 2020).

Ces résultats pré-cliniques encourageants ont motivé les industriels à évaluer ces combinaisons en clinique avec :

- L'étude NCT03672695 qui traite des patients atteints de LAM avec une combinaison entre le S63845 et le Venetoclax® (statut : en pause).
- L'étude NCT03797261 qui traite des patients atteints de LAM, LNH et DLBCL avec une combinaison entre l'AMG-176 et le Venetoclax® (statut : en pause).
- L'étude NCT03218683 qui traite des patients atteints de leucémies et lymphomes en tous genres, avec une combinaison entre l'AZD-5991 et le Venetoclax® (statut : en cours).

Malheureusement aucun retour sur ces essais n'est encore disponible.

Mais ces combinaisons entre BH3-mimétiques ciblant différentes protéines ne sont pas les seules alternatives. Ainsi, des études précliniques ont déjà associé un BH3-mimétique ciblant MCL-1 avec des agents cytotoxiques. Une combinaison entre AMG-8621 et différentes molécules cytotoxiques (inhibiteurs du protéasome / molécules immunomodulants / corticostéroïdes) a notamment été étudiée *in vitro*, avec des résultats très intéressants (Caenepeel et al., 2018). Cette combinaison pourrait d'ailleurs avoir un double intérêt : limiter les résistances associées aux chimiothérapies, et limiter également les effets secondaires liés à ces deux types de molécules. Une étude très encourageante va d'ailleurs dans ce sens, en montrant *in vivo*, que l'utilisation d'un anti-MCL1, combiné à une chimiothérapie (5-FU ; Cytarabine ; Doxorubicine ; Etoposide) ne serait pas associé à une augmentation des effets secondaire (Brinkmann et al., 2017).

Par ailleurs, des inhibiteurs du protéasome induisent une augmentation de NOXA, ce qui permet une inhibition indirecte de MCL-1 (Gomez-Bougie et al., 2007). La combinaison d'un inhibiteur du protéasome (bortezomib ou carfilzomib) avec un inhibiteur de MCL-1, AZD-5991 (Tron et al., 2018) ou AMG-176 (Caenepeel et al., 2018) a d'ailleurs permis de montrer une synergie de leur effets *in vivo*.

En conclusion les BH3-mimétiques, notamment ceux ciblant MCL-1, ont montré des résultats précliniques intéressants. Les multiples combinaisons possibles avec d'autres types de drogues permettent d'envisager de nombreuses alternatives thérapeutiques pour diverses pathologies. On peut donc supposer qu'ils deviendront demain des acteurs majeurs de la lutte anti-cancéreuse.

V. Les drimanes comme nouveau candidat

Au cours de mon doctorat, je me suis intéressé à un nouvel inhibiteur de MCL-1 d'origine naturelle, qui se fixe au niveau du sillon hydrophobe BH3. Encore aujourd'hui, de nombreux médicaments ont une origine naturelle. Ces molécules naturelles peuvent être utilisées directement après extraction et purification mais sont, le plus souvent, modifiées chimiquement afin d'améliorer leur activité biologique ou leur paramètres pharmacologiques (Swinney and Anthony, 2011).

A. Avantages et inconvénients des molécules naturelles comme sources de médicaments

1) Avantages

Les produits naturels bioactifs sont des métabolites secondaires (ou métabolites spécialisés) qui sont synthétisés par des plantes, des organismes marins ou des micro-organismes (bactéries et champignons). Au contraire des métabolites primaires, ils ne sont pas impliqués dans leur croissance, leur développement ou leur reproduction mais ils jouent un rôle écologique primordial en permettant l'adaptation de ces espèces à leur environnement. Ces molécules jouent souvent un rôle de défense contre les prédateurs. Les métabolites spécialisés possèdent souvent des structures chimiques originales et complexes leur garantissant une interaction optimisée avec leur cible ce qui a permis la survie des espèces au cours des millénaires (Feher and Schmidt, 2003; Verdine, 1996). Elles possèdent un nombre plus important de centres stéréogènes que les molécules de synthèse, ce qui leur confère plus de rigidité et de spécificité (Feher and Schmidt, 2003). Comme ces métabolites secondaires sont produites pour répondre à des contraintes environnementales, en constante évolution, leur structure chimique, s'adapte en permanence (*via* des phénomènes mutationnels des protéines qui les produisent). Elles sont capables d'interagir avec des cibles biologiques spécifiques (Seca and Pinto, 2019).

La grande diversité structurale des produits naturels fait qu'ils occupent une partie plus importante et différente de l'espace chimique que les chimiothèques synthétiques et que ce sont potentiellement de bons candidats pour des cibles biologiques nouvelles et/ou difficiles à cibler (Dobson, 2004; Reymond, 2015). Cribler des molécules d'origine naturelle pour découvrir un candidat pour une cible donnée, permet d'avoir accès à une banque de molécules d'une diversité chimique quasi infinie (Kinghorn et al., 2009). A l'heure actuelle, environ un million de molécules naturelles ont été répertoriées. Parmi elles, entre 200 000 et 250 000, dont seulement la moitié est caractérisée, présentent une activité biologique (Demain and Vaishnav, 2011).

Les produits naturels sont « prévalidés » par la nature et peuvent être considérés comme des structures privilégiées (Rosén et al., 2009).

2) Inconvénients

L'intérêt des molécules naturelle est cependant tempéré par le fait que leur structure chimique est limitée par le nombre et la nature des réactions biosynthétiques possibles, par le nombre des précurseurs chimiques biodisponibles ainsi que par leur utilité biologique (car les organismes ne produisent que des métabolites qui lui sont utiles) (Feher and Schmidt, 2003). De plus leur complexité rend leur synthèse compliquée et couteuse pour les industriels qui souhaiteraient la produire en grande quantité (Kuete and Efferth, 2014).

La reproductibilité d'un lot à l'autre, lorsque la molécule est extraite, est beaucoup plus difficile à prévoir et à contrôler, ce qui rend leur contrôle qualité très compliqué, comparé aux molécules de synthèses, dont le protocole de fabrication est défini et maîtrisé (Barrajón-Catalán, 2019). De plus, les molécules naturelles ne permettent pas plus de contourner les résistances acquises que les drogues de synthèses (Barrajón-Catalán, 2019).

Pour finir, la quantité de produit disponible est également une limite de l'utilisation de ces molécules : elles sont souvent isolées de plantes sauvages, parfois endémiques d'une région et/ou difficiles d'accès. Or la validation biologique de l'effet antitumoral d'un composé s'effectue *via* une évaluation *in vivo* sur des souris greffées à partir de tumeurs humaines (xénogreffes), des études très couteuses en composé (au moins 100 mg sont nécessaires) (Kinghorn et al., 2009). Il n'est alors pas toujours possible d'obtenir la quantité de composé nécessaire à ces essais ou aux essais cliniques qui requièrent des kilogrammes de matière. Cela peut poser des problèmes écologiques, comme dans le cas du Taxol®, qui a conduit à la destruction de nombreux ifs du pacifique. Des alternatives, telle que l'hémisynthèse doivent alors être trouvées.

Depuis 2014, un protocole international sur l'accès aux ressources génétiques et le partage juste et équitable des avantages découlant de leur utilisation a été mis en place. Il s'agit du protocole de Nagoya. Il vise un partage juste et équitable des avantages découlant de l'utilisation des ressources génétiques de plantes, animaux, bactéries ou autres, dans un but commercial, ou de recherche. Malgré l'intérêt indéniable de cet accord qui protège la biodiversité et cherche à éviter la biopiraterie, il peut représenter un frein au développement de molécules naturelles. En effet, ce protocole a pour but de partager justement et équitablement les avantages pécuniaires découlant de l'utilisation de molécules naturelles, entre les organismes ou entreprises qui les développent, et le pays/région d'où la ressource génétique qui la produit est issue. Dans les faits, de nombreuses entreprises pharmaceutiques sont aujourd'hui réticentes à travailler sur les molécules naturelles même si certains pays comme les USA et le Canada n'ont pas ratifié ce protocole. A l'échelle nationale, ce protocole se traduit par l'accès et le partage des avantages découlant de l'utilisation des ressources génétiques et des connaissances traditionnelles associées, mieux connu sous le nom d'APA.

B. Les molécules naturelles sur le marché des anti-cancéreux

1) Une stratégie qui a fait ses preuves

(a) Généralités

Le cancer est connu depuis l'antiquité. En médecine traditionnelle, les seuls traitements envisagés étaient à base d'extrait naturels, contenant des centaines ou des milliers de métabolites spécialisés actifs. Choisir une molécule naturelle pour cibler le cancer n'est donc pas une stratégie innovante. En revanche, il s'agit d'une stratégie thérapeutique qui a déjà fait ses preuves puisque depuis 1940, sur 155 agents anti-cancéreux utilisés dans la médecine occidentale, 76% sont des molécules inspirées de la nature, parmi lesquelles presque la moitié (47%) sont des molécules d'origines naturelles. Ce sont soit des molécules naturelles *per se* (14%), des molécules modifiées par hémisynthèse (28%) ou des dérivés de produits naturels (5%) (Newman and Cragg, 2020). Certains de ces composés sont isolés de micro-organismes comme les anthracyclines et la bléomycine, d'autres de plantes comme les alcaloïdes de la pervenche et les taxanes, des antimétabolites interagissant avec la tubuline ou les microtubules.

(b) Le cas du Taxotère

La famille des taxanes est d'ailleurs particulièrement intéressante, puisqu'elle illustre bien la recherche menée autour des produits naturels : dans les années 60, deux docteurs, Dr Wall et Dr Wani ont déterminé la structure de la molécule de Taxol®. Cette molécule, isolée à partir de l'écorce de l'if du Pacifique (*Taxus brevifolia*), présente une activité antitumorale (Wani et al., 1971). Mais un problème survint peu de temps après, lorsque l'arbre qui fournit cette molécule, fut menacé par les récoltes intensives de son écorce. En effet, il faut couper 6 arbres centenaires pour produire 2g de Taxol® (Les marchés de la biodiversité, 2007), soit un rendement de 0.014%. Cependant une équipe de chimiste de l'ICSN (Institut de Chimie des Substances Naturelles), menée par le Dr. Potier, a découvert qu'un précurseur du Taxol® (la DAB), est contenu dans les feuilles d'If européen (*Taxus baccata*). Ce composé conduit, par hémisynthèse, au Taxol® mais également à la formation d'une nouvelle molécule (le Taxotère®), deux fois plus active que le Taxol® (Guéritte-Voegelein et al., 1994). Grâce à ce nouveau procédé, 1kg d'aiguille d'if suffisent pour obtenir 1g du précurseur nécessaire à la synthèse du Taxotère. De plus la récolte des feuilles ne nuit pas à l'arbre. Développé par Aventis (maintenant Sanofi), le Taxotère® a été autorisé par la FDA dès 1996, et a notamment été utilisé dans le traitement du cancer du sein, du poumon non à petites cellules, et de la prostate. Il est d'ailleurs devenu l'un des médicaments ayant généré le plus de chiffre d'affaire (2.4 milliards rien que pour l'année 2010), même si son brevet est désormais tombé dans le domaine public.

(c) Une stratégie déjà appliquée pour cibler la famille BCL-2

Dans la littérature, quelques familles de produits naturels ciblant les protéines de la famille de BCL-2 ont été isolées puis développées.

Ainsi, de nombreux peptides de types antimycine ont été isolés d'actinobactérie. On peut, par exemple, citer l'antimycine A, une molécule qui se fixe au niveau du domaine BH3 de la protéine BCL-xL et est

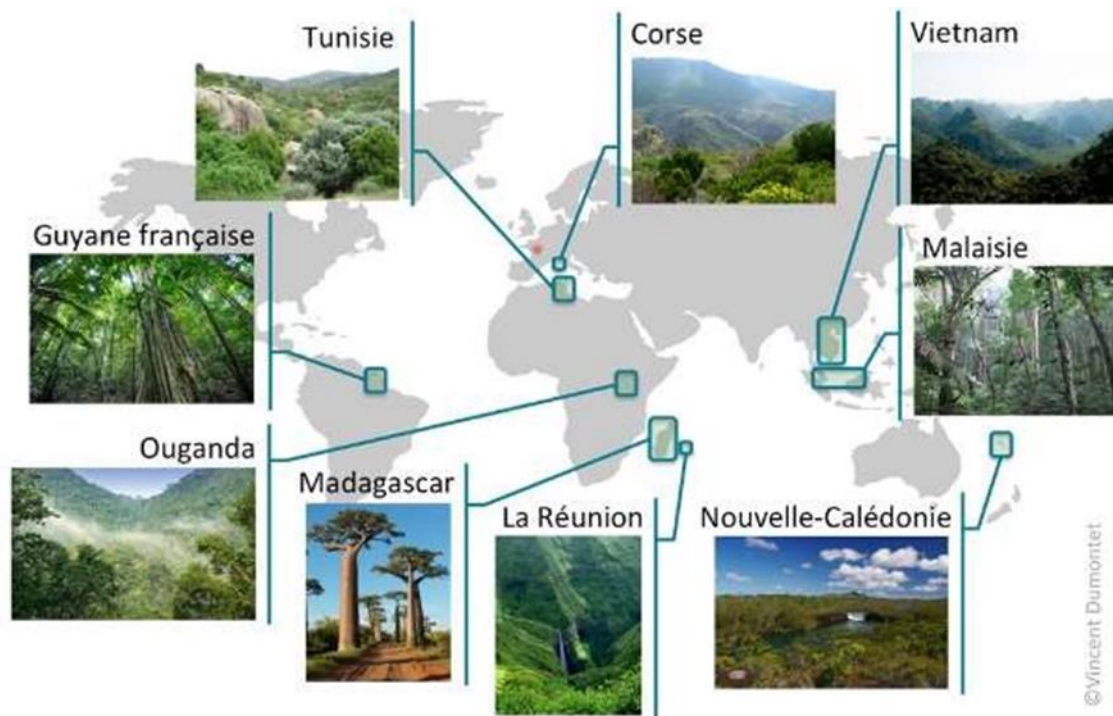


Figure 18 : Liste des coopérations nationales et internationales qui ont permis à l'ICSN, la formation de l'extractothèques.

D'après la thèse de Alma ABOU-SAMRA

capable d'inhiber sa fonction (Tzung et al., 2001), mais également d'induire l'apoptose d'hépatocytes surexprimant BCL-xL (2008).

Par ailleurs, plusieurs molécules ciblant les protéines de la famille BCL-2 ont été développées, à partir du (-)-gossypol, une molécule isolée des graines de coton. Cette molécule est un pan-inhibiteur et cible MCL-1, BCL-2 et BCL-xL avec une affinité submicromolaire (Etxebarria et al., 2008) en se fixant à leur domaine BH3 (Wang et al., 2006). Ce composé n'est cependant pas spécifique de ces protéines comme le montrent plusieurs études (Kitada et al., 2003; Opydo-Chanek et al., 2017) et n'est donc pas considéré comme un BH3-mimétique au sens strict du terme, puisqu'il est capable d'induire l'apoptose dans des cellules déficientes pour les protéines BAX et BAK, preuve qu'il active également d'autres voies de signalisations (van Delft et al., 2006). Il n'empêche que le gossypol a été évalué dans plusieurs études cliniques portant sur différents types de cancers, seul ou en combinaison, mais n'a pas obtenu d'autorisation de la FDA. Des dérivés de deuxième génération (TW37), et de troisième génération (ApoG2) ont obtenu des résultats pré-cliniques prometteurs (Hu et al., 2009; Mohammad et al., 2007), sans pour autant donner lieu à une évaluation clinique.

2) *Stratégie développée à l'ICSN pour l'identification et l'études de molécules naturelles isolées de plantes*

L'équipe « Métabolites de Plantes » de l'ICSN, actuellement dirigée par F. Roussi a mis en place, depuis plus de quarante ans, de nombreuses collaborations officielles à travers le monde, avec des universités de pays à forte biodiversité et endémisme comme le montre la figure 18. Ces collaborations ont permis d'effectuer des prospections et de collecter 6500 plantes endémiques de ces régions issues de 220 familles botaniques différentes (ICSN, 2020) ce qui correspond à 3,5% de la biodiversité mondiale. Ces plantes entières ou ces parties de plantes, sont séchées, broyées et extraites par de l'acétate d'éthyle pour former un extrait brut. Ainsi, à partir de ces 6500 plantes, plus de 14 000 extraits ont été préparés et constituent la plus grande extractothèque dans le domaine public en France, dont M. Litaudon est responsable. Cette extractothèque peut être mise en plaques multi-puits afin de la cribler pour n'importe quelle cible biologique, comme une chimiothèque de produits purs. Elle fait partie de la Chimiothèque nationale. Afin d'identifier de nouveaux candidats, appelés « hits », ces plaques sont criblées (un puit correspond à un extrait). En cas de résultats intéressants, les extraits (qui contiennent entre 100 et 1000 molécules) subissent un fractionnement bio-guidé jusqu'à l'obtention de la molécule pure.

L'équipe « Métabolites de Plantes », dans laquelle j'ai effectué une partie de ces travaux, porte un intérêt tout particulier aux inhibiteurs naturels ciblant les membres anti-apoptotique de la famille BCL-2 (Apel et al., 2014; Azmi et al., 2016; Gény et al., 2016). Dans l'optique d'identifier de nouveaux inhibiteurs originaux, 6000 extraits issus de cette extractothèque ont été criblés *via* des tests de polarisation de fluorescence (PFA) (décrit dans la section V-C), afin de déterminer leur affinité pour les protéines anti-apoptotiques de la famille BCL-2. Les molécules issues des extraits actifs ont ensuite été isolées et purifiées, puis caractérisées par résonance magnétique nucléaire (RMN). Une fois leur structure établie,

elles ont ensuite été évaluées pures, sur le même test afin de déterminer leur constante d'inhibition. Les molécules présentant les constantes d'inhibitions (K_i) les plus faibles ont été évaluées pour leur cytotoxicité *in vitro* par la technique de MTT ou par un marquage Annexine V / iodure de propidium (IP). L'équipe a également élaboré des analogues de ces molécules par synthèse totale ou hémisynthèse afin d'améliorer leurs propriétés en augmentant leur affinité et/ou leur spécificité par une approche dite de pharmacomodulation (Abou Samra et al., 2018; Desrat et al., 2014a).

L'équipe s'est, par exemple, plus particulièrement intéressée à une famille de molécules, isolée de *Meiogyne cylindrocarpa* (*Annonaceae*), une plante endémique d'Asie du Sud-Est. Le chef de file de cette famille, la meiogynine, inhibe les protéines BCL-xL et MCL-1 (activité micromolaire) sans être cependant cytotoxique (Litaudon et al., 2009). Après avoir réalisé la synthèse totale de cette molécule (Fotsop et al., 2010), ils ont synthétisé des analogues de deuxième génération (Dardenne et al., 2013; Desrat et al., 2014a, 2015), dont un en particulier (la meiogynine A1), cinquante fois plus actif que la molécule naturelle, et qui présente une affinité subnanomolaire pour MCL-1 et BCL-xL (Desrat et al., 2014b). Ils ont pu montrer que l'affinité de ces analogues envers l'une ou l'autre des protéines de cette famille change en fonction des modifications chimiques effectuées. Des analogues de troisième génération ont par la suite été élaborés, dans le but de former des molécules plus stables métaboliquement, et cytotoxiques (Abou Samra et al., 2018). L'un de ces composés se démarque par ses effets *in vitro* : c'est une pro-drogue qui présente une bonne pénétration intracellulaire. Une fois dans la cellule, celle-ci est métabolisée en drogue active avec un effet cytotoxique prometteur sur des lignées dépendante de MCL-1 et BCL-2, permettant de considérer cet inhibiteur comme un inhibiteur spécifique de MCL-1 et BCL-2 (Abou Samra et al., 2018). Cependant, devant la complexité de sa synthèse, l'évaluation de cette molécule n'a pas été poursuivie.

3) Test de screening : le test de polarisation de fluorescence (PFA)

Le criblage des extraits de plantes de l'extractothèque ICSN a impliqué la mise en place d'un test robotisé robuste par polarisation de fluorescence (FPA). Mis au point en 1926 (Perrin, 1926), cette technique de biochimie, simple à mettre en place, peu onéreuse et peu gourmande en matériel biologique, a très vite été utilisée comme test de criblage, afin de déterminer des interactions protéines-protéines (Hall et al., 2016; Zhang et al., 2015; Kieffer et al., 2020). C'est le cas en particulier pour la recherche d'inhibiteurs de la famille BCL-2 où elle a été mise au point dans différents laboratoires (Zhang et al., 2002) et utilisée pour le développement de nombreuses molécules (Abou Samra et al., 2018; Desrat et al., 2014a, 2014b; Kotschy et al., 2016; Liu et al., 2019; Qian et al., 2004; Zhai et al., 2012)

Le test de polarisation de fluorescence (FPA) est basé sur la capacité d'une molécule fluorescente, excitée par une lumière polarisée *i.e.* dans un plan, à émettre de la lumière. Si cette molécule est immobile à travers l'état excitée (≈ 4 ns pour la fluorescéine), elle émettra un rayonnement dans le même plan. Cependant, si la molécule fluorescente est en mouvement (rotation ou translation) durant son état

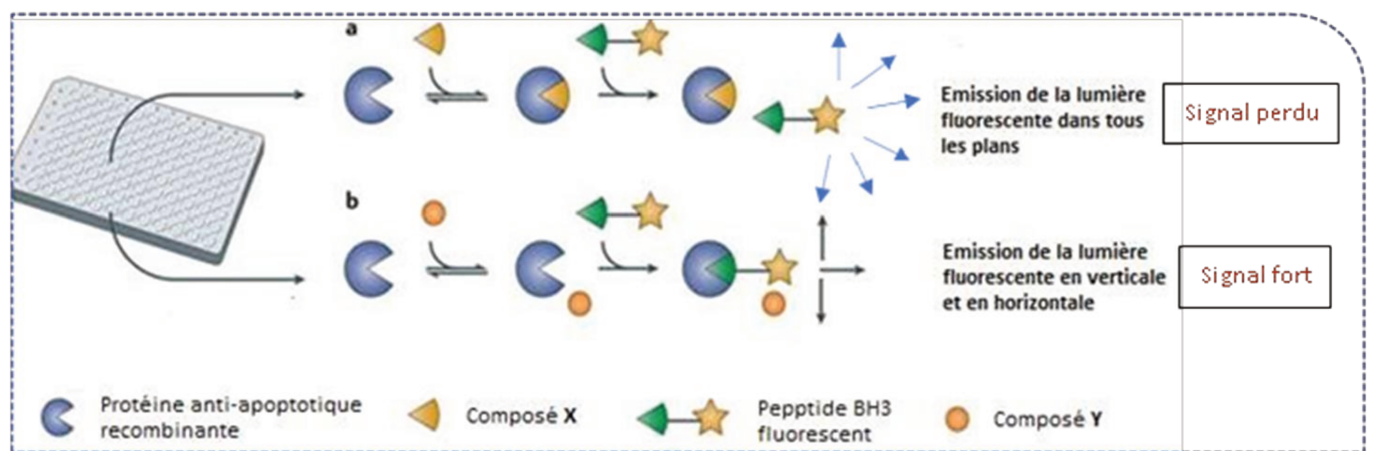


Figure 19 : Principe du test de polarisation de fluorescence (PFA) dans le cas où : il y a une forte affinité du composé pour la protéine anti-apoptotique (a) ; il y a peu ou pas d'affinité du composé pour la protéine anti-apoptotique (b).

D'après la thèse de Alma ABOU-SAMRA.

excité, elle émettra de la lumière dans un plan différent de celui dans lequel elle a été excitée. La différence d'intensité entre les deux plans est liée à la mobilité de la molécule marquée. En règle générale, la vitesse à laquelle tourne une molécule est corrélée à sa taille.

Le principe du test de FPA utilisé permet une analyse quantitative de l'interaction entre un composé ou un extrait et une protéine antiapoptotique (BCL2, Bcl-xL ou MCL-1) par déplacement d'un peptide fluorescent *BH3-only* (Hall et al., 2016; Zhang et al., 2015). Comme le montre la figure 19, selon l'affinité du composé X et Y pour la protéine anti-apoptotique, il y aura 2 cas de figures :

- Le composé X a une forte affinité (a) : l'ajout d'un peptide fluorescent, ne permet pas de rompre le complexe formé entre X et la protéine. Ce peptide reste sous forme libre et sa fluorescence émet dans tous les plans. Le signal est donc faiblement polarisé.
- Le composé Y a peu ou pas d'affinité (b) : lors de l'ajout d'un peptide fluorescent, celui-ci forme un complexe avec la protéine, en laissant le composé Y sous forme libre. Ce complexe peu mobile permet au fluorophore d'émettre dans le même plan que celui dans lequel il est excité. Il y a donc polarisation de la fluorescence émise. Plus le composé Y est affin avec la protéine, moins le complexe entre la protéine et le peptide marqué est stable, et donc moins la fluorescence est polarisée. L'affinité du composé est donc quantifiée, à travers la polarisation de la fluorescence émise par le fluorophore qui est associé au peptide.

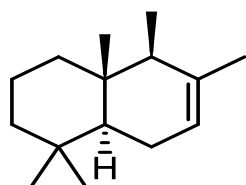
Ce test permet de déterminer une valeur de la polarisation qui est exprimée en mP (millipolarisation) et est calculée à partir de l'équation suivante :

$$mP = 1000 \times \left(\frac{I_s - I_p}{I_s + I_p} \right)$$

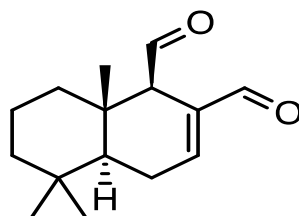
(Où I_s correspond à l'intensité parallèle et I_p à l'intensité perpendiculaire)

L'affinité d'un composé pour la protéine anti-apoptotique testée, est déterminée en mesurant les variations des valeurs de mP en fonction de la concentration du composé testé, en gardant constantes les concentrations en protéine anti-apoptotique, et en peptide fluorescent. Cela permet de déterminer une valeur d'IC50 (concentration en composé avec laquelle 50% du complexe protéine/peptide fluorescent est rompu).

Ce test par PFA est une technique rapide, robuste, économique, facile à mettre en place, et qui peut facilement être utilisée pour un criblage à grande échelle. Cependant, des phénomènes de « quenching » peuvent être observés : dans certain cas le composé testé est excité à la longueur d'onde d'émission du fluorophore. Dans ce cas, le signal émis est très supérieur à celui qui devrait être mesuré, ce qui fausse le résultat. Cette technique n'est donc pas compatible avec les extraits ou les molécules qui fluorescent dans des longueurs proches de celles d'émission du fluorophore, sous peine d'obtenir de faux positifs. De plus, cette technique, bien qu'applicable à un grand nombre d'échantillons, nécessite de coupler un



Squelette drimane



Squelette polygodial

Figure 20 : Présentation du squelette moléculaire du drimane et du polygodial, famille de molécule dont fait partie le NA1-115-7.

fluorophore à un peptide, ce qui peut interférer dans l'interaction avec la cible. Il adviendra donc de vérifier les résultats des molécules les plus intéressantes avec une autre technique qui s'affranchi de cette contrainte comme par exemple la RMN (Résonnance Magnétique Nucléaire) (Kieffer et al., 2020)

Trois tests par polarisation de fluorescence ont été mis au point à l'ICSN afin de déterminer l'affinité des extraits de plantes et des molécules pures sur BCL-xL, MCL-1 et BCL-2 :

- sur le couple BCL-xL humain/BAK par C. Geny et V. Dumontet (Geny, 2014), dans le cadre d'une collaboration avec les laboratoires Servier.

- sur le couple MCL-1/BID (MCL-1 souris puis MCL-1 humain) par C. Geny et V. Dumontet (Geny, 2014).

- sur le couple BCL-2 humain/BIM par A. Abou-Samra (Abou-Samra, 2017).

Cela a été possible grâce à la plateforme CiBi (Criblage de composés Bioactifs) de l'ICSN dirigée par J. Bignon.

C. Une nouvelle famille de candidats potentiels : les drimanes

1) Introduction

Au cours de ma thèse, je me suis intéressé à une famille de molécules naturelles originales qui possède un squelette de type polygodial. Comme l'illustre la figure 20, les polygodials sont des sesquiterpénoïdes bicycliques, de type drimane, avec deux fonctions aldéhydes dont un aldéhyde allylique et un aldéhyde pseudo-néopentylique épimérisable. Ces drimanes de type polygodial sont retrouvés dans trois familles de plantes : les *Cannellaceae*, les *Winteraceae* et les *Polygonaceae*. Ils ont également été isolés d'éponges marines et de mollusques (Rihak et al., 2018). Ils sont généralement présents en grande quantité au sein de ces organismes (Claudino et al., 2013; Fratoni et al., 2018). Des activités biologiques variées leurs sont associées: antifongique (Castelli et al., 2005; Malheiros et al., 2005), anti-nociceptive (El Sayah et al., 2000), anti-inflammatoire (da Cunha et al., 2001), anti-microbienne (C.O. Silveira et al., 2012), anti-parasitaire (Claudino et al., 2013), et anti-hyperphagique (Mendes et al., 1998).

Aucune molécule possédant ce squelette polygodial, n'a pour le moment fait l'objet de publication, visant à montrer son affinité pour les protéines de la famille BCL-2. Cependant, l'effet cytotoxique de certaines molécules a déjà été démontré sur différentes lignées cancéreuses (Montenegro et al., 2014), notamment des lignées d'hémopathies malignes (Allouche et al., 2009; Dong et al., 2011; Fratoni et al., 2016). Un polygodial particulier et ses analogues, ont même fait l'objet de plusieurs publications visant à démontrer leurs activités *in vitro* sur des modèles de cancers résistant aux drogues (Dasari et al., 2015a), mais aussi *in vivo* dans un carcinome, en jouant sur la fonction mitochondriale (De La Chapa et al., 2018). D'ailleurs, une des plantes qui produit une grande quantité de drimanes, le *Drimys brasiliensis* Miers, est utilisée en médecine traditionnelle pour soigner le cancer (Fratoni et al., 2018).

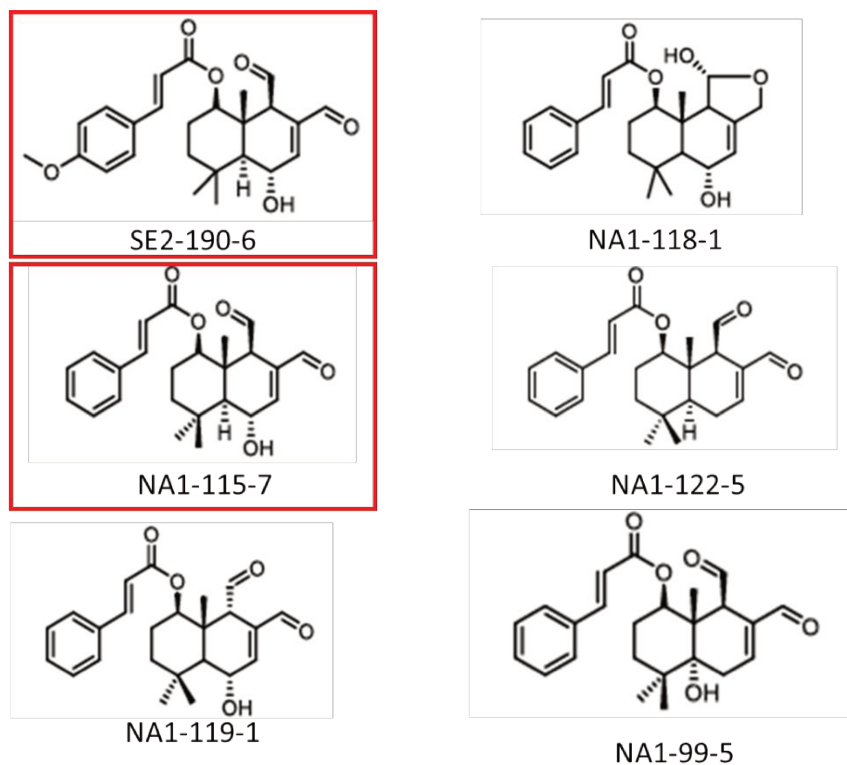


Figure 21 : Structure des différentes molécules isolées et testée pour leur affinité aux protéines de la famille BCL-2, provenant de *Zygodium P.*

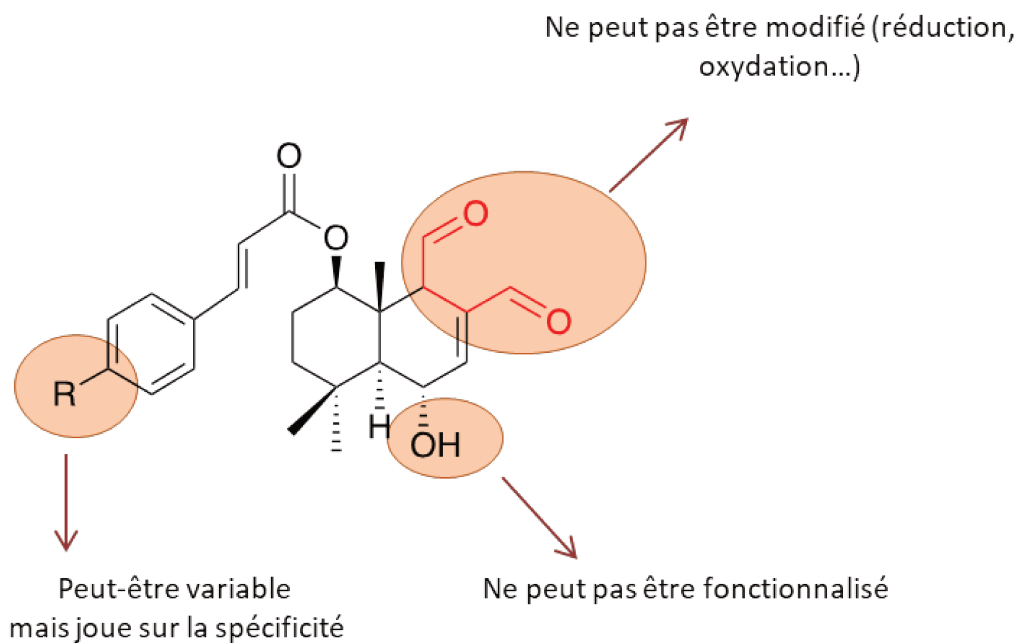


Figure 22 : Résultat des études structures/activités menées sur les différents analogues du drimane.

D'après : Fomekong Fotsop et al., 2008

2) *Le NA1-115-7 et ses dérivés*

L'équipe Métabolites de Plantes a isolée, il y a quelques années, des molécules originales à partir de deux plantes de Nouvelle-Calédonie : *Zygogynum baillonnii* (Fomekong Fotsop et al., 2008) et *Zygogynum pancheri* (Allouche et al., 2009). Ces composés, décrits dans la figure 21, sont des drimanes de type polygodial (deux fonctions aldéhydes) et comportent une fonction ester dynamique sur le cycle A. De plus, une fonction OH peut être présente en position 5 ou 6. Certains de ces composés (NA-115-7 et SE2-190-6) ont été isolés à l'échelle de plusieurs grammes, ce qui a permis de faire une étude des relations structure-activité grâce à des modifications chimiques. L'affinité de ces composés pour les protéines de la famille BCL-2 et leur cytotoxicité ont été déterminées. Comme le montre la figure 22, cette étude a permis d'identifier les groupements chimiques indispensables à l'activité biologique :

- Les deux aldéhydes en position 8 et 9, sont essentiels et ne peuvent pas être modifiés (ni par réduction en alcool, ni par oxydation en acide) ;
- La présence de l'alcool en position 6, est également déterminante pour l'effet cytotoxique de ces molécules. Celui-ci ne peut ni être supprimé, ni être fonctionnalisé, sous peine de perdre son efficacité ;
- La nature du groupement en 7' (H ou OMe) influe sur la spécificité du composé vis à vis des protéines de la famille de BCL-2.

L'objectif premier était de développer un inhibiteur spécifique de MCL-1. Parmi les molécules criblées certaines d'entre-elles, décrites notamment pour la première fois par Allouche et *al.* (Allouche et al., 2009) ont montré des résultats intéressants, ce qui a motivé le travail de cette thèse, correspondant à leur évaluation pré-clinique.

D. Les limites

1) *Le problème de solubilité et de stabilité*

Comme beaucoup de petites molécules, les produits naturels présentent souvent une faible solubilité dans les milieux aqueux, ce qui est le cas des drimanes (357 $\mu\text{mol/L}$ dans un tampon PBS à pH4, A. Malzert-Fréon). De plus, les molécules de la famille qui présentent un alcool en position 6 sont instables en milieu acide et se transforment en un composé lactone inactif sur les protéines de la famille BCL-2 et non-cytotoxique. (figure 23) (Fomekong Fotsop et al., 2008).

Concernant l'étude *in vitro*, cela ne représente pas un véritable problème. Mais pour une évaluation *in vivo*, la mauvaise solubilité de ces composés est un frein à une administration intra-veineuse, et son manque de stabilité, ferme la porte à une administration *Per Os* (à cause de l'acidité du compartiment gastrique). Il a donc fallu trouver une solution pour permettre leur évaluation *in vivo* afin de déterminer leur activité antitumorale *via* une greffe de tumeurs sur des souris.

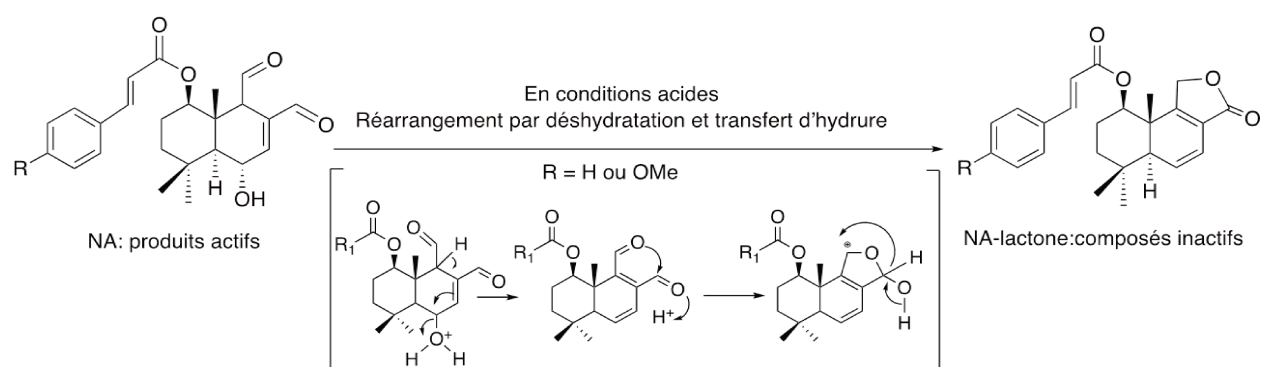


Figure 23 : Stabilité des molécules de drimanes en conditions acides.

D'après : Fomekong Fotsop et al., 2008

2) La solution : les nano-émulsions

(a) Intérêts pharmaceutiques

L'une des problématiques actuelles majeures du développement des anticancéreux concerne leur stabilité ou leur solubilité dans les milieux biologiques. Pour pallier à cet inconvénient, de nombreuses alternatives ont été développées, notamment en jouant sur leur formulation galénique (Rostagno and Prado, 2013). Il en existe de nombreuses comme les liposomes, les microcapsules, les micelles ou encore les nanoparticules. Cependant, nous nous sommes tournés vers un autre type de formulation très innovante, les nano-émulsions (NEs), grâce à une collaboration avec l'équipe de A. Malzert-Fréon (Centre d'étude et de recherche du médicament de Normandie ou CERMN). Les avantages de ce type de formulation sont nombreux : augmenter la biodisponibilité et donc réduire les doses de traitements, protéger le principe actif d'un environnement agressif pour les molécules (comme dans l'estomac), ou encore mieux contrôler sa délivrance (Akhlaker Rahman et al., 2011). Cette alternative a déjà été utilisée pour augmenter la perméabilité d'un autre inhibiteur de la famille de BCL-2 : le pyridoclast. Elle a permis une bonne solubilité et une augmentation de sa stabilité dans différents milieux biomimétiques (Groo et al., 2017), mais cela a également permis d'augmenter l'effet anti-cancéreux de ce composé (Groo et al., 2020).

(b) Définition et caractéristiques

Les NEs utilisées dans l'industrie pharmaceutique, sont des systèmes de délivrance de médicaments, par un mécanisme spontané d'encapsulation. Comme leur nom l'indique, les NEs sont une sous-classe d'émulsions dont le diamètre est compris dans une gamme « nanométrique », c'est-à-dire entre 20 et 300 nm.

Les NEs sont composées d'un mélange de deux phases non ou faiblement miscibles : une phase dite hydrophile et une phase dite lipophile. La phase présentée en surface, appelé phase dispersée, permet de déterminer la nature de ces NEs :

- les émulsions de type huile dans eau (H/E), où la phase dispersée est lipophile et la phase continue (cœur de la NE) est hydrophile.

- les émulsions de type eau dans huile (E/H), où cette fois la phase dispersée est hydrophile et la phase continue est lipophile.

Ainsi, le composé est dissous dans un co-solvant, *i.e.* un liquide qui est capable de dissoudre le principe actif et qui est miscible dans la phase dispersée. Ce mélange est ajouté à la phase continue. L'ajout de surfactant (ou tensioactif), une molécule amphiphile, est nécessaire pour stabiliser les deux phases, non miscibles, qui composent les émulsions. Après une action mécanique, les NEs sont alors formées. Elles sont alors définies par 2 paramètres principaux : leur polydispersité (PDI), qui correspond à leur homogénéité, et le diamètre hydrodynamique (Z average), qui correspond à leur taille. Dans ces travaux,

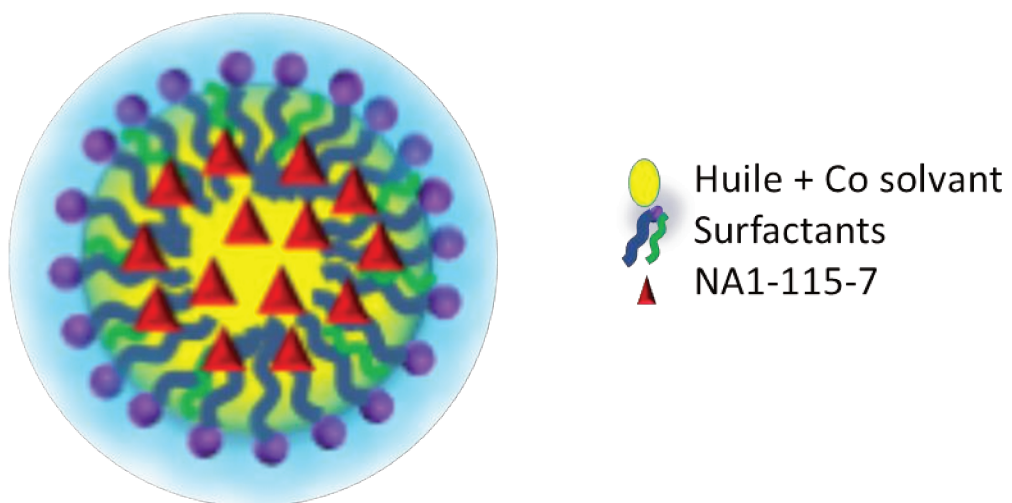


Figure 24 : Description d'une nanoémulsion de type E/H chargée avec du NA1-115-7.

une nouvelle forme de nano émulsion développée au CERMN a été utilisée (Gué et al., 2016; Seguy, Submitted). Ces NEs, de type H/E, sont présentées sur la figure 24.

De plus, il est possible de greffer, sur ces NEs, des molécules qui permettent de les adresser vers les cellules tumorales. Ce ciblage actif passe par l'utilisation de molécules qui se lient à des récepteurs cellulaires spécifiques. Il existe ainsi des NEs couplées à du folate, et donc dirigées spécifiquement contre les récepteurs aux folates qui sont surexprimés par certains types de cellules cancéreuses (Loureiro et al., 2015). Cela permet une diminution des effets secondaires et éventuellement des doses administrées. Cependant, l'encapsulation d'une molécule thérapeutique par des nano-émulsions peut également engendrer une cytotoxicité non spécifique, intrinsèque aux nano-émulsions (Ménard, 2012). Il s'agit d'un paramètre auquel il faut porter une attention particulière pour ne pas se retrouver avec une toxicité non spécifique trop importante portée à la fois par le principe actif, mais également par sa formulation (NEs).

Contexte et objectifs

Chapitre II. Contexte et objectifs

Depuis quelques années, le développement de petites molécules ciblant la famille de BCL-2 s'est accéléré et a conduit au développement du Vénétoclax, et à son approbation par la FDA en 2016. Ce BH3-mimétique, développé par AbbVie, cible spécifiquement la protéine BCL-2 et il a montré des effets thérapeutiques très impressionnants dans diverses tumeurs hématologiques dont la LLC. Les grands acteurs majeurs de l'industrie pharmaceutique se livrent donc une course pour développer de nouveaux inhibiteurs de ces protéines, et notamment des inhibiteurs de MCL-1.

Dans ce contexte, l'un de ces acteurs, les Laboratoires Servier s'étaient rapprochés de l'ICSN afin de cribler les extraits biologiques contenus dans l'extractothèque et de découvrir un éventuel inhibiteur de BCL-xL. Pour cela une technologie a été transférée à l'institut : le test de PFA, qui permet de déterminer l'affinité d'un composé pour la protéine BCL-xL. Les résultats n'ont pas été ceux attendus, mais ils ont permis à l'équipe actuellement dirigée par F. ROUSSI, de développer ce test pour deux autres protéines de cette famille (BCL-2 et MCL-1), et de continuer leur recherche dans ce domaine. Cela a permis la découverte d'une molécule ayant une affinité particulière à la fois pour MCL-1, et pour BCL-2 (Abou Samra et al., 2018). Pour mener à bien le développement de ce composé, l'équipe de F. ROUSSI a mis en place une collaboration avec une équipe de biologiste de Gustave ROUSSY, dirigée par J. WIELS. Cette équipe spécialisée dans l'étude des hémopathies malignes de type B, avait la charge des tests *in vitro* et *in vivo* pour le développement de ce composé. Du fait que la molécule ne pouvait pas être produite en grande quantité, elle n'a pas pu poursuivre son développement pré-clinique mais une série de molécules isolée d'une plante endémique de Nouvelle-Calédonie et qui présentaient également des propriétés intéressantes l'ont remplacé : les drimanes.

Mon projet, financé par l>IDEX Paris-Saclay via le programme « d'initiative doctorale interdisciplinaire » (IDI), est donc le fruit de cette collaboration entre une équipe de chimiste et une équipe de biologiste. Il avait pour objectif le développement préclinique d'un ou plusieurs candidats de cette série de drimanes, ayant une affinité particulière pour MCL-1.

- Le premier objectif était donc d'identifier le meilleur inhibiteur de MCL-1 à disposition. Pour cela, il a fallu développer le test de PFA avec la protéine MCL-1 humaine (jusqu'ici le test était réalisé avec la protéine murine, très différente de la protéine humaine). Cela a pour but l'identification d'un ou de plusieurs composés présentant une affinité très forte, ainsi qu'une spécificité pour la protéine MCL-1. Une collaboration avec une autre équipe de l'ICSN (Equipe de E. LESCOP) spécialisée dans la spectrométrie RMN, a également été développée pour confirmer ou non le potentiel des molécules sélectionnées avec le test de PFA.

- Une fois le/les candidats identifié(s), une étude *in vitro* doit être réalisée. Dans notre cas, cette étape a compris dans un premier temps, une évaluation de l'efficacité du composé sur des modèles cellulaires de lymphome B présentant ou non la cible. Elle a permis de valider que l'affinité et la spécificité observées sont bien retrouvées dans les cellules, mais aussi que ces caractéristiques sont bien associées à une induction de la mort cellulaire. L'étude *in vitro* permet également une caractérisation de son mécanisme d'action en répondant à des questions bien précises : comment le composé se lie à sa cible (MCL-1) ? Quelle voie de signalisation est engagée ? Est-ce que ce composé présente une toxicité pour les cellules / tissus sain(e)s ? L'objectif de cette partie étant de savoir si le/les candidats agissent comme des BH3-mimétiques et s'ils représentent une alternative aux molécules déjà développées jusqu'ici.
- La troisième étape a consisté à valider, pour le meilleur composé, ses effets *in vivo*. Cette étude préclinique avait comme objectif, de valider chez la souris, l'efficacité de ce traitement et sa toxicité intrinsèque.

Résultats

Chapitre III. Résultats

Cette thèse nous a permis de préparer trois articles différents autour du développement préclinique d'un nouvel inhibiteur de MCL-1. Les résultats sont donc présentés au sein de ces articles axés sur des disciplines différentes :

- **“Natural Sesquiterpenoids from Winteraceae of New-Caledonian Rainforest as covalent MCL-1 inhibitors”** est un article qui s'intéresse aux aspects chimiques et biochimiques qui conduisent à la sélection de deux candidats pour une évaluation préclinique plus poussée.
- **“The natural product NA1-115-7 is a new MCL-1 inhibitor ”** développe les résultats *in vitro* (dans la cellule) obtenu pour l'un des deux candidats avec notamment l'efficacité sur des lignées de lymphomes B, la caractérisation de la voie de signalisation induite, et de la toxicité sur les cellules saines associée à ce composé NA1-115-7.
- **“In vitro evaluation of NA1-115-7-loaded nanoemulsions, a MCL-1 specific inhibitor of natural origin, intended to treat B lymphoproliferations after oral administration”** se concentre sur le développement et la validation d'une technique innovante d'encapsulation du composé afin d'envisager son évaluation *in vivo*.

Une évaluation *in vivo* de ce composé a déjà été initiée, mais pour le moment les résultats obtenus ne permettent pas encore de pouvoir les publier. Ils seront abordés brièvement à la fin de ce chapitre.

Article 1

**Natural Sesquiterpenoids from Winteraceae of New-Caledonian Rainforest
as covalent MCL-1 inhibitors**

(Statut : Soumis)

Natural drimane sesquiterpenoids as covalent MCL-1 inhibitors

Florian Daressy,^{a,b} Florian Malard,^a Line Seguy,^c Vincent Guérineau,^a Cécile Apel,^a Vincent Dumontet,^a Aude Robert,^{b,d} Anne-Claire Groo,^c Marc Litaudon,^a Jérôme Bignon,^a Sandy Desrat,^a Aurélie Malzert-Fréon,^c Joëlle Wiels,^b Ewen Lescop,^a Fanny Roussi^{a,*}

^a Université Paris-Saclay, CNRS, Institut de Chimie des Substances Naturelles, UPR 2301, 91198 Gif-sur-Yvette, France

^b Université Paris-Saclay, Institut Gustave Roussy, CNRS UMR 9018, 114 rue Edouard-Vaillant, 94805 Villejuif Cedex, France

^c Normandie Université, UNICAEN, CERMN, 14000 Caen, France

^d Present adress : Université Paris-Saclay, Institut Gustave Roussy, INSERM U1279, 114 rue Edouard Vaillant, 94805 Villejuif Cedex

Abstract

Various sesquiterpenoids have been identified, by polarization fluorescence assay experiments, as new inhibitors of the BCL-2 family of proteins. Subtle changes in their structure significantly modified their activity on the target proteins. The two most active compounds were MCL-1 selective and bind in the BH3 binding groove. Complementary studies, by NMR and mass spectrometry analyses but also synthesis showed that they are covalent inhibitors of MCL-1 via the formation of a pyrrole adduct. In addition, cytotoxic assays revealed that these two compounds show a cytotoxic selectivity for BL2, a MCL-1/BCL-xL dependent cell line and induce apoptosis.

Keywords

Natural Compound – Covalent inhibitor - Apoptosis – BCL-2 proteins – Protein-protein interactions – Cancer

1. Introduction

Apoptosis is a well-known form of programmed cell death that is essential for tissue homeostasis through the elimination of useless or potentially harmful cells [1]. One of the most studied protein families implicated in the intrinsic (mitochondrial pathway) of apoptosis is the BCL-2 family [2]. This protein family is divided into anti- and pro-apoptotic members. The anti-apoptotic proteins such as MCL-1, BCL-xL and BCL-2 are multidomain proteins and they share short conserved sequenced regions (BH1 to BH4 motifs). Pro-apoptotic proteins are of two types and play a distinct role: either multidomain like Bax and Bak with three to four domains of homology (BH1 to BH4) or monodomain (BH3-only) like Bad, Bid or Bim. In normal conditions, the anti-apoptotic proteins sequester the BH3 domain of the pro-apoptotic proteins at a hydrophobic groove formed by their BH1, BH2 and BH3 domains *via* protein-protein interactions (PPIs), thus preventing apoptosis [3]. Cellular stress signals such as DNA damage lead to the up-regulation of BH3-only proteins that trigger apoptosis. They bind to anti-apoptotic proteins, unleashing pro-apoptotic multidomain proteins that oligomerize in the mitochondrial outer membrane leading to its permeabilization, release of cytochrome c into the cytoplasm, activation of caspases and cell death [4].

Numerous studies have shown that overexpression of the anti-apoptotic BCL-2 proteins is involved in the development of many kinds of cancers or confers resistance to apoptosis induced by standard anticancer therapies [5]. For example, proteins of the BCL-2 family play a central role in lymphocytes biology and are very often

deregulated in lymphoid malignancies. Indeed, anti-apoptotic members of this family of proteins are overexpressed through translocation, amplification of the gene or upon action of transforming agents (such as oncogenic viruses for example) in hematological malignancies [6]. On the other hand, a recent survey of various solid tumours revealed that, most of the time, MCL-1 is more abundant than BCL-2 or BCL-xL, thereby suggesting that there might be some benefit in specifically targeting MCL-1 in these tumours [7]. Similarly, in hematological cancers, patients with poor prognosis are often associated with an elevated level of MCL-1 [8]. These findings are not surprising because MCL-1 is one of the most amplified genes [9-10], and its overexpression is directly correlated with tumorigenicity [11]. Consequently, targeting this protein family, and particularly MCL-1, is a highly promising strategy for anticancer therapy that has emerged over the last decades [12]. Particularly, the development of small molecules, called BH3-mimetics, able to bind the hydrophobic cleft of the anti-apoptotic proteins, liberating the pro-apoptotic ones and restoring apoptosis has proven its great efficiency [13]. Currently, such BH3-mimetics that target MCL-1 are evaluated in clinical trials as S63845 [14], S64315 [15], AMG-176 [16], and AZD-5991 [17].

Over the past years, our team has been involved in the identification of natural compounds that target the anti-apoptotic proteins of the BCL-2 family thanks to a large screening of ICSN extract library by Polarization Fluorescence Assay (FPA) [18]. Various original natural molecules active on BCL-xL, BCL-2, and/or MCL-1 have been isolated [19, 20, 21] and chemically modified or synthesized [22, 23, 24, 25, 26, 27].

A few years ago, we reported the isolation of various drimane sesquiterpenoids **1** from barks and leaves of three *Zygogynum* (Winteraceae) of New Caledonia and their chemical modification [28, 29]. Drimane sesquiterpenoids [30] are widespread secondary metabolites, produced by various higher plants (of the Canellaceae, Taxaceae, Polygonaceae and Winteraceae families), but also fungi, sponges, ferns and nudibranch. They are characterized by a common *trans*-decalin structure of type **2**, decorated by a wide range of substituents (Figure 1). This structural diversity goes along with a vast array of biological activities, including cytotoxic, antibacterial, antifungal and antifeedant properties.

A cinnamate ester at C1 confers originality to compounds of type **1** isolated in our group. We have disclosed that most of these molecules are cytotoxic on HCT-116, HL60 and/or KB cell lines if aldehyde functions are present at C8 and C9. We have also shown that their reduction, oxidation or cyclisation is detrimental [28]. These results were confirmed by Fratoni *et al.* [31], who have pointed out that drimane derivatives with similar structures as **1** isolated from *Drimys brasiliensis* (Winteraceae) are cytotoxic against various myeloid and lymphoid cell lines. Contrarily, drimanes like polygodial **2** that do not possess a cinnamoyl group at C1 are found much less cytotoxic [32].

Albeit their promising biological activity, little is known about the mode of action and biological target of drimanes of type **1**. In this paper, we want to disclose that their cytotoxic effect is due to their interaction with anti-apoptotic proteins from BCL-2 family, and more specifically with MCL-1.

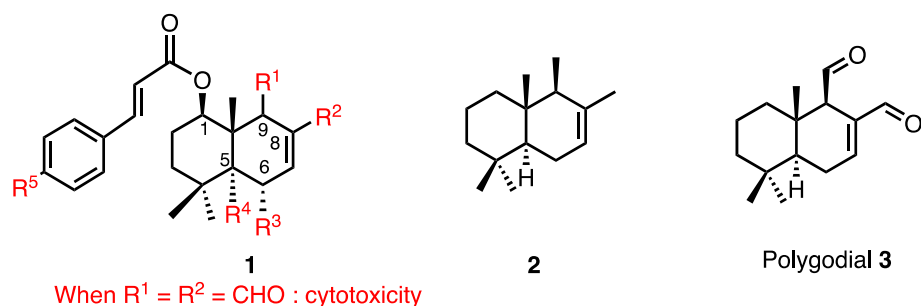


Fig. 1. General structure of drimane sesquiterpenoids.

2. Results & discussion

As part of our continuing search for novel plant-derived anti-cancer agents, the ethyl acetate bark and leave extracts of various *Zygogynum* (Winteraceae) from New Caledonia were found to significantly disrupt interactions between the anti-apoptotic proteins BCL-xL with pro-apoptotic proteins Bak. This urged us to investigate the pro-apoptotic potency of various pure drimane sesquiterpenoids **4-9** previously isolated in our team from these plants [28, 29] (Fig. 2).

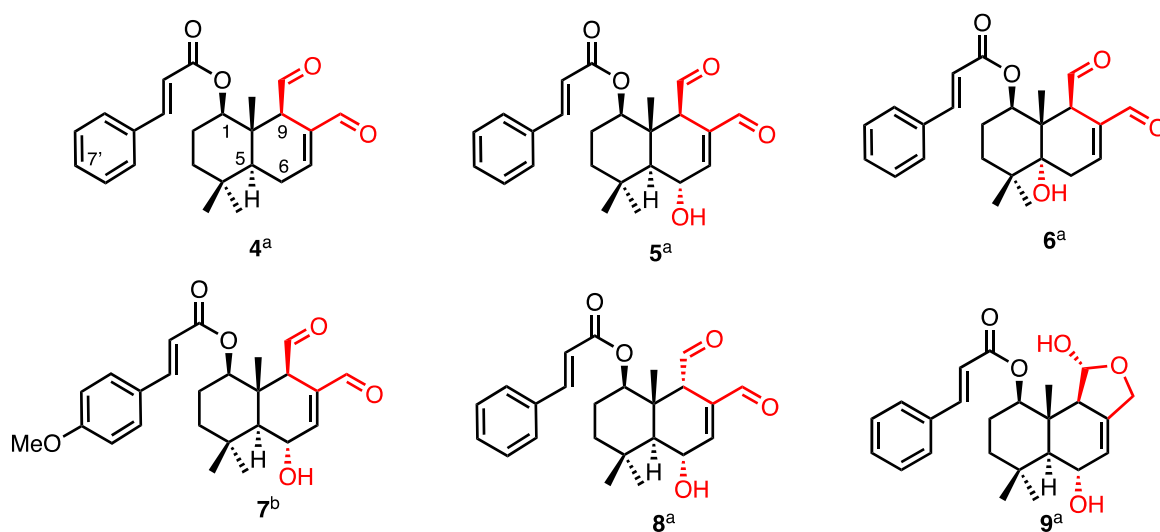


Fig. 2. Structure of some drimane sesquiterpenoids isolated in our team from a- *Zygogynum pancheri*; b- *Zygogynum baillonii* and evaluated for their activity on BCL-2 family proteins

The binding affinities of these natural compounds (**4-9**) for human isoforms of BCL-2, BCL-xL and MCL-1 has been evaluated by competition against fluorescently labelled BH3 pro-apoptotic proteins, Bim, Bak and Bid, respectively, as described by Qian *et al.* [34]. They were compared to three known compounds used as references: meiogynin A a natural pan-BCL-2 inhibitor [19], ABT 737 a dual BCL-xL and BCL-2 inhibitor [33] and S63845 [14] that is MCL-1 selective (Table 1). We have found that all tested drimanes are MCL-1 and BCL-xL inhibitors with no affinity for BCL-2 (entries 1-6). In addition, the apparent affinity of all these compounds toward MCL-1 and

BCL-xL is increased by a factor of four when they are incubated in the presence of the proteins for a period of 6 h instead of 2. This is a noticeable result as it is not the case for the control compounds (entries 7-9).

Table 1. Biological evaluation of compounds **4-9** compared to control molecules (meiogynin A, ABT-737, and S63845) on BCL-xL/Bak, MCL-1/Bid and BCL-2/Bim displacement assays.

Entry	Compd.	MCL-1/Bid binding affinity ^a <i>Ki</i> ^b (μM)		BCL-xL/Bak binding affinity ^a <i>Ki</i> ^b (μM)		BCL-2/Bim binding affinity ^a <i>Ki</i> ^b (μM) ^c
		2 h	6 h	2 h	6 h	
1	4	5.41 ± 1.78	1.51 ± 0.06	>23	7.02 ± 1.84	>23
2	5	1.52 ± 0.13	0.35 ± 0.03	9.58 ± 0.9	3.03 ± 0.45	>23
3	6	7.5 ± 0.8	2.04 ± 0.19	>23	11.7 ± 0.84	>23
4	7	2.90 ± 0.46	0.57 ± 0.03	3.88 ± 0.27	1.27 ± 0.05	>23
5	8	14.85 ± 4.12	5.69 ± 0.20	>23	>23	>23
6	9	17.53 ± 0.54	5.26 ± 0.06	> 23	>23	>23
7	meiogynin A ^d	5.40 ± 0.43	4.68 ± 0.49	4.71 ± 1.36	4.07 ± 1.08	1.44 ± 0.16
8	ABT-737 ^d	ND	ND	0.13 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.32 ± 0.05
9	S63845 ^d	0.21 ± 0.02	0.19 ± 0.02	ND	ND	ND

a- Binding affinities were measured by fluorescence polarization [34] after competition between the ligand and a fluorescein-labeled peptide; b- *Ki* is the concentration of the ligand corresponding to 50% of the binding of the labelled reference compound, corrected for experimental conditions [35]; c- Binding affinities were only determined after 2 h of incubation; d- Displacement assays for control molecule are also described in following references: meiogynin A see [25]; ABT-737 see [33]; S63845 see [14]

The structure-activity relationship studies that can be deduced from these experiments match perfectly to those published by us [28] and Madeiros's group [31] following the cytotoxicity studies on similar compounds. Aldehyde functions in position 8 and 9 are required as demonstrated with compound **9** that presents a low affinity for MCL-1 with *Ki* = 5.26 μM and is not active on BCL-xL. In addition, position of the hydroxyl group greatly influences the affinity when comparing compounds **4**, **5** and **6** (entries 1-3): an OH at position 5 is detrimental for activity on MCL-1. On the other hand, absolute configuration of aldehyde at C9 is decisive as compounds **9β-5** is 16 times more potent than **9α-8** (see entries 2 and 5). On the contrary, functionalization of the cinnamoyl moiety has a low impact (compounds **5** and **7**, entries 2 and 4).

Finally, the most potent and interesting compounds are **5** and **7** that only differ by the presence of a methoxy group on the cinnamoyl moiety. Functionalization in position 7' does not affect the affinity for MCL-1 as both present sub-micromolar activities (with *Ki* of 0.35 and 0.57 μM respectively) in the same range of order than S63845. However, the presence of a methoxy group in position 7' increases the affinity of compound **7** for BCL-XL (1.27 μM) compared to compound **5** (3.03 μM). Compound **5** is more selective towards MCL-1 than compound **7** (*i.e.* it is 9 times more active on Mcl-1 than on BCL-xL compared to twice for compound **7**). As selectivity for

MCL-1 with regard to BCL-xL is an important criteria in lymphoid malignancies, where MCL-1 is overexpressed but where BCL-xL is constitutively present and should not be totally inhibited to prevent thrombocytopenia [36], compound **5** seems more promising than **7**.

NMR experiments were carried out to confirm the interaction between compounds **5** or **7** and the proteins MCL-1 and BCL-xL in order to determine more precisely their binding mode. Preliminary solubility experiments (Fig. S1) indicated that both molecules are soluble enough (≥ 200 -400 μ M) in presence of organic co-solvent (3.5 % DMSO) for interaction studies with MCL-1 and BCL-xL proteins.

We first titrated a ^{15}N -labeled Mcl-1 solution with increasing concentration of compound **7** (Fig. 4). During the titration, ligand **7** induced two types of successive spectral changes of the protein, in a concentration dependent manner (Fig. 4A, 4B). The first one was characterized upon addition of compound **7** at low concentration (up to 2 eq.), by the progressive decrease in peak intensity, without chemical shift variation, for a consequent (~ 15) set of ^1H - ^{15}N resonances. Notably, no new cross peak appeared in the spectra, suggesting extensive line broadening for the 15 above-mentioned residues in the formed complex. Disappearing residues were mapped on MCL-1 structure (Fig. 4C). These were located within the BH3-binding groove of the protein composed by α -helices $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$ and $\alpha 5$. We observed a similar behaviour in α -helix $\alpha 6$ that does not directly interact with the ligand in most crystal structures, as already reported for MCL-1 complex with BH3-derived peptides [37]. The second type of spectral changes was identified at higher ligand concentration (> 2 eq.), where all signals from MCL-1 decreased uniformly and almost no signal could be seen anymore at maximum ligand concentration (300 μ M, 6 eq). In conclusion, compound **7** binds to MCL-1 with a strong affinity in the BH3-binding pocket and likely induces the oligomerization of MCL-1 at high concentration (> 200 μ M). These experiments also showed that several NMR signals are missing for residues in the ligand binding sites of the formed complex. This is usually indicative of conformational sampling at the intermediate timescale ($\sim$ ms) and suggests potential conformational dynamics within the MCL-1/compound **7** complex.

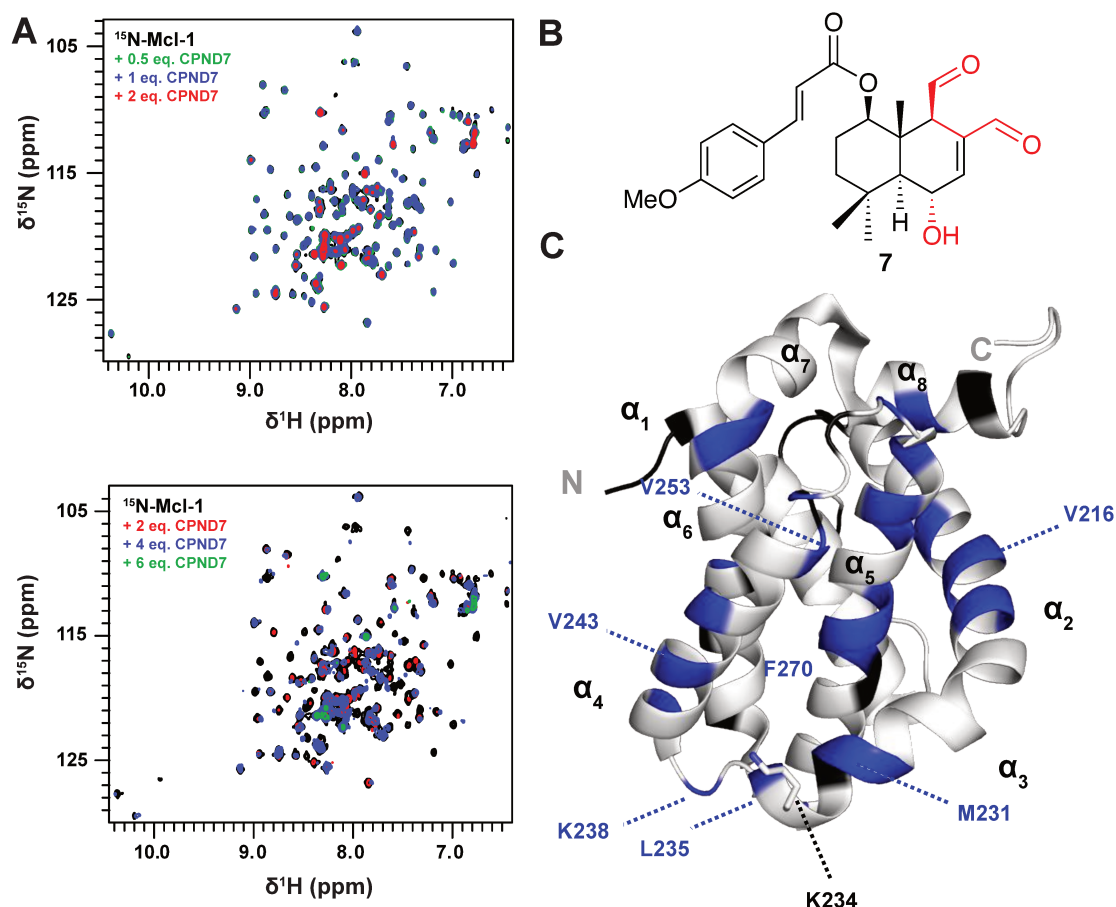


Fig. 3. Compound **7** binds to human MCL-1 with strong affinity in the BH3 binding-groove. (A) Overlay of SOFAST ^1H - ^{15}N HMQC spectra from isolated MCL-1 (50 μM) (black) and in presence of increasing amount of compound **7**; (B) Compound **7**; (C) Disappearance of ^1H - ^{15}N resonances in presence of compound **7** (2 eq.) and corresponding residues (blue) mapped on MCL-1 structure (pdb code: 2MHS): L213, V216, G217, G219, V220, G230, M231, L235, K238, E240, S243, R246, V251, S253, T259, W261, R263, V265, S269, F270, G271, A272, E292, T301, K302 and F315. Residues for which no data are available are highlighted (black). Those include prolines and others that could not be assigned to a ^1H - ^{15}N resonances in the spectrum of free MCL-1. Side-chain of K234 residue is oriented toward the binding pocket (black dash and label).

In order to locate the binding pocket of compound **5** on human MCL-1, ^1H - ^{15}N SOFAST HMQC spectra of ^{15}N -labeled MCL-1 were recorded in presence of increasing amounts of ligands **5** up to its solubility limit (Fig. 3). After each ligand increment, several h were necessary to reach apparent system equilibrium. Throughout the titration, spectral perturbations were clearly visible by progressive shifts of several resonances, mainly in rapid exchange regime at the chemical shift timescale, although some peaks also underwent some line broadening (Fig. 3A and 3B). At the ligand maximum concentration (225 μM), the protein (50 μM) was not fully saturated. Residues located in helical regions (α_2 , α_3 , α_4 and α_5) forming the BH3-binding groove of the protein were predominantly affected upon ligand addition as judged from large chemical shift perturbation upon ligand binding (Fig. 3C). This indicates that compound **5** and BH3 motifs do share a common binding pocket in the protein. Consistently, helical regions that do not form the BH3-binding groove (α_1 , α_6 , α_7 , α_8) did not show perturbation above threshold upon

binding of compound **5**. Surprisingly, at the largest ligand concentration, we observed a new set of cross-peaks in the spectra, close to cross-peaks that underwent rapid exchange shifts at lower ligand concentration. This suggests a second type of events for MCL-1/compound **5**. We excluded the possibility of a second binding site since it would be of stronger affinity as indicated from the slow (or nul) exchange between the new peaks and the first binding mode. Since we previously observed a time-dependent inhibition mode for compound **5**, we next hypothesized that compound **5** could chemically cross-react with MCL-1 to yield a covalent complex at longer time and large ligand excess.

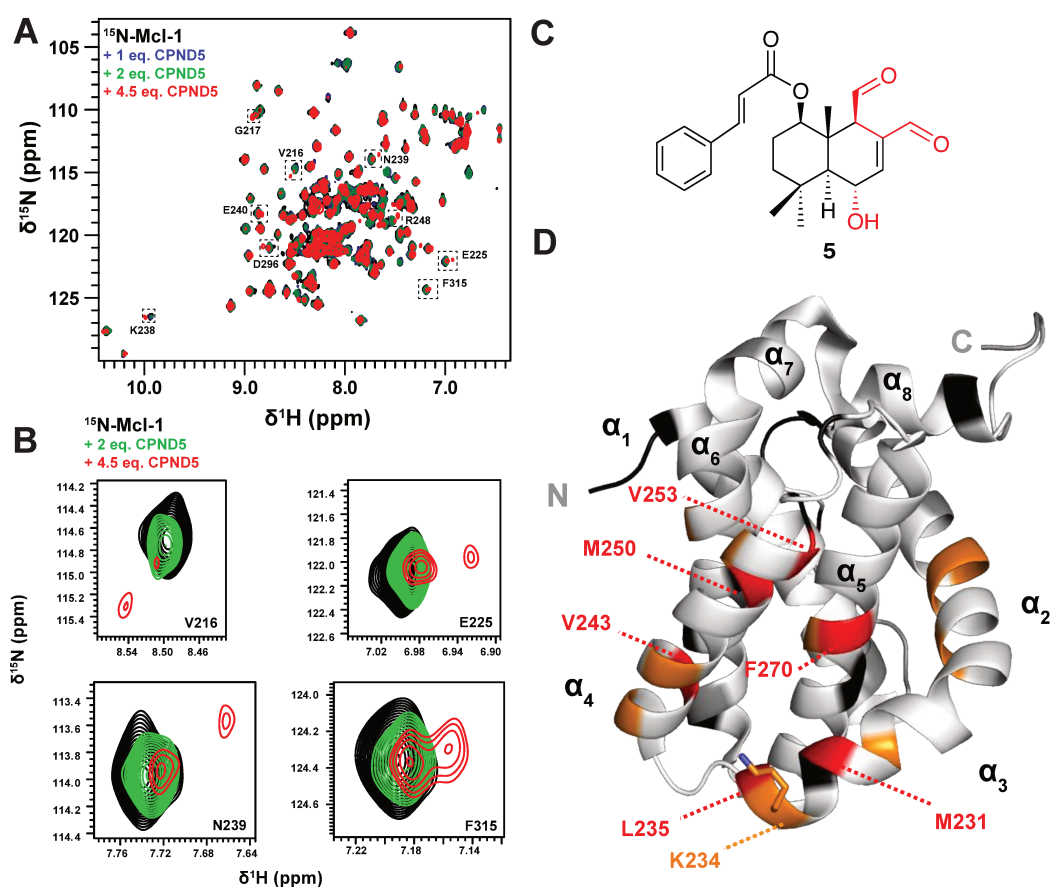


Fig. 4. Compound **5** binds to human MCL-1 with micromolar affinity in the BH3 binding-groove. (A) Overlay of ^1H - ^{15}N SOFAST HMQC spectra of MCL-1 alone (50 μM) (black) and in presence of compound **5** at 1 eq. (blue), 2 eq. (green) and 4.5 eq. (red). The spectral regions where new cross-peaks were observed at the largest ligand concentration are highlighted (dashed black frames) and the closest neighbouring residue ^1H - ^{15}N resonance is labelled for each frame; (B) Close-up view of several spectral regions for which new cross-peaks were observed at the largest ligand concentration; (C) Compound **5**; (D) Mapping of combined ^1H - ^{15}N chemical shift perturbations on MCL-1 structure (pdb code: 2MHS): red > 0.1 ppm (M231, L235, V243, M250, V253, F270), $0.1 > \text{orange} > 0.05$ ppm (V216, G217, K234, S245, I251, G271), grey < 0.005 ppm. Residues for which no data are available are highlighted (black). Those include prolines and others that could not be assigned to a ^1H - ^{15}N resonances in the spectrum of free MCL-1.

NMR experiments demonstrated that compound **5** and **7** bind human MCL-1 BH3 domain with good affinity. The same experiments performed with BCL-xL showed that compound **5** binds to BCL-xL in the BH3-binding groove of the protein with rather low affinity (Fig. S2). Although several residues from the BH3-binding groove of the protein ($\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$ and $\alpha 5$) were affected upon ligand addition, the analysis of the bound BCL-xL spectrum reveals modest changes, with most spectral perturbations in rapid exchange regime. However, for a very limited number of residues (< 5), intermediate and slow exchange regime shifts could be observed. BCL-xL was far ($< 50\%$) from being saturated at the maximum used concentration of ligand ($150\ \mu\text{M}$) since the rapid exchange shifts are linear regarding the concentration of ligand along the whole titration. This indicated the apparent lower affinity of compound **5** for BCL-xL when compared to MCL-1.

A last experience was carried out to compare the relative affinity of compound **7** for MCL-1 and BCL-xL. The ^1H - ^{15}N SOFAST HMQC spectrum of free ^{15}N -labeled MCL-1 was compared with the ^1H - ^{15}N spectra of MCL-1 in presence of compound **7** (1 eq.) with or without BCL-xL (1 eq.). About 75 % of MCL-1 was bound to compound **7** in absence of BCL-xL as seen from the partial disappearing of resonances from residues in the BH3 binding groove of the protein (Fig.S3). Upon addition of BCL-xL, no significant change was observed in the spectrum of ^{15}N -labeled MCL-1 in term of both ^1H - ^{15}N chemical shifts and intensity (Fig. S3). This confirmed the selectivity of compound **7** for human MCL-1 compared to BCL-xL. Considering the relative concentration of the two proteins, this suggests that the relative affinity of compound **7** for BCL-xL could be at least 20 times lower compared to MCL-1 in this kind of experiments.

This last NMR experiment as well as the ^1H - ^{15}N HMQC spectrum of MCL-1 in presence of 4.5 eq. of compound **5** and intriguing FPA results, may also account for the ability of compounds **5** and **7** to form a covalent bond with MCL-1 or BCL-xL via a Paal-Knorr condensation (Fig. 5). This hypothesis is also based on the fact that, in the literature, the activity of 9β -polygodial **3** on the taste sense has been linked to its ability to interact covalently with a lysine of the taste receptors by a modified Paal-Knorr condensation [38, 39, 40]. The inactive 9α isomer **13** was supposed to be unable of such reaction. So far, only ^1H NMR spectroscopic monitoring of **3** and **13** with methylamine and, later on, chemical reaction between **3** and 4-nitroaniline [32] were able to support this hypothesis (Scheme 1). Indeed, newly-formed pyrroles are most of the time unstable and not isolable.

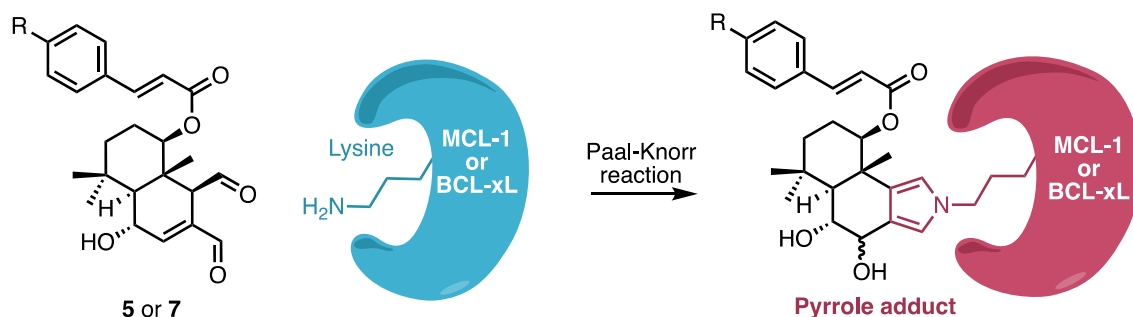
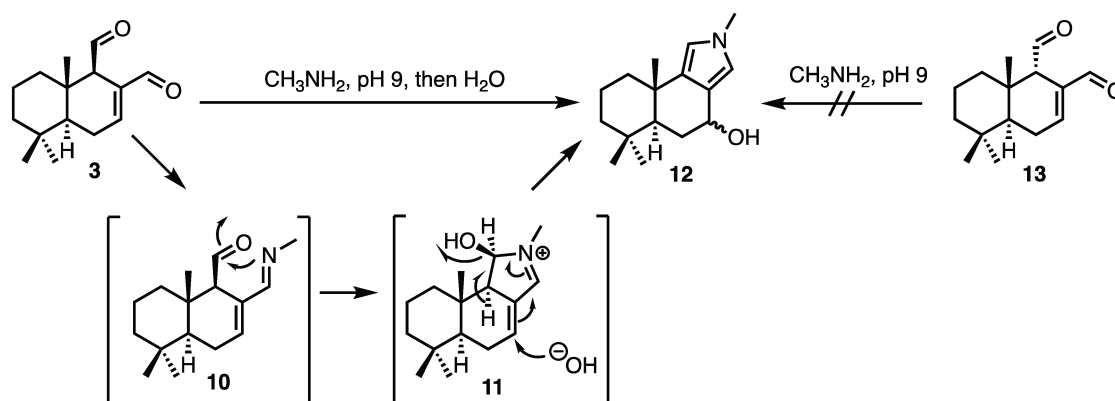


Fig 5. Suggested covalent interaction between compound **5** and MCL-1 protein *via* a Paal-Knorr rearrangement.



Scheme 1. NMR spectroscopic monitoring between 9 β - or 9 α -polygodial **3** and **13** and methylamine to mimic the covalent interaction with a lysine of the protein of the taste sense [37]. Sodano *et al.* have shown that only 9 β -polygodial is able to react *via* a Paal-Knorr rearrangement, whereas 9 α isomer is unreactive.

In our case, this assumption of a covalent interaction between 9 β -**5** and 9 β -**7** and MCL-1 and BCL-xL by a Paal-Knorr reaction is substantiated by the fact that **5** and **7** are **16** times more active on MCL-1 and BCL-xL than 9 α -**8**. The short residue stretch (231-238) encompassing lysine 234 and lysine 238 is affected upon addition of compound **5** or compound **7** on MCL-1. Thus, these lysine residues probably contribute in ligand binding, which consequently suggests their side-chain may orient toward the ligand.

These results support our hypothesis. MALDI experiments were carried out on MCL-1 incubated or not with 0.5, 1 and 2 equivalents of compound **5** (Fig. 5A and Fig. S4). After 2 h of incubation with 2 equivalents of **5**, more than 95% of the peak corresponding to native MCL-1 has disappeared in favour of a peak with a higher mass of about 378 Da. This difference in mass corresponds perfectly to the formation of a covalent adduct between compound **5** and a lysine *via* a Paal-Knorr rearrangement. A similar result was obtained with 2 equivalents of compound **7** (Fig. S5A). On the contrary, the same experiment carried out with 2 equivalents of compound **8** did not show the formation of such covalent adduct (Fig. 5B). This observation corroborates that of Sodano [Error! Bookmark not defined.] who has proposed that the ability to perform this rearrangement depends on the configuration of C9, due to the difference in distance between the two carbonyl functions. In our case, this information is crucial as **5** and **7** are 16 times more active on MCL-1 than compound **8**. We assume that this difference in affinity is due to the formation of a covalent bond between the two molecules and the protein. Likewise, MALDI experiments carried out on BCL-xL incubated with either **5** or **7** (2 eq.) showed the formation of covalent adducts but in less extent than with MCL-1 (*i.e.* of the order of 50%), perfectly in accordance with FPA results (Fig. 5C and S5B).

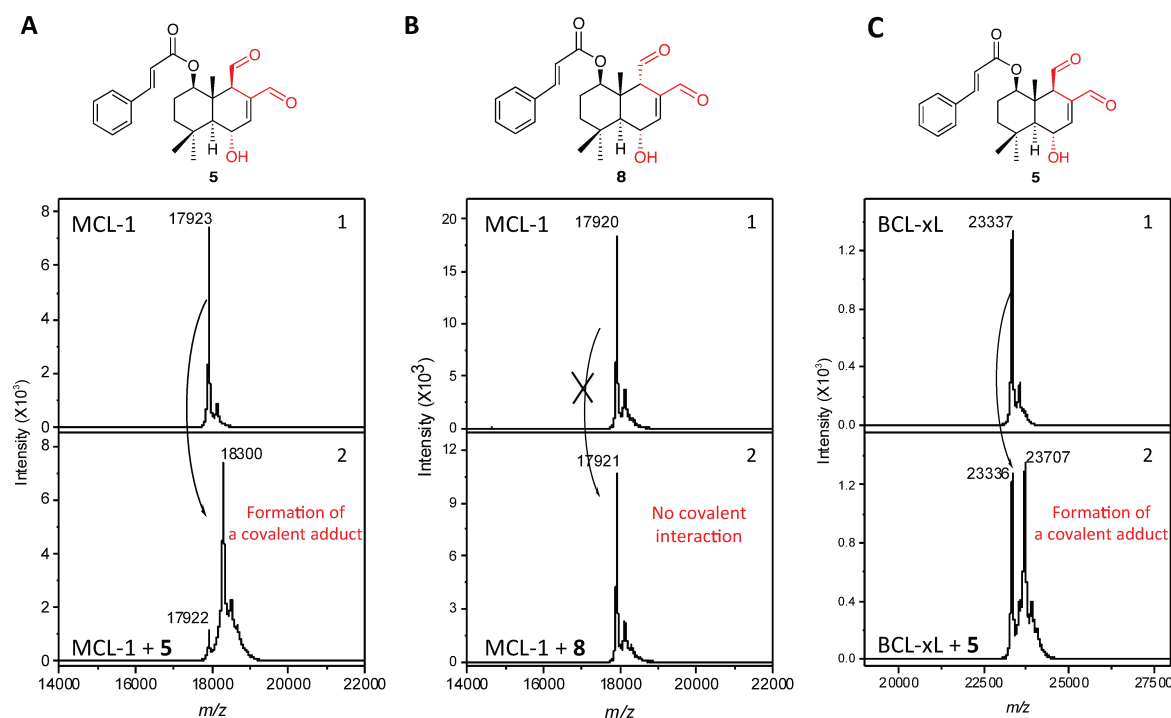
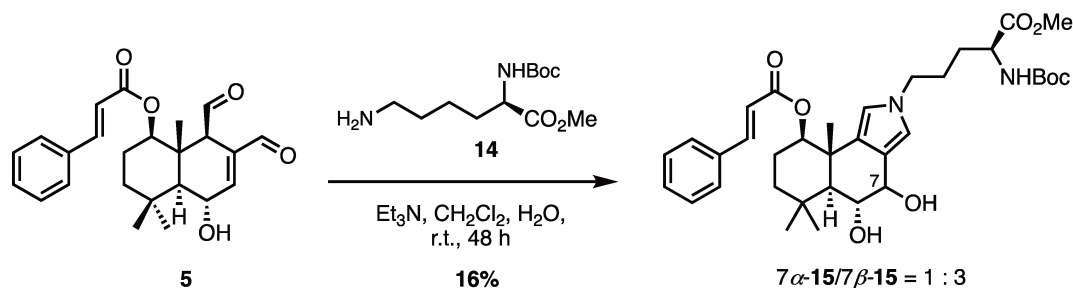


Fig. 5. MALDI experiments of MCL-1 and BCL-xL incubated at 22 °C for 2 h. (A) 1- MCL-1 alone; 2- MCL-1 with 2 eq. of **5**; (B) 1- MCL-1 alone; 2- MCL-1 with 2 equivalents of compound **8**; (C) 1- BCL-xL alone; 2- BCL-xL with 2 eq. of **5**.

To go further and characterize unambiguously the adduct thus formed, compound **5** was engaged in a reaction with protected lysine derivative **14** in wet dichloromethane at room temperature for 48 h (scheme 2). ^1H NMR analysis of the crude mixture revealed the disappearance of protons at 9.35 and 9.75 ppm corresponding to the aldehyde functions, as well as the apparition of two singlets around 6.4 ppm, characteristic of the protons of a pyrrole ring. In the flask, reactions between **5** and lysine took much more time than within MCL-1. This suggests the protein plays a key role in orientating the aldehydes of **5** so that they interact correctly with the lysine in the BH3 groove. Gratifyingly, the Paal-Knorr products 7α - and 7β -**15** could be isolated. They resulted from rearrangement between **5** and lysine **14** followed by a subsequent regioselective addition of water on C7. Both were sensitive to acidic conditions and prone to degradation.



Scheme 2. Formation of Paal-Knorr pyrrole adducts **15** by reaction between compound **5** and lysine derivative **14**.

As it has been demonstrated that drimane derivatives are cytotoxic against myeloid and lymphoid cell lines [31], we intended to associate the cytotoxicity of compounds **5** and **7** to their affinity to anti-apoptotic members of BCL-2, and more particularly to MCL-1 as these proteins are known to play a central role in haematological malignancies tumorigenicity. *In vitro* tests were realized on 2 haematological cells lines whose dependences to anti-apoptotic members of BCL-2 family have been previously characterized [25]. Thus, BL2, a Burkitt lymphoma cell line, is dependent on BCL-xL and MCL-1 for their survival whereas Remb1, a lymphoblastoid cell line (EBV-transformed normal B lymphocytes), is dependent on BCL-xL. First, cells were treated for 24 h with increasing concentrations of compounds **4** to **9** (0-50 μ M) to determine the LC_{50} (lethal concentration 50%). Cell viability was evaluated by MTT assays (Table 2). Results obtained on both cell lines indicated that, apart **9**, which is non cytotoxic, only compounds **5** and **7** showed a real cytotoxic selectivity for BL2, the MCL-1/BCL-xL dependent cell line (4.0 and 3.8 μ M respectively) over Remb1 ($LC_{50} > 15$ μ M), the BCL-xL dependent cell line. The same selectivity was observed for S63845, a MCL-1 inhibitor. On the contrary, ABT 737 a BCL-2 and BCL-xL inhibitor was only cytotoxic for Remb1. As expected, the cytotoxicity associated to compounds **5** and **7** seems correlated to MCL-1 dependency.

Table 2. Cytotoxic activities of compounds **4-9** on haematological cancer cell lines.

Compd.	BL2 ^a IC ₅₀ (μ M) ^b	Remb1 ^a IC ₅₀ (μ M) ^b
4	5.5 $\pm$ 1.1	5.6 $\pm$ 1.5
5	4.0 $\pm$ 0.7	>15
6	5.7 $\pm$ 0.3	8.9 $\pm$ 1.0
7	3.8 $\pm$ 0.3	>15
8	2.3 $\pm$ 0.1	5.3 $\pm$ 0.9
9	>15	>15
S63845	0.13 $\pm$ 0.01	>15
ABT-737	>15	0.89 $\pm$ 0.03

a- Dependencies: MCL-1/BCL-xL (BL2), BCL-xL (Remb1);

b- IC₅₀ measures the drug concentrations required for 50% cell death after 24 h.

For a better characterisation of the nature of the cytotoxicity observed, cells were then treated (or not) with 5 μ M of each compound for 24 h. Apoptosis was measured by flow cytometry after labelling the cells with Annexin V-FITC and PI (Fig. 6). Compounds **5** and **7** were shown to promote a strong induction of apoptosis on BL2 cell line (respectively 86% and 78% of AV⁺ cells), whereas they had a much weaker effect in Remb1 cell line (respectively 35% and 40% of AV⁺ cells).

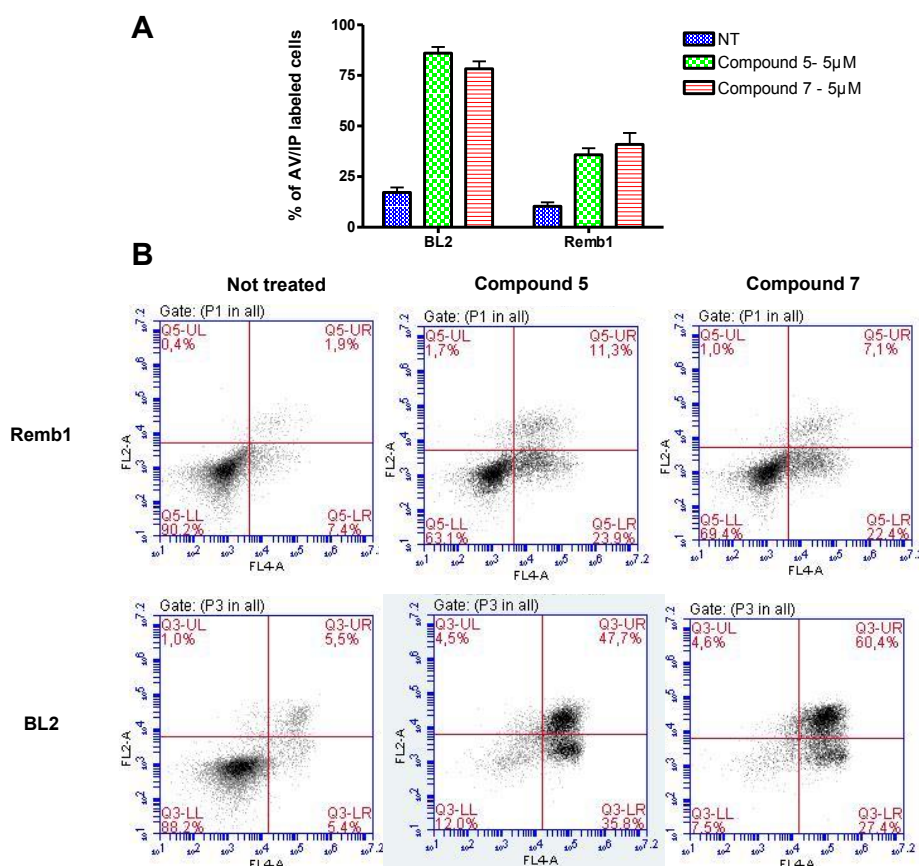


Fig. 6. Apoptosis induction by compounds **5** and **7** on haematological cell lines. Cells were treated (or not) with 5 μ M of each compound for 24 h and apoptosis was determined by flow cytometry after labelling with annexin V-FITC and PI. (A) Dot plots representative of at least three independent experiments. (B) Histogram showing the proportion of cells in apoptosis. The values presented (mean $\pm$ S.D.)

3. Conclusions

In summary, we have shown that drimane-type natural compounds **4-8** are inhibitors of proteins of the BCL-2 family. Among them, compounds **5** and **7** are the most potent molecules, with a sub-micromolar affinity for MCL-1. At cellular level, these two compounds are selective of BL2, a MCL-1/BCL-xL dependent cell line and induce apoptosis. A more detailed study regarding their mode of action, based on NMR and MALDI experiments revealed that compounds **5** and **7** are covalent inhibitors of MCL-1 and in a less extent of BCL-xL. This was confirmed by the synthesis of the corresponding Paal-Knorr adducts **15**. Although for many years, there were reluctances to develop covalent inhibitors of a target due to safety concerns, there has been recent renewed interest for such compounds [41], [42]. In fact, these inhibitors often present a strong affinity for their target, a prolonged effect in patients since they are not eliminated by the bloodstream and limit the risk of acquired resistance. The covalent bond between compounds **5** and **7** and MCL-1 is created thanks to a selective Paal-Knorr rearrangement. If Cimino et al have hypothesised this rearrangement for the first time in 1984, we were able to confirm it

unambiguously for the first time thanks to the synthesis of compounds **15** and **16**. These drimane derivatives **5** and **7** are thus the first examples of covalent BH3-mimetics that target MCL-1⁴³ and could constitute good candidates for a new therapeutic strategy.

4. Experimental section

General experimental details

All reagents and solvents were used as purchased from commercial suppliers. Purification by column chromatography on silica gel was performed using Merck Silica Gel 60 (70–230 mesh). ¹H and ¹³C NMR spectra were recorded on Bruker ARX500 or Bruker AVANCE III 700 instruments using CDCl₃ or CD₃CN as internal reference. Chemical shifts (δ values) are given in parts per million (ppm), and multiplicity of signals are reported as follows: s, singlet; bs, broad singlet; d, doublet; t, triplet; q, quartet; dd, doublet of doublets; m, multiplet. HRMS analyses were performed using a Waters LCT Premier instrument by ElectroSpray Ionization (ESI). Protein-ligand NMR experiments were recorded on a Bruker 600 or 800 (Avance III) and 950 MHz (Avance III HD) spectrometers equipped with cryoprobes. A MALDI-TOF/TOF UltrafleXtreme mass spectrometer (Bruker Daltonics, Bremen) was used for all MALDI-TOF experiments. Mass spectra were obtained in linear positive ion mode. The laser intensity was set just above the ion generation threshold to obtain peaks with the highest possible signal-to-noise (S/N) ratio without significant peak broadening. All data were processed using the FlexAnalysis software package (Bruker Daltonics). Sinapic acid (SA, used as the matrix for MALDI-TOF experiments, was of the highest grade available and used without further purification) was purchased from Sigma Aldrich.

Plant material

For compounds **4**, **5**, **6**, **8** and **9**: Trunk barks and leaves of *Z. pancheri* subsp. *pancheri* were collected in the rainforest of Nodela (South Province of New Caledonia) by one of us (V. D.). The corresponding voucher specimen (DUM-578) is kept at the Herbarium of New Caledonia (NOU). See ref [29].

For compound **7**: Trunk barks of *Zygogynum baillonii* were collected in the high-altitude scrubland of "Monts Dzumac", South Province of New Caledonia, by one of us (M.L.). A voucher specimen (LIT-1275) is deposited in the Herbarium of New Caledonia (NOU).

Extraction and isolation

Extraction, isolation and characterisation of these compounds have already been described: see [29] for compounds **4**, **5**, **6**, **8** and **9**; see [28] and [44] for compound **7**.

Human MCL-1 production and purification

Plasmid pET15b (AmpR) encoding for the human MCL-1 deleted for the PEST domain and C-terminal transmembrane segment (MCL-1 sequence from 172 to 329) in fusion with an *N*-terminal histidine tag followed by a Maltose Binding Protein (MBP) segment was generously shared by L. Carlier (LBM, CNRS/Sorbonne-Universités)

and incorporated into BL21 Rosetta pLysS (ChloR) using electroporation method. This biomass was made in a 1 L culture at 37°C, to an optical density of 0.6-0.9 prior to induction. Induction of protein expression was carried out by adding isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) and lasted 18 h at 15 °C, and then the culture was finally harvested and the bacterial pellet containing the protein of interest was collected. After the bacterial lysis, a histidine affinity chromatography was performed (5 mL HisTrap FF crude, GE). The elution product from histidine-affinity chromatography was digested by prescission enzyme. The completion of protein digestion was checked through SDS-PAGE experiments. Once completed, the digestion product was concentrated with an adapted centrifugal filter (Amicon) and the His-TAG was removed by a histidine affinity chromatography column (5 mL HisTrap FF crude, GE). Finally, MCL-1 was purified by size-exclusion chromatography (SEC) with S200 column (buffer: 20 mM Tris pH 7, 300 mM NaCl).

BCL-xL, MCL-1 and BCL-2 binding affinity assays

The binding affinities of compounds for BCL-2, BCL-xL and MCL-1 were evaluated by competition against fluorescently labelled reference compounds, Bim, Bak and Bid, respectively, as described by Qian *et al.* [34]. Human isoform BCL-2 (isoform 2), human 45-84/C37 BCL-xL and human 172-327 MCL-1 proteins were recombinantly produced at ICSN (ref?). Bim, FITC-Ahx-Bim-OH, Bak, FITC-Ahx-Bak-OH, Bid and FITC-Ahx-Bid-OH peptides were synthesized by GenePep Laboratories (Montpellier, France). Labelled and unlabelled peptides were diluted in assay buffer, which contained 20 μ M Na₂HPO₄ (pH 7.4), 50 μ M NaCl, 2 μ M EDTA, 0.05% Pluronic F-68 (without pluronic acid for storage at -20 °C). Labelled BH3 peptide (15 nM of Bak and Bid, 3 nM of Bim), 100 nM protein, and 100 μ M of unlabelled BH3 peptide or compound (first diluted in 10 mM DMSO and then buffer for final concentration from 10⁻⁹ to 10⁻⁴ M) into a final volume of 20 μ L were distributed in a 384-well black flat-bottomed microplate (PS, Hibase, Small Volume, Med. Binding, VWR Garnier Bio-One 784076). The microplate was then incubated at room temperature for 2 and 6 h (except for BCL-2 not stable at RT for 6 h) and shaken before fluorescent polarization was measured. Fluorescence polarization in millipolarization units was measured with a Beckman Coulter Paradigm® using FP cartridge (λ_{ex} 485 nm, λ_{em} 535 nm). The exposure time was 300 ms per channel. All experimental data were collected using the Biomek Software® (Beckman Coulter, Inc, Brea, CA, USA) and analysed using Microsoft Excel 2010 (Microsoft, Redmond, WA, USA). Results are expressed as binding activity, *i.e.* percentage of inhibition of the binding of labelled reference compound, converted into K_i , the concentration corresponding to 50% of such inhibition, and corrected for experimental conditions according to Kenakin rearranged equation [45], which is adapted from Cheng and Prusoff equation [35]. Unlabelled peptides Bim, Bak and Bid were used as positive controls. The performance of the assays was monitored by use of Z' factors as described by Zhang *et al.* [46]. The Z' factors for these assays were 0.85 and 0.8 for BCL-xL/Bak (at 2h and 6h respectively); 0.8 for MCL-1/Bid (at 2 and 6 h); 0.7 for BCL-2/Bim indicating the robustness of such assays.

NMR experiments

Spectroscopic measurements were performed in the NMR spectroscopy buffer (NaPO₄ 20 mM pH 7.4, 50 mM NaCl, 2 μ M EDTA, 2 mM TCEP, 3.5% DMSO, 95% / 5% H₂O / D₂O, 0.05% pluronic acid 10% + Roche anti-

protease EDTA free) at 298K. Reference experiments with both isolated, ¹⁵N-labeled MCL-1 (human) and BCL-xL (human) were carried out by using 50 μM of protein in a 3 mm (200 μL) NMR tube. For each titration point, the content of the NMR tube was added into a lyophilized aliquot of the desired compound. After vigorous resuspension of the ligand, the solution was transferred back in the NMR tube for measurement. Experiments for the assessment of ligand solubility were performed in the same manner, except that the reference experiment was protein-free and buffer-only. Combined 1H-15N chemical shift perturbations were calculated as follows:

$$\Delta\delta_{H,N} = \sqrt{(\Delta\delta_H)^2 + 0,14 * (\Delta\delta_N)^2}$$

With:

$$\Delta\delta_X = \Delta\delta_{X,bound} - \Delta\delta_{X,free}$$

MALDI-TOF mass Spectrometry

Sample for MALDI analysis was prepared at a concentration of 50 μM in a buffer (NaPO₄ 20 mM pH 7.4, 50 mM NaCl, 2 μM EDTA, 3.5% DMSO, 0.05% pluronic acid 10% + Roche anti-protease EDTA free). The matrix solution was prepared at a concentration of 45 mM in H₂O/CH₃CN/TFA 1:1:0.1. The sample was prepared by mixing the sample solution with matrix solution at a volume ratio of 1:9.

Synthetic procedure and description of compounds 15 and 16

Dialdehyde compound **5** (61 mg, 0.15 mmol), lysP.HCl **14** (92 mg, 0.31 mmol, 2 eq) and triethylamine (43 μL, 0.31 mmol) were dissolved in wet dichloromethane. The reaction was stirred at room temperature for 48 h then concentrated *in vacuo*. The crude residue was purified by flash chromatography on silica gel using a gradient of heptane and ethyl acetate to give compound **7α-15** (4 mg, 4%) and **7β-16** (11 mg, 12%). **Compound 7α-15**: ¹H NMR (700 MHz, CDCl₃): δ 7.74 (d, J = 16.0 Hz, 1H), 7.68 (m, 2H), 7.43 (m, 3H), 6.65 (d, J = 16.0 Hz, 1H), 6.54 (s, 1H), 6.26 (s, 1H), 5.46 (s, NH), 4.76 (dd, J = 4.1, 11.3 Hz, 1H), 4.53 (t, J = 4.4 Hz, 1H), 4.19 (td, J = 4.4, 9.9 Hz, 1H), 3.98 (m, 1H), 3.68 (t, J = 6.9 Hz, 2H), 3.61 (s, 3H), 2.99 (brs, 1H, OH), 2.75 (d, J = 10.7 Hz, 1H, OH), 1.82 (m, 3H), 1.77 (m, 1H), 1.58 (m, 3H), 1.49 (m, 1H), 1.46 (m, 1H), 1.38 (s, 9H), 1.37 (s, 3H), 1.19 (s, 3H), 1.19 (m, 2H), 1.17 (s, 3H), ppm; ¹³C NMR (175 MHz, CDCl₃): δ 174.2, 167.4, 145.5, 135.7, 131.5, 131.0, 130.0 (2C), 129.3 (2C), 120.7, 120.0, 119.1, 115.0, 82.1, 80.2, 71.1, 67.0, 54.6, 52.6, 50.9, 50.0, 42.3, 41.8, 36.1, 33.9, 32.0, 31.6, 28.5 (3C), 25.8, 23.8, 22.5, 20.9 ppm; HRMS (ESI)*: *m/z* calcd. for C₃₆H₅₀N₂NaO₈ [M-OH+OMe+Na]⁺ 661.3465; found 661.3451. **Compound 7β-16**: ¹H NMR (700 MHz, CDCl₃): δ 7.74 (d, J = 16.0 Hz, 1H), 7.68 (m, 2H), 7.44 (m, 3H), 6.66 (d, J = 16.0 Hz, 1H), 6.46 (s, 1H), 6.26 (s, 1H), 5.49 (s, NH), 4.71 (dd, J = 4.1, 11.4 Hz, 1H), 4.35 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 4.00 (m, 1H), 3.97 (m, 1H), 3.66 (brs, 2H), 3.62 (s, 3H), 3.14 (OH), 2.93 (OH), 1.83 (m, 1H), 1.76 (m, 1H), 1.58 (m, 4H), 1.48 (m, 1H), 1.44 (s, 3H), 1.41 (m, 1H), 1.38 (s, 9H), 1.21 (s, 3H), 1.19 (m, 2H), 1.16 (s, 3H) ppm; ¹³C NMR (175 MHz, CDCl₃): δ 173.8, 167.0, 145.6, 135.7, 131.5, 131.2, 130.0 (2C), 129.3 (2C), 122.0, 120.3, 117.0, 115.5, 82.2, 80.4, 75.6, 75.5, 55.4, 54.7, 52.7, 49.8, 42.3, 40.7, 36.1, 34.2, 32.1, 31.6, 28.7 (3C), 25.7, 23.7, 22.5, 21.7 ppm; HRMS (ESI)*: *m/z* calcd. for C₃₆H₅₀N₂NaO₈ [M-OH+OMe+Na]⁺ 661.3465; found 661.3488. * Mass experiments were performed in MeOH

Cell lines

BL2 and Remb1 cell lines were kindly provided by the International Agency for Research on Cancer (IARC, Lyon). All cell lines were cultured in RPMI 1640 medium (Invitrogen) containing 2 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate, 20 mM glucose, 100 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin and supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (complete RPMI medium). Cell lines were maintained at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂.

MTT assay

Cell viability was measured by the MTT (3-(4, 5-dimethylthiazolyl-2)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide) assay. 7.104 cells (in triplicate) were incubated for 24 h at 37 °C with various concentrations (0/0.625/1.25/2.5/10/25/50 µM) of both compounds in 100 µL of complete RPMI medium. Then, 20 µL of MTT reagent (final concentration 1 mg/mL) was added and plates were incubated 2 h more. Finally, 100 µL of lysis buffer (30% SDS, 33% Dimethylformamide, 2% glacial acetic acid, 0.025 N HCl, pH = 4.7) was added and absorbance was recorded at 570 nm after an overnight incubation. The LC₅₀ values were calculated after plotting the dose-response curves using the GraphPad Prism software.

Quantification of apoptosis

Apoptosis was assessed by labelling cells with annexin-V-FITC and propidium iodide (PI). 3×10^5 cells were incubated for 24 h at 37 °C with 5 µM of each compound in complete RPMI medium. Cells were then washed in PBS, resuspended in annexin buffer (10 mM HEPES/NaOH, pH = 7.4, 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 1.8 mM CaCl₂) containing 2.5 µg/mL annexin V-FITC (eBioscience) and incubated for 5–10 min. After 100 µL of in annexin buffer supplemented with PI (10 µg/mL; Sigma-Aldrich) was added. Analysis (n = 10 000) was done by flow cytometry (Accuri C6 cytometer, Becton-Dickinson). Annexin V-positive cells (PI negative and positive) were considered as apoptotic cells.

Corresponding authors

E-mail address: fanny.roussi@cnrs.fr

Acknowledgments

The authors are very grateful to North and South Provinces of New Caledonia who facilitated our field investigation. We gratefully acknowledge University Paris-Saclay for a grant for one of us (F. D.). The authors warmly thank L. Carlier (LBM, Jussieu) for the gift of MCL-1 plasmid and Jean-François Gallard (ICSN) for NMR experiments on the 700 MHz apparatus.

Supplementary data

References

- [1] A. Strasser, S. Cory, J. M. Adams, *EMBO J.* 30 (2011) 3667.
- [2] P. E. Czabotar, G. Lessene, A. Strasser, J. M. Adams, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15 (2014) 49.
- [3] S. N. Willis, J. M. Adams, *Curr. Opin. Cell Biol.* 17 (2005) 617.
- [4] J. Montero, A. Letai, *Cell Death Differ.* 25 (2018) 56.
- [5] P. Gimenez-Bonafé, A. Tortosa, R. Perez-Tomas, *Curr. Cancer Drug Targets* 9 (2009) 320.
- [6] J.C. Reed, *Blood* 111 (2008) 3322.
- [7] W.J. Placzek, J. Wei, S. Kitada, D. Zhai, J.C. Reed, M. Pellecchia, *Cell Death Dis.* 1 (2010) e40.
- [8] A. H. Wei, A. W. Roberts, A. Spencer, A. S. Rosenberg, D. Siegel, R. B. Walter, S. Caenepeel, P. Hughes, Z. McIver, K. Mezzi, P. K. Morrow, A. Stein, *Blood Rev.* (2020) 100672.
- [9] a- R. Beroukhim, C. H. Mermel, D. Porter, G. Wei, S. Raychaudhuri, J. Donovan, J. Barretina, J. S. Boehm, J. Dobson, M. Urashima, K. T. Mc Henry, R. M. Pinchback, A. H. Ligon, Y.-J. Cho, L. Haery, H. Greulich, M. Reich, W. Winckler, M. S. Lawrence, B. A. Weir, K. E. Tanaka, D. Y. Chiang, A. J. Bass, A. Loo, C. Hoffman, J. Prensner, T. Liefeld, Q. Gao, D. Yecies, S. Signoretti, E. Maher, F. J. Kaye, H. Sasaki, J. E. Tepper, J. A. Fletcher, J. Taberner, J. Baselga, M.-S. Tsao, F. Demichelis, M. A. Rubin, P. A. Janne, M. J. Daly, C. Nucera, R. L. Levine, B. L. Ebert, S. Gabriel, A. K. Rustgi, C. R. Antonescu, M. Ladanyi, A. Letai, L. A. Garraway, M. Loda, D. G. Beer, L. D. True, A. Okamoto, S. L. Pomeroy, S. Singer, T. R. Golub, E. S. Lander, G. Getz, W. R. Sellers, M. Meyerson, *Nature* 463 (2010) 899.
- [10] T. I. Zack, S. E. Schumacher, S. L. Carter, A. D. Cherniack, G. Saksena, B. Tabak, M. S. Lawrence, C.-Z. Zhang, J. Wala, C. H. Mermel, C. Sougnez, S. B. Gabriel, B. Hernandez, H. Shen, P. W. Laird, G. Getz, M. Meyerson, R. Beroukhim, *Nat. Genet.* 45 (2013) 1134.
- [11] K. J. Campbell, M. L. Bath, M. L. Turner, C. J. Vandenberg, P. Bouillet, D. Metcalf, C. L. Scott, S. Cory, *Blood* 116 (2010) 3197.
- [12] M. S. Davids, A. Letai, *J. Clin. Oncol.* 30 (2012) 3127.
- [13] S. D'Aguzzo, D. Del Bufalo, *Cells* 9 (2020) 1287.
- [14] A. Kotschy, Z. Szlavik, J. Murray, J. Davidson, A. L. Maragno, G. Le Toumelin-Braizat, M. Chanrion, G. L. Kelly, J.-N. Gong, D. M. Moujalled, A. Bruno, M. Csekei, A. Paczal, Z. B. Szabo, S. Sipos, G. Radics, A. Prosenyak, B. Balint, L. Ondi, G. Blasko, A. Robertson, A. Surgenor, P. Dokurno, I. Chen, N. Matassova, J. Smith, C. Pedder, C. Graham, A. Studeny, G. Lysiak-Auvity, A.-M. Girard, F. Gravé, D. Segal, C. D. Riffkin, G. Pomilio, L. C. A. Galbraith, B. J. Aubrey, M. S. Brennan, M. J. Herold, C. Chang, G. Guasconi, N. Cauquil, F. Melchiorre, N. Guigal-Stephan, B. Lockhart, F. Colland, J. A. Hickman, A. W. Roberts, D. C. S. Huang, A. H. Wei, A. Strasser, G. Lessene, O. Geneste, *Nature* 538 (2016) 477.
- [15] Z. Szlavik, M. Csekei, A. Paczal, Z. B. Szabo, S. Sipos, G. Radics, A. Prosenyak, B. Balint, J. Murray, J. Davidson, I. Chen, P. Dokurno, A. E. Surgenor, Z. M. Daniels, R. E. Hubbard, G. Le Toumelin-Braizat, A. Claperon, G. Lysiak-Auvity, A.-M. Girard, A. Bruno, M. Chanrion, F. Colland, A.-L. Maragno, D. Demarles, O. Geneste, A. Kotschy *J. Med. Chem.* 63 (2020) 13762.
- [16] S. Caenepeel, S. P. Brown, B. Belmontes, G. Moody, K. S. Keegan, D. Chui, D. A. Whittington, X. Huang, L. Poppe, A. C. Cheng, M. Cardozo, J. Houze, Y. Li, B. Lucas, N. A. Paras, X. Wang, J. P. Taygerly, M. Vimolratana, M. Zancanella, L. Zhu, E. Cajulis, T. Osgood, J. Sun, L. Damon, R. K. Egan, P. Greninger, J. D. McClanaghan, J. Gong, D. Moujalled, G. Pomilio, P. Beltran, C. H. Benes, A.W. Roberts, D. C. S. Huang, A. Wei, J. Canon, A. Coxon, P. E. Hughes, *Cancer Discov.* (2018) 0387.
- [17] A. E. Tron, M. A. Belmonte, A. Adam, B. M. Aquila, L. H. Boise, E. Chiarparin, J. Cidado, K. J. Embrey, E. Gangl, F. D Gibbons, G. P. Gregory, D. Hargreaves, J. A. Hendricks, J. W. Johannes, R. W. Johnstone, S. L. Kazmirski, J. G. Kettle, M. L. Lamb, S. M. Matulis, A. K. Nooka, M. J. Packer, B. Peng, P. B. Rawlins, D. W. Robbins, A. G. Schuller, N. Su, W. Yang, Q. Ye, X. Zheng, J.P. Secrist, E.A. Clark, D.M. Wilson, S.E. Fawell, A.W. Hird, *Nat. Commun.* 9 (2018) <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07551-w>
- [18] C. Kieffer, J. -P. Jourdan, M. Jouanne, A.-S. Voisin-Chiret, *Drug Discov. Today* 25 (2020) 1592.
- [19] M. Litaudon, H. Bousserouel, K. Awang, O. Nosjean, M.-T. Martin, M. E. Tran Huu Dau, H. A. Hadi, J. A. Boutin, T. Sévenet, F. Guéritte, *J. Nat. Prod.* 72 (2009) 480.
- [20] C. Apel, C. Geny, V. Dumontet, N. Birlirakis, F. Roussi, V. C. Pham, D. T. M. Huong, V. H. Nguyen, V. M. Chau, M. Litaudon, *J. Nat. Prod.* 77 (2014) 1430.
- [21] C. Gény, G. Rivière, J. Bignon, N. Birlirakis, E. Guittet, K. Awang, M. Litaudon, F. Roussi, V. Dumontet, *J. Nat. Prod.* 79 (2016) 838.
- [22] D. Fomekong Fotsop, F. Roussi, A. Leverrier, A. Bretéché, F. Guéritte, *J. Org. Chem.* 75 (2010) 7412.
- [23] S. Desrat, A. Pujals, C. Colas, J. Dardenne, C. Geny, L. Favre, V. Dumontet, B. Iorga, M. Litaudon, M. Raphaël, J. Wiels, F. Roussi, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 24 (2014) 5086.

-
- [24] S. Desrat, C. Remeur, C. Geny, G. Rivière, C. Colas, V. Dumontet, N. Birlirakis, B. Iorga, F. Roussi, *Chem Comm.* 50 (2014) 8593.
- [25] A. Abou Samra, A. Robert, C. Gov, L. Favre, L. Eloy, E. Jacquet, J. Bignon, J. Wiels, S. Desrat, F. Roussi, *Eur. J. Med. Chem.* 148 (2018) 26.
- [26] S. Gapil Tiamas, F. Audet, A. Abou Samra, J. Bignon, M. Litaudon, C. Fourneau, A. Ariffin, K. Awang, S. Desrat, F. Roussi, *Eur. J. Org. Chem.* 42 (2018) 5830.
- [27] S. Gapil Tiamas, F. Daressy, A. Abou Samra, J. Bignon, V. Steinmetz, M. Litaudon, C. Fourneau, K. Hoong Leong, A. Ariffin, K. Awang, S. Desrat, F. Roussi, *Bioorg Med Chem Lett.* 30 (2020) 127003.
- [28] D. Fomekong-Fotsop, F. Roussi, C. Le Callonec, Hadjira Bousserouel, M. Litaudon, F. Guéritte, *Tetrahedron* 64 (2008) 2192.
- [29] N. Allouche, C. Apel, M.-T. Martin, V. Dumontet, F. Guéritte, M. Litaudon, *Phytochem.* 70 (2009) 546.
- [30] B. M. J. Jansen, A. de Groot, *Nat. Prod. Rep.* 21 (2004) 449.
- [31] E. Fratonì, A. E. de Athayde, M. da Silva Machado, T. Zermiani, I. Venturi, M. Corêa dos Santos, F. Lobato, V. C. Filho, G. C. Franchi Jr., A. E. Nowill, J. R. Santin, A. Malheiros, *Biomed. Pharmacother.* 103 (2018) 1498.
- [32] R. Dasari, A. De Carvalho, D. C. Medellin, K. N. Middleton, F. Hague, M. N. M. Volmar, L.V. Frolova, M. F. Rossato, J. J. De La Chapa, N. F. Dybdal-Hargreaves, A. Pillai, R. E. Kálin, V. Mathieu, S. Rogelj, C. B. Gonzales, J. B. Calixto, A. Evidente, M. Gautier, G. Munirathinam, R. Glass, P. Burth, S. C. Pelly, W. A. L. van Otterlo, R. Kiss, A. Kornienko, *Eur. J. Med. Chem.* 103 (2015) 226.
- [33] T. Oltersdorf, S. W. Elmore, A. R. Shoemaker, R. C. Armstrong, D. J. Augeri, B. A. Belli, M. Bruncko, T. L. Deckwerth, J. Dinges, P. J. Hajduk, M. K. Joseph, S. Kitada, S. J. Korsmeyer, A. R. Kunzer, A. Letai, C. Li, M. J. Mitten, D. G. Nettesheim, S. Ng, P. M. Nimmer, J. M. O'Connor, A. Oleksijew, A. M. Petros, J. C. Reed, W. Shen, S. K. Tahir, C. B. Thompson, K. J. Tomaselli, B. Wang, M. D. Wendt, H. Zhang, S. W. Fesik, S. H. Rosenberg, *Nature* 435 (2005) 677.
- [34] J. Qian, M. J. Voorbach, J. R. Huth, M. L. Coen, H. Zhang, S.-C. Ng, K. M. Comess, A. M. Petros, S. H. Rosenberg, U. Warrior, D. J. Burns, *Anal. Biochem.* 328 (2004) 131.
- [35] C. Yung-Chi, W.H. Prusoff, *Biochem. Pharmacol.* 22 (1973) 3099.
- [36] C. Tse, A. R. Shoemaker, J. Adickes, M. G. Anderson, J. Chen, S. Jin, E. F. Johnson, K. C. Marsh, M. J. Mitten, P. Nimmer, L. Roberts, S. K. Tahir, Y. Xiao, X. Yang, H. Zhang, S. Fesik, S. H. Rosenberg, S. W. Elmore, *Cancer Res.* 68 (2008) 3421.
- [37] Q. Liu, T. Moldoveanu, T. Sprules, E. Matta-Camacho, N. Mansur-Azzam, K. Gehring, *J. Biol. Chem.* 285 (2010) 19615.
- [38] G. Cimino, A. Spinella, G. Sodano, *Tetrahedron Lett.* 25 (1984) 4151.
- [39] G. Cimino, G. Sodano, A. Spinella, *Tetrahedron* 43 (1987) 5401.
- [40] A. Kornienko, J. J. La Clair, *Nat. Prod. Rep.* 34 (2017) 1051.
- [41] J. Singh, R.C. Petter, T.A. Baillie, A. Whitty, *Nat. Rev. Drug Discov.* 10 (2011) 307.
- [42] A.K. Ghosh, I. Samanta, A. Mondal, W.R. Liu, *ChemMedChem* 14 (2019) 889.
- [43] S. Lee, T. E. Wales, S. Escudero, D. T. Cohen, J. Luccarelli, C. G. Gallagher, N. A. Cohen, A. J. Huhn, G. H. Bird, J. R. Engen, L. D. Walensky, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 23 (2016) 600.
- [44] L. Larsen, S. D. Lorimer, N. B. Perry, *Biochem. Syst. Ecol.* 35 (2007) 286.
- [45] Z. W. Nikolovska-Coleska, R. Wang, X. Fang, H. Pan, Y. Tomita, P. Li, P. P. Roller, K. Krajewski, N. G. Saito, J. A. Stuckey, S. Wang, *Anal Biochem.* 332 (2004) 261.
- [46] J. H. Zhang, T. D. Y. Chung, K. R. Oldenburg, *J Biomol Screen* 4 (1999) 67.

Supporting information

Natural Sesquiterpenoids from Winteraceae as covalent MCL-1 inhibitors

Florian Daressy,^{a,b} Florian Malard,^a Line Seguy,^c Vincent Guérineau,^a Cécile Apel,^a Vincent Dumontet,^a Aude Robert,^d Anne-Claire Groo,^c Marc Litaudon,^a Jérôme Bignon,^a Sandy Desrat,^a Aurélie Malzert-Fréon,^c Joëlle Wiels,^b Ewen Lescop,^a Fanny Roussi^{a,*}

^a *Institut de Chimie des Substances Naturelles, CNRS, ICSN UPR2301, Université Paris-Saclay, avenue de la terrasse, 91198 Gif-sur-Yvette, France*

^b *Institut Gustave Roussy, CNRS UMR 9018, Université Paris-Saclay, 114 rue Edouard-Vaillant, 94805 Villejuif Cedex, France*

^c *Normandie Université, UNICAEN, CERMN, 14000 Caen, France*

^d *Institut Gustave Roussy, INSERM U1279, Université Paris-Saclay, 114 rue Edouard Vaillant, 94805 Villejuif Cedex*

Solubility experiments for compounds **5** and **7**

From 0 μM to 400 μM sharp resonances could be observed for methyl hydrogen of **7**. Signal intensity was proportional to ligand concentration in this range, with no major modification of peak shape. This indicates that **7** is soluble up to at least 400 μM . With **5**, a similar protocol was used to demonstrate that the molecule is soluble up to at least 200 μM .

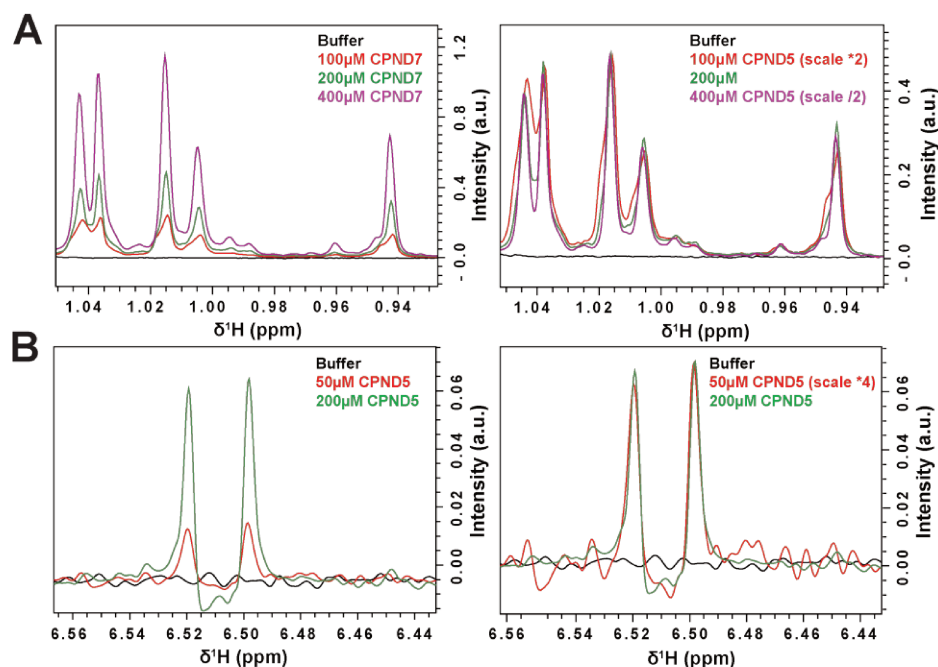


Fig. S1. Solubility of Mcl-1 selective ligands **5** and **7**. Overlay of ^1H spectra from buffer (black) and in presence of increasing concentration of (A) **7** (0-400 μM) and (B) **5** (0-200 μM). Experiments were recorded at 800 MHz and 25 $^{\circ}\text{C}$ in the following buffer: 20 mM NaPO_4 pH 7.4, 50 mM NaCl , 2 μM EDTA, 2 mM TCEP, 0.005% pluronic acid, 3.5% DMSO, and 5% D_2O / 95 % H_2O .

Binding study of compound 5 with BCL-xL

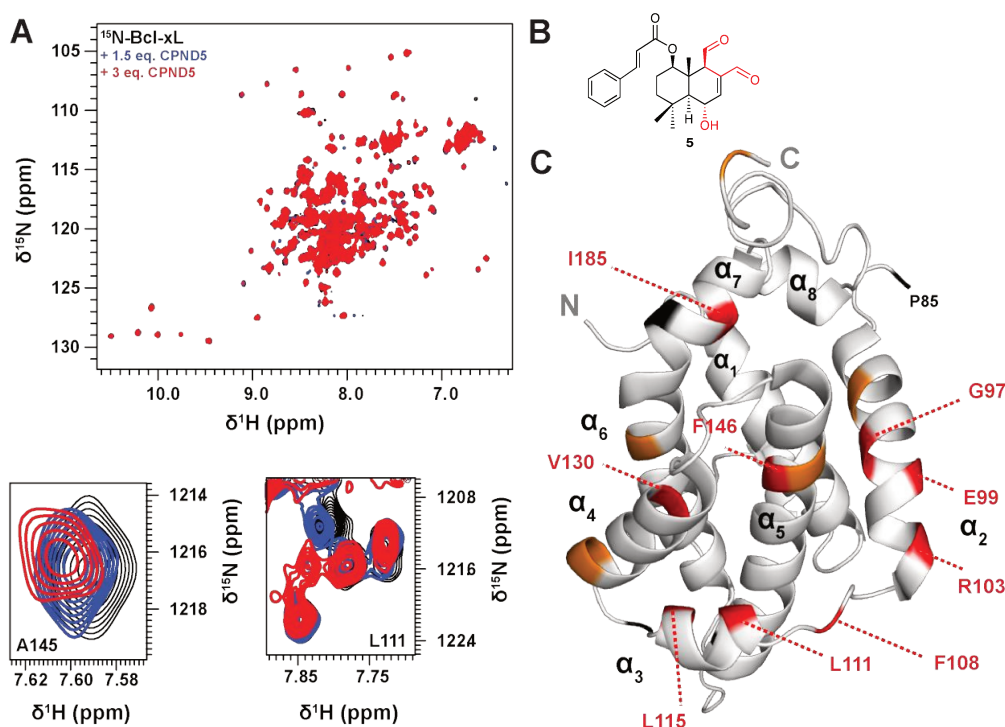


Fig. S2. Compound 5 binds to human BCL-xL with low affinity in the BH3-groove. (A) Overlay of ^1H - ^{15}N SOFAST-HMQC spectra from isolated ^{15}N labeled BCL-xL (50 μM) (black) and in presence of compound 5 (1.5 eq.) (blue), (3 eq.) (red). A close-up view of selected crosspeaks is shown (right). (B) Structure of compound 5. (C) Mapping of largest combined ^1H - ^{15}N chemical shift perturbations (red >0.02 , $0.02 >$ orange >0.015) on BCL-xL structure. Residues for which no data are available are highlighted (black). Those include prolines and others that could not be assigned to a ^1H - ^{15}N resonances in the spectrum of free Mcl-1

Compound 7 selectivity for Mcl-1 compared to Bcl-xL

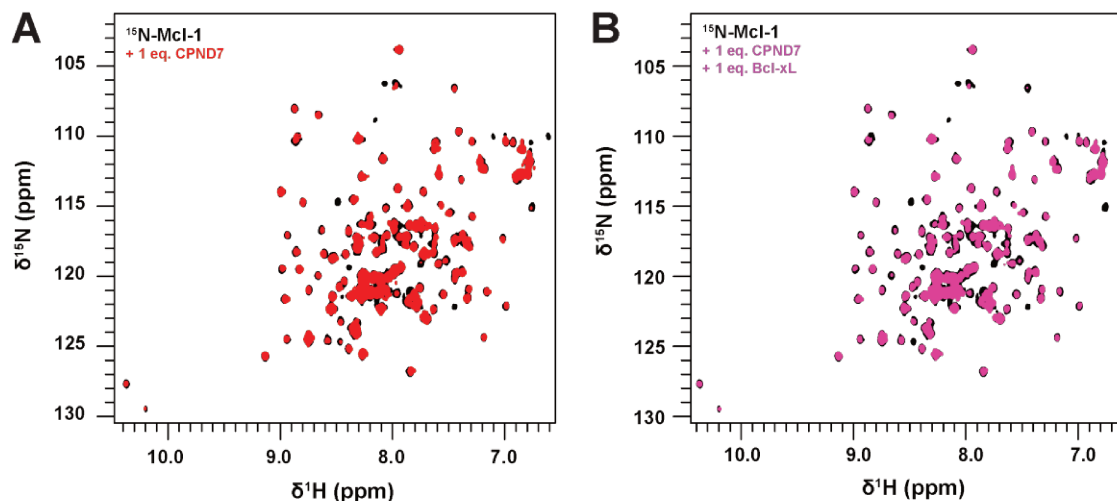


Fig. S3. Relative affinity of compound 7 for Mcl-1 and Bcl-xL evaluated by NMR. (A) Overlay of ^1H - ^{15}N SOFAST HMQC from isolated ^{15}N labeled Mcl-1 (50 μM) (black) and in presence of 1 eq. of compound 7. (B) Overlay of SOFAST ^1H - ^{15}N HMQC from isolated ^{15}N labeled Mcl-1 (50 μM) (black) and in presence of 1 eq. of compound 7 plus 1 eq. of unlabeled Bcl-xL.

MALDI experiments of MCL-1 incubated with increasing amounts of compound 5

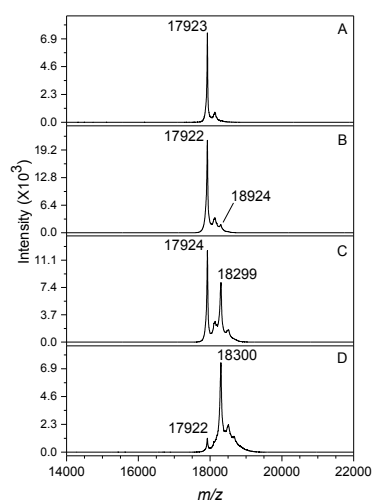


Fig. S4. MALDI experiments of Mcl-1 incubated at 22 °C for 2h with increasing amounts of compound **5** in the following buffer: 20 mM Na_2HPO_4 (pH 7.4), 50 mM NaCl, 2 μM EDTA, 0.05% Pluronic F-68. (A) Mcl-1 alone; (B) Mcl-1 with 0.5 eq. of **5**; (C) Mcl-1 with 1 eq. of **5**; (D) Mcl-1 with 2 eq. of **5**

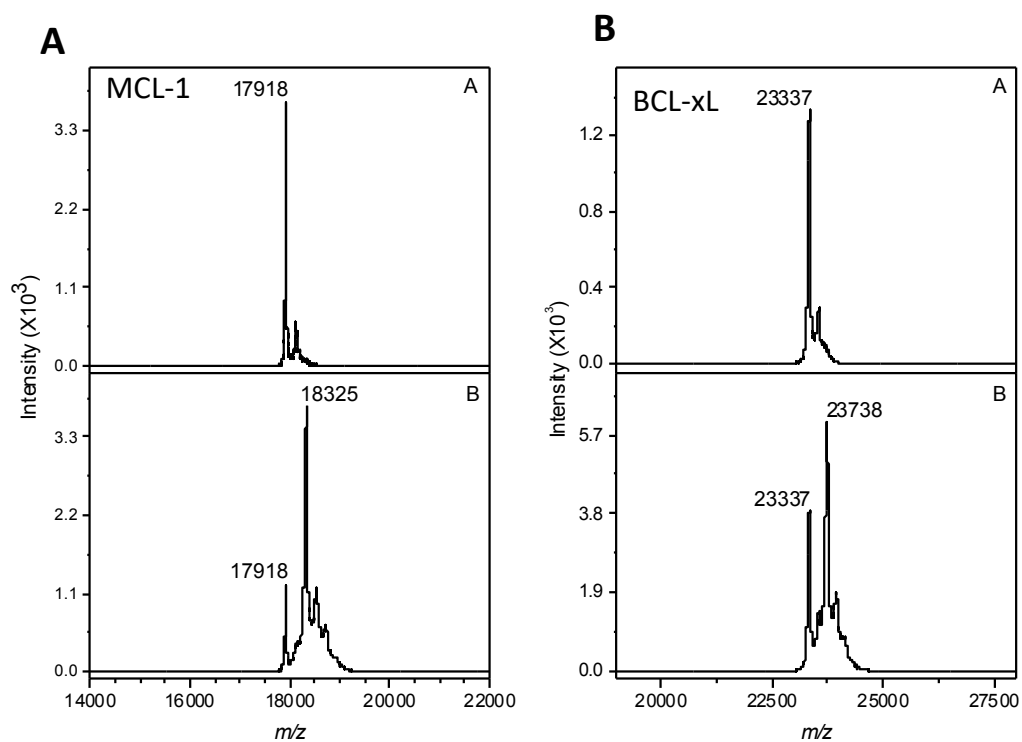
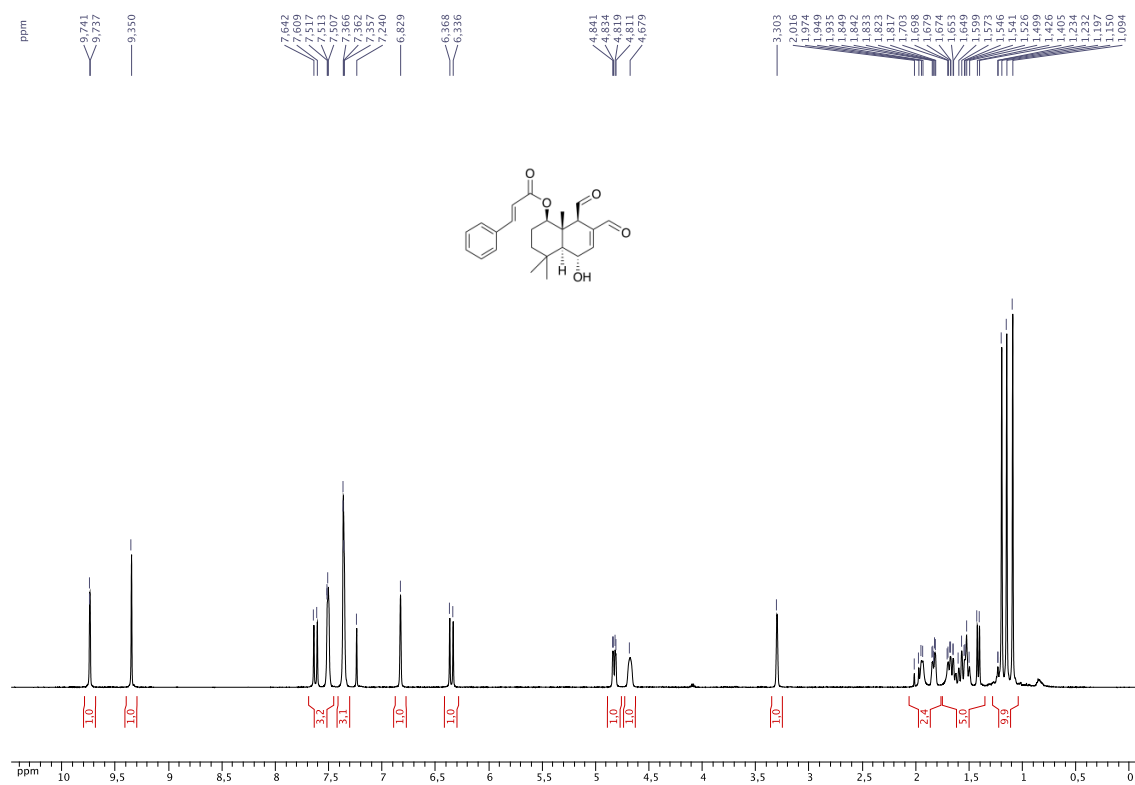


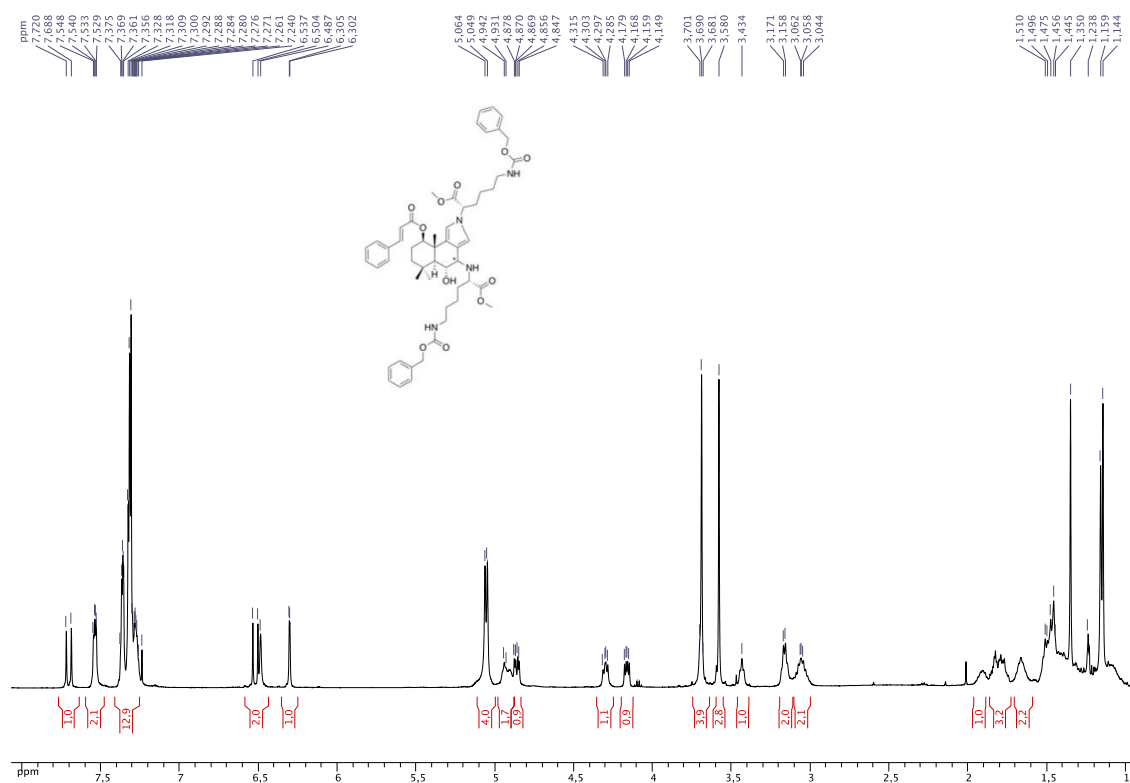
Fig. S5. MALDI experiments of MCL-1 and BCL-xL incubated at 22 °C for 2h with compound **7**. (A) A- MCL-1 alone; B- MCL-1 with 2 eq. of **7**; (B) A- BCL-xL alone; B- BCL-xL with 2 eq. of **7**.

RMN spectra of compounds **5** and **16**

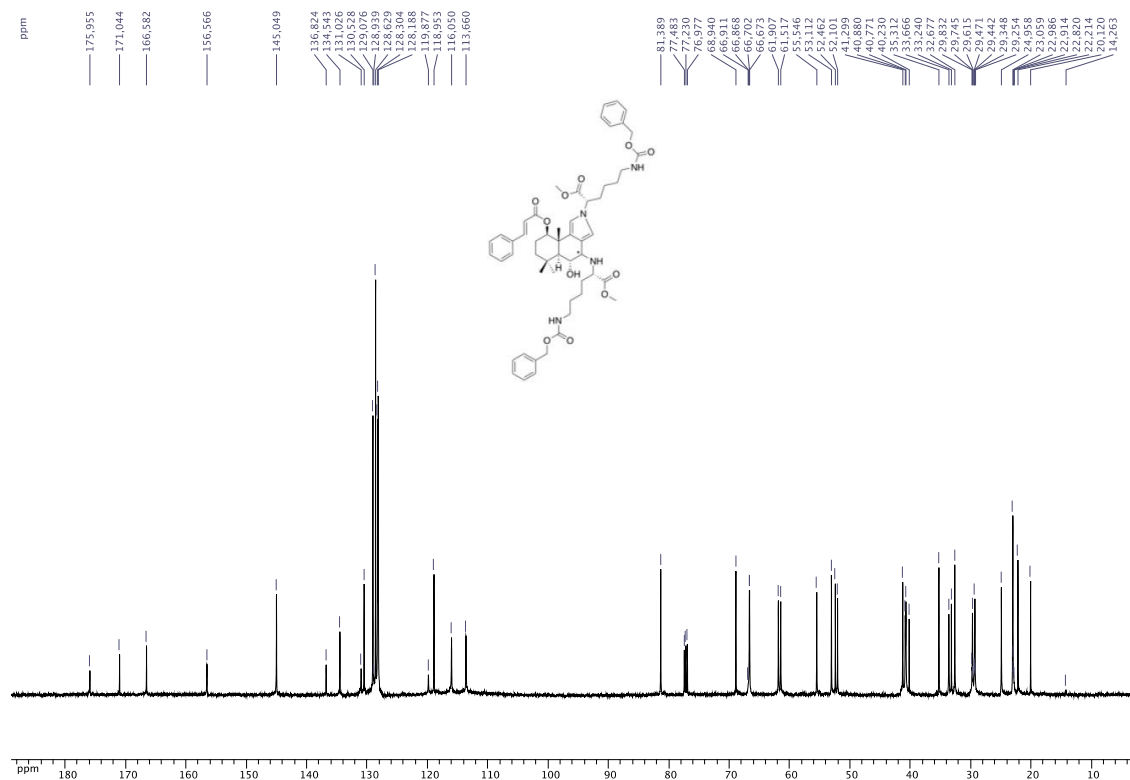
^1H spectrum of compound **5**, CDCl_3 , 500 MHz



^1H spectrum of compound **16**, CDCl_3 , 500 MHz



^{13}C spectrum of compound **16**, CDCl_3 , 125 MHz



Article 2

The natural product NA1-115-7 is a new a new MCL-1 inhibitor

(Statut : Soumis dans les prochaines semaines)

The natural product NA1-115-7 is a new MCL-1 inhibitor.

Florian Daressy^{1,2}, Line Séguy³, Loëtitia Favre^{4,5}, Sophie Corvaisier³, Cécile Apel², Anne-Claire Groo³, Marc Litaudon², Vincent Dumontet², Aurélie Malzert-Fréon³, Sandy Desrat², Fanny Roussi², Aude Robert^{6,§,*} and Joëlle Wiels^{1,§,*}

§ these authors contributed equally to this work

¹ Université Paris-Saclay, CNRS, Institut Gustave Roussy, METSY UMR9018, 94805, Villejuif, France.

² Université Paris-Saclay, CNRS, Institut de Chimie des Substances Naturelles, UPR 2301, 91198, Gif-sur-Yvette, France.

³ Normandie Univ, UniCaen, CERMN, F-14000 Caen, France

⁴ Univ Paris-Est Créteil, Inserm, U955, F-94009 Créteil, France.

⁵ AP-HP, CHU Henri Mondor, Département de Pathologie, F-94009 Créteil, France.

⁶ Université Paris-Saclay, Inserm, Institut Gustave Roussy, Dynamique des Cellules Tumorales, UMR1279, 94800, Villejuif, France.

* Corresponding authors: joelle.wiels@gustaveroussy.fr, aude.robert@gustaveroussy.fr

Abstract

Dynamic interactions between the anti- and pro-apoptotic members of the BCL-2 family play a major role in cellular homeostasis. Furthermore, over-expression of anti-apoptotic members (BCL-2, BCL-xL, MCL-1...) participates in the development of tumors as well as in their resistance to chemotherapy or radiotherapy treatments. Synthetic inhibitors targeting these anti-apoptotic proteins have therefore been developed, some of which being currently in clinical trials. Among BCL-2 family members, MCL-1 is an interesting target since, in addition to being associated with chemoresistance, it is also responsible for resistance to other anti-apoptotic member inhibitors. In this report, we present the characterization and biological efficacy of a new MCL-1 inhibitor isolated from *Zygogynum Pancheri*, a plant of the *Winteraceae* Family. In previous studies we have shown that this compound (compound 5 now named NA1-115-7) is a drimane sesquiterpenoid which has a selective and high affinity for the BH3-binding pocket of MCL-1, is able to form a covalent bond with MCL-1 and is cytotoxic for an MCL-1-dependent cell line. We now show that treatment with NA1-115-7 stabilized MCL-1, disrupted its interactions with BAK and rapidly induced apoptosis through a BAK and BAX-mediated process. Indeed, two hours of contact of NA1-115-7 with the tumor cells were enough to trigger cell death. We also report that NA1-115-7 is not toxic to erythrocytes, peripheral blood mononuclear cells, platelets or cardiomyocytes. These results highlight the potential

of natural products as specific BH3 mimetics devoid of toxicity on normal cells and indicate that NA1-115-7 is a very promising tool in the treatment of hematological malignancies.

Introduction

Apoptosis plays a fundamental role during the normal development of multicellular organisms and is critical for tissue homeostasis. Therefore, dysregulation of this process can lead to the occurrence of various types of diseases such as neurodegenerative diseases or cancer. There are two major pathways of induction of apoptosis: extrinsic signaling through death receptors and intrinsic through mitochondria. The main regulators of the mitochondrial pathway belong to a family of proteins called the B-cell lymphoma 2 (BCL-2) family which all contain at least one BCL-2 homology (BH) domain and are distributed in “pro” and “anti-apoptotic” members. The pro-apoptotic family comprises two subclasses, the BH3-only (BIM, BID, Puma, NOXA...) which play a regulatory role and the effectors (BAK, BAX...). In physiological conditions, the anti-apoptotic members (MCL-1, BCL-2, BCL-xL, BCL-w, BFL-1/A1...) interact, through a hydrophobic groove on their surface, with the BH3 domain of the proapoptotic proteins and apoptosis is controlled. In case of cellular stress, the BH3-only are upregulated and apoptosis is induced either directly by their ability to activate the BAK or BAX pro-apoptotic effectors or indirectly by disrupting the complex formed by the anti-apoptotics and the effectors which are thereby released. When activated, BAK and BAX oligomerize to form pores which lead to mitochondrial outer membrane permeabilization (MOMP) and apoptogenic factors (cytochrome c, SMAC/DIABLO...) are released in the cytosol where they can trigger the apoptotic signaling pathways involving caspases [1-3].

In tumor cells, the balance between pro and apoptotic proteins is often disrupted by either a downregulation of the pro or an upregulation of the anti-apoptotics which participates to the maintenance of these cells and to their resistance to conventional treatments inducing apoptosis. In the last few years, the latter observation has prompted numerous laboratories to develop new tools targeting the anti-apoptotic proteins and more particularly BCL-2. Today, most of these tools are small-molecules called « BH3 mimetics » and one (ABT199/Venetoclax), considering its efficacy in several preclinical models of hematological malignancies [4], has received an approval from the FDA and is now used in

clinics for various indications [5-8]. However, during the studies devoted to develop these BCL-2 inhibitors, acquired resistances to treatment have been observed, due to an upregulation of MCL-1 [9-13]. It has also been shown that losing MCL-1 expression sensitized cells to the BCL-2 inhibitors [14]. Furthermore, resistance to chemotherapeutic drugs have also been attributed to MCL-1 [15-17].

Indeed, MCL-1 is a peculiar member of the BCL-2 family with specific and essential functions during embryogenesis since its deletion results in embryonic lethality during the peri-implantation period. It is also required for the survival of various cell lineages such as neutrophils and lymphocytes or neurons and cardiomyocytes [18-22]. Furthermore, in contrast with the other members of the family, MCL-1 contains a long N-terminus which is relatively unstructured and contains two PEST (proline/glutamic acid/serine/threonine-containing) domains which are involved in regulation of its degradation and its short half-life (1-2 hours) [23, 24]. Amplification of the MCL-1 gene is one of the most common event in cancers [25] and overexpression of the MCL-1 protein is observed in several solid tumors (lung, pancreas, prostate, ovaries...) and hematological malignancies. It is notably involved in the survival of multiple myeloma (MM), acute myeloid leukemia (AML), B-lineage acute lymphoblastic leukemia (ALL) and B cell lymphoma [26-29]. It has also been shown that MCL-1 gene loss in B lymphoid progenitors of *Eμ-Myc* transgenic mice delayed MYC-dependent lymphomagenesis [30] and that the sustained growth of Burkitt lymphoma cells is dependent on MCL-1 [31]. All these features make MCL-1 a very interesting target for new therapies.

New BH3-mimetics directed to this protein have thus been recently developed and their efficacy, either alone or in combination with Venetoclax or other drugs, has been demonstrated in preclinical studies [32-35]. Currently four MCL-1 inhibitors, S64315, AZD-5991, AMG-176 and AMG-397, are evaluated in phase I clinical trials (NCT02979366, NCT02992483, NCT03672695, NCT02675452, NCT03797261, NCT03465540, and NCT03218683). So far, all these compounds are synthetic molecules obtained by using fragment-based methods and structure-based design.

Natural products are playing a significant role in drug discovery and development processes. Since the 1940's, 75% of the 175 small molecules used in cancer therapy are

either natural products or derivatives of natural products. Screening of plant extracts, marine organisms or microorganisms can provide highly original and functionalized bioactive molecules that are unlikely obtained by the screening of synthetic libraries. In this study, we present the characterization and biological efficacy of a new MCL-1 inhibitor isolated from *Zygogynum Pancheri*, a plant of the *Winteraceae* Family, endemic of the New Caledonia rainforest. This compound is a drimane sesquiterpenoid with two aldehydes in position 8 and 9 and a cinnamoyl group at C1 that we recently described [36]. By fluorescence polarization and NMR studies, we have shown that this compound (compound 5 now named NA1-115-7) has a selective and high affinity for the BH3-binding pocket of MCL-1 and by MTT assay that it is cytotoxic for MCL-1-dependent cells. In this report, we show that treatment with NA1-115-7 stabilized MCL-1 and specifically induced apoptosis of MCL-1-dependent cell lines through activation of BAK and BAX and release of Cytochrome c and SMAC/Diablo from the mitochondria. Two hours of contact of NA1-115-7 with the tumor cells were sufficient to trigger cell death. Of note, no toxicity was observed on erythrocytes, peripheral blood mononuclear cells, platelets or cardiomyocytes. The absence of cardiotoxicity of NA1-115-7 was also confirmed by hERG testing.

Results

Evaluation of NA1-115-7 cytotoxicity in different B lymphoid cell lines

In order to determine the fine specificity of NA1-115-7, we first realized a BH3-profiling assay on various hematological cell lines and selected four of them which are primed and dependent on either BCL-2, BCL-xL or MCL-1. These cells were then treated for 24h with various concentrations of NA1-115-7 and a cell proliferation assay (MTT) was performed. As shown in Table 1, NA1-115-7 was strongly cytotoxic for the MCL-1 and BCL-xL-dependent cell line, BL2 and for the MCL-1-dependent cell line, H929 with LC50 (Lethal Concentration 50%) of 3.6 μ M and 6.7 μ M respectively whereas it was much less cytotoxic for Remb1 and RS4;11 which are respectively dependent on BCL-xL and BCL-2, (LC50 of 12.2 μ M and 9.9 μ M) (Table 1).

NA1-115-7 induces apoptosis through the mitochondrial pathway in MCL-1-dependent cells

We next investigated the mechanism of NA1-115-7-induced cell death. First, cells were treated or not with 4 μ M of NA1-115-7 for 24h and apoptosis was measured by flow cytometry after labeling the cells with annexin-V-FITC and PI. S63845, a previously described

specific MCL-1 BH3-mimetic [33] was also added at 0.5 μ M as a positive control. A strong induction of apoptosis was observed in BL2 and H929 cell lines treated with NA1-115-7 (88.5 $\pm$ 2% and 90.5 $\pm$ 3% respectively), whereas Remb1 and RS4;11 were much less sensitive with only 20.5 $\pm$ 2% and 40 $\pm$ 5% of cells in apoptosis (Figure 1A). Very similar results were obtained with S63845 thereby confirming the MCL-1 specificity of NA1-115-7.

To further elucidate the apoptotic pathway involved, we then measured the release of the apoptogenic factors cytochrome c and SMAC/DIABLO from the mitochondria to the cytosol. After treating BL2 and Remb1 cells for 7h with NA1-115-7 (4 μ M) or S63845 (0.5 μ M), mitochondrial and cytosolic fractions were prepared and analyzed by Western blot. Fractionation quality was checked by probing blots with antibodies recognizing proteins known to be localized in the mitochondria (VDAC) or in the cytoplasm (LDH). In untreated cells, as expected, cytochrome c and SMAC/DIABLO were only found in the mitochondrial fraction. After treatment of BL2 cells with NA1-115-7, both apoptogenic factors were totally relocalized in the cytoplasm whereas, in Remb1 cells, they remained in the mitochondria (Figure 1B). Similar results were obtained after S63845 treatment.

Another hallmark of apoptosis is the cleavage of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) – a DNA repair enzyme – by caspases. This cleavage was thus assessed by western blot after treatment of the BL2 cells during various periods of time. As shown in Figure 1C, the 85 kDa PARP cleavage product was detected as soon as 2h after treatment and its level gradually increased until 16h of treatment. These results prompted us to compare the levels of apoptosis in BL2 cells treated either 24h with NA1-115-7 (4 μ M) or 2h followed by 22h of incubation in complete medium. As shown in Figure 1D, both treatments induced 92 $\pm$ 0.5% of Annexin V / PI-positive cells. Altogether, these results indicate that a short exposure to NA1-115-7 is sufficient to specifically trigger the mitochondrial apoptotic pathway in MCL-1-dependent cell lines. They are in line with our previous mass spectrometry data showing the interaction of NA1-115-7 with the MCL-1 BH3-groove [36]

BAK and BAX are activated in MCL-1 dependent cells treated with NA1-115-7

A major step of the mitochondrial pathway is the involvement of the pro-apoptotic proteins BAK and BAX to form pores in the mitochondrial outer membrane that allow release of the apoptogenic factors. When activated both proteins undergo conformational changes which result in the unmasking of N-terminal epitopes. Labelling of the cells with

conformation-dependent antibodies therefore allows to determine if BAK and BAX are activated or not. Flow cytometry analysis with such antibodies showed that after a 4h treatment with NA1-115-7, BAK was activated in BL2 cells whereas it was not activated in Remb1 (in $46 \pm 15\%$ and $10 \pm 2\%$ of cells respectively, Figure 2A). Similarly, BAX was activated in BL2 cells but not in Remb1 (in $41 \pm 16\%$ and $10 \pm 6\%$ of cells respectively, Figure 2B). Following treatment with NA1-115-7, BAK and BAX are therefore activated only in MCL-1 dependent cells.

In physiological conditions, BAX translocates constantly between cytosol and mitochondria but when activated, it remains in mitochondria [37]. Western blot analysis of subcellular fractions of BL2 cells showed that, indeed, the amount of BAX decreased in the cytosol of cells treated with NA1-115-7 ($4\mu\text{M}$) or S63845 ($0.5\mu\text{M}$) for 7h whereas it increased in the mitochondrial fraction (Figure 2C). These results confirm that BAX is activated by the treatment of MCL-1-dependent cells with NA1-115-7.

Disruption of the complex MCL-1/BAK and MCL-1 stabilization during NA1-115-7 treatment

All members of the BCL-2 family are engaged in dynamic interactions between anti- and pro-apoptotic actors which regulate cell fate and which can be disrupted by BH3-mimetics. In order to further investigate the apoptotic pathway induced by NA1-115-7, we thus analyzed its effect on the MCL-1/BAK complexes. Total protein extracts of BL2 cells treated or not with NA1-115-7 ($4\mu\text{M}$) for 4h were submitted to immunoprecipitation with an anti-MCL-1 Ab and co-immunoprecipitation of BAK was then checked by western blot. As seen in Figure 3A, BAK co-immunoprecipitated with MCL-1 in untreated cells whereas this interaction was diminished by 50% in NA1-115-7-treated cells (Figure 3A).

As mentioned previously, MCL-1 is characterized by a high turnover rate and a short half-life. Since previous reports have shown that MCL-1 specific BH3 mimetics induce a protein half-life extension [32, 33], we next measured the level of MCL-1 after treatment of BL2 cells with NA1-115-7 ($4\mu\text{M}$) and cycloheximide (CHX) – an inhibitor of protein synthesis acting at the translational level – or CHX alone (Figure 3B). As expected, in cells treated with CHX alone the amount of MCL-1 rapidly decreased (half-life between 30 and 60 min) but in cells treated with a combination of NA1-115-7 and CHX, MCL-1 was clearly stabilized (half-life between 2 and 4h).

From all our results, we can therefore conclude that NA1-115-7 specifically targets and stabilizes MCL-1, disrupts its binding to BAK and triggers an apoptotic signaling pathway involving BAK and BAX activation.

NA1-115-7 is not toxic for normal blood cells and is not cardiotoxic

The ultimate goal of developing new specific MCL-1 inhibitors is to use them in future clinical trials. For this, it is necessary to demonstrate that they have no major toxicity on normal cells. We first tested the effect of NA1-115-7 at various concentrations on human erythrocytes isolated from healthy donors (Figure 4). After 24h of treatment, erythrocytes were centrifuged and hemolysis was detected by visual examination (Figure 4A and supplemental Figure 1). Our results indicate that at 2 μ M and 4 μ M which are the optimal concentrations to induce apoptosis of tumor cells, NA1-115-7 presented no hemolytic activity (at 2 μ M) or a very weak activity (at 4 μ M). The effect of treatment with S63845 at 0.5 μ M was similar to NA1-115-7 treatment at 4 μ M. These results were confirmed by microscopic analysis of erythrocytes after 24h of treatment with NA1-115-7 at 4 μ M or S63845 at 0.5 μ M (Figure 4B). These results confirm previous ones of Fratoni *et al* obtained on other drimane sesquiterpene [38].

Next, we measured the effect of NA1-115-7 on platelets that are key elements in case damaged blood vessels occurred. Platelets isolated from healthy donors were incubated for 24h with NA1-115-7 (4 μ M) or S63845 (0.5 μ M) or ABT-737 (10 μ M) as a positive control and apoptosis was measured by FACS analysis after annexin V / PI labeling of the cells. Results in Figure 5A show that ABT-737 induced more than 90% of apoptosis in platelets whereas NA1-115-7 and S63845 had a very weak effect (22 $\pm$ 16% and 21 $\pm$ 17% of apoptotic cells, respectively).

MCL-1 is known to play an essential role in the survival of various cell types including lymphocytes and cardiomyocytes [20, 39]. We thus evaluated the toxicity of our compound (and of S6384) on human PBMC obtained from healthy donors. After 24h of treatment, apoptosis was tested by labeling the cells with annexin V and PI: a weak induction of apoptosis was observed in PBMC treated with NA1-115-7 (22 $\pm$ 4% of apoptotic cells) whereas a higher proportion of PBMC treated with S63845 entered in apoptosis (58 $\pm$ 13%) (Figure 5B). Finally, we also assessed the cardiotoxicity of NA1-115-7 by two different technics. First, we determined the LC50 of NA1-115-7 and S63845 on H9C2 cell line derived

from rat heart myoblasts and classically used to measure cardiotoxicity of drugs. Doxorubicin which is known for its cardiotoxic activity was used as a positive control. As shown in Figure 5C, LC50 was above 20 μ M for NA1-115-7 and above 1 μ M for S63845, two concentrations which are much higher than their respective efficacy doses. To confirm these results, the hERG (human *ether-à-go-go*-related gene) inhibition assay was performed. hERG is a potassium channel which is a key player in repolarization of the cardiac action potential and when its function is reduced the risk of potentially fatal cardiac arrhythmias is greatly increased. It is therefore essential to determine if a new potential therapeutic tool could have cardiac toxicity by binding and inhibiting hERG. Binding of NA1-115-7 to hERG was determined with the PredictorTM hERG polarization assay (Figure 5D). The low affinity of NA1-115-7 didn't allow to determine an IC50 value for the hERG channel inhibition. At 10 μ M of NA1-115-7, only 46.2% of channels were inhibited.

Altogether these results allow us to conclude that NA1-115-7, at doses that induced apoptosis of tumor cells, has no toxicity on normal blood cells and is not cardiotoxic.

Discussion

MCL-1 is a crucial regulator of cell survival in both normal and neoplastic cells and is often responsible for resistance to anticancer therapy. In this study, we have investigated the therapeutic potential of a natural product NA1-115-7 as a novel specific inhibitor of MCL-1. Here and in a previous study [36], we have demonstrated that our compound meets the criteria of a true BH3-mimetic by presenting: 1) a selective and high affinity for the BH3-binding pocket of MCL-1; 2) a specific cytotoxicity for MCL-1-dependent cells; 3) a rapid induction of BAX/BAK apoptosis. Indeed, we showed that NA1-115-7 was able to disrupt BAK/MCL-1 interaction and consequently, activated BAX and BAK leading to apoptosis induction in MCL-1 dependent cells. Moreover, only two hours contact with the cells were sufficient to induce apoptosis of MCL-1-dependent cells. Interestingly, we also showed that BL2 cells which, as determined by BH3 profiling, are dependent on both MCL-1 and BCL-xL are efficiently killed by NA1-115-7. This suggest that BCL-xL cannot compensate MCL-1 inhibition for the survival of these cells and is in line with a previous report showing that MCL-1 is essential to sustain the growth of BL cells [31].

Since the knockout of MCL-1 in murine models causes hepatic, hematological and cardiac toxicities including rapid development of heart failure [40] and considering that a clinical trial

using AMG-397 have been suspended for cardiac toxicity (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03465540>), the tolerability of MCL-1 inhibitors is an important matter for their clinical development. Our results showed that NA1-115-7 had no toxicity on erythrocytes, peripheral blood mononuclear cells, platelets, or cardiomyocytes. In regard of all these results, NA1-115-7 appears as a very promising lead with a real therapeutic interest, in particular for MCL-1 dependent B cell lymphoproliferations.

The mechanism of BAX/BAK activation remains an important question in apoptosis signaling. After NA1-115-7 treatment, BAK activation was expected, since BAK directly interacts with MCL-1 [41, 42], but activation and relocation of BAX was more surprising even if Smith *et al.*, have shown recently that the MCL-1 inhibitor S63845 induced mainly BAX-dependent apoptosis [43]. However, they have also shown that no direct interaction exists between MCL-1 and BAX and that activation of BAX could be mediated by the displacement of BAK, BIM and NOXA [43]. Similarly, in our model, MCL-1 was able to interact with NOXA and BAK but not with BID and BAX (data not shown). Germain and colleagues have demonstrated that high concentrations of MCL-1 inhibited the conformational change of BAX and that lower concentrations were able to inhibit the formation of oligomer of BAX [44], thereby suggesting a relationship between MCL-1 expression and BAX activation. Moreover, others have shown that degradation of MCL-1 in presence of BIM can induced BAX-dependent apoptosis which suggests that inhibiting MCL-1 would allow BIM to activate BAX [45]. In fact, the anti-apoptotic BCL-2 members can sequester BAX and BAK monomers to prevent their homo-oligomerization but they can also sequester BH3 activators to prevent BAX and BAK activation. By interacting with MCL-1, our compound could liberate BH3 activators such as BIM or NOXA. Indeed, the displacement of BIM or/and NOXA could be functionally important for NA1-115-7-induced apoptosis, as released BIM or/and NOXA could initiate apoptosis by binding directly to BAX and BAK and activate them. Another hypothesis is that BAK can directly contribute to BAX activation. Smith *et al.* have shown that BAX can contribute to BAK activation upon ABT-199 treatment and that BAX activation was reduced in BAK-deleted cells treated by S63845 thus suggesting that they can activate each other [43]. Based on results obtained with liposomes that contained an extended BH3 peptide (BH3 helix and additional downstream sequences) of BAX and recombinant BAX, it has been hypothesized that active BAX uses its extended BH3 domain to directly bind and

activate an inactive BAX [46]. An interesting work also revealed that association with the MOM through the helix 9 of BAX/BAK was required and sufficient for BAX/BAK activation in the absence of all BH3-only and anti-apoptotic BCL-2 proteins [47]. So, we can hypothesize that the rupture of BAK/MCL-1 interaction activated BAK which can oligomerize with inactive BAX in the MOM and activate the hetero-oligomers.

The binding of NA1-115-7 to MCL-1 first results in stabilization and then degradation of MCL-1, two outcomes which have already been observed for other MCL-1 inhibitors, AMG-176 [32] and S63845 [33]. We have shown elsewhere by ligand-protein NMR experiments [36] that this compound is MCL-1 selective over BCL-2 and BCL-xL and binds in the groove formed by its BH1, BH2 and BH3 regions (more precisely helix $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$ and $\alpha 5$). The signal of a lysine in particular (K234), located near the BH3 domain and thus near the hydrophobic groove of MCL-1, is very affected in presence of NA1-115-7. MALDI experiments also showed that our compound formed a stable and irreversible complex with a lysine (via a Paal-Knorr reaction) and, although it remains to be confirmed, we assume that this reaction occurs with the lysine 234. This makes NA1-115-7, the first covalent MCL-1 inhibitor described so far having the ability to act as a "suicide" molecule: once attached to the target, it is degraded with it. We hypothesize that this can explain the μ Molar doses needed to induce apoptosis with NA1-115-7 as compared to nMolar doses needed for other molecules such as S63845. This characteristic may limit the use of NA1-115-7 in certain cancers since tumors that overexpress MCL-1 would require high doses of NA1-115-7 which could be cytotoxic. In contrast, diseases such as Multiple Myeloma which are predominantly MCL-1 dependent but do not show amplification of the 1q arm, and therefore potentially do not overexpress MCL-1, could be very good candidates [48].

Considering the lipophilic structure of NA1-115-7 and its sensitivity to acid conditions, the drugability parameters of this lead could hamper its clinical development. Thus, it was crucial to find ways to increase its solubilization and its stabilization in order to envisage animal experiments. We already showed elsewhere that NA1-115-7-loaded nanoemulsions (NE) increased its bioavailability and penetration in cells (Daressy F, Seguy L *et al*, in preparation ¹) and should thus permit its *in vivo* evaluation. Such a formulation will allow

¹ *In vitro* evaluation of NA1-115-7-loaded nanoemulsions, a MCL-1 specific inhibitor of natural origin, intended to treat lymphoproliferation after oral administration, *in preparation*

potential applications like dose adjustment, treatment schedule optimization and also delivery of large amounts of the lead by using various administration routes.

Materials and Methods

Reagents

ABT-737 was kindly provided by Abbott Laboratories (Chicago, IL, USA). S63845 and ABT-199 was purchased on MedChem express. Doxorubicin was provided by Gustave Roussy hospital pharmacy.

Primary antibodies used for Western blot analysis were obtained as followed: Rabbit anti-BAX pAb (N-20), mouse anti-LDH mAb (H-10), Rabbit anti-MCL-1 pAb (S-19), Goat anti-BAK pAb (G-23), were purchased from Santa Cruz Biotechnology Inc. Mouse anti-PARP mAb (Ab-2) was purchased from Calbiochem. Mouse B-actin mAb (AC-74), was purchased from Sigma Aldrich. Rabbit anti-SMAC/DIABLO pAb was purchased from Imgenex. Rabbit anti-VDAC, and Rabbit anti-NOXA mAbs (D8L7U), were purchased from Cell Signaling. Mouse anti-Cytochrome C mAb (7H8-2C12), was purchased from BD.

Horse radish peroxidase (HRP)-conjugated donkey anti-rabbit IgG and HRP-conjugated goat anti-mouse IgG secondary antibodies used for western blotting were purchased from GE Healthcare.

Cell lines

BL2 and Remb1 cell lines were kindly provided by the International Agency for Research on Cancer (IARC, Lyon). NCI-H929 and RS4;11 cells were purchased from DSMZ (Braunschweig, Germany), H9C2 cells from ATCC. BL2, Remb1 and RS4;11 cell lines were cultured in RPMI 1640 medium (Invitrogen) supplemented with 2mM L-glutamine, 1mM sodium pyruvate, 20mM glucose, 100 U/mL penicillin, 100µg/mL streptomycin and 10 % heat-inactivated fetal calf serum. NCI-H929 and H9C2 cell lines were cultured in RPMI 1640 advanced medium (Invitrogen) and DMEM (Invitrogen) respectively, both supplemented with 2mM L-glutamine, 1mM sodium pyruvate, 20mM glucose, 100 U/mL penicillin, 100µg/mL streptomycin and 2% heat-inactivated fetal calf serum. All cells were incubated at 37°C in a humidified incubator in an atmosphere of 5% CO₂.

MTT assay

Cell viability was measured by the MTT (3-(4, 5-dimethylthiazolyl-2)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide) assay. 7.10^4 cells (in triplicate) were incubated for 24 h at 37 °C with various concentrations (0/0.156/0.313/0.625/1.25/2.5/10/25/50 μ M) of NA1-115-7 in 100 μ L of complete RPMI medium. Then, 20 μ L of MTT reagent (final concentration 1 mg/mL) was added and plates were incubated 2 extra hours at 37°C. Finally, 100 μ L of lysis buffer (30% SDS, 33% Dimethylformamide, 2% glacial acetic acid, 0.025N HCl, pH = 4.7) was added and absorbance was recorded at 570 nm after an overnight incubation at room temperature (RT). The LC50 values were calculated after plotting the dose-response curves using the GraphPad Prism software. Experiments were performed at least three times.

Quantification of apoptosis

Apoptosis was assessed by labelling cells with annexin-V-FITC and propidium iodide (PI). 3.10^5 cells were treated for indicated times in complete corresponding medium, then washed in PBS, resuspended in annexin buffer (10 mM HEPES/NaOH, pH = 7.4, 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 1.8 mM CaCl₂) containing 2.5 μ g/mL annexin V-FITC (eBioscience) and incubated for 5–10 min before addition of 100 μ L of in annexin buffer supplemented with PI (10 μ g/mL; Sigma-Aldrich). Analysis (n = 10 000) was done by flow cytometry (Accuri C6 cytometer, Becton-Dickinson). Annexin V-positive cells (PI negative and positive) were considered as apoptotic cells. For PBMC and platelets, cells were labelled with anti-CD3-FITC (BD Pharmingen) or anti-CD41-FITC (BD Pharmingen) respectively, to identify the population isolated and with Annexin V-APC. Experiments were performed at least three times.

Preparation of mitochondrial and cytosolic fractions

Aliquots of 2.10^6 cells were resuspended in 100 μ L of ice-cold cell lysis and mitochondria intact (CLAMI) buffer (250 mM sucrose, 70 mM KCl, 200 μ g/ml digitonin, complemented with protease inhibitor cocktail) and incubated at 4 °C for 5 min. The samples were then centrifuged at 1000 g for 5 min at 4 °C. The supernatants (cytosolic fractions) were recovered and stored at – 80 °C. The pellets were resuspended in 50 μ L of IP (immunoprecipitation) buffer (30 mM Tris HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 2 mM EGTA, 0.2% Triton X100, 0.3% NP40, complete protease inhibitor) and incubated for 10 min

at 4 °C. Samples were then centrifuged at 10 000 g for 10 min at 4 °C and supernatants (mitochondrial fractions) were stored at – 80 °C until use in further experiments. Total protein concentration was measured by Bradford assay (Biorad), and then a Western blot analysis was performed.

MCL-1 immunoprecipitation

After treatment with DMSO, or NA1-115-7 (4μM), MCL-1 immunoprecipitation was performed using beads coupled either with an anti-MCL-1 mouse mAb (B-6) (Santa Cruz Biotechnology Inc) or with control mouse IgG (sc-2343) (Santa Cruz Biotechnology Inc), overnight at 4°C. Immune complexes were boiled in Laemmli buffer. Immunoprecipitates with anti-MCL-1 (IP) or an isotype Ab (IgG), and 15% of the cell lysates (input) were analyzed by Western blot assay.

Western blot analysis

Total extract preparation and immunoblotting were carried out as previously described [49]. The blots were imaged with the ImageQuant LAS4000 imager (GE healthcare) or on film (Amersham). Densitometry analysis of the blots was carried out using Quantity One software, version 4.6 (Bio-Rad).

Measurement of BAX and BAK activation

After 4h treatment with 4μM, cells were washed with ice-cold PBS and fixed for 5 min in PBS/0.25% paraformaldehyde (PFA) at RT. Cells were then washed with PBS and incubated 30 min at RT with conformational anti-BAX mAb (clone 6A7; Santa Cruz Biotechnology) or anti-BAK (clone Ab-1; Merck Millipore) diluted in PBS/200 μg/ml digitonin (Sigma-Aldrich). Cells were then washed with PBS, incubated 30 min at RT with a goat anti-mouse Alexa 488-conjugated secondary Ab (Beckman Coulter) in PBS, and washed twice with PBS before flow cytometry analysis (BD Accuri C6).

Platelets, erythrocytes and PBMC isolation

Isolation of platelets and erythrocytes was done after peripheral blood mononuclear cells (PBMC) isolation using Ficoll density gradient of blood diluted in sterile PBS (1:1). Ficoll was added at the bottom of a tube and gently overlayed with the diluted blood (1:2.5). After

centrifugation at RT at 2200rpm with no brake for 20 min, cells at the interface (containing PBMC), In the pellets (Red blood cells) and in the supernatant (Platelets) were collected.

- PBMC were washed in PBS and then centrifugated at 300g during 10min two times. At the end, the pellet was resuspended in RPMI 1640 supplemented with 10% FBS and cultured at 37°C in a humidified incubator in an atmosphere of 5% CO₂ during maximum 48h.

- Red blood cells were washed in PBS and centrifugated 100g and then cultured at 37°C, CO₂, in RPMI 1640 supplemented with 10% FBS.

- The supernatant was mixed with HEP buffer (140mM NaCl, 2.7mM KCL, 3.8mM HEPES, 5mM EGTA, pH 7.4) (1:1) and then centrifuged at 100g for 15min at RT, without brake, to pellet cell other than platelets. The Supernatant obtained was then centrifuged at 800g for 15min at RT, without brake and the pellet obtained was washed in PBS. Platelets are slowly resuspended in RPMI 1640 supplemented with 10% FBS, and cultured at 37°C in a humidified incubator in an atmosphere of 5% CO₂ for up to 2 days.

Measurement of erythrocyte lysis

13.10⁶ red blood cells were resuspended in PBS and treated with various concentrations of NA1-115-7 (2, 4, 8 and 16µM) or S63845 (0.5µM). Cells were resuspended in water for positive control. After 24h of treatment:

- cells were examined by inverted microscopy (Zeiss Axiovert S100) and pictures were taken
- cells were transferred in hemolyse tubes, centrifuged at 100g and hemolysis was evaluated according to the color of supernatant.

hERG inhibition assay

hERG channel binding was determined with the Predictor™ hERG Fluorescence Polarization Assay (PV5665 ThermoFischer). Briefly, reagents were thawed, and were mixed by pipetting 20x with Predictor™ hERG membranes. The fluorescent tracer was diluted at 4 nM in the Predictor™ hERG buffer. The tested compound was dissolved in DMSO at 10 mM and was then diluted from 400 µM to 0.04 nM in the Predictor™ hERG buffer. The assay was performed in a 96-well Greiner microplate (675093 Dutscher). 25 µL of each concentration of NA were dispensed into the plate. Then, 50 µL of the Predictor™ hERG membranes and 25 µL of the fluorescent tracer 4 nM were added. The plate was incubated at RT for 4 hours. The fluorescence polarization measurements were made using a Synergy 2 microplate

reader (Biotek Instrument, Colmar, France). Both parallel and perpendicular fluorescence were measured using 530/25 nm excitation and 590/35 nm emission filters with a 570 nm dichroic mirror. The gain was fixed at 110. A known hERG channel blocker (E-4031), provided by the kit, was assayed as positive reference, and was tested at final concentrations ranging from 0.01 nM to 10 μ M. IC50 values were determined graphically by plotting the % inhibition versus the logarithm of 8 NA concentrations in the assay solution using the GraphPad Prism software (version 6.01, GraphPad Software, La Jolla, CA, USA).

References

1. Czabotar, P.E., et al., *Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2014. **15**(1): p. 49-63.
2. Kale, J., E.J. Osterlund, and D.W. Andrews, *BCL-2 family proteins: changing partners in the dance towards death*. Cell Death Differ, 2018. **25**(1): p. 65-80.
3. Kalkavan, H. and D.R. Green, *MOMP, cell suicide as a BCL-2 family business*. Cell Death Differ, 2018. **25**(1): p. 46-55.
4. Souers, A.J., et al., *ABT-199, a potent and selective BCL-2 inhibitor, achieves antitumor activity while sparing platelets*. Nat Med, 2013. **19**(2): p. 202-8.
5. Adams, J.M. and S. Cory, *The BCL-2 arbiters of apoptosis and their growing role as cancer targets*. Cell Death Differ, 2018. **25**(1): p. 27-36.
6. Barillé-Nion, S., S. Lohard, and P.P. Juin, *Targeting of BCL-2 Family Members during Anticancer Treatment: A Necessary Compromise between Individual Cell and Ecosystemic Responses?* Biomolecules, 2020. **10**(8).
7. D'Aguanno, S. and D. Del Bufalo, *Inhibition of Anti-Apoptotic Bcl-2 Proteins in Preclinical and Clinical Studies: Current Overview in Cancer*. Cells, 2020. **9**(5).
8. Delbridge, A.R., et al., *Thirty years of BCL-2: translating cell death discoveries into novel cancer therapies*. Nat Rev Cancer, 2016. **16**(2): p. 99-109.
9. Bodo, J., et al., *Acquired resistance to venetoclax (ABT-199) in t(14;18) positive lymphoma cells*. Oncotarget, 2016. **7**(43): p. 70000-70010.
10. Konopleva, M., et al., *Mechanisms of apoptosis sensitivity and resistance to the BH3 mimetic ABT-737 in acute myeloid leukemia*. Cancer Cell, 2006. **10**(5): p. 375-88.
11. Tahir, S.K., et al., *Influence of Bcl-2 family members on the cellular response of small-cell lung cancer cell lines to ABT-737*. Cancer Res, 2007. **67**(3): p. 1176-83.
12. van Delft, M.F., et al., *The BH3 mimetic ABT-737 targets selective Bcl-2 proteins and efficiently induces apoptosis via Bak/Bax if Mcl-1 is neutralized*. Cancer Cell, 2006. **10**(5): p. 389-99.
13. Williams, M.M., et al., *Key Survival Factor, Mcl-1, Correlates with Sensitivity to Combined Bcl-2/Bcl-xL Blockade*. Mol Cancer Res, 2017. **15**(3): p. 259-268.
14. Phillips, D.C., et al., *Loss in MCL-1 function sensitizes non-Hodgkin's lymphoma cell lines to the BCL-2-selective inhibitor venetoclax (ABT-199)*. Blood Cancer J, 2015. **5**: p. e368.
15. Kaufmann, S.H., et al., *Elevated expression of the apoptotic regulator Mcl-1 at the time of leukemic relapse*. Blood, 1998. **91**(3): p. 991-1000.
16. Wertz, I.E., et al., *Sensitivity to antitubulin chemotherapeutics is regulated by MCL1 and FBW7*. Nature, 2011. **471**(7336): p. 110-4.
17. Li, X.X., et al., *Increased MCL-1 expression predicts poor prognosis and disease recurrence in acute myeloid leukemia*. Onco Targets Ther, 2019. **12**: p. 3295-3304.

18. Arbour, N., et al., *Mcl-1 is a key regulator of apoptosis during CNS development and after DNA damage*. J Neurosci, 2008. **28**(24): p. 6068-78.
19. Dzhagalov, I., A. St John, and Y.W. He, *The antiapoptotic protein Mcl-1 is essential for the survival of neutrophils but not macrophages*. Blood, 2007. **109**(4): p. 1620-6.
20. Opferman, J.T., et al., *Development and maintenance of B and T lymphocytes requires antiapoptotic MCL-1*. Nature, 2003. **426**(6967): p. 671-6.
21. Thomas, R.L., et al., *Loss of MCL-1 leads to impaired autophagy and rapid development of heart failure*. Genes Dev, 2013. **27**(12): p. 1365-77.
22. Vikstrom, I., et al., *Mcl-1 is essential for germinal center formation and B cell memory*. Science, 2010. **330**(6007): p. 1095-9.
23. Kozopas, K.M., et al., *MCL1, a gene expressed in programmed myeloid cell differentiation, has sequence similarity to BCL2*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(8): p. 3516-20.
24. Liu, H., et al., *Stabilization and enhancement of the antiapoptotic activity of mcl-1 by TCTP*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(8): p. 3117-26.
25. Zack, T.I., et al., *Pan-cancer patterns of somatic copy number alteration*. Nat Genet, 2013. **45**(10): p. 1134-40.
26. Glaser, S.P., et al., *Anti-apoptotic Mcl-1 is essential for the development and sustained growth of acute myeloid leukemia*. Genes Dev, 2012. **26**(2): p. 120-5.
27. Koss, B., et al., *Requirement for antiapoptotic MCL-1 in the survival of BCR-ABL B-lineage acute lymphoblastic leukemia*. Blood, 2013. **122**(9): p. 1587-98.
28. Wenzel, S.S., et al., *MCL1 is deregulated in subgroups of diffuse large B-cell lymphoma*. Leukemia, 2013. **27**(6): p. 1381-90.
29. Wuillème-Toumi, S., et al., *Mcl-1 is overexpressed in multiple myeloma and associated with relapse and shorter survival*. Leukemia, 2005. **19**(7): p. 1248-52.
30. Grabow, S., et al., *Critical B-lymphoid cell intrinsic role of endogenous MCL-1 in c-MYC-induced lymphomagenesis*. Cell Death Dis, 2016. **7**: p. e2132.
31. Kelly, G.L., et al., *Targeting of MCL-1 kills MYC-driven mouse and human lymphomas even when they bear mutations in p53*. Genes Dev, 2014. **28**(1): p. 58-70.
32. Caenepeel, S., et al., *AMG 176, a Selective MCL1 Inhibitor, Is Effective in Hematologic Cancer Models Alone and in Combination with Established Therapies*. Cancer Discov, 2018. **8**(12): p. 1582-1597.
33. Kotschy, A., et al., *The MCL1 inhibitor S63845 is tolerable and effective in diverse cancer models*. Nature, 2016. **538**(7626): p. 477-482.
34. Ramsey, H.E., et al., *A Novel MCL1 Inhibitor Combined with Venetoclax Rescues Venetoclax-Resistant Acute Myelogenous Leukemia*. Cancer Discov, 2018. **8**(12): p. 1566-1581.
35. Tron, A.E., et al., *Discovery of Mcl-1-specific inhibitor AZD5991 and preclinical activity in multiple myeloma and acute myeloid leukemia*. Nat Commun, 2018. **9**(1): p. 5341.
36. Daessy, F., et al., *Natural Sesquiterpenoids from Winteraceae of New Caledonian Rainforest as covalent MCL-1 inhibitors*. submitted, 2020.
37. Todt, F., et al., *Differential retrotranslocation of mitochondrial Bax and Bak*. Embo j, 2015. **34**(1): p. 67-80.
38. Fratoni, E., et al., *Antiproliferative and toxicological properties of drimanes obtained from *Drimys brasiliensis* stem barks*. Biomed Pharmacother, 2018. **103**: p. 1498-1506.
39. Wang, X., et al., *Deletion of MCL-1 causes lethal cardiac failure and mitochondrial dysfunction*. Genes Dev, 2013. **27**(12): p. 1351-64.
40. Thomas, R.L. and A.B. Gustafsson, *MCL1 is critical for mitochondrial function and autophagy in the heart*. Autophagy, 2013. **9**(11): p. 1902-3.
41. Cuconati, A., et al., *DNA damage response and MCL-1 destruction initiate apoptosis in adenovirus-infected cells*. Genes Dev, 2003. **17**(23): p. 2922-32.
42. Willis, S.N., et al., *Proapoptotic Bak is sequestered by Mcl-1 and Bcl-xL, but not Bcl-2, until displaced by BH3-only proteins*. Genes Dev, 2005. **19**(11): p. 1294-305.

43. Smith, V.M., et al., *Specific interactions of BCL-2 family proteins mediate sensitivity to BH3-mimetics in diffuse large B-cell lymphoma*. Haematologica, 2020. **105**(8): p. 2150-2163.
44. Germain, M., J. Milburn, and V. Duronio, *MCL-1 inhibits BAX in the absence of MCL-1/BAX Interaction*. J Biol Chem, 2008. **283**(10): p. 6384-92.
45. Rennebeck, G., M. Martelli, and N. Kyprianou, *Anoikis and survival connections in the tumor microenvironment: is there a role in prostate cancer metastasis?* Cancer Res, 2005. **65**(24): p. 11230-5.
46. Tan, C., et al., *Auto-activation of the apoptosis protein Bax increases mitochondrial membrane permeability and is inhibited by Bcl-2*. J Biol Chem, 2006. **281**(21): p. 14764-75.
47. O'Neill, K.L., et al., *Inactivation of prosurvival Bcl-2 proteins activates Bax/Bak through the outer mitochondrial membrane*. Genes Dev, 2016. **30**(8): p. 973-88.
48. Seiller, C., et al., *Dual targeting of BCL2 and MCL1 rescues myeloma cells resistant to BCL2 and MCL1 inhibitors associated with the formation of BAX/BAK hetero-complexes*. Cell Death Dis, 2020. **11**(5): p. 316.
49. Garibal, J., et al., *Caspase-8-mediated cleavage of Bid and protein phosphatase 2A-mediated activation of Bax are necessary for Verotoxin-1-induced apoptosis in Burkitt's lymphoma cells*. Cell Signal, 2010. **22**(3): p. 467-75.

Legends to Figures

Figure 1: NA1-115-7 specifically induced apoptosis in MCL-1 dependent cell lines through activation of the mitochondrial pathway. **A** – Cells were treated or not for 24h with NA1-115-7 (4 μ M) or S63845 (0,5 μ M). Apoptosis was assessed by flow cytometry after labelling the cells with Annexin V-FITC and PI. Values (mean $\pm$ S.D.) are from at least five independent experiments. **B** – Cells were treated or not for 7h with NA1-115-7 (4 μ M) or S63845 (0,5 μ M). Cytosolic and mitochondrial fractions were then submitted to western blot analysis with anti-cytochrome c mAb and SMAC/DIABLO pAb. LDH and VDAC were used as cytosolic and mitochondrial markers, respectively. *Lower bands correspond to previous staining with BAX antibody. **C** – BL2 cells were treated or not with NA1-115-7 (4 μ M) during various periods of time and PARP cleavage was assessed by western blot analysis. **D** – BL2 cells were treated or not with NA1-115-7 (4 μ M) for 24h or for 2h. In the latter case, cells were then washed and incubated for 22h in complete medium. Apoptosis was assessed by flow cytometry after labelling the cells with Annexin V-FITC and PI. Values (mean $\pm$ S.D.) are from at least three independent experiments. Statistical analysis was performed by Kruskal & Wallis test (***: p<0.025).

Figure 2: In MCL-1 dependent cells, NA1-115-7 activates BAK and BAX. **A** – BL2 and Remb1 cells were treated or not with NA1-115-7 during 4h. Cells were then fixed, permeabilized, labeled with BAK conformational mAb (ab-1) and analyzed by flow cytometry. **B** – cells were

treated as in **A** and labeled with 6A7 conformational BAX mAb. Values (mean±S.D.) are from at least five independent experiments. **C** – BL2 cells were treated or not for 7h with NA1-115-7 (4µM) or S63845 (0,5µM). Cytosolic and mitochondrial fractions were prepared and submitted to western blot with an anti-BAX mAb. LDH and VDAC were used as cytosolic and mitochondrial markers, respectively. * Upper bands correspond to previous staining with SMAC/DIABLO antibody. Statistical analysis was performed by Mann & Whitney test (***: $p<0,01$).

Figure 3: *NA1-115-7 disrupts the complex MCL-1/BAK and stabilizes MCL-1 at early stages.* **A** – BL2 cells were treated or not with NA1-115-7 during 4h and whole cell lysates were prepared and immunoprecipitated with a mouse anti-MCL-1 mAb (B-6) or a control mouse IgG. The immunoprecipitated proteins were then analyzed by western blot with anti-BAK pAb or anti-MCL-1. (Input) corresponds to 15% of the total lysate. **B** – Western blot characterization of MCL-1 protein half-life in BL2 cells treated with CHX (500µM) with or without NA1-115-7 (4µM) for different times. Densitometry analysis of the blots was carried out using Quantity One software, version 4.6 (Bio-Rad). Fold change values shown under the MCL-1 blot were calculated in reference to the untreated control and normalized to β -actin levels.

Figure 4: *at efficacy doses NA1-115-7 has a very weak hemolytic activity.* **A** – Erythrocytes were treated for 24h with NA1-115-7 at various doses (2, 4, 8 and 16µM), with S63845 (0,5µM) or with water as a positive control. Lysis of erythrocytes was visually estimated (see pictures presented in supplemental figure 1). **B** – Erythrocytes were treated for 24h with NA1-115-7 (4µM), with S63845 (0,5µM) or with water as a positive control and examined with a light inverted microscope (X100)

Figure 5: *NA1-115-7 is not cytotoxic for PBMC, platelets and cardiac cells.* **A** – PBMC were treated for 24h with NA1-115-7 (4µM) or S63845 (0,5µM) and apoptosis was assessed. Values (mean±S.D.) are from two independent experiments. **B** – Platelets were treated as in (A) and by ABT-737 (10µM) and apoptosis was assessed by flow cytometry after labelling of the cells with Annexin V-FITC and PI. Values (mean±S.D.) are from at least four independent experiments. **C** – H9C2 cells were treated with NA1-115-7, S63845 and Doxorubicin (as a positive control) at various doses. Cell viability was determined by MTT assay and LC50 was

calculated. **D** – Cardiotoxicity of NA1-115-7 was determined by hERG inhibition assay. IC50 values were determined graphically using GraphPad Prism software. E-4031 is an inhibitor of hERG channel.

Draft

Table 1: NA1-115-7 is only cytotoxic for MCL-1 dependent cell lines.

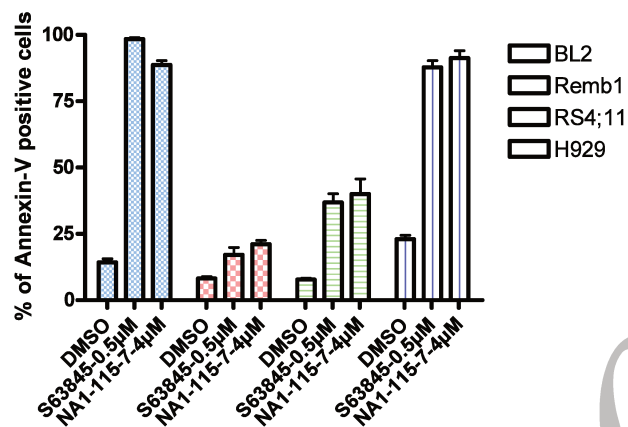
Cell lines	Dependencies*	Lethal concentration 50 % (LC50) (μM)			
		NA1-115-7	S63845	ABT-737	ABT-199
BL2	MCL-1 / BCL-xL	3,6	0,13	>10	>10
Remb1	BCL-xL	12,2	>1	0,89	>10
RS4;11	BCL-2	9,9	>1	0,8	0,2
H929	MCL-1	6,7	0,08	>10	>10

Cell viability was determined by MTT after 24h of treatment with NA1-115-7 at 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.312 μM. ABT-199 and ABT-737 were tested at the same concentrations. S63845 was tested at doses between 2 and 0.03 μM

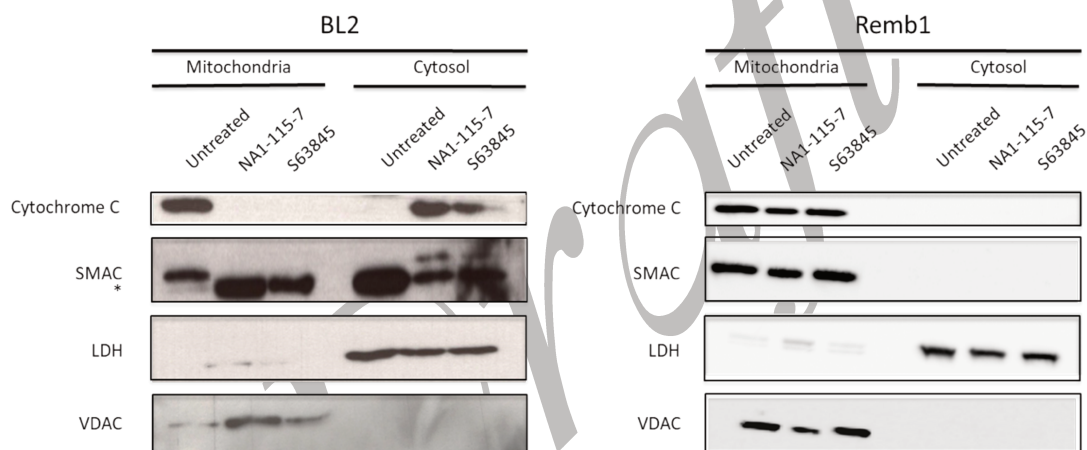
* Cell dependency for anti-apoptotic molecules was determined by BH3-profiling.

Figure 1

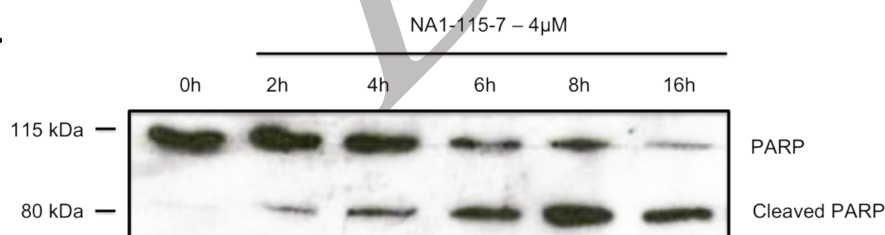
A.



B.



C.



D.

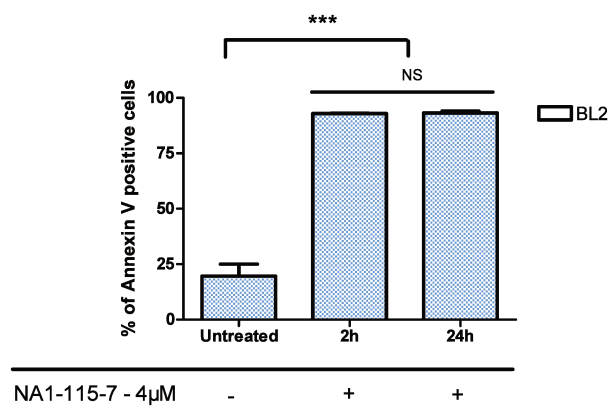
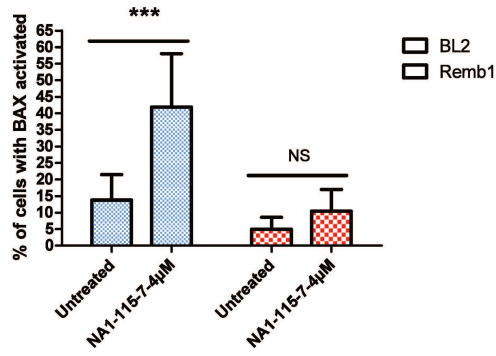
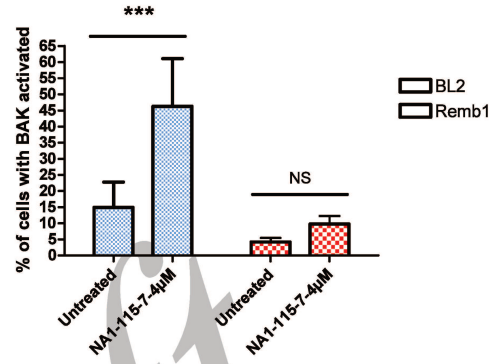


Figure 2

A.



B.



C.

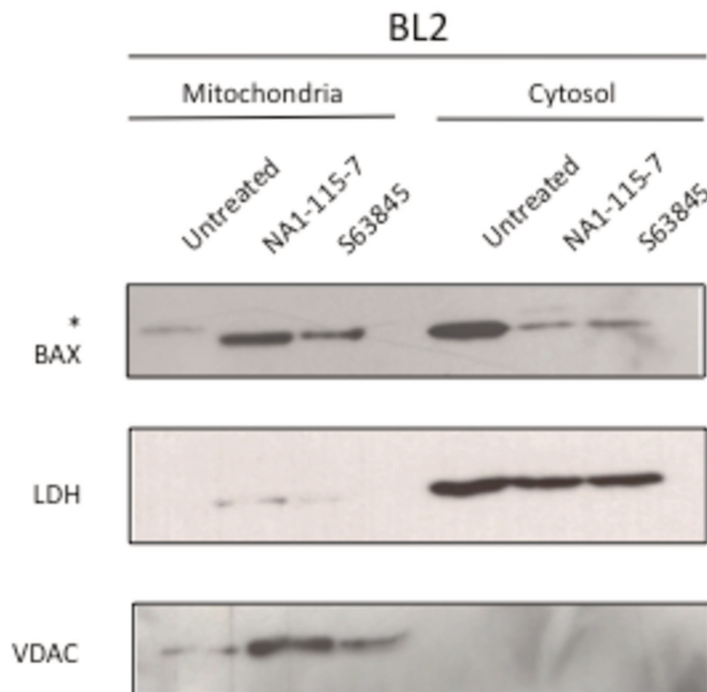
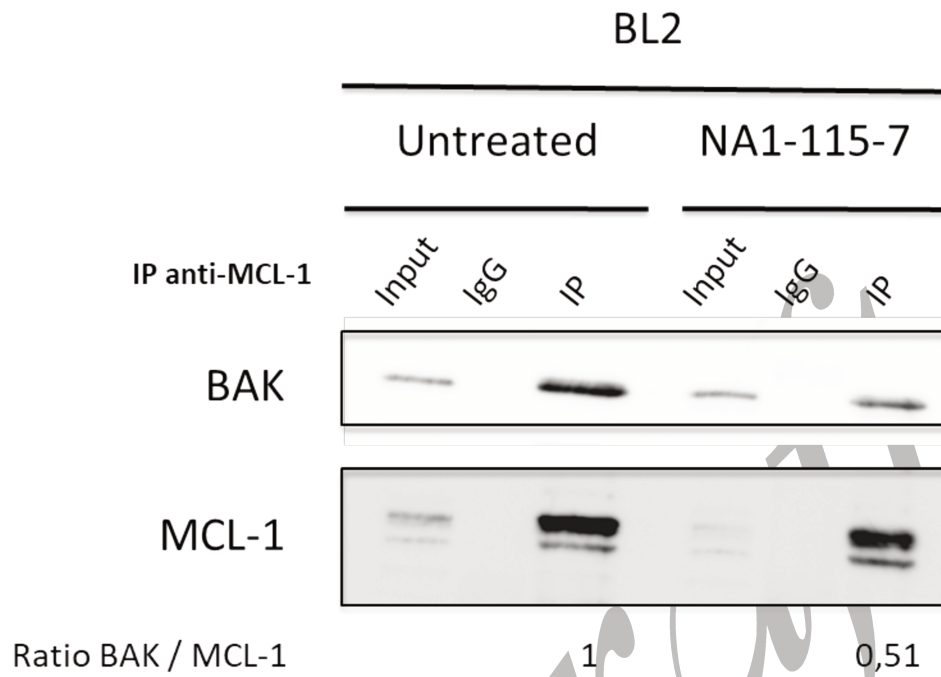


Figure 3

A.



B.

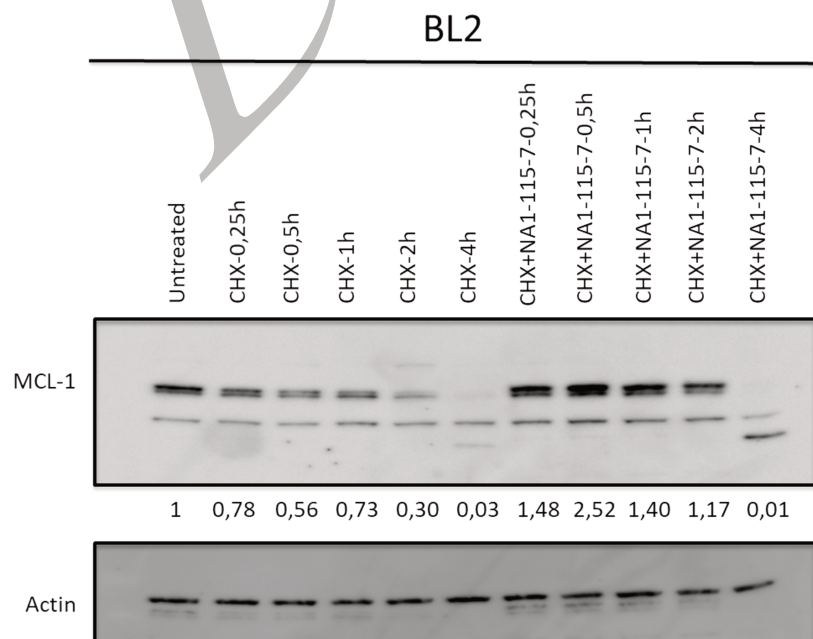


Figure 4

A.

Treatment (24h)	NT	H2O	S63845	NA1-115-7				
			0,5μM	2μM	4μM	8μM	16μM	
Cell lysis	-	+++	+/-	-	+/-	++	+++	

B.

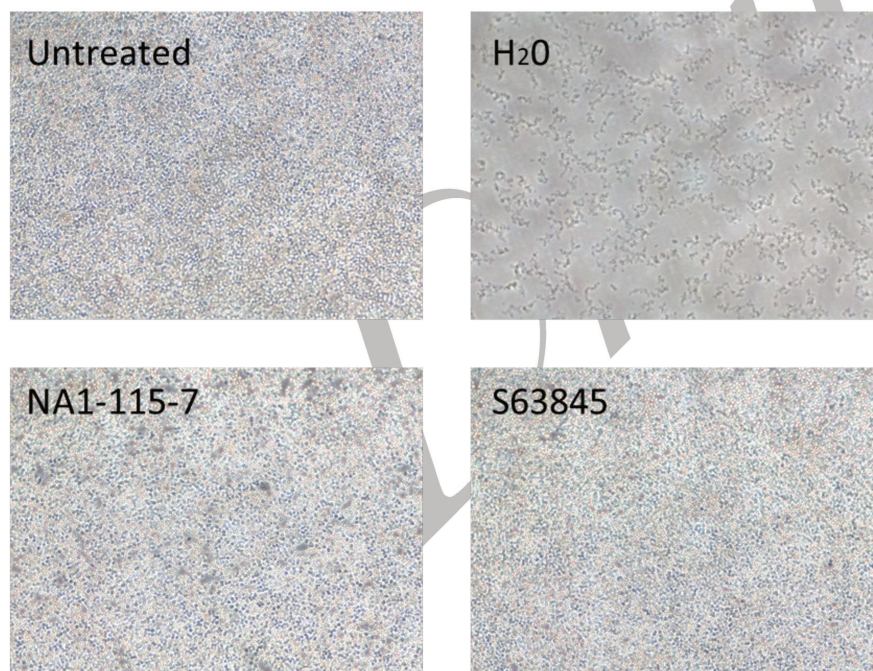
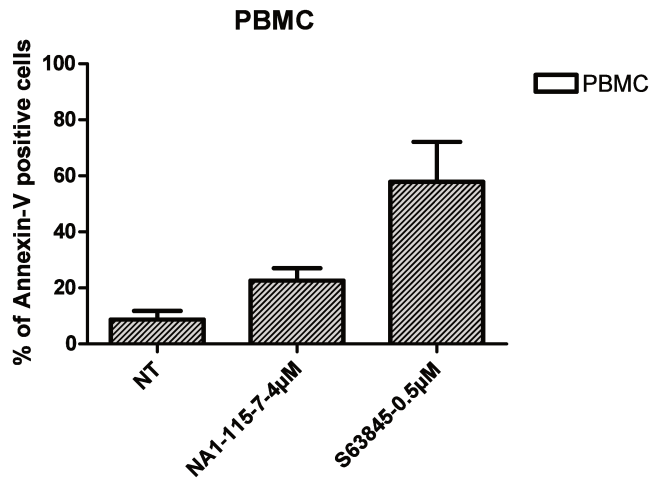
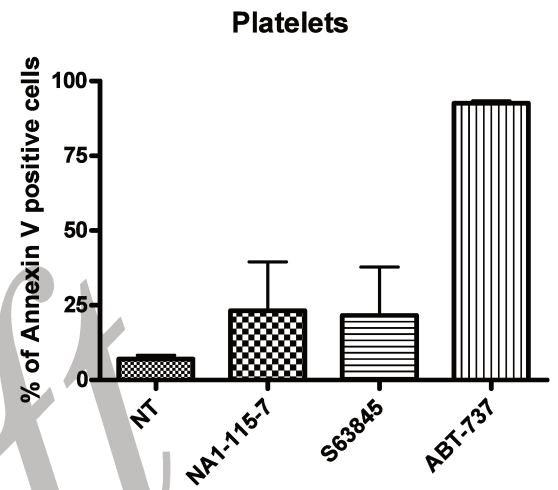


Figure 5

A.



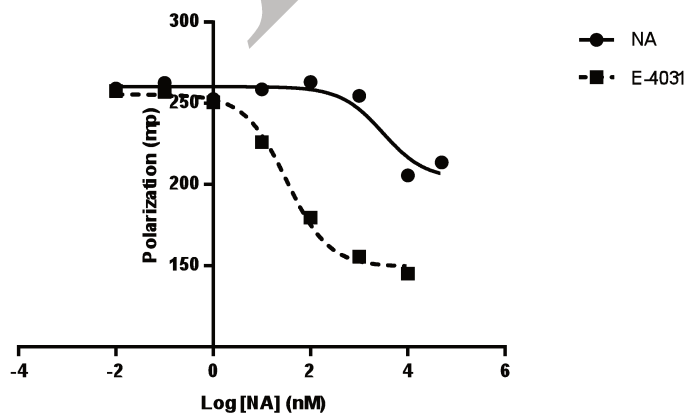
B.



C.

Cell lines	Lethal Concentration (LC50) (μM)		
	NA1-115-7	S63845	Doxorubicin
H9C2	> 20	> 1	0,69

D.



Compound	IC ₅₀ (nM)	% inhibition
E-4031	33.9	
NA	ND	46.2 at 10 μM

Article 3

***In vitro* evaluation of NA1-115-7-loaded nanoemulsions, a MCL-1 specific inhibitor of natural origin, intended to treat B lymphoproliferation after oral administration**

(Statut : Soumis dans les prochaines semaines)

In vitro evaluation of NA1-115-7-loaded nanoemulsions, a MCL-1 specific inhibitor of natural origin, intended to treat B lymphoproliferations after oral administration

Line Séguy^{1*}, Anne-Claire Groo¹, Aurélie Malzert-Fréon¹

Fanny Roussi², Vincent Dumontet², Marc Litaudon², Cécile Apel²

Florian Daressy^{*3}, Sophia Lahlil³, Aude Robert⁴, Joëlle Wiels³

¹ Normandie Univ, UNICAEN, CERMN, 14000 Caen, France

² Institut de Chimie des Substances Naturelles, CNRS, ICSN UPR2301, Université Paris-Saclay, 91198 Gif-sur-Yvette, France

³ UMR 9018 CNRS, Université Paris-Saclay, Institut Gustave Roussy, 94805 Villejuif, France

⁴ UMR1279 INSERM, Université Paris-Saclay, Institut Gustave Roussy, 94805 Villejuif Cedex

*equal contribution

1. Introduction

Apoptosis is a process of programmed cell death involved in cellular homeostasis to eliminate supernumerary, damaged, or degenerated cells. As mentioned by Hanahan et Weinberg [1], apoptosis resistance is a critical stage in tumor development. Among pathways involved in apoptosis, the main one, the mitochondrial pathway, is regulated by the BCL-2 protein family [2]. This family is divided between anti- and pro-apoptotic members, which balance to regulate apoptosis process. However, in many cancers, and in particular in hematological cancer, BCL-2 proteins expression is dysregulated. Indeed, MCL-1 is one of the most amplified genes in cancer [3]. Moreover, studies have demonstrated its overexpression is correlated to tumorigenesis [4] and tumor maintenance [5].

For several years, inhibitors targeting MCL-1, belonging to BH3-mimetics, have been developed. These small molecules mimic the BH3-domain, a region essential for interactions between BCL-2 protein family to reestablished apoptosis [6]. Among them, three are in clinical evaluation : S63845, AMG-176 and AZD-5991, respectively developed by Servier, Amgen and AstraZeneca [7], [8], [9].

However, these molecules are confronted at difficulties in their clinical development, suggesting that it is interesting to provide other alternative molecules. Natural products are still playing a significant role in the drug discovery and development process. Thus, from the 1940's to date, 75% of the 175 small molecules used in cancer therapy, are either natural products per se or are based thereon, or mimic natural products in one form or another [10]. In this context, we isolated from the barks of two *Zygogynum* from New Caledonia, *Z. baillonii* and *Z. pancheri* several molecules could be promising MCL-1 inhibitors [11]. These Original bicyclic sesquiterpenoids present a drimane skeleton with a dialdehyde function and are mainly active on MCL-1. They interact with MCL-1 in its BH3-groove and present an originally covalent binding through reaction between di-aldehyde of compounds and NH₂ function presented by a lysin of MCL-1, making them suicide molecules. We also confirmed these results by an *in vitro* preclinical evaluation of NA1-115-7, one of these compounds [12]. On lymphoproliferation

cells, NA1-115-7 induced apoptosis through mitochondrial apoptotic pathways, only in MCL-1 dependent cell lines. Moreover, this compound has been shown to be safe for blood and cardiac cells.

However, like a large number of natural compounds, this compound presents a lipophilic structure (estimated logP=3.18 from ChemAxon software), [13] harmful to its *in vivo* evaluation. So, the drugability parameters of this lead could hamper its preclinical development.

Among formulation strategies, that can be proposed to reach preclinical, drug delivery systems (DDS) appear advantageous. Indeed, nanocarriers may protect an active pharmaceutical ingredient (API) from degradation, enhance its absorption by facilitating diffusion through epithelium, modify pharmacokinetics and drug tissue distribution profile, and/or improve intracellular penetration and distribution [14]. In a recent work of our team, we reported the development of nanoemulsions on the basis of the biocompatibility profile of their excipients assessed from a miniaturized haemolytic test, and through a design of experiments [15]. Nanodroplets are generated from a simple self-emulsification formulation process. After characterization of their physico-chemical properties, this formulation appeared very performant to improve BCS class II drugs solubility, without any use of organic solvents, and could be proposed for their biological studies.

In the present paper, to anticipate the preclinical evaluation of the new lead NA1-115-7, and by considering that oral administration route is the most common route in animal dosing, we first propose to characterize the stability of the drug in biomimetic media relevant for oral administration. Then, in order to improve its druggability parameters, the development of NA1-115-7-loaded nanoemulsions will be realized. The toxicity of this new NA1-115-7 formulation will be determined on normal cells, as its activity against lymphoproliferation cells. Both will be compared to the unencapsulated drug.

2.2. Methods

2.2.1. Plant material and obtention of pure NA1-115-7

Trunk barks and leaves of *Z. pancheri* subsp. *pancheri* were collected in the rainforest of Nodela (South Province of New Caledonia) by one of us (V. D.). The corresponding voucher specimen (DUM-578) is kept at the Herbarium of New Caledonia (NOU). Extraction and isolation of NA1-115-7 has been performed using a described procedure, see Allouche et al. [16]. This compound was identified by spectroscopic methods (¹H NMR, ¹³C NMR, IR, UV and mass) and by comparison with data reported in the literature see L. Larsen et al. [17]

2.2.2. NA1-115-7 thermodynamic solubility assessment

NA1-115-7 thermodynamic solubility was determined in a phosphate buffered saline solution at pH 7.4, according to a miniaturized procedure of the shake-flask method, that we previously reported [18]. Briefly, 10 µL of a 50 mM solution of NA1-115-7 in DMSO was added to a 5 mL glass tube containing 990 µL of buffer solution (n=4). Tubes were shaken by inversion at room temperature. An immediate precipitation was observed in all tubes. After shaking for 24 h, the solution was transferred in microtubes, and was centrifuged at 14,500 g for 5 min. 100 µL supernatant was mixed with 100 µL

acetonitrile/DMSO (99:1; v/v) in a Greiner UV microplate. Determination of solubility was made with an Infinite 200 Pro-Tecan (Lyon, France) in spectrophotometric mode ($\lambda_{\text{max}} = 280 \text{ nm}$) from a calibration curve obtained from seven standard solutions of the compound solubilized at 0, 2, 5, 10, 20, 50, and 100 μM in a 50:50 (v/v) mixture of buffer with acetonitrile/DMSO (99:1; v/v). Calibration curves were linear with $R^2 > 0.999$.

2.2.3. NA1-115-7 dosage by UHPLC

NA1-115-7 concentrations were measured by ultra high-performance liquid chromatography (UHPLC). The apparatus was composed by an Agilent binary pump 1290, an autosampler 1290 and a diode array UV detector 1260 (Agilent technologies, Santa Clara, CA, USA). The column used was a reversed phase column C18 (Restek® Ultra, 5 μm , 2.1 x 50 mm). Injected volume and total run time were 8 μL and 2.5 min, respectively. The flow rate was 0.5 mL/min. The column temperature was maintained at 25°C. Mobile phase was initially composed of a mixture of 50 % acetonitrile (A) and 50 % acetonitrile (B). Then, it reached 90 % A after 2 min, by applying a linear gradient, maintained for 0.5 min and returned to the initial conditions. Retention time of NA1-115-7 was found to be 1.93 min and the detection wavelength was 280 nm. In these conditions, linearity was observed in the range from 1 to 100 $\mu\text{g/mL}$ with a correlation coefficient above 0.999 ($y=13.50x + 1.944$).

2.2.4. Stability studies in biorelevant media

Phosphate buffered saline (PBS) pH=7.4 was prepared according to the European Pharmacopeia, 10th ed. (European Pharmacopeia, 2020). Simulated gastric fluid (SGF) was prepared according to USP XXIV (US Pharmacopeia XXIV, 2006). The SGF medium contained 0.32 % (w/v) of pepsin, the pH was 1.2. The FaSSIF/FeSSIF fluids are a simplification of the proximal small intestine composition in the fasted state (FaSSIF) or in the fed state (FeSSIF). Composition of each medium used was described before by our team [18]. They were used in an updated (V2) version, according to those proposed by Jantravid et al., with well controlled amounts of lecithin, bile components (containing bile salt and lipolysis products), and defined pH (6.5 for FaSSIF, and 5.8 for FeSSIF).

Before NA1-115-7 stability assays, the compound was dissolved in DMSO at 10.1 mM (4.0 mg/mL). The NA1-115-7 solution and the NA1-115-7-loaded nanoemulsions PNEs were diluted at a final concentration of 1% (v/v) and incubated at 37°C in the different biomimetic media in triplicate. In these conditions, expected final concentrations in different media were $101.7 \pm 1.0 \mu\text{M}$ and $101.9 \pm 3.1 \mu\text{M}$ for NA1-115-7 and NA1-115-7-loaded NEs, respectively. Samples were collected at defined times for the 3 hours experiments (0, 30 and/or 60, 120, and 180 minutes). They were then centrifuged for 5 min at 14,500 rpm to eliminate aggregates of medium component and precipitated NA1-115-7. Quantification of solubilized drug in media samples were made by UHPLC method, after a 1:10 dilution of the supernatant in methanol, as described in 2.2.3. The mean concentration (μM of NA1-115-7) was calculated from a calibration curve. The granulometric characteristics of the NA1-115-7-loaded NEs supernatant were measured by DLS as described in 2.2.6.

2.2.5. Formulation of the nanoemulsions

Nanoemulsions formulation was adapted from spontaneous nano-emulsification method previously described by our team [19], and adapted by Seguy *et al.* [15]. The triglycerides (Labrafac® WL 1349, 84.4 mg), the surfactant (Kolliphor® HS 15, 132.6 mg) and the solubilizer (Transcutol® HP, 24.1 mg) were mixed together, heated to 70 °C under gentle magnetic stirring (250 rpm), and cooled down at 25°C where the magnetic stirring was increased from 250 rpm to 750 rpm. 1 mL of 65 mM phosphate buffer was suddenly added, leading to spontaneous emulsification, maintained for 15 minutes under stirring at room temperature. NA1-115-7-loaded nanoemulsions were prepared as the unloaded nanoemulsions by adding NA1-115-7, at defined loading rate, at the beginning of the formulation into the anhydrous phase, which was heated to 70°C under stirring (250 rpm), and mixed for 5 minutes by ultrasonic treatment at room temperature before addition of the aqueous phase. Each formulation was filtered through 0.2 µm regenerated cellulose syringe filters (Minisart® Syringe Filter, Sartorius, Goettingen, Germany) before use.

2.2.6. Granulometric properties and zeta-potential measurements

Dynamic light scattering (DLS) was used to determine the granulometric properties of the nanoemulsions (average hydrodynamic diameter in volume, polydispersity index (PDI). A NanoZS® apparatus (Malvern Instruments, Worcestershire, UK) equipped with a 633 nm laser at a fixed scattering angle of 173° was used. The temperature of the cell was kept constant at 25°C. The nanoemulsions were 1/100 (v/v) diluted in NaCl 1 mM in order to assure an appropriate scattered intensity on the detector before measurements. Zeta potential analyses were realized in the same conditions using a NanoZS® apparatus equipped with DTS 1070 cell at 25°C, with a dielectric constant of 78.5, a refractive index of 1.33, a viscosity of 0.8872 cP and a cell voltage of 150 V. The zeta potential was calculated from the electrophoretic mobility using the Smoluchowski equation. All measurements were performed in triplicate.

2.2.7. NA1-115-7 dosage in NA1-115-7-loaded NEs

After check of the absence of interactions between NEs and NA1-115-7 peaks, the UHPLC method described in 2.2.3 was used. NA1-115-7-loaded NEs samples were first diluted in acetonitrile/water (1:1, v/v) mixture (1/1000, v/v), and the concentration of NA1-115-7 was determined.

The encapsulation efficiency (EE) was determined in triplicate and calculated as follows:

$$EE (\%) = 100 \times \frac{\text{Quantity of NA1-115-7 entrapped}}{\text{Total quantity of NA1-115-7 added}}$$

The drug loading (DL) was defined as:

$$DL (\%) = 100 \times \frac{\text{Quantity of NA1-115-7 entrapped}}{\text{Total quantity of anhydrous excipients}}$$

2.2.8. Storage stability studies

The short-term stability of the nanoemulsions was investigated over a storage period of 2 weeks at 4°C. The stock NA1-115-7-loaded NEs formulations were diluted at regular intervals with a 1/100 (v/v) dilution in NaCl 1 mM for evaluating the size distribution and zeta potential. In parallel, the encapsulation

efficiency was quantified by the UHPLC method, as described above. All assays and measurements were performed in triplicate.

2.2.9 MTT assay

BL2 cell viability was measured by the MTT (3-(4, 5-dimethylthiazolyl-2)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide) assay. 7×10^4 cells (in triplicate) were incubated for 24 h at 37°C with various concentrations of unloaded (i.e., blank) NEs after dilution in RPMI medium by a factor comprised between 1:8,000 to 1:500, v/v (equivalent to 30.1 to 482.5 µg/mL of anhydrous excipients, respectively) or with equivalent concentrations of each excipient of the NEs (Kolliphor® HS15, Labrafac® W1349, Transcutol® HP). Then, 20 µL of MTT reagent (final concentration 1 mg/mL) was added and plates were incubated 2 extra hours at 37°C. Finally, 100 µL of lysis buffer (30% SDS, 33% Dimethylformamide, 2% glacial acetic acid, 0.025N HCl, pH = 4.7) was added and absorbance was recorded at 570 nm after an overnight incubation at RT (Room Temperature). The LC₅₀ values were calculated after plotting the dose-response curves using the GraphPad Prism software. Experiments were performed in triplicate.

2.2.10. Quantification of apoptosis

Apoptosis was assessed by labelling cells with annexin-V-FITC and propidium iodide (PI). 3.105 cells were treated for indicated times in complete corresponding medium, then washed in PBS, resuspended in annexin buffer (10 mM HEPES/NaOH, pH = 7.4, 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 1.8 mM CaCl₂) containing 2.5 µg/mL annexin V-FITC (eBioscience) and incubated for 5–10 min before addition of 100 µL of in annexin buffer supplemented with PI (10 µg/mL; Sigma-Aldrich). Analysis (n = 10 000) was done by flow cytometry (Accuri C6 cytometer, Becton-Dickinson). Annexin V-positive cells (PI negative and positive) were considered as apoptotic cells. For PBMC cells were labelled with anti-CD3-FITC (BD Pharmigen) to identify the population isolated and with Annexin V-APC. Experiments were performed at least four times.

2.2.11 PBMC isolation

Isolation of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) was done by FICOLL. Blood 1:1 in sterile PBS. FICOLL is added at the bottom of a tube and gently overlay with the diluted blood (1:2.5). After centrifugation at RT at 2200rpm with no brake for 20 min, cells at the interface (containing PBMC) were washed in PBS and then centrifugated at 300g during 10min two times. At the end, the pellet is resuspended in RPMI 1640 supplemented with 10% FBS and cultured at 37°C in a humidified incubator in an atmosphere of 5% CO₂ during maximum 48h.

2.2.12 Measurement of BAK activation

After 4h treatment with 4µM, cells were washed with ice-cold PBS and fixed for 5 min in PBS/0.25% paraformaldehyde (PFA) at room temperature (RT). Cells were then washed with PBS and incubated 30 min at RT with conformational anti-BAX mAb (clone 6A7; Santa Cruz Biotechnology) diluted in PBS/200 µg/ml digitonin (Sigma-Aldrich). Cells were then washed with PBS, incubated 30 min at RT with a goat anti-mouse Alexa 488-conjugated secondary Ab (Beckman Coulter) in PBS, and washed

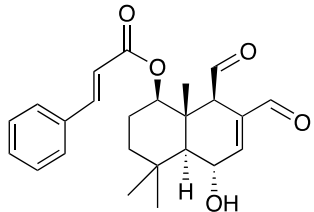
twice with PBS before flow cytometry analysis (BD Accuri C6). Experiments were performed at least three times.

3. Results and discussion

3.1. NA1-115-7 solubility and stability assessment

From its structural properties, NA1-115-7 appears as a molecule that respects Lipinski's rules (Lop P: 4.34, MW: 396.48, only 1 H donor and 5 H acceptors). At physiological pH, the molecule is not ionized. The thermodynamic solubility of NA1-115-7 was determined from the shake-flask method and was found to be $357.5 \pm 9.8 \mu\text{M}$ i.e. $141.7 \pm 3.9 \mu\text{g/mL}$.

Table 1. Structural properties of NA1-115-7

	MW: 396.48	Lop P: 4.34	MP: ??	pKa>12
---	------------	-------------	--------	--------

NA1-115-7, initially dissolved in DMSO at 10.1 mM (4.0 mg/mL), was added to the different biomimetic media (1:100 dilution) before immediate quantification of the solubilized drug. The solubilized NA1-115-7 values appear better in the intestinal media ($96.5 \pm 0.6 \mu\text{M}$ in the simulated fasted state - FaSSIF, and $94.7 \pm 0.5 \mu\text{M}$ in the fed state one - FeSSIF) than in the simulated gastric fluid (SGF, $78.3 \pm 0.3 \mu\text{M}$). Once the beginning of the experiment, in these conditions, NA1-115-7 equilibrium solubility is reached in both intestinal media, being not affected by the presence of bile salts/phospholipids.

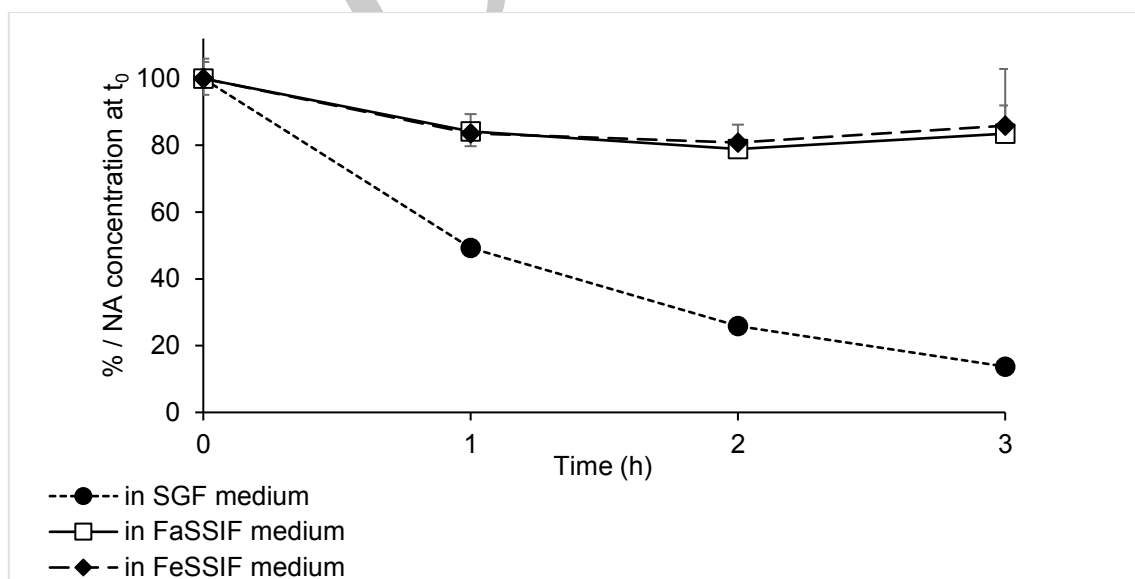
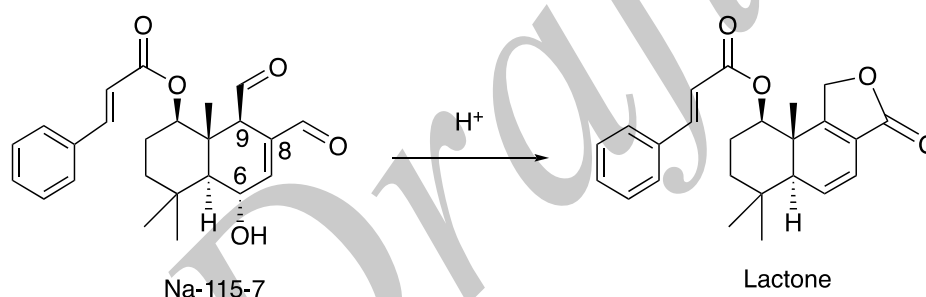


Fig. 1. NA1-115-7 kinetic solubility in biomimetic media at 37°C (n=3)

In both simulated intestinal media, about 16% of NA1-115-7 is lost after one hour, before a steady-state was reached. In the biomimetic acidic environment of the stomach, the fraction of the solubilized molecule gradually decreases over time. The usual transit time is between 15 min and 3 h in stomach (Javadzadeh and Hamedeyazdan, *Novel Drug Delivery Systems for Modulation of Gastrointestinal Transit Time in "Recent Advances in Novel Drug Carrier System" 2012*). After 3 hours, only about 14% of NA1-115-7 is recovered, *i.e.* $10.7 \pm 0.1 \mu\text{M}$. Such results can't be explained by a difference in NA1-115-7 ionized state since, considering its pKa values (Table 1.), the molecule is unionized in the different media. Instability in SGF is reliable to NA1-115-7 degradation in time as attested by the appearance of a second peak on the UHPLC chromatogram at $t_R = 2.24$, which increases in time and becomes predominant 3h after the beginning of the experiment (results not shown).

In fact, we have previously shown that a compound, with a structure similar to NA1-115-7, was sensitive to acidic conditions and rearranged spontaneously to a lactone [13]. This was due to the presence of the $6\alpha\text{-OH}$. We thus assume that NA-115-7 rearranges spontaneously in the biomimetic acidic environment of the stomach to a lactone. According to the SAR studies we have performed on that chemical series [11], this lactone is probably inactive on MCL-1 protein. In fact, we have shown that aldehydes at C8 and C9 are required.



Scheme 1. Rearrangement of NA1-115-7 in acidic media

To permit its preclinical development, it appears crucial to find solutions to permit NA1-115-7 stabilization against acid conditions, in particular if latter, oral administration is envisaged during early animal experiments.

3.2. NA1-115-7-loaded nanoemulsions (NEs) formulation and characterization

A nanoemulsion formulation was recently developed by our team on the basis of the biocompatibility profile of its excipients determined through a valuable miniaturized process implying human whole blood (Seguy et al. *Pharmaceutics*, under submission). Considering its valuable interest to solubilize, and stabilize active pharmaceutical ingredients, we decided to transpose this formulation to NA1-115-7.

NA1-115-7-loaded NEs were successfully formulated by spontaneous emulsification process by using a 2 wt% drug loading rate.

Table 2. Physico-chemical properties of blank (*i.e.* unloaded) and NA1-115-7-loaded nanoemulsions (NEs).

	z-average diameter (nm)	PDI	ζ potential (mV)	Encapsulation efficiency (%)	NA1-115-7 payload
Blank NEs	47.6 ± 0.4	0.135 ± 0.005	-6.3 ± 0.5	-	-
NA-NEs	42.4 ± 0.4	0.152 ± 0.005	-5.6 ± 0.3	91.2 ± 1.8	4.0 ± 0.1 mg/mL 10.2 ± 0.2 mM

NA1-115-7-loaded droplets appear monodisperse in size (polydispersity index value lower than 0.2) and present a mean diameter of 42.4 ± 0.4 nm, comparable to that of unloaded NEs (47.6 ± 0.4 nm) (Table 2). Zeta potential values are neutral for both blank NEs and NA1-115-7-loaded NEs, in coherence with the nature of the excipients used and the unionized state of the drug. Considering the high encapsulation efficiency of NA1-115-7 in the NEs, a drug payload of 10.2 ± 0.2 mM (*i.e.*, 4.0 ± 0.1 mg/mL) is obtained.

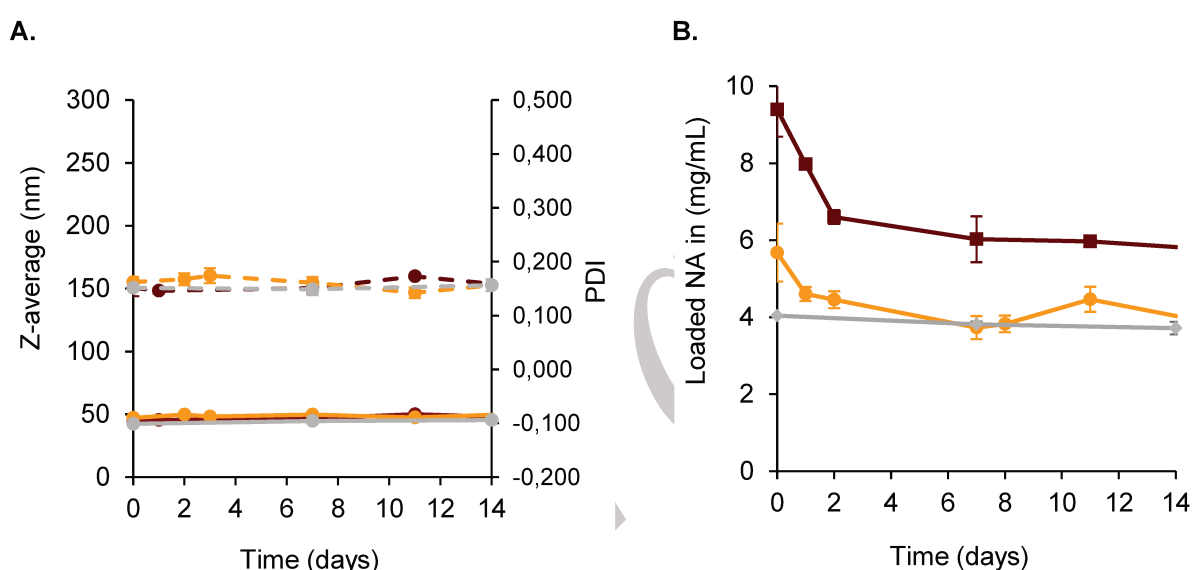


Fig. 2. Evolution in time of **A.** the granulometric properties of 4°C stored NEs formulated with increasing NA1-115-7 loading rates (in grey for 4 mg/mL, in orange for 6 mg/mL and in red for 9 mg/mL), and of **B.** their resulting payloads.

Interestingly, monodisperse nanoemulsions can be also formulated up to a high drug payload of 22.7 ± 0.2 mM (*i.e.*, 9.0 ± 0.1 mg/mL). At this concentration, it can be noted that the drug added to the anhydrous mixture during the formulation process, seems totally dissolved. After addition of the aqueous phase, a homogeneous colloidal suspension is observed. What is remarkable is that these nanoemulsions do not undergo Ostwald ripening as their granulometric properties remain very stable for over 2 weeks upon storage at 4°C (Fig. 2.A).

In comparison with NA1-115-7 thermodynamic solubility at pH 7.4, the formulation permits a 60 fold increase of the NA1-115-7 apparent solubility. Thus, NA1-115-7 appears to spontaneously oversaturate into the nanoemulsion droplets following addition of excess drug to the excipients. However, over time, some NA1-115-7 molecules precipitate before reaching thermodynamic equilibrium (Fig. 2.B). Such a behavior was recently reported for venetoclax into supersaturated lipid-based formulations vehicles (sLBF) [20]. Indeed, this selective B-cell lymphoma-2 inhibitor licenced in 2016 for the treatment of

leukaemia was formulated with defined oils and monoglycerides. The resulting sLBF appeared as good strategy to promote and maintain drug supersaturation, and *in fine* permit to obtain higher drug oral bioavailability.

NA1-115-7-loaded NEs with an initial concentration of 10.2 mM (4.0 mg/mL), were added into a simulated gastric fluid solution. After this 1:100 dilution, the drug kinetic solubility was assessed at 37°C, and compared to free NA1-115-7 (Fig. 3).

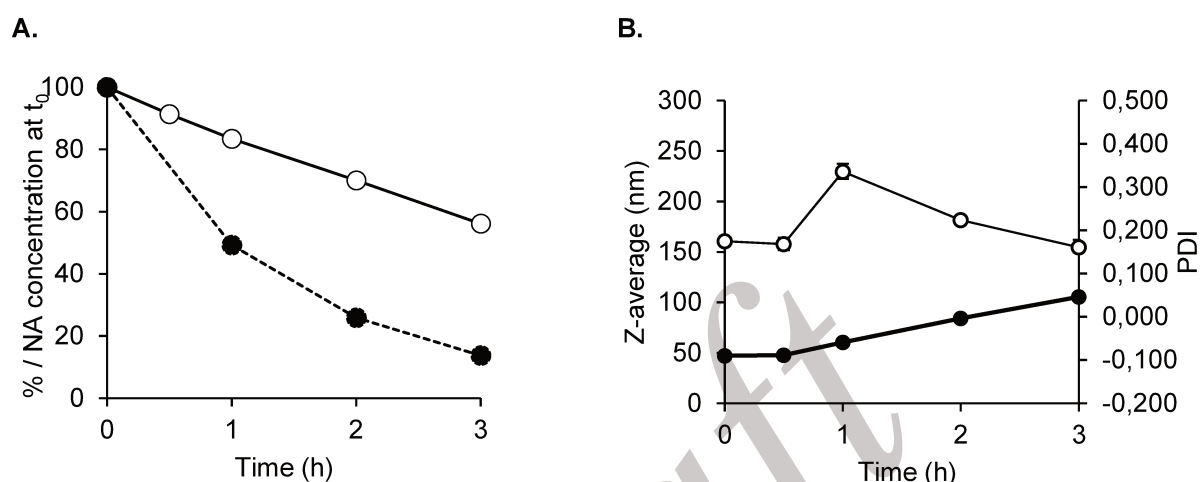


Fig. 3. A. Comparison of the solubilized NA1-115-7 in SGF, in time, at 37°C, from a DMSO solution or from the NE formulation; **B.** Concomitant evolution of the granulometric properties (hydrodynamic diameter shown as z-average, and subsequent PDI) of the NA1-115-7-loaded NEs in SGF at 37°C ($n = 3$).

NA1-115-7 appears totally available once the dilution of the NA-loaded NEs formulation into SGF (NA1-115-7 concentration of $113.0 \pm 1.1 \mu\text{M}$ at the beginning of the experiment, Fig. 3.A). NEs seem to be a valuable approach to carry this drug and permit its oral administration by controlling the dosage since this concentration is considerably higher than the free NA1-115-7 form ($78.3 \pm 0.3 \mu\text{M}$ at t_0). In time, as objectified from the PDI increase and the slight evolution of the NEs average diameter, the droplets are partly reorganized, and release some NA1-115-7 molecules in the biomimetic gastric medium (Fig. 3.B). Nevertheless, they appear efficient in the stabilization of NA1-115-7 since after 3 hours, approximately 56% of the molecule present in the medium is recovered. This is equivalent to a final concentration of $63.4 \pm 0.7 \mu\text{M}$, which is 6 times higher than for the unencapsulated molecule ($10.7 \pm 0.1 \mu\text{M}$, Fig. 1). It is known that the residence time in the stomach varies according to many parameters (age, species, fasting or feeding state, volume of food intake, etc.). Moreover, considering that for a liquid administration, gastric emptying is rapid and that the majority of the contents are evacuated within the first hour, NA1-115-7 stabilization thanks to NE formulation appears as a promising way to further envisage NA1-115-7 preclinical studies after oral administration.

3.3. Nanoemulsions biological evaluation

3.3.1. *In vitro* cytotoxicity of NE on BL2 cells

In order to better anticipate future *in vivo* tests, the development of *in vitro* experiments capable of providing information on cytotoxicity during non-clinical studies are necessary (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé, « Recommandations for toxicological evaluation of nanoparticle medicinal products », 2011). Nanoemulsions, that we proposed for the encapsulation of NA1-115-7, are formulated by an organic solvent-free method. Indeed, the use of organic solvents can provide safety issue and be dose-limiting due to their toxicity. Ours nanoemulsions have been developed from anhydrous mixtures made of excipients already described in the European Pharmacopeia. Their hemocompatibility has been already proven on human whole blood (Seguy et al. Pharmaceutics, under submission).

Blank nanoemulsions were diluted in RPMI 1640 medium by a factor comprised between 1:8;000 to 1:500, v/v (equivalent to 30.1 to 482.5 µg/mL of anhydrous excipients, respectively). Their cytotoxicity was assessed by MTT test on BL2 cells. This cell lines have demonstrated a good sensibility to NA1-115-7 during its *in vitro* evaluation [11], [12]. It was compared to that of each excipient used in similar proportions to those of the corresponding diluted NEs. After 24h cells exposure to formulations, neither Labrafac® WL 1349, *i.e.* a medium chains triglyceride, or Transcutol® HP, a high-purity solvent and solubilizer, altered the growth of BL2 cells whatever the concentration used (Fig. 4.).

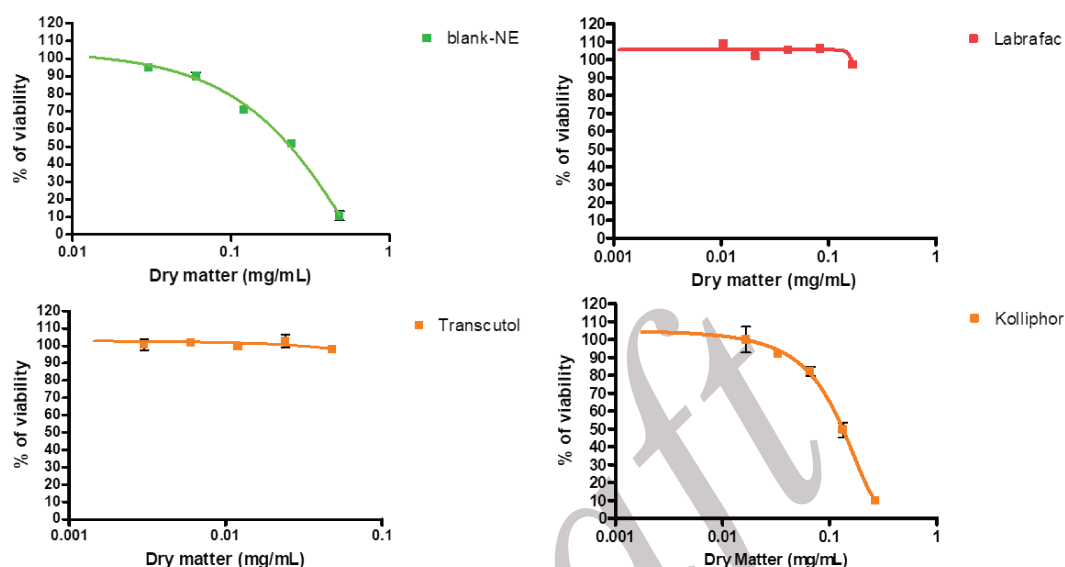
Cell survival only slightly decreased (<20%) at a 1:2,000 dilution of the NEs (*i.e.* a corresponding concentration of the anhydrous excipients of 120.6 µg/mL). In consequence, exposure of cells below this blank NEs concentration, and ideally after a 1:4,000 dilution to discard any cytotoxicity, should be performed before use on BL2 cells. Considering the NA payloads comprised between 10.2 and 22.7 mM (4 and 9 mg/mL, respectively) (Fig. 2), it should be possible to explore the effects of NA on BL2 cells with concentrations up to 2.5 and 5.7 µM.

Moreover, an LC₅₀ of 236 µg/mL was determined for blank NEs (Fig. 4.) on BL2 cells. The toxicity is attributable to Kolliphor® HS 15 as the value of LC₅₀ of 132 µg/mL is coherent with the proportion of the non ionic surfactant used in the formulation (55%, w/w). Nevertheless, due to its unique solubilization characteristics and safety profiles, this solubilizer with inherent amphiphilicity stemming, is widely used in parenteral and oral formulations for over several decades [21]. As all surfactants, it may induce some side effects at high concentration. Thus, it occurs also with surfactants that are widely used like polysorbate 80 and Kolliphor® ELP, but to a much larger extent (Solutol® HS15- Non-clinical safety and toxicology report (BASF)).

If used alone, Kolliphor® HS15 is known to form 13-14 nm sized micelles in aqueous medium above its CMC (0.06-0.1 mM corresponding to about 55-95 µg/mL) whatever the nature of the aqueous buffer. On epithelial cells, it was shown that this surfactant exerted significant toxicity at concentrations above its CMC [22]. Surfactant monomers, eventually provided by micelles, would incorporate into the cell membrane. Through set up of a consequent disorder in the phospholipid bilayer packing following its insertion, Kolliphor® HS15 would induce membrane permeability enhancement, and hence, toxicity. Increased endocytosis rate in presence of this surfactant at permeability enhancing concentrations was

also reported [22]. Maybe, this effect could be explored to facilitate endocytosis of the Kolliphor® HS15-based NEs.

Fig. 4. BL2 cells viability following 24 h exposure to the formulated blank NEs diluted in water or to each anhydrous excipient. Data are expressed as the mean $\pm$ standard error of the mean ($n = 3$). Results obtained for BL2 cells with culture medium alone were considered correspond to 100% survival.



3.3.2. *In vitro* efficacy of loaded-NA1-115-7

Considering NA1-115-7 as an MCL-1 inhibitor inducing a massive cell death on lymphoproliferation cells by activation of the apoptotic mitochondrial pathway [12], we hope translate these results to loading-NA1-115-7. The high encapsulation efficiency of the compound into NE up to 22.7mM and the non-apparent toxicity of NE when the NA1-115-7 payloads is comprised between 10.2 and 22.7 mM seem to be promising for its *in vitro* evaluation. Apoptosis induction was measured in two hematological cell lines, BL2 and Remb1, dependent of MCL-1/BCL-xL and BCL-xL respectively for apoptosis resistance [12]. Cells were treated either with free-NA1-115-7 (2/4 μ M), or blank-NE (equivalent to a treatment of 2 μ M), or with NENA (2 μ M), during 24h. Apoptosis was then quantified after an Annexin V / PI labeling (Fig 5). In BL2, 4 μ M of free-NA1-115-7 induced 86 $\pm$ 3% of apoptosis, whereas a concentration of 2 μ M induced 47 $\pm$ 5% of apoptosis. Interestingly, Blank-NE alone at an equivalent of treatment of 2 μ M, are not toxic and then, not induced apoptosis neither in BL2 nor Remb1 cell lines. On the contrary, a treatment with 2 μ M of NENA was sufficient to induce 88 $\pm$ 3.5% of apoptosis in BL2 cells. On Remb1 cells, a treatment with 2 μ M of NENA was weakly associated with apoptosis with only 19.5 $\pm$ 3 % of apoptotic cells. The same percentages were found after treatment with free-NA1-115-7 at 2 and 4 μ M, with respectively 16.5 $\pm$ 3 % and 22 $\pm$ 2.5 % of apoptotic cells. These results suggested that NENA were more effective than free-NA1-115-7 to induce apoptosis in the MCL-1 dependent cell line BL2. Treatment doses could be down from 4 μ M to 2 μ M while maintaining a massive apoptosis induction. In

the BCL-xL dependent cell line, apoptosis was weakly induced following 2 μ M NENA treatment. NE provide an advantage by increasing efficiency of the compound and preserve its specificity.

A similar enhancement of efficacy has already been observed with this nanoemulsions formulation applied to another MCL-1 inhibitor, the Pyridoclast [2]. It was shown in vitro that anti-tumor activity of the Pyridoclast-loaded nanoemulsions has increased to 2.5-fold its activity compare to free-Pyridoclast on an ovarian cancer cell line [3]. This activity was illustrated by a strong increase of caspase 3/7 activation from 10 μ M Pyridoclast-loaded NEs. The interaction between NE and either membrane component as phospholipids, or extracellular matrix of cells, promotes nanocarriers entry into the cell by endocytosis [4]. Here, the presence of Kolliphor® HS15 could be explain in part the enhancement of the cell uptake by endocytosis.

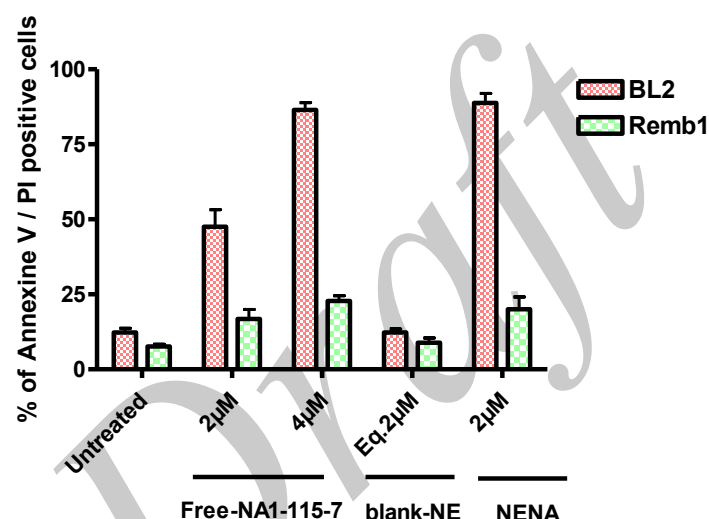


Fig. 5. Apoptosis induction was measured after 24h treatment with free-NA1-115-7 at 2 and 4 μ M, Blank-NE equivalent to a treatment of 2 μ M (eq 2 μ M) or NENA at 2 μ M with Annexin V / PI labelling analysed by cytometry. The values presented (mean $\pm$ S.D.) are from at least five independent experiments

3.3.3 Engagement of mitochondrial apoptosis pathway

NA1-115-7 is a BH3-mimetic specific of MCL-1 which disrupted BAK/MCL-1 interaction leading to BAK activation and to the switch on of the mitochondrial pathway [12]. To confirm that loaded-NA1-115-7 triggered the same apoptotic pathway than free-NA1-115-7, BAK activation, a critical stage of this signaling pathway, was analyzed on BL2 and Remb1 cell lines. BAK activation was quantified by cytometry after labelling cells with a conformational antibody that recognizes only activated form of BAK (Fig 7). In BL2 cells (MCL-1/BCL-xL dependent cell line) treated for 4h with blank-NE (Eq. 2 μ M), only 11.2 $\pm$ 4% of cells exhibited an activated form of BAK, which was close to the percentage observed in untreated cells (15 $\pm$ 1.5%). In contrast, treatment with NENA at 2 μ M or free-NA1-115-7 at 4 μ M, induce an activation of BAK in respectively 50.8 $\pm$ 3% and 43.4 $\pm$ 4% of cells. In Remb1 (BCL-xL dependent cell line) regardless of treatment, less than 10% of cells showed an activated form of BAK.

Thus, loaded-NA1-115-7 allowed a rapid and strong induction of apoptotic mitochondrial pathway specifically in MCL-1 dependent cell line at 2 μ M, confirming the previous results obtained.

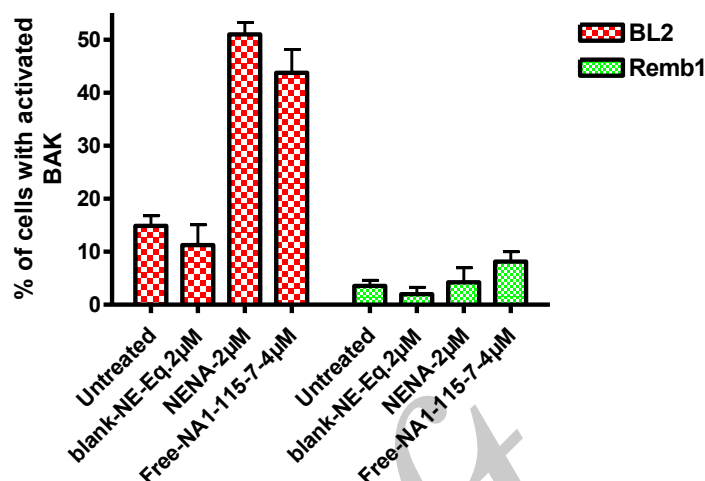


Fig. 6 BL2 and Remb1 cell lines were treated or not with Blank-NE at an equivalent of 2 μ M, NENA at 2 μ M or free-NA1-115-7 at 4 μ M for 4h. Cells were then fixed, permeabilized, labelled with ab1, a conformational BAK antibody, and then analyzed by flow cytometry. The values presented (mean $\pm$ S.D.) are from minimum three independent experiments.

3.3.4 *In vitro* toxicity on healthy cells

Then, it was important to confirmed that this enhancement of activity was not associated with higher toxicity in healthy cells. Thus, loaded-NA1-115-7 was tested PBMC (definition) isolated from healthy donor and apoptosis was quantified after Annexin V / PI labelling (Fig 6). First, blank-NE equivalent to a treatment of 2 μ M were not associated with apoptosis on PBMC, confirming the NE safety. A weakly apoptosis (16 $\pm$ 2% and 21.5 $\pm$ 2% respectively) was observed after treatment with a concentration of 2 μ M of NENA or 4 μ M of free-NA1-115-7 compare to the percentage obtained with 0.5 μ M of S63845, a known MCL-1 inhibitor (61 $\pm$ 4%). These results indicate that, like free-NA1-115-7, loaded-NA1-115-7 was not associated with toxicity in healthy PBMC, a great advantage in the perspective of its *in vivo* evaluation.

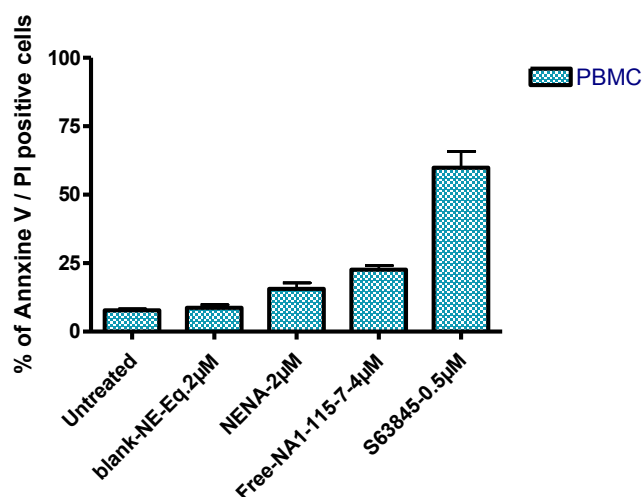


Fig. 7 Apoptosis induction was measured on PBMC after 24h treatment with blank-NEs equivalent to a treatment of 2µM (Blank-NEs-Eq.2µM), NENA at 2µM, free-NA1-115-7 at 4µM, or S63845 at 0.5µM with Annexin V / PI labeling analyzed by cytometry. The values presented (mean ± S.D.) are from minimum four independent experiments.

4. Conclusion

Although NA1-115-7 appears as a selective MCL-1 inhibitor of therapeutic interest for the treatment of lymphoproliferation, its hydrophobic character and its instability in acidic conditions could hamper its valuable preclinical development. Thanks to the use of nanoemulsions, the challenge of limited solubility and stability was overcome. By keeping in mind that the formulation itself could be not totally exempt of biological effect, it appeared important to characterize the cytotoxicity profile of the nanoemulsions in order to define optimal use conditions for *in vitro* evaluations. The biocompatible formulation tool permitted to preserve NA1-115-7 specificity as MCL-1 inhibitor inducing massive cell death on lymphoproliferation cells by activation of the apoptotic mitochondrial pathway. Nanoemulsions even increase efficiency of the compound on hematological cells, while showing no toxicity in healthy PBMC cells, offering a great advantage in the perspective of its *in vivo* evaluation.

References

- [1] D. Hanahan et R. A. Weinberg, « Hallmarks of Cancer: The Next Generation », *Cell*, vol. 144, n° 5, p. 646-674, mars 2011, doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
- [2] P. E. Czabotar, G. Lessene, A. Strasser, et J. M. Adams, « Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy », *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 15, n° 1, p. 49-63, janv. 2014, doi: 10.1038/nrm3722.

- [3] T. I. Zack *et al.*, « Pan-cancer patterns of somatic copy number alteration », *Nature Genetics*, vol. 45, n° 10, p. 1134-1140, oct. 2013, doi: 10.1038/ng.2760.
- [4] K. J. Campbell *et al.*, « Elevated Mcl-1 perturbs lymphopoiesis, promotes transformation of hematopoietic stem/progenitor cells, and enhances drug resistance », *Blood*, vol. 116, n° 17, p. 3197-3207, oct. 2010, doi: 10.1182/blood-2010-04-281071.
- [5] S. P. Glaser *et al.*, « Anti-apoptotic Mcl-1 is essential for the development and sustained growth of acute myeloid leukemia », *Genes & Development*, vol. 26, n° 2, p. 120-125, janv. 2012, doi: 10.1101/gad.182980.111.
- [6] A. Letai, M. C. Bassik, L. D. Walensky, M. D. Sorcinelli, S. Weiler, et S. J. Korsmeyer, « Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics », *Cancer Cell*, vol. 2, n° 3, p. 183-192, sept. 2002, doi: 10.1016/S1535-6108(02)00127-7.
- [7] A. Kotschy *et al.*, « The MCL1 inhibitor S63845 is tolerable and effective in diverse cancer models », *Nature*, vol. 538, n° 7626, p. 477-482, oct. 2016, doi: 10.1038/nature19830.
- [8] S. Caenepeel *et al.*, « AMG 176, a Selective MCL1 Inhibitor, is Effective in Hematological Cancer Models Alone and in Combination with Established Therapies », *Cancer Discovery*, p. CD-18-0387, sept. 2018, doi: 10.1158/2159-8290.CD-18-0387.
- [9] A. E. Tron *et al.*, « Discovery of Mcl-1-specific inhibitor AZD5991 and preclinical activity in multiple myeloma and acute myeloid leukemia », *Nature Communications*, vol. 9, n° 1, déc. 2018, doi: 10.1038/s41467-018-07551-w.
- [10] D. J. Newman et G. M. Cragg, « Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years $\pm$ », *Journal of Natural Products*, vol. 70, n° 3, p. 461-477, mars 2007, doi: 10.1021/np068054v.
- [11] F. Daessy, « Natural Sesquiterpenoids from Winteraceae of Caledonian Rainforest as covalent MCL-1 inhibitors », Submitted.
- [12] F. Daessy, « The natural product NA1-115-7 is a new MCL-1 inhibitor », In preparation.
- [13] D. Fomekong Fotsop, F. Roussi, C. Le Callonec, H. Bousserouel, M. Litaudon, et F. Guéritte, « Isolation and characterization of two new drimanes from *Zygogynum baillonii* and synthesis of analogues », *Tetrahedron*, vol. 64, n° 9, p. 2192-2197, févr. 2008, doi: 10.1016/j.tet.2007.12.022.
- [14] P. Couvreur et C. Vauthier, « Nanotechnology: Intelligent Design to Treat Complex Disease », *Pharmaceutical Research*, vol. 23, n° 7, p. 1417-1450, juill. 2006, doi: 10.1007/s11095-006-0284-8.
- [15] L. Seguy, « Safe non-hemolytic nanoemulsions as template for intravenous administration of hydrophobic APIs », Submitted.
- [16] N. Allouche, C. Apel, M.-T. Martin, V. Dumontet, F. Guéritte, et M. Litaudon, « Cytotoxic sesquiterpenoids from Winteraceae of Caledonian rainforest », *Phytochemistry*, vol. 70, n° 4, p. 546-553, mars 2009, doi: 10.1016/j.phytochem.2009.01.012.
- [17] L. Larsen, S. D. Lorimer, et N. B. Perry, « Contrasting chemistry of fruits and leaves of two Pseudowintera species: Sesquiterpene dialdehyde cinnamates and prenylated flavonoids », *Biochemical Systematics and Ecology*, vol. 35, n° 5, p. 286-292, mai 2007, doi: 10.1016/j.bse.2006.11.001.
- [18] A.-C. Groo, M. De Pascale, A.-S. Voisin-Chiret, S. Corvaisier, M. Since, et A. Malzert-Fréon, « Comparison of 2 strategies to enhance pyridoclox solubility: Nanoemulsion delivery system versus

salt synthesis », *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 97, p. 218-226, janv. 2017, doi: 10.1016/j.ejps.2016.11.025.

[19] E. Gué, M. Since, S. Ropars, R. Herbinet, L. Le Pluart, et A. Malzert-Fréon, « Evaluation of the versatile character of a nanoemulsion formulation », *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 498, n° 1-2, p. 49-65, févr. 2016, doi: 10.1016/j.ijpharm.2015.12.010.

[20] N. J. Koehl, L. J. Henze, M. Kuentz, R. Holm, et B. T. Griffin, « Supersaturated Lipid-Based Formulations to Enhance the Oral Bioavailability of Venetoclax », *Pharmaceutics*, vol. 12, n° 6, juin 2020, doi: 10.3390/pharmaceutics12060564.

[21] F. Ruchatz et H. Schuch, « Physicochemical properties of Solutol® HS 15 and its solubilizates », p. 6-7, 1998.

[22] S. Shubber, D. Vllasaliu, C. Rauch, F. Jordan, L. Illum, et S. Stolnik, « Mechanism of Mucosal Permeability Enhancement of CriticalSorb® (Solutol® HS15) Investigated In Vitro in Cell Cultures », *Pharmaceutical Research*, vol. 32, n° 2, p. 516-527, févr. 2015, doi: 10.1007/s11095-014-1481-5.

Draft

Données non publiées

Etude *in vivo*

Résultats préliminaires de l'étude *in vivo* :

Afin de pouvoir mener une étude approfondie du composé NA1-115-7, il a tout d'abord fallu récolter à nouveau la plante, qui est un arbre endémique de Nouvelle-Calédonie. Ce travail a été effectué par Vincent Dumontet (ICSN) qui a, au préalable, obtenu toutes les autorisations de récolte nécessaires. Après avoir séché et broyé les écorces, celles-ci ont été envoyées à l'ICSN afin d'être extraites par un solvant organique. L'extrait d'écorce a ensuite été purifié selon un protocole déjà mis au point (Allouche et al., 2009). Le composé NA1-115-7 est très majoritaire au sein de cet extrait (5% environ) et a pu être obtenu à l'échelle de plusieurs grammes.

La première partie de l'évaluation *in vivo* du NA1-115-7 avait pour objectif de déterminer la voie d'administration, le schéma d'administration et la dose maximum tolérée. En général pour obtenir ces informations, il est possible de s'appuyer sur les données de pharmacocinétiques (PK). Cependant, par manque de temps, nous avons dû nous passer de ces informations pour répondre à nos questions. Les nanoémulsions (NE) développées pour cette évaluation *in vivo* étaient conçues à la fois pour une administration par voie intra-veineuse (IV) et par voie *Per Os*. La seule condition pour utiliser ce type de formulation en voie IV est un bolus très lent (100µL/min), afin de limiter la toxicité locale, mais également réduire le risque d'hyperventilation déjà observée par le passé et parfois associée à la mort chez la souris. Les NEs ont donc été préparées à Caen (Eq. A. MALZERT-FREON) et divisées en deux lots : un restant à Caen, utilisé pour le dosage du NA1-115-7 encapsulé, et l'autre nous étant envoyé pour le traitement des souris. Devant les avantages de l'injection IV, nous avons tout d'abord choisi d'évaluer cette voie d'administration. Des souris *Nude*, souris présentant une modification génétique les empêchant d'avoir un thymus fonctionnel et donc par conséquent un nombre extrêmement réduit de lymphocytes T, ont été utilisées pour évaluer l'efficacité anti-tumoral du NA1-115-7. En effet, l'intérêt de ces souris immunodéficientes est que si on leur injecte des cellules tumorales humaines, celles-ci se développent, alors que ce n'est pas possible chez des souris immunocompétentes. Les souris ont donc été injectées (dose unique) avec différentes concentrations de NA1-115-7 au niveau de la veine de la queue. Cependant, malgré les faibles doses injectées, nous avons observé une forte toxicité qui se manifestait :

- Aux plus faibles concentrations par une nécrose au point d'injection
- Aux plus fortes concentrations par une mort de la souris dans les 20min qui suivait l'injection en présentant des symptômes qui pourraient être associés à une embolie pulmonaire (dyspnée, stress, sang dans les poumons après autopsie, ...).

Cette toxicité n'est pas retrouvée avec le traitement par des NE-blanches (non chargées avec le NA1-115-7) ce qui indique que la toxicité est associée au NA1-115-7 sans que nous puissions l'expliquer. Nous avons donc abandonné cette voie d'administration pour nous concentrer sur l'administration *Per*

Os. Avec ce nouveau protocole, des *Nude* ont été gavées en dose unique avec les NEs chargées de NA1-115-7 (NENA) ou avec des NE-blanches. Une dose maximale tolérée a pu être déterminée aux alentours de 40mg/kg. Cette dose étant déterminée, nous avons voulu savoir si les souris étaient capables de supporter une accumulation de cette dose avec un gavage tous les jours. Au bout de trois jours, l'expérimentation a été stoppée à la vue de signes manifestes de toxicité présentés par les souris gavées avec le NENA, mais pas avec les NE-blanches. Cette toxicité s'est traduite par différents symptômes :

- Posture voutée et recroquevillée
- Peu / pas de déplacements
- Toilettage approximatif : piloérection
- Yeux mi-clos

Ces résultats nous ont donc permis d'établir un premier schéma d'administration : Gavage à 20mg/kg de NA1-115-7 tous les trois jours, et d'écarter les soupçons de toxicité liée aux NEs.

Une fois ce protocole défini, il nous a donc fallu évaluer si, lorsque le NA1-115-7 encapsulé était administré, la molécule induisait un effet anti-tumoral. Comme modèle tumoral, nous avons choisi d'inoculer en sous-cutanée $7,5.10^6$ cellules de la lignée BL2 – avec laquelle nous avons obtenu des résultats intéressants *in vitro* – avec du MatriGel® (1:1) chez des souris *Nude*. Ce choix était aussi justifié par des expériences précédentes de l'équipe ayant utilisé des greffes de lignées de Burkitt sur des souris *Nude*. Cependant, seule une tumeur BL2 sur vingt a pris (5%), ce qui est bien trop faible pour obtenir un nombre suffisant d'animaux afin que les résultats soient significatifs. Après avoir répété l'expérience une nouvelle fois, et obtenu les mêmes résultats, nous avons donc choisi de changer de souche de souris, en utilisant des souris de type NSG (NOD scid gamma), plus immunodéprimées que les *Nude*. En effets, il s'agit de l'une des souches les plus immunodéprimées, puisque suite à plusieurs mutations, elles ne disposent ni de cellules T matures, ni de cellules B matures, ni même de NK. De plus, ces souris sont même déficientes pour la plupart des cytokines. Avec cette nouvelle souche, nous avons eu une prise de greffe de 100%. Les manipulations sont donc en cours pour évaluer l'effet anti-tumoral du NA1-115-7 lorsqu'il est administré selon le protocole défini. Les souris seront traitées *Per os*, soit avec les NE-blanches, soit avec les NENA, à une dose de 20mg/kg (ou équivalent pour les NE-blanches), tous les trois jours. Les paramètres sanguins des souris ont été déterminés (plaquettes, neutrophiles, globules rouges, ...) avant le début du traitement, et seront mesurés pour chacun des deux groupes au cours du traitement. De même, les organes vitaux (rein, rate, foie, poumon et cœur) seront prélevés et leurs poids seront comparés entre les groupes, afin de déterminer une éventuelle toxicité associée au NA1-115-7. Un suivi du poids de la souris, autre critère permettant d'évaluer au mieux l'état général de la souris, sera réalisé tous les deux jours. L'effet anti-tumoral est quant à lui déterminé de façon régulière (tous les deux jours) en mesurant la largeur (l) et la longueur (L) de la tumeur. Le volume tumoral est alors déterminé en appliquant la formule suivante :

$$Volume (en mm^3) = \frac{L \times l^2}{2}$$

Lorsque la tumeur dépasse un seuil de 2000mm³, la souris est sacrifiée et sortie de l'étude. De la même façon, si une souris présente un des signes manifestes de douleurs (apparence physique, comportement, réponse aux stimuli ...), ou une perte de poids significative (>10%), elle sera sortie de l'étude et sacrifiée.

Discussion

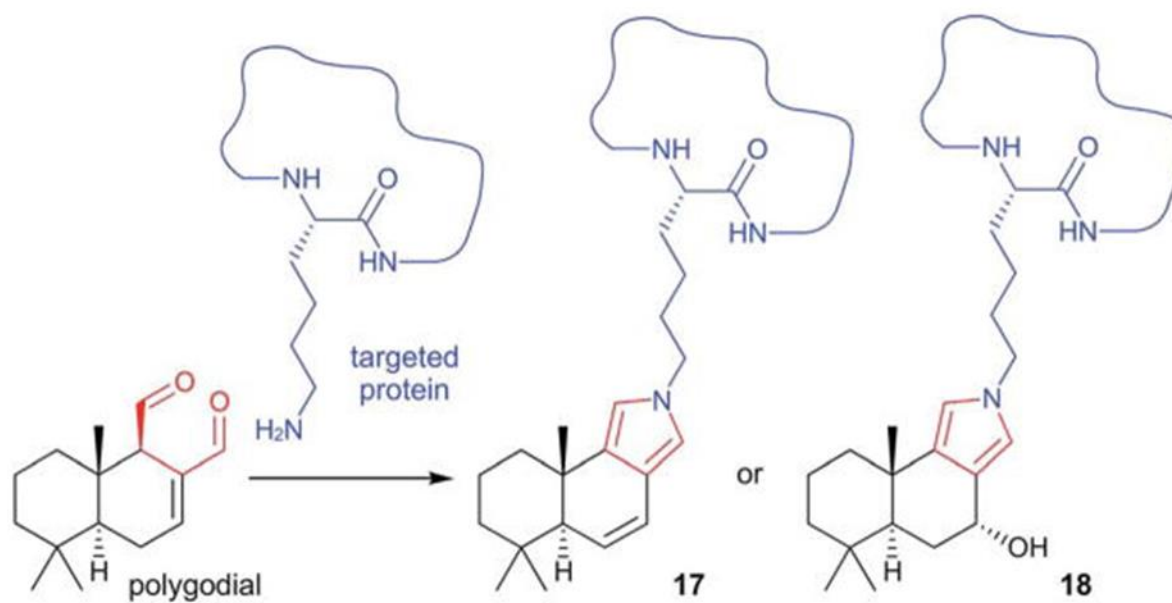


Figure 25 : Description de la réaction de Paal-Knoor d'une molécule de type polygodial avec une protéine présentant une lysine.

D'après Kornienko et al., 2017

Chapitre IV. Discussion

Les résultats obtenus au cours de ce projet de thèse ont conduit à la rédaction de trois publications dans des domaines différents : chimie, biochimie, biologie et galénique. Cependant, dans chacune des parties de ce travail, des questions se posent. Pour y répondre et mieux comprendre le mécanisme d'action précis de ce composé, des expériences complémentaires pourraient être réalisées.

Publication n°1

La première publication est axée autour de l'aspect chimique et biochimique de ce projet. Le criblage à grande échelle, réalisé à partir de l'extractothèque de l'ICSN par un test de FPA, a permis d'isoler des composés terpéniques de type drimane de deux plantes de Nouvelle-Calédonie. Parmi ceux-ci, deux composés, dont le NA1-115-7 ont montré une très bonne affinité pour MCL-1 (de l'ordre du sub-nanomolaire), une affinité moyenne pour BCL-xL et aucune affinité pour BCL-2. Ces résultats ont été confirmés par des études d'interactions avec MCL-1 et BCL-xL par résonance magnétique nucléaire (RMN). Elles ont montré que ces deux composés se lient à MCL-1 au niveau de son sillon BH3 et de confirmer que leur affinité est beaucoup plus forte pour MCL-1 que pour BCL-xL. Ces composés, dont le NA1-115-7, peuvent donc être considérés comme sélectifs de MCL-1. Dans un deuxième temps, le mode d'interaction entre MCL-1 et le NA1-115-7 a été étudié plus en détails. En effet, une étude ancienne (Cimino et al., 1987) propose que l'activité biologique des molécules de type polygodial puisse provenir de leur capacité à former une liaison covalente avec une lysine de la protéine cible. Cette liaison se ferait *via* un réarrangement de type Paal-Knorr pour conduire à un composé pyrrole. Cependant, seules quelques études expérimentales entre un polygodial simple et des molécules aminées étayaient cette hypothèse (Dasari et al., 2015). L'étude par RMN effectuée par F. Malard (ICSN) a montré que le signal de certains acides aminés (dont la lysine 134), localisés à proximité du domaine BH3 et donc du sillon hydrophobe de MCL-1, sont très affectés lors de l'addition de notre composé. Nous avons donc émis l'hypothèse que celui-ci formait, avec une lysine du sillon hydrophobe, un complexe stable et irréversible. Une expérience de MALDI (V. Guérineau, ICSN) a permis de confirmer cette hypothèse. En effet, après addition de deux équivalents de NA1-115-7 à la protéine MCL-1, nous observons, au bout de deux heures, la formation de manière quasi quantitative, d'un pic d'une masse supérieure de 380 Da, correspondant à la formation d'un adduit pyrrole. Les réactions Paal-Knorr entre une protéine et un produit naturel, ont fait l'objet d'une revue qui montre à quel point elle peut constituer un avantage pour le développement des nouvelles molécules en leur conférant un potentiel thérapeutique très intéressant (Kornienko and La Clair, 2017). Au niveau cellulaire, cette inhibition de type suicide (ou covalente) conduit à la fois à la dégradation de la cible et de la molécule inhibitrice. Bien que longtemps écarté du développement de nouvelles drogues par les industriels, à cause du risque élevé de « off-target » (non

Compound	Category/binding site	In vitro potency	In vitro or in vivo properties
AZD5991	MCL-1 inhibition via BAK-dependent mechanism/ligand-binding pocket	K_i : 200 pM IC_{50} : 0.72 nM	100% tumor regression in mouse models after single dose; synergistic in vivo efficacy with SOC regimens
S63845	Inhibition of MCL-1/BAK interaction/BH3-binding groove	K_i : <1.2 nM K_d : 0.19 nM	25 mg/kg well tolerated and highly effective against mouse tumors
S64315 (MIK665)	–	–	–
AMG 176	Selective MCL-1 inhibition/BH3-binding groove	K_i : <1 nM	Rapid and robust induction of apoptosis in tumor xenografts after a single dose
AMG 397	Selective MCL-1 inhibition/–	–	–

Figure 26 : Liste des inhibiteurs de MCL-1 actuellement en clinique.

D'après Wei et al., 2020

VU661013	MCL-1 inhibition/destabilizes BIM/MCL-1 association	K_i : 97 pM
Compound 42	Displaces BIM from MCL-1	K_i : 70–300 pM
BIM SAHB _A	Preferentially displaces BIM from MCL-1	EC_{50} : 2–18 μ M
Clinical evaluation does not appear to be progressing		
Fesik compound 53	Inhibition of MCL-1/BH3 peptide binding	K_i : 0.055 μ M
A-1210477	Inhibition of MCL-1/disrupts BIM binding	K_i : 0.0004–0.0005 μ M
Zhang compound 12	Inhibition of MCL-1/BH3 peptide binding	K_i : 0.48 μ M IC_{50} : 2.2 μ M
MIM1	Inhibition of MCL-1/BAK interaction	IC_{50} : 4.2 μ M
UMI-77	Inhibition of MCL-1/BAK interaction	K_i : 0.49 μ M
Roussi compound 2c	Inhibition of MCL-1 activity	K_i : 0.46 μ M
Cardone compound 9	Inhibition of MCL-1/BH3 peptide binding	IC_{50} : 0.31 μ M
Compound 34	Inhibition of MCL-1/disrupts BIM binding	IC_{50} : 6.1 μ M
Chai compound 7	Inhibition of MCL-1/BH3 peptide binding	K_i : 8 μ M
Pyridoclast	Inhibition of MCL-1/disrupts BIM binding	–
Liu & Wang A1	Inhibition of MCL-1/BH3 peptide binding	K_i : 0.18 μ M

Figure 27 : Liste des autres inhibiteurs de MCL-1 actuellement développés.

D'après Wei et al., 2020

spécificité) et d'hépatotoxicité (Singh et al., 2011), ce type de mécanisme présente, comme le décrit Ghosh et al., et Singh et al., de nombreux avantages (Ghosh et al., 2019) :

- Une forte affinité pour la cible.
- Un effet prolongé chez les patients puisque l'inhibiteur n'est pas éliminé par la circulation sanguine (données PK/PD différentes des inhibiteurs non-covalents).
- Un risque limité de résistance acquise. Il a d'ailleurs été démontré que ces composés sont bien plus efficaces sur les cellules qui ont acquis une résistance après traitement avec un inhibiteur non-covalent (Kwak et al., 2005).

Sur les 39 molécules covalentes approuvées par la FDA en 2011, 20% sont utilisées dans la lutte contre le cancer. L'intérêt récent pour ce type de molécules s'est traduit par le développement de plusieurs inhibiteurs covalents des protéines kinases (EGFR, BTK, ...) et des protéines de la famille RAS, par exemple (Ghosh et al., 2019).

Pour déterminer de manière non ambiguë la structure de l'adduit formé entre une lysine et le NA1-115-7, la réaction décrite en figure 25, a été reproduite au laboratoire. Du NA1-115-7 a été agité à température ambiante avec de la lysine (deux équivalents) dans un mélange de dichlorométhane et d'eau. Après purification, une molécule a été obtenue avec un rendement de 25%. Il s'agit du composé qui a subi un réarrangement de Paal-Knorr suivi de l'addition d'un deuxième équivalent de lysine. Contrairement à l'expérience de MALDI, qui montre que le NA-1-115-7 se lie de manière covalente à MCL-1 en moins de deux heures, la réaction avec la lysine dure 48h. Cela indique clairement que l'affinité de notre composé pour le sillon hydrophobe de MCL-1 favorise la réaction de Paal-Knorr, et donc par conséquent, que cette molécule ne risque pas de réagir avec l'ensemble des lysines exposées par les différentes protéines de l'organisme. Ces données indiquent aussi que le composé NA1-115-7 est une molécule « suicide » (une fois fixée à la cible elle est dégradée avec). A notre connaissance, il s'agit du premier BH3-mimétique suicide.

L'importance de MCL-1, cette protéine anti-apoptotique de la famille BCL-2, dans la survie de nombreux types de cancer, et en particulier dans les hémopathies malignes, est bien avérée (Glaser et al., 2012; Gong et al., 2016). De même, son implication dans les résistances aux traitements (Michels et al., 2014; Trivigno et al., 2012; Wertz et al., 2011) et dans les rechutes (Guillème-Toumi et al., 2005) est très bien documenté. MCL-1 est également responsable de certaines résistances aux BH3-mimétiques ciblant BCL-2 et/ou BCL-xL (van Delft et al., 2006; Lin et al., 2016), ce qui suggère qu'une combinaison entre des BH3-mimétiques ciblant BCL-2 et MCL-1 pourrait être d'un grand intérêt thérapeutique (Li et al., 2019). L'ensemble de ces caractéristiques de MCL-1 ont incité plusieurs équipes à développer des inhibiteurs spécifiques comme le présente les Figure 26 et 27. Parmi ceux-ci, trois composés ont été produits par des compagnies pharmaceutiques : AZD-5991 (Astrazeneca) ; AMG176 (Amgen) et S63845 (Servier). Tous trois ont montré des résultats pré-cliniques encourageants, mais

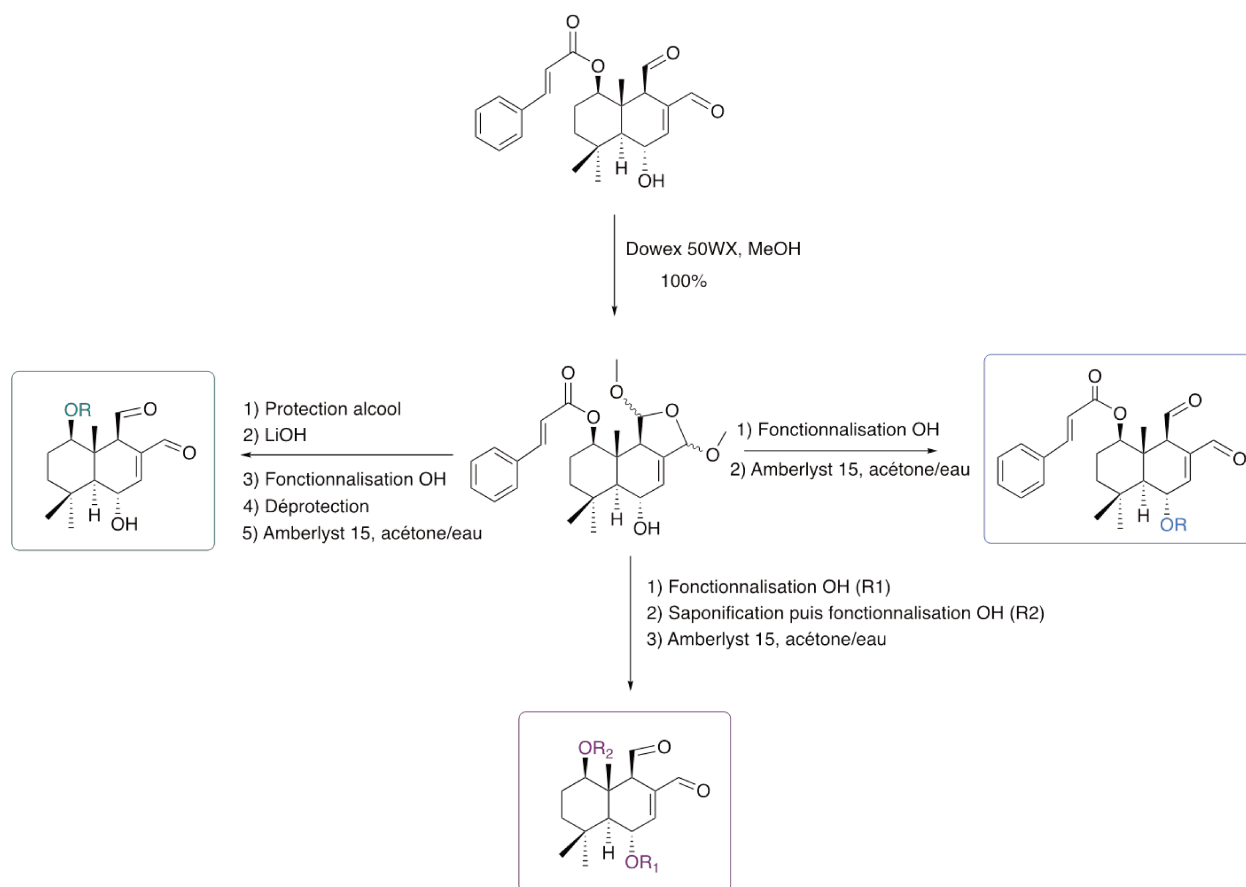


Figure 28 : Ensemble des modifications chimiques envisageables afin de valoriser au maximum le NA1-115-7

semblent confrontés aujourd'hui à des difficultés lors de leur développement clinique, attestées notamment par l'arrêt provisoire de certaines évaluations cliniques. Les causes de ces arrêts sont confidentielles, mais il est possible de suspecter une toxicité chez les patients. Une cardiotoxicité a notamment obligé Amgen à suspendre son essai clinique NCT03465540. Le problème de cardiotoxicité avait déjà été abordé, lorsque le rôle de MCL-1 dans les cardiomyocytes a été découvert (Wang et al., 2013). Wei et *al.* souligne à juste titre qu'il faudra déterminer, en clinique, pour chacun des composés ciblant MCL-1, une fenêtre thérapeutique présentant un profil de toxicité acceptable aux vues des multiples implications physiologiques de MCL-1 (Wei et al., 2020).

Dans ce contexte, il est donc important de développer de nouveaux outils, ou de nouvelles stratégies, qui permettraient de continuer à cibler MCL-1, tout en limitant les effets secondaires qui y sont associés. Des systèmes de vectorisation, par des anticorps par exemple (ADC), permettrait d'augmenter le ciblage des cellules tumorales, préservant au passage les cellules cardiaques. Le développement de composés moins toxiques, possédant un mécanisme d'action original (molécule suicide par exemple), représenterait également une alternative aux molécules déjà développées.

Concernant les perspectives associées au NA1-115-7, il serait intéressant de moduler la structure de ce composé, tout en conservant la base de la structure du drimane. Cela permettrait d'améliorer son affinité pour la protéine MCL-1, ainsi que sa spécificité. Différentes fonctionnalisations peuvent alors être envisagées au niveau de l'alcool libre et/ou de l'alcool engagé dans une fonction ester. En effet, il est possible de protéger les deux aldéhydes et de les déprotéger dans des conditions douces. Cela pourrait nous donner accès, en relativement peu d'étapes, à différentes librairies de molécules (Figure 28). Il serait également possible d'envisager d'y greffer un fluorophore. La synthèse d'un analogue fluorescent permettrait de faire des expériences de co-localisation avec la mitochondrie et de vérifier sa spécificité (*in vitro*), mais également de mieux comprendre le comportement du NA1-1157 *in vivo*, en le localisant dans l'organisme.

Publication n°2

Par la suite, nous avons évalué l'efficacité et la toxicité du composé NA1-115-7 et déterminé son mécanisme d'action *in vitro* (publication n°2).

Dans un premier temps, nous avons montré que l'affinité et la sélectivité de ce composé pour MCL-1, se traduit par une cytotoxicité spécifique. Nos expériences nous ont permis de démontrer que le composé NA1-115-7 est cytotoxique uniquement pour les lignées MCL-1-dépendantes, et ce, de façon rapide (24h), et avec une LC50 faible. Dans ces cellules, NA1-115-7 induit la voie mitochondriale de l'apoptose.

Dans le but de caractériser le mécanisme d'action de notre molécule, nous avons ensuite montré que le maximum d'effet est possible après une incubation de seulement 2h des cellules avec le NA1-115-7 (analyse de l'apoptose à 24h). Un résultat similaire avait déjà été observé avec le composé d'Amgen (Caenepeel et al., 2018). Cela s'explique par la fixation rapide du NA1-115-7 sur MCL-1. Celle-ci peut également être confirmée par la rupture du complexe MCL-1/BAK, dès 4h, comme le montrent les résultats de co-immunoprécipitations. Ces résultats complètent ceux obtenus par RMN qui ont montré que la fixation du NA1-115-7 sur MCL-1 se fait au niveau du sillon-hydrophobe. Ce composé agirait donc comme un BH3-mimétique puisqu'il présente de nombreuses caractéristiques qui leur sont classiquement associées :

- Une affinité très forte pour MCL-1
- L'engagement de MCL-1 dans les cellules (la cible est atteinte dans les cellules)
- Une cytotoxicité rapide, dirigée uniquement contre les lignées dépendantes de MCL-1

Il nous reste à démontrer formellement que l'apoptose induite est bien dépendante de BAX et de BAK. En effet, il s'agit d'une, et pas des moindres, caractéristique des BH3-mimétiques. Pour le moment nous n'avons pas pu obtenir de modèles cellulaires nous permettant de valider ou non cette hypothèse, mais il s'agira de l'une des priorités pour le futur. Si cette dépendance est établie, cela suggérerait que notre composé interagit uniquement avec MCL-1, et qu'il n'impliquerait pas d'autres voies de signalisations pour induire l'apoptose.

Nous avons ensuite montré que la liaison du NA1-115-7 avec MCL-1 entraîne dans un premier temps une stabilisation, puis une dégradation de la protéine, des résultats déjà observés avec l'AMG-176 (Caenepeel et al., 2018), et avec le S63845 (Kotschy et al., 2016). Comme nous l'avons démontré par les expériences de MALDI, l'interaction de notre composé avec MCL-1 est cependant plus complexe que celle de ces deux molécules. Bien que ciblant le sillon hydrophobe, notre composé se lie de façon covalente avec la protéine. Cette propriété originale est très intéressante et permet de positionner notre molécule différemment de celles déjà développées jusqu'ici. En effet, le caractère suicide du NA1-115-7 ne permet pas de cibler des tumeurs qui surexpriment massivement MCL-1 car les doses nécessaires à sa saturation pourraient être très importantes et donc éventuellement toxiques. Contrairement aux molécules S63845, AMG-176 ou AZD-5991, la monothérapie dans ce type de tumeurs ne serait pas efficace. Par contre, ce composé pourrait jouer un rôle de molécule sensibilisatrice pour, par exemple, prévenir des résistances de MCL-1 au Venetoclax®. Une autre possibilité pourrait être le traitement des MM, qui sont principalement dépendant de MCL-1 mais qui ne présentent pas d'amplification du bras 1q et donc ne surexpriment pas MCL-1 (Seiller et al., 2020).

Nous avons également montré qu'un traitement avec le NA1-115-7 induit l'activation de BAK et de BAX, ainsi que la relocalisation de BAX à la membrane mitochondriale. Si l'activation de BAK est attendue, puisque BAK interagit directement avec MCL-1 (Cuconati et al., 2003; Willis et al., 2005),

l'activation et la relocalisation de BAX est plus surprenante. En effet, il semblerait qu'aucune interaction directe n'existe entre MCL-1 et BAX. Cependant, il a déjà été mis en évidence que de fortes concentrations de MCL-1 inhibent le changement conformationnel de BAX, et que des concentrations plus faibles sont capables d'inhiber la formation d'oligomères de BAX (Germain et al., 2008). Par ailleurs le processus d'anoïkis, une forme d'apoptose dépendante de BAX, qui intervient lorsqu'une cellule se détache de sa matrice, peut être induite par la dégradation de MCL-1 et la présence de BIM. Cela suggère donc que l'inhibition/dégradation de MCL-1, permettrait à BIM d'activer BAX (Rennebeck et al., 2005). Cette interaction indirecte entre MCL-1 et BAX, empêchant l'activation et la translocation de BAX vers la mitochondrie avait déjà été évoquée par Germain et *al.* Ils avaient montré que la fonction anti-apoptotique de MCL-1 requiert même la présence de BAX, et semble également impliquée dans ces de l'anti-apoptotique BCL-xL, à travers la protéine BH3-only BAD (Germain et al., 2008). L'implication de BAD et/ou de BIM reste malgré tout controversée et d'autres équipes de chercheurs qui ont étudié ce sujet soulignent l'importance du type de cancer. En effet, dans certains cancers dits « solides » il semblerait que les interactions entre pro- et anti-apoptotiques soient différentes de celles présentées précédemment. Cela aurait pour conséquences l'induction d'une apoptose indépendante des BH3-only, notamment de BIM et BAD lors du ciblage pharmacologique de MCL-1 et BCL-xL dans ces tumeurs (Greaves et al., 2019). Ces travaux confirment cependant l'importance de l'inhibition de MCL-1 pour rétablir l'apoptose dans ce type de cancer, mais aussi le fait que cette apoptose est indépendante de BAK mais pas de BAX. L'activation de BAX, même si elle n'est pas directe, joue donc un rôle important dans l'apoptose induite par l'inhibition de MCL-1. Nous ne sommes d'ailleurs pas les premiers à montrer que le ciblage de MCL-1 par un BH3-mimétique est associé à une activation de BAX. En effet, lors de la 5^{ème} conférence annuelle de l'ESH (European School of Hematology ; Lisbonne, 2019), Strasser et *al.* ont présenté des résultats obtenus avec le S63845 qui mettaient en évidence que la perte de BAX dans des cellules de lymphomes, conférait une résistance à cet anti-MCL-1 (Strasser, 2019). Comprendre comment MCL-1 est impliquée dans la résistance à l'apoptose dépendante de BAX serait un point intéressant pour mieux comprendre le mécanisme d'action de notre composé, ainsi que celui de tous les BH3-mimétiques ciblant MCL-1.

Par ailleurs, les interrogations concernant BAX ne s'arrêtent pas là : la façon dont elle forme des complexes, seule ou avec BAK, pour perméabiliser la membrane est sujette à des controverses. Depuis quelques temps, l'idée généralement admise que BAX et BAK forment uniquement des homodimères pour perméabiliser la membrane mitochondriale est peu à peu remise en question. Une étude récente démontre d'ailleurs que BAX activée était capable de former un hétérodimère avec BAK après un traitement combiné de S63845 et de Venetoclax (Seiller et al., 2020). Cette coopération entre BAX et BAK peut aussi être associée à d'autres signaux apoptotiques que ceux induits par l'inhibition de MCL-1 et BCL-2. Ainsi une étude de notre équipe a montré que l'induction de l'apoptose de cellules de lymphomes de Burkitt par la vérotoxine impliquait à la fois des homodimères de BAK et BAX

contribuant au relargage initial du cytochrome c et de SMAC/DIABLO de la mitochondrie et des hétérodimères BAX/BAK amplifiant ce processus (Debernardi et al., 2018). Enfin une autre équipe a montré des résultats similaires après un traitement avec du TNF- α (Sundararajan et al., 2001). Par ailleurs l'analyse de BAX en microscopie à super-résolution a aussi montré dans la membrane de la mitochondrie, la présence de grandes structures en forme d'anneaux de taille homogène mais également hétérogène, qui pourraient refléter l'assemblage d'homodimères et d'hétérodimères (Große et al., 2016; Salvador-Gallego et al., 2016). Cela serait donc intéressant de creuser ces questions afin de mieux comprendre ce processus.

En plus de son originalité de fixation (molécule suicide), une des autres caractéristiques importantes du NA1-115-7, lui permettant de se démarquer des autres composés développés, est sa très faible toxicité *in vitro*. Celle-ci a été mise en évidence au niveau des cellules sanguines humaines saines (globules rouges, PBMC ou encore plaquettes), des résultats qui n'ont pas été publiés pour la molécule AZD-5991 (Tron et al., 2018) ni pour le S63845 (Kotschy et al., 2016). De plus, la suppression de MCL-1 au niveau physiologique, a des répercussions délétères pour le cœur comme le montre les articles de Thomas et al. et Wang et al., ce qui a terme, peut être un véritable problème pour le développement clinique des inhibiteurs de MCL-1 (Thomas et al., 2013a; Wang et al., 2013). Nous avons également démontré l'absence de cardiotoxicité du NA1-115-7 *in vitro*. Outre son implication au niveau sanguin et cardiaque, MCL-1 joue un rôle important au niveau du foie, des cellules souches et du cerveau (Cazanave and Gores, 2009; Hasan et al., 2013; Hikita et al., 2009; Rasmussen et al., 2018), il serait alors intéressant de confirmer que, comme d'autres drimanés étudiés par Fratoni et al., notre composé ne présente pas de toxicité dans ces organes (Fratoni et al., 2018).

Publication n°3

Les résultats *in vitro* obtenus avec le NA1-115-7 étant convaincants, nous avons donc décidé d'évaluer sa toxicité *in vivo*. Les deux principaux inconvénients de ce composé sont sa faible solubilité en milieu aqueux (comme 50% des molécules qui entrent en développement pré-clinique), mais aussi son instabilité (notamment à pH acide) comme a pu le montrer Fomekong et al. (Fomekong Fotsop et al., 2008). Pour l'évaluation *in vitro* ces inconvénients n'ont pas posé de problèmes puisque le composé était dilué dans du DMSO, non toxique lorsqu'il est utilisé à une concentration finale de 0,1%. En revanche, il a été nécessaire de travailler sur une formulation adaptée pour l'évaluation *in vivo* et de la valider. C'est ce travail qui fait l'objet de la troisième publication.

La solubilité d'un composé dans une formulation donnée est l'une des propriétés les plus importantes pour déterminer la voie d'administration (Bergström et al., 2014). Afin de trouver la formulation adéquate pour ce composé sensible en conditions acides, nous avons établi une collaboration avec l'équipe du Dr MALZERT-FREON (CERMN). Celle-ci a encapsulé le NA1-115-7 en utilisant une technologie innovante : les nano-émulsions (NE) versatiles (Gué et al., 2016). Ces dernières années les

systèmes de délivrance de drogues à l'échelle nanométrique se sont développés (Mazzaferro et al., 2013), permettant d'augmenter la biodisponibilité de nombreuses molécules (Cui et al., 2019; Ezzat et al., 2019; Groo et al., 2015; Youssef et al., 2018). Après une évaluation de la stabilité du NA1-115-7 encapsulé, dans différents milieux biomimétiques, nous avons cherché à évaluer la toxicité intrinsèque de ces NEs. Nous avons ainsi pu détecter une toxicité induite par l'un des constituants, le Kolliphor. Pour s'en affranchir, nous avons déterminé un seuil minimum de chargement du NA1-115-7, dans ces NEs. Nous avons également démontré que le NA1-115-7 encapsulé n'entraînait pas plus de toxicité sur les cellules saines que sa forme libre, et que l'apoptose induite dans les cellules tumorales était une conséquence de l'activation de la voie mitochondriale de l'apoptose. Lorsque le composé est encapsulé, un traitement à une concentration de 2 μ M permet d'obtenir des résultats similaires à ceux obtenus avec 4 μ M de composé libre. Cela peut s'expliquer tout d'abord par le fait que les NEs protègent et stabilisent le composé, permettant ainsi d'augmenter sa stabilité dans les différents milieux bio-mimétiques. D'autre part, les NEs sont composées de Kolliphor® HS15, ce qui améliore sa pénétration cellulaire. En effet, les NEs sont capables d'interagir avec les phospholipides et d'autres constituants de la membrane cellulaire, mais également avec la matrice extracellulaire. Cette interaction augmente le phénomène d'absorption cellulaire par un phénomène d'endocytose, et donc par la même occasion, augmente sa biodisponibilité.

Cette augmentation d'activité a également été observée lors de l'encapsulation du Pyridoclast, un autre inhibiteur de MCL-1, par la même stratégie (Groo et al., 2017). Son activité anti-tumorale sur des cellules du cancer de l'ovaire est augmentée de 2,5 fois, comparée à sa forme libre. Cette activité a également été mesurée par l'activation des caspases 3 et 7 et l'apoptose en temps réel a pu être visualisée par imagerie (Groo et al., 2020). Que ce soit avec le NA1-115-7 ou le Pyridoclast, le fait d'encapsuler ces composés dans des NEs augmente donc leur efficacité.

Ce type de formulation permet d'envisager à la fois le gavage *Per Os* (car elle le protège d'un pH acide) mais également la voie intra-veineuse (IV) (Gué et al., 2016). La première permet une administration facile et répétable, mais permet également de baisser la pénibilité et le coût du traitement (Thanki et al., 2013). En revanche, la présence de nourriture dans l'estomac, peut perturber la stabilité des NEs (Groo et al., 2017). A l'inverse, l'IV ne présente pas cette première clairance hépatique, ni même le contact avec les sucs gastriques. En revanche, l'administration est plus compliquée, difficilement répétable et peut causer certains dommages au niveau du point d'injection. Dans notre cas, nous n'avons pas eu le choix car nous avons constaté que l'administration IV de ces NEs chargées avec le NA1-115-7 était associée à une très forte toxicité (probablement une embolie pulmonaire) entraînant la mort ou l'obligation d'euthanasier l'animal (données non présentées). Les raisons exactes de cette toxicité ne sont pas connues mais nous pouvons émettre certaines hypothèses. Bien que les NEs aient été développées pour prévenir certains risques comme l'hémolyse, fréquente avec ce type de formulation (Haley and Frenkel, 2008), elles n'ont pas été développées pour prévenir les risques d'interactions avec

les plaquettes. Les NEs pourraient donc former des caillots, entraînant des occlusions (Yuan et al., 2008). L'absence de toxicité du groupe contrôle NE blanches indique cependant qu'il s'agirait d'un mécanisme, impliquant la présence du NA1-115-7. D'ailleurs, nous ne pouvons pas être sûrs que le NA1-115-7 se trouve bien entièrement dans le cœur de la NE, ou qu'il n'est pas relargué de façon précoce. Si cela était le cas, cette présence de NA1-115-7 en forte concentration dans le sang pourrait très bien être associée à une toxicité. Les variations du pH (Kuentz, 2008), ou l'action d'enzymes comme les lipases (Ozturk et al., 2015) sont des paramètres bien connus qui entraînent une libération précoce des drogues contenues dans les NEs.

La voie IV a donc été abandonnée. Dans notre cas, les NEs sont formées avec du polyéthylenglycol (PEG), ce qui permet de diminuer les interactions des NEs avec les enzymes digestives et donc de prévenir une dégradation par le tractus gastro-intestinal. Cela améliore également la pénétration de la muqueuse (Groo et al., 2014; Palacio et al., 2016). Une administration *Per Os* est donc tout à fait envisageable avec ce type de formulation, et a donc été sélectionnée pour l'évaluation *in vivo* du NA1-115-7.

Perspectives liées au développement vivo

Les effets du NA1-115-7 encapsulé dans des NEs sont actuellement évalués sur des greffes de tumeurs BL2 faites sur des souris de souche NSG car les cellules BL2 n'ont pas formé de tumeurs chez les souris de la souche *Nude*. Ces résultats peuvent s'expliquer par le fait que les souris NSG sont plus immunodéprimées que les *Nude*, qui disposent de cellules B et NK (natural killer) actives, mais pas de cellules T (même si leur nombre a tendance à augmenter avec l'âge) (Okada et al., 2019). Une autre étude avait d'ailleurs déjà montré que les cancers hématologiques ne formaient pas de tumeurs chez les souris *Nude*, à l'inverse des NSG (Shultz et al., 2014).

D'autres modèles de xénogreffes auraient également pu être utilisés. Des modèles plus innovants et plus représentatifs des cancers hématologiques ont également été développés. Par exemple, le développement *in vivo* d'AZD5991, a été réalisé sur un modèle d'AML dit « disséminé » (Tron et al., 2018). Dans ce type de modèle murin, les cellules cancéreuses sont injectées directement dans la circulation sanguine, ce qui est plus représentatif de ce type de cancer. Après traitement, la moelle osseuse et le sang périphérique sont collectés afin de détecter ou non la présence de ces cellules cancéreuses et donc déterminer l'effet anti-tumoral du produit.

Si nous continuons d'aborder les questions du modèle murin, celui-ci, tel qu'il est utilisé n'est pas forcément le plus adapté. Par exemple, pour les composés AZD-5991 et S63845, les toxicités ont été déterminées *in vivo*, chez la souris. Or la protéine MCL-1 d'origine murine est très différente de celle d'origine humaine (Kotschy et al., 2016), et il est donc peu probable que l'absence de toxicité trouvée chez la souris puisse être retranscrite chez l'humain. La toxicité de notre composé a également été évaluée chez la souris. Mais ces résultats peuvent être plus facilement retranscrits chez l'humain puisque

le NA1-115-7 présente une affinité pour la protéine MCL-1 murine supérieure à celle observée pour la protéine humaine (données non présentées). Une autre équipe a déjà évalué la toxicité d'un drimane, ayant une structure proche de celle du NA1-115-7, *in vivo* sur le rat. La protéine MCL-1 de cette espèce est très proche de celle présente chez l'humain. Aucune toxicité de ce composé (par ailleurs sans affinité démontrée pour MCL-1) n'avait pu être mise en évidence envers les principaux organes (cœur, poumon, foie, rate et rein), lors d'un traitement à 2g/kg (Fratoni et al., 2018). Ces résultats confortent les nôtres quant à l'absence de toxicité du NA1-115-7. Pour évaluer pré-cliniquement les inhibiteurs potentiels de MCL-1, le rat est certes une alternative, mais les souris humanisées pour MCL-1, développées et produites au WEHI (Melbourne, Australie) semblent être un outil encore plus intéressant. Les expériences menées par Amgen confirment d'ailleurs l'intérêt de leur utilisation dans la détection des toxicités, puisqu'ils ont montré que lors de leur traitement, par AMG-176, le nombre de cellules B, de monocytes et de neutrophiles était affecté, alors qu'il ne l'était pas lors du traitement de souris WT (Caenepeel et al., 2018). Les travaux sur ces souris humanisées ont également permis d'établir une dose maximum tolérée de S63845 bien plus basse (12.5 mg/kg) que celle déterminée sur des souris WT (40 mg/kg) (Brennan et al., 2018).

Aujourd'hui, les expériences *in vivo* sont toujours en cours mais il est d'ores et déjà envisageable de mettre au point différentes stratégies afin d'améliorer les effets antitumoraux observés :

- En améliorant le schéma d'administration. L'absence de données de pharmacocinétique (PK) ou de pharmacodynamique (PD), ne nous a pas permis d'établir de façon optimale un schéma d'administration. La dose maximale tolérée étant aux alentours de 40mg/kg, nous avons pris le parti de traiter tous les 3 jours à 20 mg/kg. Il reste cependant possible qu'une dose plus importante, ou bien une fréquence de traitement plus élevée, n'auraient pas été associées à une toxicité. D'autres schémas d'administration devront donc être testés.

- En fonctionnalisant les NEs. Le récepteur au folate (ou acide folique) est fréquemment surexprimé à la surface des cellules cancéreuses (Cheung et al., 2016). Son ciblage actif, en ajoutant du folate sur les NEs, permet de faciliter l'absorption par différents mécanismes tels que la phagocytose ou l'endocytose (Tomasina et al., 2013a). Il a d'ailleurs déjà été démontré que les vecteurs agrémentés d'acide folique étaient mieux internalisés dans les cellules de lymphomes B surexprimant ces récepteurs (Qiu et al., 2018). L'utilisation de l'acide folique présente de nombreux avantages : une très forte affinité pour son récepteur ($K_d \sim 10^{-10}$ M), une très petite taille (441.4 g/mol), une faible immunogénicité, une bonne stabilité, et pour finir une bonne compatibilité avec les solvants aqueux et organiques. Son coût, relativement abordable et sa disponibilité sont également des avantages à son utilisation. Différentes stratégies ont été mises en place pour le lier aux NEs (Zalipsky et al., 2004). Parmi elles, une stratégie rapide et facile consiste à décorer des nanoparticules avec un dérivé du folate, simplement en injectant ce dérivé (folic acid-polyethylene glycol 2000-distearylphosphatidylethanolamine, FA-PEG-DSPE) à la

préparation initiale. Cette approche permet un positionnement exclusif du folate à l'extérieur des nanoparticules (Tomasina et al., 2013b). Grâce à cela, les nanoparticules atteignent rapidement les cellules cancéreuses et peuvent être internalisées par une voie d'endocytose dépendante des récepteurs au folate permettant ainsi une délivrance rapide de la drogue. Nous supposons que le même effet est à prévoir avec nos NEs couplées au folate.

- En trouvant un modèle d'hémopathie maligne plus adapté. En effet, la compréhension du mécanisme d'action de notre composé nous a permis d'identifier certaines contraintes à son utilisation. Il est donc important de trouver un modèle dépendant de MCL-1 mais qui ne surexprime pas la protéine, comme les MM. Une autre perspective est portée par les modèles résistants aux autres BH3-mimétiques, et notamment au Venetoclax. NA1-115-7 pourrait alors être utilisé dans un premier temps, en tant que molécule sensibilisatrice.

- En combinant les NENA avec d'autres traitements. En effet jusqu'ici, même si l'utilisation des inhibiteurs de MCL-1 en monothérapie présente des résultats intéressants, son utilisation en combinaison avec d'autres BH3-mimétiques ou avec des traitements classiques (chimiothérapies, radiothérapies...) semble encore plus intéressante. Tout d'abord dans le cas où il est avéré que MCL-1 joue un rôle essentiel dans la résistance au Venetoclax®, il a été montré que l'inhibition de MCL-1 induisait une meilleure efficacité de ce BH3-mimétique ciblant BCL-2 dans les LAM (Luedtke et al., 2017). De même, un inhibiteur de MCL-1, lorsqu'il était couplé à l'ABT-737, un inhibiteur dual BCL-2/BCL-xL, pouvait palier aux résistances de lignées hématologiques résistantes à l'ABT-737 (Doi et al., 2012). Pour cela, les nouvelles molécules BH3-mimétiques développées, ont souvent été testées en combinaison avec le Venetoclax®, et les résultats présentés sont très encourageants (Algarín et al., 2020; Caenepeel et al., 2018; Li et al., 2019; Tron et al., 2018). Des essais cliniques entre ces nouvelles molécules et l'ABT-199 (NCT03218683 ; NCT03672695 ; NCT03797261) ont donc été démarrés. Dans le cas d'une combinaison avec une chimiothérapie, il a déjà été démontré qu'une diminution de l'expression de MCL-1, combinée avec les chimiothérapies classiques était bénéfique (Brinkmann et al., 2017). Un essai clinique a donc également été lancé entre AMG-176 et l'azacitidine (NCT02675452). Il existe moins de données concernant une combinaison entre un inhibiteur de MCL-1 et un traitement par radiothérapie, même si cela a déjà été démontré comme bénéfique (Wei et al., 2015).

Il serait donc intéressant d'utiliser l'une de ces stratégies pour notre molécule afin d'augmenter son effet antitumoral et de la proposer comme une vraie alternative aux molécules en cours de développement.

Pour finir sur les perspectives de développement de cette molécule, il est intéressant de revenir sur le modèle d'étude. Comme tous les BH3-mimétiques ciblant MCL-1 développés, le choix des hémopathies malignes a été privilégié. Cela se justifie notamment par le rôle omniprésent de MCL-1 dans ces pathologies (Wei et al., 2020). Cependant l'action de MCL-1 est beaucoup plus vaste et ne se limite pas

aux cancers sanguins (Beroukhi et al., 2010). Combiner ces BH3-mimétiques avec d'autres molécules permettrait de cibler les cancers solides résistants ou en rechute, qui présentent une dépendance à MCL-1. Des études pré-cliniques vont d'ailleurs dans ce sens, comme par exemple la combinaison de AMG-176 avec le trametinib (un inhibiteur de MEK), qui permet de meilleurs résultats que le trametinib en monothérapie, dans le cancer du poumon (Nangia et al., 2018). L'utilisation des NEs couplées au folate serait aussi un avantage dans le ciblage de ces cellules, qui pour la plupart surexpriment les récepteurs à l'acide folique.

Bien que nous ayons beaucoup travaillé au développement de ce composé, ce qui a porté ces fruits puisqu'il représente une vraie alternative aux autres inhibiteurs en cours de développement, notamment par son originalité (d'origine, de fixation, de toxicité ...), un travail d'optimisation reste à faire pour en tirer tout son potentiel. Démontrer qu'il s'agit bien d'un véritable BH3-mimétique entraînant une apoptose dépendante de BAX et BAK est évidemment la priorité. Il s'ensuivra une évaluation *in vivo* plus approfondie permettant de déterminer dans quel contexte son utilisation est la plus intéressante. Pour finir, son système de fixation covalente à sa cible pourrait nous inciter à faire un vrai travail de modulation de la molécule, en jouant sur sa structure, afin, par exemple, d'augmenter son affinité et donc de développer un dérivé encore plus intéressant.

Ce composé devra encore franchir plusieurs étapes supplémentaires dans son développement pour atteindre la phase clinique.

Bibliographie

Chapitre V. Bibliographie

Abou Samra, A., Robert, A., Gov, C., Favre, L., Eloy, L., Jacquet, E., Bignon, J., Wiels, J., Desrat, S., and Roussi, F. (2018). Dual inhibitors of the pro-survival proteins Bcl-2 and Mcl-1 derived from natural compound meiogynin A. *Eur. J. Med. Chem.* *148*, 26–38.

Abou-Samra, A. (2017). Conception, synthèse et évaluation biologique d'inhibiteurs des protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2. Paris-Saclay.

Aichberger, K.J., Mayerhofer, M., Krauth, M.-T., Skvara, H., Florian, S., Sonneck, K., Akgul, C., Derdak, S., Pickl, W.F., Wacheck, V., et al. (2005). Identification of mcl-1 as a BCR/ABL-dependent target in chronic myeloid leukemia (CML): evidence for cooperative antileukemic effects of imatinib and mcl-1 antisense oligonucleotides. *Blood* *105*, 3303–3311.

Akgul, C., Moulding, D.A., White, M.R., and Edwards, S.W. (2000a). In vivo localisation and stability of human Mcl-1 using green fluorescent protein (GFP) fusion proteins. *FEBS Lett.* *478*, 72–76.

Akgul, C., Turner, P.C., White, M.R.H., and Edwards*, S.W. (2000b). Functional analysis of the human MCL-1 gene: *Cell. Mol. Life Sci.* *57*, 684–691.

Akhlaquer Rahman, M., Harwansh, R., Aamir Mirza, M., Hussain, S., and Hussain, A. (2011). Oral Lipid Based Drug Delivery System (LBDDS): Formulation, Characterization and Application: A Review. *Curr. Drug Deliv.* *8*, 330–345.

Algarín, E.M., Díaz-Tejedor, A., Mogollón, P., Hernández-García, S., Corchete, L.A., San-Segundo, L., Martín-Sánchez, M., González-Méndez, L., Schoumacher, M., Banquet, S., et al. (2020). Preclinical evaluation of the simultaneous inhibition of MCL-1 and BCL-2 with the combination of S63845 and venetoclax in multiple myeloma. *Haematologica* *105*, e116–e120.

Allouche, N., Apel, C., Martin, M.-T., Dumontet, V., Guéritte, F., and Litaudon, M. (2009). Cytotoxic sesquiterpenoids from Winteraceae of Caledonian rainforest. *Phytochemistry* *70*, 546–553.

Anilkumar, U., Khacho, M., Cuillerier, A., Harris, R., Patten, D.A., Bilen, M., Iqbal, M.A., Guo, D.Y., Trudeau, L.-E., Park, D.S., et al. (2020). MCL-1Matrix maintains neuronal survival by enhancing mitochondrial integrity and bioenergetic capacity under stress conditions. *Cell Death Dis.* *11*.

Apel, C., Gény, C., Dumontet, V., Birlirakis, N., Roussi, F., Pham, V.C., Doan Thi Mai, H., Nguyen, V.H., Chau, V.M., and Litaudon, M. (2014). Endiandric Acid Analogues from *Beilschmiedia ferruginea* as Dual Inhibitors of Bcl-xL/Bak and Mcl-1/Bid Interactions. *J. Nat. Prod.* *77*, 1430–1437.

Arbour, N., Vanderluit, J.L., Le Grand, J.N., Jahani-Asl, A., Ruzhynsky, V.A., Cheung, E.C.C., Kelly, M.A., MacKenzie, A.E., Park, D.S., Opferman, J.T., et al. (2008). Mcl-1 is a key regulator of apoptosis during CNS development and after DNA damage. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *28*, 6068–6078.

Azmi, M.N., Péresse, T., Remeur, C., Chan, G., Roussi, F., Litaudon, M., and Awang, K. (2016). Kingianins O–Q: Pentacyclic polyketides from *Endiandra kingiana* as inhibitor of Mcl-1/Bid interaction. *Fitoterapia* *109*, 190–195.

Bae, J., Leo, C.P., Hsu, S.Y., and Hsueh, A.J.W. (2000). MCL-1S, a Splicing Variant of the Antiapoptotic BCL-2 Family Member MCL-1, Encodes a Proapoptotic Protein Possessing Only the BH3 Domain. *J. Biol. Chem.* *275*, 25255–25261.

Barnhart, B.C., Alappat, E.C., and Peter, M.E. (2003). The CD95 Type I/Type II model. *Semin. Immunol.* *15*, 185–193.

- Barrajón-Catalán, E. (2019). Natural Compounds as New Cancer Treatments. *Medicines* 6, 78.
- Behl, C. (2000). Apoptosis and Alzheimer's disease. *J. Neural Transm.* 107, 1325–1344.
- Bergström, C.A.S., Holm, R., Jørgensen, S.A., Andersson, S.B.E., Artursson, P., Beato, S., Borde, A., Box, K., Brewster, M., Dressman, J., et al. (2014). Early pharmaceutical profiling to predict oral drug absorption: Current status and unmet needs. *Eur. J. Pharm. Sci.* 57, 173–199.
- Bernet, A., Mazelin, L., Coissieux, M., Gadot, N., Ackerman, S.L., Scoazec, J., and Mehlen, P. (2007). Inactivation of the UNC5C Netrin-1 Receptor Is Associated With Tumor Progression in Colorectal Malignancies. *Gastroenterology* 133, 1840–1848.
- Beroukhi, R., Mermel, C.H., Porter, D., Wei, G., Raychaudhuri, S., Donovan, J., Barretina, J., Boehm, J.S., Dobson, J., Urashima, M., et al. (2010). The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers. *Nature* 463, 899–905.
- Birkinshaw, R.W., and Czabotar, P.E. (2017). The BCL-2 family of proteins and mitochondrial outer membrane permeabilisation. *Semin. Cell Dev. Biol.* 72, 152–162.
- Blanco-Rodríguez, J., and Martínez-García, C. (1998). Apoptosis pattern elicited by several apoptogenic agents on the seminiferous epithelium of the adult rat testis. *J. Androl.* 19, 487–497.
- Bodo, J., Zhao, X., Durkin, L., Souers, A.J., Phillips, D.C., Smith, M.R., and Hsi, E.D. (2016). Acquired resistance to venetoclax (ABT-199) in <i>t(14;18)</i> positive lymphoma cells. *Oncotarget* 7.
- Bouillet, P. (1999). Proapoptotic Bcl-2 Relative Bim Required for Certain Apoptotic Responses, Leukocyte Homeostasis, and to Preclude Autoimmunity. *Science* 286, 1735–1738.
- Bouillet, P., Purton, J.F., Godfrey, D.I., Zhang, L.-C., Coultas, L., Puthalakath, H., Pellegrini, M., Cory, S., Adams, J.M., and Strasser, A. (2002). BH3-only Bcl-2 family member Bim is required for apoptosis of autoreactive thymocytes. *Nature* 415, 922–926.
- Brennan, M.S., Chang, C., Tai, L., Lessene, G., Strasser, A., Dewson, G., Kelly, G.L., and Herold, M.J. (2018). Humanized Mcl-1 mice enable accurate preclinical evaluation of MCL-1 inhibitors destined for clinical use. *Blood* 132, 1573–1583.
- Brinkmann, K., Grabow, S., Hyland, C.D., Teh, C.E., Alexander, W.S., Herold, M.J., and Strasser, A. (2017). The combination of reduced MCL-1 and standard chemotherapeutics is tolerable in mice. *Cell Death Differ.* 24, 2032–2043.
- Broecker-Preuss, M., Becher-Boveleth, N., Müller, S., and Mann, K. (2016). The BH3 mimetic drug ABT-737 induces apoptosis and acts synergistically with chemotherapeutic drugs in thyroid carcinoma cells. *Cancer Cell Int.* 16.
- Caenepeel, S., Brown, S.P., Belmontes, B., Moody, G., Keegan, K.S., Chui, D., Whittington, D.A., Huang, X., Poppe, L., Cheng, A.C., et al. (2018). AMG 176, a Selective MCL1 Inhibitor, is Effective in Hematological Cancer Models Alone and in Combination with Established Therapies. *Cancer Discov.* CD-18-0387.
- Campbell, K.J., Bath, M.L., Turner, M.L., Vandenberg, C.J., Bouillet, P., Metcalf, D., Scott, C.L., and Cory, S. (2010). Elevated Mcl-1 perturbs lymphopoiesis, promotes transformation of hematopoietic stem/progenitor cells, and enhances drug resistance. *Blood* 116, 3197–3207.
- Cang, S., Iragavarapu, C., Savooji, J., Song, Y., and Liu, D. (2015). ABT-199 (venetoclax) and BCL-2 inhibitors in clinical development. *J. Hematol. Oncol.* 8.

- Capoulade, C., Paillerets, B.B., Lefrère, I., Ronsin, M., Feunteun, J., Tursz, T., and Wiels, J. (1998). Overexpression of MDM2, due to enhanced translation, results in inactivation of wild-type p53 in Burkitt's lymphoma cells. *Oncogene* 16, 1603–1610.
- Casara, P., Davidson, J., Claperon, A., Le Toumelin-Braizat, G., Vogler, M., Bruno, A., Chanrion, M., Lysiak-Auvity, G., Le Diguarher, T., Starck, J.-B., et al. (2018). S55746 is a novel orally active BCL-2 selective and potent inhibitor that impairs hematological tumor growth. *Oncotarget* 9.
- Castelli, M.V., Lodeyro, A.F., Malheiros, A., Zacchino, S.A.S., and Roveri, O.A. (2005). Inhibition of the mitochondrial ATP synthesis by polygodial, a naturally occurring dialdehyde unsaturated sesquiterpene. *Biochem. Pharmacol.* 70, 82–89.
- Cazanave, S.C., and Gores, G.J. (2009). The liver's dance with death: Two Bcl-2 guardian proteins from the abyss. *Hepatology* 50, 1009–1013.
- Chakraborty, A., White, S.M., Schaefer, T.S., Ball, E.D., Dyer, K.F., and Tweardy, D.J. (1996). Granulocyte colony-stimulating factor activation of Stat3 alpha and Stat3 beta in immature normal and leukemic human myeloid cells. *Blood* 88, 2442–2449.
- Chanan-Khan, A.A., Niesvizky, R., Hohl, R.J., Zimmerman, T.M., Christiansen, N.P., Schiller, G.J., Callander, N., Lister, J., Oken, M., and Jagannath, S. (2009). Phase III randomised study of dexamethasone with or without oblimersen sodium for patients with advanced multiple myeloma. *Leuk. Lymphoma* 50, 559–565.
- Chauhan, D., Velankar, M., Brahmandam, M., Hideshima, T., Podar, K., Richardson, P., Schlossman, R., Ghobrial, I., Raje, N., Munshi, N., et al. (2007). A novel Bcl-2/Bcl-XL/Bcl-w inhibitor ABT-737 as therapy in multiple myeloma. *Oncogene* 26, 2374–2380.
- Cheng, E.H. (1997). Conversion of Bcl-2 to a Bax-like Death Effector by Caspases. *Science* 278, 1966–1968.
- Cheung, A., Bax, H.J., Josephs, D.H., Ilieva, K.M., Pellizzari, G., Opzoomer, J., Bloomfield, J., Fittall, M., Grigoriadis, A., Figini, M., et al. (2016). Targeting folate receptor alpha for cancer treatment. *Oncotarget* 7, 52553–52574.
- Chinnaiyan, A.M., O'Rourke, K., Tewari, M., and Dixit, V.M. (1995). FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of fas and initiates apoptosis. *Cell* 81, 505–512.
- Chou, C.-H., Lee, R.-S., and Yang-Yen, H.-F. (2006). An Internal EELD Domain Facilitates Mitochondrial Targeting of Mcl-1 via a Tom70-dependent Pathway. *Mol. Biol. Cell* 17, 3952–3963.
- Choudhary, G.S., Al-harbi, S., Mazumder, S., Hill, B.T., Smith, M.R., Bodo, J., Hsi, E.D., and Almasan, A. (2015). MCL-1 and BCL-xL-dependent resistance to the BCL-2 inhibitor ABT-199 can be overcome by preventing PI3K/AKT/mTOR activation in lymphoid malignancies. *Cell Death Dis.* 6, e1593–e1593.
- Cimino, G., Spinella, A., and Sodano, G. (1987). Identification an an intermediate in the reaction between polygodial and metylamine in biomimetic conditions. 4151–4152.
- Clarke, P.G.H., and Clarke, S. (2012). Nineteenth century research on cell death. *Exp. Oncol.* 34, 139–145.
- Claudino, V.D., Silva, K.C. da, Cechinel Filho, V., Yunes, R.A., Monache, F.D., Giménez, A., Salamanca, E., Gutierrez-Yapu, D., and Malheiros, A. (2013). Drimanes from *Drimys brasiliensis* with leishmanicidal and antimalarial activity. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 108, 140–144.

- Clohessy, J.G., Zhuang, J., and Brady, H.J.M. (2004). Characterisation of Mcl-1 cleavage during apoptosis of haematopoietic cells. *Br. J. Haematol.* *125*, 655–665.
- C.O. Silveira, A., D. Claudino, V., A. Yunes, R., Cechinel-Fiho, V., Malheiros, A., M.M. Cordova, C., and Bella Cruz, A. (2012). Antibacterial Activity and Toxicity of *Drimys brasiliensis*.
- Cohen, H.Y., Lavu, S., Bitterman, K.J., Hekking, B., Imahiye-robo, T.A., Miller, C., Frye, R., Ploegh, H., Kessler, B.M., and Sinclair, D.A. (2004). Acetylation of the C Terminus of Ku70 by CBP and PCAF Controls Bax-Mediated Apoptosis. *Mol. Cell* *13*, 627–638.
- Cosentino, K., and García-Sáez, A.J. (2017). Bax and Bak Pores: Are We Closing the Circle? *Trends Cell Biol.* *27*, 266–275.
- Cotter, F.E., Johnson, P., Hall, P., Pocock, C., al Mahdi, N., Cowell, J.K., and Morgan, G. (1994). Antisense oligonucleotides suppress B-cell lymphoma growth in a SCID-hu mouse model. *Oncogene* *9*, 3049–3055.
- Croxton, R., Ma, Y., Song, L., Haura, E.B., and Cress, W.D. (2002). Direct repression of the Mcl-1 promoter by E2F1. *Oncogene* *21*, 1359–1369.
- Cuconati, A., Mukherjee, C., Perez, D., and White, E. (2003). DNA damage response and MCL-1 destruction initiate apoptosis in adenovirus-infected cells. *Genes Dev.* *17*, 2922–2932.
- Cui, W., Zhao, H., Wang, C., Chen, Y., Luo, C., Zhang, S., Sun, B., and He, Z. (2019). Co-encapsulation of docetaxel and cyclosporin A into SNEDDS to promote oral cancer chemotherapy. *Drug Deliv.* *26*, 542–550.
- da Cunha, F.M., Fröde, T.S., Mendes, G.L., Malheiros, A., Filho, V.C., Yunes, R.A., and Calixto, J.B. (2001). Additional evidence for the anti-inflammatory and anti-allergic properties of the sesquiterpene polygodial. *Life Sci.* *70*, 159–169.
- Czabotar, P.E., Lee, E.F., van Delft, M.F., Day, C.L., Smith, B.J., Huang, D.C.S., Fairlie, W.D., Hinds, M.G., and Colman, P.M. (2007). Structural insights into the degradation of Mcl-1 induced by BH3 domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 6217–6222.
- Czabotar, P.E., Westphal, D., Dewson, G., Ma, S., Hockings, C., Fairlie, W.D., Lee, E.F., Yao, S., Robin, A.Y., Smith, B.J., et al. (2013). Bax Crystal Structures Reveal How BH3 Domains Activate Bax and Nucleate Its Oligomerization to Induce Apoptosis. *Cell* *152*, 519–531.
- Czabotar, P.E., Lessene, G., Strasser, A., and Adams, J.M. (2014). Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *15*, 49–63.
- Dai, H., Meng, X.W., and Kaufmann, S.H. (2016). Mitochondrial apoptosis and BH3 mimetics. *F1000Research* *5*, 2804.
- Danial, N.N., and Korsmeyer, S.J. (2004). Cell Death. *Cell* *116*, 205–219.
- Dardenne, J., Desrat, S., Guéritte, F., and Roussi, F. (2013). Asymmetric Synthesis of Two Analogues of Meiogynin A: Asymmetric Synthesis of Two Analogues of Meiogynin A. *Eur. J. Org. Chem.* *2013*, 2116–2122.
- Dasari, R., De Carvalho, A., Medellin, D.C., Middleton, K.N., Hague, F., Volmar, M.N.M., Frolova, L.V., Rossato, M.F., De La Chapa, J.J., Dybdal-Hargreaves, N.F., et al. (2015a). Wittig derivatization of sesquiterpenoid polygodial leads to cytostatic agents with activity against drug resistant cancer cells and capable of pyrrolylation of primary amines. *Eur. J. Med. Chem.* *103*, 226–237.

- Dasari, R., De Carvalho, A., Medellin, D.C., Middleton, K.N., Hague, F., Volmar, M.N.M., Frolova, L.V., Rossato, M.F., De La Chapa, J.J., Dybdal-Hargreaves, N.F., et al. (2015b). Synthetic and Biological Studies of Sesquiterpene Polygodial: Activity of 9-Epipolygodial against Drug-Resistant Cancer Cells. *ChemMedChem* 10, 2014–2026.
- Davids, M.S., and Letai, A. (2013). ABT-199: taking dead aim at BCL-2. *Cancer Cell* 23, 139–141.
- Day, C.L., Chen, L., Richardson, S.J., Harrison, P.J., Huang, D.C.S., and Hinds, M.G. (2005). Solution Structure of Prosurvival Mcl-1 and Characterization of Its Binding by Proapoptotic BH3-only Ligands. *J. Biol. Chem.* 280, 4738–4744.
- De La Chapa, J., Singha, P., Sallaway, M., Self, K., Nasreldin, R., Dasari, R., Hart, M., Kornienko, A., Just, J., Smith, J., et al. (2018). Novel polygodial analogs P3 and P27: Efficacious therapeutic agents disrupting mitochondrial function in oral squamous cell carcinoma. *Int. J. Oncol.*
- Debernardi, J. (2016). Le récepteur GB3/CD77 : analyse de l'apoptose induite par la verotoxine-1 dans les cellules de lymphome de Burkitt et recherche de ligands endogènes. Paris-Saclay.
- Debernardi, J., Hollville, E., Lipinski, M., Wiels, J., and Robert, A. (2018). Differential role of FL-BID and t-BID during verotoxin-1-induced apoptosis in Burkitt's lymphoma cells. *Oncogene* 37, 2410–2421.
- Degheidy, H.A., Gadalla, S.M., Farooqui, M.Z.H., Abbasi, F., Arthur, D.C., Bauer, S.R., Wilson, W.H., Wiestner, A., Stetler-Stevenson, M.A., and Marti, G.E. (2013). Bcl-2 level as a biomarker for 13q14 deletion in CLL. *Cytometry B Clin. Cytom.* 84, 237–247.
- Degterev, A., Boyce, M., and Yuan, J. (2003). A decade of caspases. *Oncogene* 22, 8543–8567.
- Del Gaizo Moore, V., Brown, J.R., Certo, M., Love, T.M., Novina, C.D., and Letai, A. (2007). Chronic lymphocytic leukemia requires BCL2 to sequester prodeath BIM, explaining sensitivity to BCL2 antagonist ABT-737. *J. Clin. Invest.* 117, 112–121.
- Delbridge, A.R.D., and Strasser, A. (2015). The BCL-2 protein family, BH3-mimetics and cancer therapy. *Cell Death Differ.* 22, 1071–1080.
- van Delft, M.F., Wei, A.H., Mason, K.D., Vandenberg, C.J., Chen, L., Czabotar, P.E., Willis, S.N., Scott, C.L., Day, C.L., Cory, S., et al. (2006). The BH3 mimetic ABT-737 targets selective Bcl-2 proteins and efficiently induces apoptosis via Bak/Bax if Mcl-1 is neutralized. *Cancer Cell* 10, 389–399.
- Demain, A.L., and Vaishnav, P. (2011). Natural products for cancer chemotherapy: Natural products - cancer. *Microb. Biotechnol.* 4, 687–699.
- Denicourt, C. (2004). MEDICINE: Targeting Apoptotic Pathways in Cancer Cells. *Science* 305, 1411–1413.
- Desrat, S., Remeur, C., Gény, C., Rivière, G., Colas, C., Dumontet, V., Birlirakis, N., Iorga, B.I., and Roussi, F. (2014a). From meiogynin A to the synthesis of dual inhibitors of Bcl-xL and Mcl-1 anti-apoptotic proteins. *Chem. Commun.* 50, 8593.
- Desrat, S., Pujals, A., Colas, C., Dardenne, J., Gény, C., Favre, L., Dumontet, V., Iorga, B.I., Litaudon, M., Raphaël, M., et al. (2014b). Pro-apoptotic meiogynin A derivatives that target Bcl-xL and Mcl-1. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 24, 5086–5088.
- Desrat, S., Remeur, C., and Roussi, F. (2015). Development of an efficient route toward meiogynin A-inspired dual inhibitors of Bcl-xL and Mcl-1 anti-apoptotic proteins. *Org. Biomol. Chem.* 13, 5520–5531.

- Dewson, G., Ma, S., Frederick, P., Hockings, C., Tan, I., Kratina, T., and Kluck, R.M. (2012). Bax dimerizes via a symmetric BH3:groove interface during apoptosis. *Cell Death Differ.* *19*, 661–670.
- Dickens, L.S., Powley, I.R., Hughes, M.A., and MacFarlane, M. (2012a). The “complexities” of life and death: Death receptor signalling platforms. *Exp. Cell Res.* *318*, 1269–1277.
- Dickens, L.S., Boyd, R.S., Jukes-Jones, R., Hughes, M.A., Robinson, G.L., Fairall, L., Schwabe, J.W.R., Cain, K., and MacFarlane, M. (2012b). A Death Effector Domain Chain DISC Model Reveals a Crucial Role for Caspase-8 Chain Assembly in Mediating Apoptotic Cell Death. *Mol. Cell* *47*, 291–305.
- Dijkers, P.F., Medema[†], R.H., Lammers, J.-W.J., Koenderman, L., and Coffey, P.J. (2000). Expression of the pro-apoptotic Bcl-2 family member Bim is regulated by the forkhead transcription factor FKHR-L1. *Curr. Biol.* *10*, 1201–1204.
- Ding, Q., He, X., Hsu, J.-M., Xia, W., Chen, C.-T., Li, L.-Y., Lee, D.-F., Liu, J.-C., Zhong, Q., Wang, X., et al. (2007). Degradation of Mcl-1 by β -TrCP Mediates Glycogen Synthase Kinase 3-Induced Tumor Suppression and Chemosensitization. *Mol. Cell. Biol.* *27*, 4006–4017.
- Ding, Q., Huo, L., Yang, J.-Y., Xia, W., Wei, Y., Liao, Y., Chang, C.-J., Yang, Y., Lai, C.-C., Lee, D.-F., et al. (2008). Down-regulation of Myeloid Cell Leukemia-1 through Inhibiting Erk/Pin 1 Pathway by Sorafenib Facilitates Chemosensitization in Breast Cancer. *Cancer Res.* *68*, 6109–6117.
- Dobson, C.M. (2004). Chemical space and biology. *Nature* *432*, 824–828.
- Doi, K., Li, R., Sung, S.-S., Wu, H., Liu, Y., Manieri, W., Krishnegowda, G., Awwad, A., Dewey, A., Liu, X., et al. (2012). Discovery of Marinopyrrole A (Maritoclax) as a Selective Mcl-1 Antagonist that Overcomes ABT-737 Resistance by Binding to and Targeting Mcl-1 for Proteasomal Degradation. *J. Biol. Chem.* *287*, 10224–10235.
- Dong, W.-H., Mei, W.-L., Zhao, Y.-X., Zeng, Y.-B., Wang, H., and Dai, H.-F. (2011). A new drimane sesquiterpenoid glycoside from the seeds of *Antiaris toxicaria*. *J. Asian Nat. Prod. Res.* *13*, 561–565.
- Donovan, N., Becker, E.B.E., Konishi, Y., and Bonni, A. (2002). JNK Phosphorylation and Activation of BAD Couples the Stress-activated Signaling Pathway to the Cell Death Machinery. *J. Biol. Chem.* *277*, 40944–40949.
- Dousset, C., Maïga, S., Gomez-Bougie, P., Le Coq, J., Touzeau, C., Moreau, P., Le Gouill, S., Chiron, D., Pellat-Deceunynck, C., Moreau-Aubry, A., et al. (2017). BH3 profiling as a tool to identify acquired resistance to venetoclax in multiple myeloma. *Br. J. Haematol.* *179*, 684–688.
- Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L., and Wang, X. (2000). Smac, a Mitochondrial Protein that Promotes Cytochrome c-Dependent Caspase Activation by Eliminating IAP Inhibition. *Cell* *102*, 33–42.
- Du, H., Wolf, J., Schafer, B., Moldoveanu, T., Chipuk, J.E., and Kuwana, T. (2011). BH3 Domains other than Bim and Bid Can Directly Activate Bax/Bak. *J. Biol. Chem.* *286*, 491–501.
- Eckelman, B.P., and Salvesen, G.S. (2006). The Human Anti-apoptotic Proteins cIAP1 and cIAP2 Bind but Do Not Inhibit Caspases. *J. Biol. Chem.* *281*, 3254–3260.
- Eckelman, B.P., Salvesen, G.S., and Scott, F.L. (2006). Human inhibitor of apoptosis proteins: why XIAP is the black sheep of the family. *EMBO Rep.* *7*, 988–994.
- Edlich, F. (2015). The great migration of Bax and Bak. *Mol. Cell. Oncol.* *2*, e995029.

- Edlich, F., Banerjee, S., Suzuki, M., Cleland, M.M., Arnoult, D., Wang, C., Neutzner, A., Tjandra, N., and Youle, R.J. (2011). Bcl-xL Retrotranslocates Bax from the Mitochondria into the Cytosol. *Cell* 145, 104–116.
- Edwards, S.W., Derouet, M., Howse, M., and Moots, R.J. (2004). Regulation of neutrophil apoptosis by Mcl-1. *Biochem. Soc. Trans.* 32, 489–492.
- El Sayah, M., Filho, V.C., Yunes, R.A., Malheiros, Â., and Calixto, J.B. (2000). Action of Polygodial on Agonist-Induced Contractions of the Rat Portal Vein In Vitro: *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 35, 670–675.
- Elkholi, R., Floros, K.V., and Chipuk, J.E. (2011). The Role of BH3-Only Proteins in Tumor Cell Development, Signaling, and Treatment. *Genes Cancer* 2, 523–537.
- Ellis, H. (1986). Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell* 44, 817–829.
- Erlich, S., Mizrachi, L., Segev, O., Lindenboim, L., Zmira, O., Adi-Harel, S., Hirsch, J.A., Stein, R., and Pinkas-Kramarski, R. (2007). Differential Interactions Between Beclin 1 and Bcl-2 Family Members. *Autophagy* 3, 561–568.
- Escudero, S., Zaganjor, E., Lee, S., Mill, C.P., Morgan, A.M., Crawford, E.B., Chen, J., Wales, T.E., Mourtada, R., Luccarelli, J., et al. (2018). Dynamic Regulation of Long-Chain Fatty Acid Oxidation by a Noncanonical Interaction between the MCL-1 BH3 Helix and VLCAD. *Mol. Cell* 69, 729–743.e7.
- Eskes, R., Desagher, S., Antonsson, B., and Martinou, J.-C. (2000). Bid Induces the Oligomerization and Insertion of Bax into the Outer Mitochondrial Membrane. *Mol. Cell. Biol.* 20, 929–935.
- Esposti, M.D., Ferry, G., Masdehors, P., Boutin, J.A., Hickman, J.A., and Dive, C. (2003). Post-translational Modification of Bid Has Differential Effects on Its Susceptibility to Cleavage by Caspase 8 or Caspase 3. *J. Biol. Chem.* 278, 15749–15757.
- Ettxebarria, A., Landeta, O., Antonsson, B., and Basañez, G. (2008). Regulation of antiapoptotic MCL-1 function by gossypol: Mechanistic insights from in vitro reconstituted systems. *Biochem. Pharmacol.* 76, 1563–1576.
- Ezzat, H.M., Elnaggar, Y.S.R., and Abdallah, O.Y. (2019). Improved oral bioavailability of the anticancer drug catechin using chitosomes: Design, in-vitro appraisal and in-vivo studies. *Int. J. Pharm.* 565, 488–498.
- Fang, W., Nath, K.A., Mackey, M.F., Noelle, R.J., Mueller, D.L., and Behrens, T.W. (1997). CD40 inhibits B cell apoptosis by upregulating bcl-xL expression and blocking oxidant accumulation. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* 272, C950–C956.
- Favaloro, B., Allocati, N., Graziano, V., Di Ilio, C., and De Laurenzi, V. (2012). Role of apoptosis in disease. *Aging* 4, 330–349.
- Feher, M., and Schmidt, J.M. (2003). Property Distributions: Differences between Drugs, Natural Products, and Molecules from Combinatorial Chemistry. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 43, 218–227.
- Fischer, U., Stroh, C., and Schulze-Osthoff, K. (2006). Unique and overlapping substrate specificities of caspase-8 and caspase-10. *Oncogene* 25, 152–159.
- Fitamant, J., Guenebeaud, C., Coissieux, M.-M., Guix, C., Treilleux, I., Scoazec, J.-Y., Bachelot, T., Bernet, A., and Mehlen, P. (2008). Netrin-1 expression confers a selective advantage for tumor cell survival in metastatic breast cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 4850–4855.

- Fleisher, T.A. (1997). Apoptosis. *Ann. Allergy. Asthma. Immunol.* 78, 245–250.
- Fogha, J., Marekha, B., De Giorgi, M., Voisin-Chiret, A.S., Rault, S., Bureau, R., and Sopkova-de Oliveira Santos, J. (2017). Toward Understanding Mcl-1 Promiscuous and Specific Binding Mode. *J. Chem. Inf. Model.* 57, 2885–2895.
- Fomekong Fotsop, D., Roussi, F., Le Callonec, C., Bousserouel, H., Litaudon, M., and Guéritte, F. (2008). Isolation and characterization of two new drimanes from *Zygogynum baillonii* and synthesis of analogues. *Tetrahedron* 64, 2192–2197.
- Formanek jr., R. (2002). FDA Consumer (U.S. Department of Health, Education, and Welfare, Public Health Service, Food and Drug Administration, 2003).
- Fotsop, D.F., Roussi, F., Leverrier, A., Bretéché, A., and Guéritte, F. (2010). Biomimetic Total Synthesis of Meiogynin A, an Inhibitor of Bcl-xL and Bak Interaction. *J. Org. Chem.* 75, 7412–7415.
- Fraser, C., Ryan, J., and Sarosiek, K. (2019). BH3 Profiling: A Functional Assay to Measure Apoptotic Priming and Dependencies. In *BCL-2 Family Proteins*, E. Gavathiotis, ed. (New York, NY: Springer New York), pp. 61–76.
- Fratoni, E., Claudino, V.D., Yunes, R.A., Franchi, G.C., Nowill, A.E., Filho, V.C., Monache, F.D., and Malheiros, A. (2016). Further drimane sesquiterpenes from *Drimys brasiliensis* stem barks with cytotoxic potential. *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 389, 791–797.
- Fratoni, E., de Athayde, A.E., da Silva Machado, M., Zermiani, T., Venturi, I., Corrêa dos Santos, M., Lobato, F., Cechinel Filho, V., Franchi, G.C., Nowill, A.E., et al. (2018). Antiproliferative and toxicological properties of drimanes obtained from *Drimys brasiliensis* stem barks. *Biomed. Pharmacother.* 103, 1498–1506.
- Fresquet, V., Rieger, M., Carolis, C., García-Barchino, M.J., and Martinez-Climent, J.A. (2014). Acquired mutations in BCL2 family proteins conferring resistance to the BH3 mimetic ABT-199 in lymphoma. *Blood* 123, 4111–4119.
- Fritsch, R.M., Schneider, G., Saur, D., Scheibel, M., and Schmid, R.M. (2007). Translational repression of MCL-1 couples stress-induced eIF2 alpha phosphorylation to mitochondrial apoptosis initiation. *J. Biol. Chem.* 282, 22551–22562.
- Fu, W.-N., Bertoni, F., Kelsey, S.M., McElwaine, S.M., Cotter, F.E., Newland, A.C., and Jia, L. (2003). Role of DNA methylation in the suppression of Apaf-1 protein in human leukaemia. *Oncogene* 22, 451–455.
- Fujise, K., Zhang, D., Liu, J., and Yeh, E.T.H. (2000). Regulation of Apoptosis and Cell Cycle Progression by MCL1: DIFFERENTIAL ROLE OF PROLIFERATING CELL NUCLEAR ANTIGEN. *J. Biol. Chem.* 275, 39458–39465.
- Fulda, S. (2010). Evasion of Apoptosis as a Cellular Stress Response in Cancer. *Int. J. Cell Biol.* 2010, 1–6.
- Galluzzi, L., Bravo-San Pedro, J.M., and Kroemer, G. (2014). Organelle-specific initiation of cell death. *Nat. Cell Biol.* 16, 728–736.
- Galluzzi, L., Kepp, O., and Kroemer, G. (2016). Mitochondrial regulation of cell death: a phylogenetically conserved control. *Microb. Cell* 3, 101–108.

- Galluzzi, L., Vitale, I., Aaronson, S.A., Abrams, J.M., Adam, D., Agostinis, P., Alnemri, E.S., Altucci, L., Amelio, I., Andrews, D.W., et al. (2018). Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ.* 25, 486–541.
- Gao, Z., Tian, Y., Wang, J., Yin, Q., Wu, H., Li, Y.-M., and Jiang, X. (2007). A Dimeric Smac/Diablo Peptide Directly Relieves Caspase-3 Inhibition by XIAP: DYNAMIC AND COOPERATIVE REGULATION OF XIAP BY SMAC/DIABLO. *J. Biol. Chem.* 282, 30718–30727.
- Gaut, D., Burkenroad, A., Duong, T., Feammelli, J., Sasine, J., and Schiller, G. (2020). Venetoclax combination therapy in relapsed/refractory acute myeloid leukemia: A single institution experience. *Leuk. Res.* 90, 106314.
- Gautrey, H.L., and Tyson-Capper, A.J. (2012). Regulation of Mcl-1 by SRSF1 and SRSF5 in Cancer Cells. *PLoS ONE* 7, e51497.
- Gavathiotis, E., Suzuki, M., Davis, M.L., Pitter, K., Bird, G.H., Katz, S.G., Tu, H.-C., Kim, H., Cheng, E.H.-Y., Tjandra, N., et al. (2008). BAX activation is initiated at a novel interaction site. *Nature* 455, 1076–1081.
- Geny, C. (2014). Recherche d'inhibiteurs naturels des protéines anti-apoptotiques Bcl-xL et Mcl-1.
- Gény, C., Rivière, G., Bignon, J., Birlirakis, N., Guittet, E., Awang, K., Litaudon, M., Roussi, F., and Dumontet, V. (2016). Anacardic Acids from *Knema hookeriana* as Modulators of Bcl-xL/Bak and Mcl-1/Bid Interactions. *J. Nat. Prod.* 79, 838–844.
- Germain, M., and Duronio, V. (2007). The N Terminus of the Anti-apoptotic BCL-2 Homologue MCL-1 Regulates Its Localization and Function. *J. Biol. Chem.* 282, 32233–32242.
- Germain, M., Milburn, J., and Duronio, V. (2008). MCL-1 Inhibits BAX in the Absence of MCL-1/BAX Interaction. *J. Biol. Chem.* 283, 6384–6392.
- Ghosh, A.K., Samanta, I., Mondal, A., and Liu, W.R. (2019). Covalent Inhibition in Drug Discovery. *ChemMedChem* 14, 889–906.
- Jimenez-Bonafe, P., Tortosa, A., and Perez-Tomas, R. (2009). Overcoming Drug Resistance by Enhancing Apoptosis of Tumor Cells. *Curr. Cancer Drug Targets* 9, 320–340.
- Glaser, S.P., Lee, E.F., Trounson, E., Bouillet, P., Wei, A., Fairlie, W.D., Izon, D.J., Zuber, J., Rappaport, A.R., Herold, M.J., et al. (2012). Anti-apoptotic Mcl-1 is essential for the development and sustained growth of acute myeloid leukemia. *Genes Dev.* 26, 120–125.
- Goldschneider, D., and Mehlen, P. (2010). Dependence receptors: a new paradigm in cell signaling and cancer therapy. *Oncogene* 29, 1865–1882.
- Golstein, P., and Kroemer, G. (2007). Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends Biochem. Sci.* 32, 37–43.
- Gomez-Bougie, P., Wuillème-Toumi, S., Ménoret, E., Trichet, V., Robillard, N., Philippe, M., Bataille, R., and Amiot, M. (2007). Noxa Up-regulation and Mcl-1 Cleavage Are Associated to Apoptosis Induction by Bortezomib in Multiple Myeloma. *Cancer Res.* 67, 5418–5424.
- Gong, J.-N., Khong, T., Segal, D., Yao, Y., Riffkin, C.D., Garnier, J.-M., Khaw, S.L., Lessene, G., Spencer, A., Herold, M.J., et al. (2016). Hierarchy for targeting prosurvival BCL2 family proteins in multiple myeloma: pivotal role of MCL1. *Blood* 128, 1834–1844.

- Grad, J.M., Zeng, X.-R., and Boise, L.H. (2000). Regulation of Bcl-xL: a little bit of this and a little bit of STAT. *Curr. Opin. Oncol.* 12, 543–549.
- Grandin, M., Mathot, P., Devailly, G., Bidet, Y., Ghantous, A., Favrot, C., Gibert, B., Gadot, N., Puisieux, I., Herceg, Z., et al. (2016). Inhibition of DNA methylation promotes breast tumor sensitivity to netrin-1 interference. *EMBO Mol. Med.* 8, 863–877.
- Greaves, G., Milani, M., Butterworth, M., Carter, R.J., Byrne, D.P., Eyers, P.A., Luo, X., Cohen, G.M., and Varadarajan, S. (2019). BH3-only proteins are dispensable for apoptosis induced by pharmacological inhibition of both MCL-1 and BCL-XL. *Cell Death Differ.* 26, 1037–1047.
- Green, D.R., and Fitzgerald, P. (2016). Just So Stories about the Evolution of Apoptosis. *Curr. Biol.* 26, R620–R627.
- Green, D.R., and Llamby, F. (2015). Cell Death Signaling. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 7, a006080.
- Green and John C.Reed, D.R. (1998). Mitochondria and Apoptosis. *Science* 281, 1309–1312.
- Griffiths, G.J., Dubrez, L., Morgan, C.P., Jones, N.A., Whitehouse, J., Corfe, B.M., Dive, C., and Hickman, J.A. (1999). Cell Damage-induced Conformational Changes of the Pro-Apoptotic Protein Bak In Vivo Precede the Onset of Apoptosis. *J. Cell Biol.* 144, 903–914.
- Groo, A., Bossiere, M., Trichard, L., Legras, P., Benoit, J., and Lagarce, F. (2015). *In vivo* evaluation of paclitaxel-loaded lipid nanocapsules after intravenous and oral administration on resistant tumor. *Nanomed.* 10, 589–601.
- Groo, A.-C., Mircheva, K., Bejaud, J., Ailhas, C., Panaiotov, I., Saulnier, P., Ivanova, T., and Lagarce, F. (2014). Development of 2D and 3D Mucus Models and Their Interactions with Mucus-Penetrating Paclitaxel-Loaded Lipid Nanocapsules. *Pharm. Res.* 31, 1753–1765.
- Groo, A.-C., De Pascale, M., Voisin-Chiret, A.-S., Corvaisier, S., Since, M., and Malzert-Fréon, A. (2017). Comparison of 2 strategies to enhance pyridoclox solubility: Nanoemulsion delivery system versus salt synthesis. *Eur. J. Pharm. Sci.* 97, 218–226.
- Groo, A.C., Hedir, S., Since, M., Brotin, E., Weiswald, L.-B., Paysant, H., Nee, G., Coolzaet, M., Goux, D., Delépée, R., et al. (2020). Pyridoclox-loaded nanoemulsion for enhanced anticancer effect on ovarian cancer. *Int. J. Pharm.* 587, 119655.
- Große, L., Wurm, C.A., Brüser, C., Neumann, D., Jans, D.C., and Jakobs, S. (2016). Bax assembles into large ring-like structures remodeling the mitochondrial outer membrane in apoptosis. *EMBO J.* 35, 402–413.
- Gué, E., Since, M., Ropars, S., Herbinet, R., Le Pluart, L., and Malzert-Fréon, A. (2016). Evaluation of the versatile character of a nanoemulsion formulation. *Int. J. Pharm.* 498, 49–65.
- Guéritte-Voegelein, F., Guénard, D., Dubois, J., Wahl, A., and Potier, P. (1994). [Chemical and biological studies on Taxol (Paclitaxel) and Taxotere (Docetaxel), new antineoplastic agents]. *J. Pharm. Belg.* 49, 193–205.
- Haley, B., and Frenkel, E. (2008). Nanoparticles for drug delivery in cancer treatment. *Urol. Oncol. Semin. Orig. Investig.* 26, 57–64.
- Hall, M.D., Yasgar, A., Peryea, T., Braisted, J.C., Jadhav, A., Simeonov, A., and Coussens, N.P. (2016). Fluorescence polarization assays in high-throughput screening and drug discovery: a review. *Methods Appl. Fluoresc.* 4, 022001.

- Han, J., Goldstein, L.A., Gastman, B.R., Froelich, C.J., Yin, X.-M., and Rabinowich, H. (2004). Degradation of Mcl-1 by Granzyme B: Implications for Bim-mediated mitochondrial apoptotic events. *J. Biol. Chem.* 279, 22020–22029.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 144, 646–674.
- Harris, M.H., and Thompson, C.B. (2000). The role of the Bcl-2 family in the regulation of outer mitochondrial membrane permeability. *Cell Death Differ.* 7, 1182–1191.
- Harris, N.L., Jaffe, E.S., Diebold, J., Flandrin, G., Muller-Hermelink, H.K., Vardiman, J., Lister, T.A., and Bloomfield, C.D. (1999). The World Health Organization Classification of Neoplastic Diseases of the Hematopoietic and Lymphoid Tissues. *Ann. Oncol.* 10, 1419–1432.
- Hasan, S.M.M., Sheen, A.D., Power, A.M., Langevin, L.M., Xiong, J., Furlong, M., Day, K., Schuurmans, C., Opferman, J.T., and Vanderluit, J.L. (2013). Mcl1 regulates the terminal mitosis of neural precursor cells in the mammalian brain through p27Kip1. *Development* 140, 3118–3127.
- Heere-Ress, E., Thallinger, C., Lucas, T., Schlagbauer-Wadl, H., Wacheck, V., Monia, B.P., Wolff, K., Pehamberger, H., and Jansen, B. (2002). Bcl-XL is a chemoresistance factor in human melanoma cells that can be inhibited by antisense therapy. *Int. J. Cancer* 99, 29–34.
- Hengartner, M.O., and Horvitz, H.R. (1994). *C. elegans* cell survival gene ced-9 encodes a functional homolog of the mammalian proto-oncogene bcl-2. *Cell* 76, 665–676.
- Hengartner, M.O., and Robert Horvitz, H. (1994). Programmed cell death in *Caenorhabditis elegans*. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 4, 581–586.
- Henkart, P.A. (1994). Lymphocyte-mediated cytotoxicity: Two pathways and multiple effector molecules. *Immunity* 1, 343–346.
- Herrant, M., Jacquet, A., Marchetti, S., Belhacène, N., Colosetti, P., Luciano, F., and Auberger, P. (2004). Cleavage of Mcl-1 by caspases impaired its ability to counteract Bim-induced apoptosis. *Oncogene* 23, 7863–7873.
- Herrera-Merchan, A., Cerrato, C., Luengo, G., Dominguez, O., Piris, M.A., Serrano, M., and Gonzalez, S. (2010). miR-33-mediated downregulation of p53 controls hematopoietic stem cell self-renewal. *Cell Cycle* 9, 3297–3305.
- Hervouet, E., Cheray, M., Vallette, F., and Cartron, P.-F. (2013). DNA Methylation and Apoptosis Resistance in Cancer Cells. *Cells* 2, 545–573.
- Hikita, H., Takehara, T., Shimizu, S., Kodama, T., Li, W., Miyagi, T., Hosui, A., Ishida, H., Ohkawa, K., Kanto, T., et al. (2009). Mcl-1 and Bcl-xL cooperatively maintain integrity of hepatocytes in developing and adult murine liver. *Hepatology* 50, 1217–1226.
- Hird, A.W., and Tron, A.E. (2019). Recent advances in the development of Mcl-1 inhibitors for cancer therapy. *Pharmacol. Ther.* 198, 59–67.
- Hirpara, J.L., Loh, T., Ng, S.B., Chng, W.J., and Pervaiz, S. (2016). Aberrant localization of apoptosis protease activating factor-1 in lipid raft sub-domains of diffuse large B cell lymphomas. *Oncotarget* 7, 83964–83975.
- Honda, R., Tanaka, H., and Yasuda, H. (1997). Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53. *FEBS Lett.* 420, 25–27.

- Howie, S.E.M., Harrison, D.J., and Wyllie, A.H. (1994). Lymphocyte Apoptosis - Mechanisms and Implications in Disease. *Immunol. Rev.* *142*, 141–156.
- Hsu, Y.-T., and Youle, R.J. (1998). Bax in Murine Thymus Is a Soluble Monomeric Protein That Displays Differential Detergent-induced Conformations. *J. Biol. Chem.* *273*, 10777–10783.
- Hu, W., Chan, C.S., Wu, R., Zhang, C., Sun, Y., Song, J.S., Tang, L.H., Levine, A.J., and Feng, Z. (2010). Negative Regulation of Tumor Suppressor p53 by MicroRNA miR-504. *Mol. Cell* *38*, 689–699.
- Hu, Z.-Y., Sun, J., Zhu, X.-F., Yang, D., and Zeng, Y.-X. (2009). ApoG2 induces cell cycle arrest of nasopharyngeal carcinoma cells by suppressing the c-Myc signaling pathway. *J. Transl. Med.* *7*, 74.
- Huang, H.M., Huang, C.J., and Yen, J.J. (2000). Mcl-1 is a common target of stem cell factor and interleukin-5 for apoptosis prevention activity via MEK/MAPK and PI-3K/Akt pathways. *Blood* *96*, 1764–1771.
- Hwang, J.J., Kuruvilla, J., Mendelson, D., Pishvaian, M.J., Deeken, J.F., Siu, L.L., Berger, M.S., Viallet, J., and Marshall, J.L. (2010). Phase I dose finding studies of obatoclax (GX15-070), a small molecule pan-BCL-2 family antagonist, in patients with advanced solid tumors or lymphoma. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *16*, 4038–4045.
- ICSN (2020). Plant metabolites and associated microorganisms: Isolation, s. a. b. Extractothèque ICSN.
- Inoshita, S., Takeda, K., Hatai, T., Terada, Y., Sano, M., Hata, J., Umezawa, A., and Ichijo, H. (2002). Phosphorylation and Inactivation of Myeloid Cell Leukemia 1 by JNK in Response to Oxidative Stress. *J. Biol. Chem.* *277*, 43730–43734.
- Isomoto, H., Kobayashi, S., Werneburg, N.W., Bronk, S.F., Guicciardi, M.E., Frank, D.A., and Gores, G.J. (2005). Interleukin 6 upregulates myeloid cell leukemia-1 expression through a STAT3 pathway in cholangiocarcinoma cells. *Hepatology* *42*, 1329–1338.
- Jacobson, M.D., Weil, M., and Raff, M.C. (1997). Programmed Cell Death in Animal Development. *Cell* *88*, 347–354.
- Jamil, S., Sobouti, R., Hojabrpour, P., Raj, M., Kast, J., and Duronio, V. (2005). A proteolytic fragment of Mcl-1 exhibits nuclear localization and regulates cell growth by interaction with Cdk1. *Biochem. J.* *387*, 659–667.
- Jamil, S., Mojtabavi, S., Hojabrpour, P., Cheah, S., and Duronio, V. (2008). An essential role for MCL-1 in ATR-mediated CHK1 phosphorylation. *Mol. Biol. Cell* *19*, 3212–3220.
- Jost, P.J., Grabow, S., Gray, D., McKenzie, M.D., Nachbur, U., Huang, D.C.S., Bouillet, P., Thomas, H.E., Borner, C., Silke, J., et al. (2009). XIAP discriminates between type I and type II FAS-induced apoptosis. *Nature* *460*, 1035–1039.
- Jourdan, M., De Vos, J., Mechti, N., and Klein, B. (2000). Regulation of Bcl-2-family proteins in myeloma cells by three myeloma survival factors: interleukin-6, interferon-alpha and insulin-like growth factor 1. *Cell Death Differ.* *7*, 1244–1252.
- Juárez-Salcedo, L.M., Desai, V., and Dalia, S. (2019). Venetoclax: evidence to date and clinical potential. *Drugs Context* *8*, 212574.
- Julien, O., and Wells, J.A. (2017). Caspases and their substrates. *Cell Death Differ.* *24*, 1380–1389.

- Kägi, D., Ledermann, B., Bürki, K., Zinkernagel, R.M., and Hengartner, H. (1996). Molecular mechanisms of lymphocyte-mediated cytotoxicity and their role in immunological protection and pathogenesis in vivo. *Annu. Rev. Immunol.* *14*, 207–232.
- Kang, M.H., and Reynolds, C.P. (2009). Bcl-2 Inhibitors: Targeting Mitochondrial Apoptotic Pathways in Cancer Therapy. *Clin. Cancer Res.* *15*, 1126–1132.
- Kelly, G.L., Grabow, S., Glaser, S.P., Fitzsimmons, L., Aubrey, B.J., Okamoto, T., Valente, L.J., Robati, M., Tai, L., Fairlie, W.D., et al. (2014). Targeting of MCL-1 kills MYC-driven mouse and human lymphomas even when they bear mutations in p53. *Genes Dev.* *28*, 58–70.
- Kerr, J.F.R., Wyllie, A.H., and Currie, A.R. (1972). Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wideranging Implications in Tissue Kinetics. *Br. J. Cancer* *26*, 239–257.
- Khaled, A.R., Kim, K., Hofmeister, R., Muegge, K., and Durum, S.K. (1999). Withdrawal of IL-7 induces Bax translocation from cytosol to mitochondria through a rise in intracellular pH. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *96*, 14476–14481.
- Kieffer, C., Jourdan, J.P., Jouanne, M., and Voisin-Chiret, A.S. (2020). Noncellular screening for the discovery of protein–protein interaction modulators. *Drug Discov. Today*.
- Kim, H., Rafiuddin-Shah, M., Tu, H.-C., Jeffers, J.R., Zambetti, G.P., Hsieh, J.J.-D., and Cheng, E.H.-Y. (2006). Hierarchical regulation of mitochondrion-dependent apoptosis by BCL-2 subfamilies. *Nat. Cell Biol.* *8*, 1348–1358.
- Kim, H., Tu, H.-C., Ren, D., Takeuchi, O., Jeffers, J.R., Zambetti, G.P., Hsieh, J.J.-D., and Cheng, E.H.-Y. (2009a). Stepwise Activation of BAX and BAK by tBID, BIM, and PUMA Initiates Mitochondrial Apoptosis. *Mol. Cell* *36*, 487–499.
- Kim, J.-H., Sim, S.-H., Ha, H.-J., Ko, J.-J., Lee, K., and Bae, J. (2009b). MCL-1ES, a novel variant of MCL-1, associates with MCL-1L and induces mitochondrial cell death. *FEBS Lett.* *583*, 2758–2764.
- Kinghorn, A.D., Chin, Y.-W., and Swanson, S.M. (2009). Discovery of natural product anticancer agents from biodiverse organisms. *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* *12*, 189–196.
- Kirsch, D.G., Doseff, A., Chau, B.N., Lim, D.-S., de Souza-Pinto, N.C., Hansford, R., Kastan, M.B., Lazebnik, Y.A., and Hardwick, J.M. (1999). Caspase-3-dependent Cleavage of Bcl-2 Promotes Release of Cytochrome *c*. *J. Biol. Chem.* *274*, 21155–21161.
- Kitada, S., Leone, M., Sareth, S., Zhai, D., Reed, J.C., and Pellecchia, M. (2003). Discovery, Characterization, and Structure–Activity Relationships Studies of Proapoptotic Polyphenols Targeting B-Cell Lymphocyte/Leukemia-2 Proteins. *J. Med. Chem.* *46*, 4259–4264.
- Kobayashi, S., Lee, S.-H., Meng, X.W., Mott, J.L., Bronk, S.F., Werneburg, N.W., Craig, R.W., Kaufmann, S.H., and Gores, G.J. (2007). Serine 64 Phosphorylation Enhances the Antiapoptotic Function of Mcl-1. *J. Biol. Chem.* *282*, 18407–18417.
- Konopleva, M., Contractor, R., Tsao, T., Samudio, I., Ruvolo, P.P., Kitada, S., Deng, X., Zhai, D., Shi, Y.-X., Sneed, T., et al. (2006). Mechanisms of apoptosis sensitivity and resistance to the BH3 mimetic ABT-737 in acute myeloid leukemia. *Cancer Cell* *10*, 375–388.
- Konopleva, M., Watt, J., Contractor, R., Tsao, T., Harris, D., Estrov, Z., Bornmann, W., Kantarjian, H., Viallet, J., Samudio, I., et al. (2008). Mechanisms of Antileukemic Activity of the Novel Bcl-2 Homology Domain-3 Mimetic GX15-070 (Obatoclax). *Cancer Res.* *68*, 3413–3420.

- Konopleva, M., Pollyea, D.A., Potluri, J., Chyla, B., Hogdal, L., Busman, T., McKeegan, E., Salem, A.H., Zhu, M., Ricker, J.L., et al. (2016). Efficacy and Biological Correlates of Response in a Phase II Study of Venetoclax Monotherapy in Patients with Acute Myelogenous Leukemia. *Cancer Discov.* *6*, 1106–1117.
- Kornienko, A., and La Clair, J.J. (2017). Covalent modification of biological targets with natural products through Paal–Knorr pyrrole formation. *Nat. Prod. Rep.* *34*, 1051–1060.
- Koss, B., Morrison, J., Perciavalle, R.M., Singh, H., Rehg, J.E., Williams, R.T., and Opferman, J.T. (2013). Requirement for antiapoptotic MCL-1 in the survival of BCR-ABL B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Blood* *122*, 1587–1598.
- Kotschy, A., Szlavik, Z., Murray, J., Davidson, J., Maragno, A.L., Le Toumelin-Braizat, G., Chanrion, M., Kelly, G.L., Gong, J.-N., Moujalled, D.M., et al. (2016). The MCL1 inhibitor S63845 is tolerable and effective in diverse cancer models. *Nature* *538*, 477–482.
- Kozopas, K.M., Yang, T., Buchan, H.L., Zhou, P., and Craig, R.W. (1993). MCL1, a gene expressed in programmed myeloid cell differentiation, has sequence similarity to BCL2. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *90*, 3516–3520.
- Krajewski, S., Bodrug, S., Krajewska, M., Shabaik, A., Gascoyne, R., Berean, K., and Reed, J.C. (1995). Immunohistochemical analysis of Mcl-1 protein in human tissues. Differential regulation of Mcl-1 and Bcl-2 protein production suggests a unique role for Mcl-1 in control of programmed cell death in vivo. *Am. J. Pathol.* *146*, 1309–1319.
- Kuentz, M. (2008). Drug Absorption Modeling as a Tool to Define the Strategy in Clinical Formulation Development. *AAPS J.* *10*, 473–479.
- Kuete, V., and Efferth, T. (2014). Biodiversity, Natural Products and Cancer Treatment (WORLD SCIENTIFIC).
- Kuwana, T., Bouchier-Hayes, L., Chipuk, J.E., Bonzon, C., Sullivan, B.A., Green, D.R., and Newmeyer, D.D. (2005). BH3 Domains of BH3-Only Proteins Differentially Regulate Bax-Mediated Mitochondrial Membrane Permeabilization Both Directly and Indirectly. *Mol. Cell* *17*, 525–535.
- Kwak, E.L., Sordella, R., Bell, D.W., Godin-Heymann, N., Okimoto, R.A., Brannigan, B.W., Harris, P.L., Driscoll, D.R., Fidias, P., Lynch, T.J., et al. (2005). Irreversible inhibitors of the EGF receptor may circumvent acquired resistance to gefitinib. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *102*, 7665–7670.
- Kwon, J.J., Factora, T.D., Dey, S., and Kota, J. (2019). A Systematic Review of miR-29 in Cancer. *Mol. Ther. - Oncolytics* *12*, 173–194.
- Landeta, O., Landajuela, A., Gil, D., Taneva, S., DiPrimo, C., Sot, B., Valle, M., Frolov, V.A., and Basañez, G. (2011). Reconstitution of Proapoptotic BAK Function in Liposomes Reveals a Dual Role for Mitochondrial Lipids in the BAK-driven Membrane Permeabilization Process. *J. Biol. Chem.* *286*, 8213–8230.
- Le Gouill, S., Podar, K., Amiot, M., Hideshima, T., Chauhan, D., Ishitsuka, K., Kumar, S., Raje, N., Richardson, P.G., Harousseau, J.-L., et al. (2004). VEGF induces Mcl-1 up-regulation and protects multiple myeloma cells against apoptosis. *Blood* *104*, 2886–2892.
- Lee, J.H., Schütte, D., Wulf, G., Füzesi, L., Radzun, H.-J., Schweyer, S., Engel, W., and Nayernia, K. (2006). Stem-cell protein Piwil2 is widely expressed in tumors and inhibits apoptosis through activation of Stat3/Bcl-XL pathway. *Hum. Mol. Genet.* *15*, 201–211.

- Lei, K., and Davis, R.J. (2003). JNK phosphorylation of Bim-related members of the Bcl2 family induces Bax-dependent apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *100*, 2432–2437.
- Leich, E., Salaverria, I., Bea, S., Zettl, A., Wright, G., Moreno, V., Gascoyne, R.D., Chan, W.-C., Braziel, R.M., Rimsza, L.M., et al. (2009). Follicular lymphomas with and without translocation t(14;18) differ in gene expression profiles and genetic alterations. *Blood* *114*, 826–834.
- Leshchiner, E.S., Braun, C.R., Bird, G.H., and Walensky, L.D. (2013). Direct activation of full-length proapoptotic BAK. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *110*, E986–E995.
- Lessene, G., Czabotar, P.E., Sleebs, B.E., Zobel, K., Lowes, K.N., Adams, J.M., Baell, J.B., Colman, P.M., Deshayes, K., Fairbrother, W.J., et al. (2013). Structure-guided design of a selective BCL-XL inhibitor. *Nat. Chem. Biol.* *9*, 390–397.
- Letai, A. (2017). Apoptosis and Cancer. *Annu. Rev. Cancer Biol.* *1*, 275–294.
- Letai, A., Bassik, M.C., Walensky, L.D., Sorcinelli, M.D., Weiler, S., and Korsmeyer, S.J. (2002). Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics. *Cancer Cell* *2*, 183–192.
- Leu, C.-M., Chang, C., and Hu, C. (2000). Epidermal growth factor (EGF) suppresses staurosporine-induced apoptosis by inducing mcl-1 via the mitogen-activated protein kinase pathway. *Oncogene* *19*, 1665–1675.
- Leuenroth, S.J., Grutkoski, P.S., Ayala, A., and Simms, H.H. (2000). The loss of Mcl-1 expression in human polymorphonuclear leukocytes promotes apoptosis. *J. Leukoc. Biol.* *68*, 158–166.
- Levine, B. (2005). Autophagy in cell death: an innocent convict? *J. Clin. Invest.* *115*, 2679–2688.
- Ley, R., Ewings, K.E., Hadfield, K., and Cook, S.J. (2005). Regulatory phosphorylation of Bim: sorting out the ERK from the JNK. *Cell Death Differ.* *12*, 1008–1014.
- Li, H., Zhu, H., Xu, C., and Yuan, J. (1998). Cleavage of BID by Caspase 8 Mediates the Mitochondrial Damage in the Fas Pathway of Apoptosis. *Cell* *94*, 491–501.
- Li, L.Y., Luo, X., and Wang, X. (2001). Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* *412*, 95–99.
- Li, M., Wu, X.-M., Gao, J., Yang, F., Zhang, C.-L., Ke, K., Wang, Y.-C., Zheng, Y.-S., Yao, J.-F., Guan, Y.-Y., et al. (2018). Mutations in the P10 region of procaspase-8 lead to chemotherapy resistance in acute myeloid leukemia by impairing procaspase-8 dimerization. *Cell Death Dis.* *9*, 516.
- Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Alnemri, E.S., and Wang, X. (1997). Cytochrome c and dATP-Dependent Formation of Apaf-1/Caspase-9 Complex Initiates an Apoptotic Protease Cascade. *Cell* *91*, 479–489.
- Li, Y., Gao, X., Wei, C., Guo, R., Xu, H., Bai, Z., Zhou, J., Zhu, J., Wang, W., Wu, Y., et al. (2020). Modification of Mcl-1 alternative splicing induces apoptosis and suppresses tumor proliferation in gastric cancer. *Aging* *12*, 19293–19315.
- Li, Z., He, S., and Look, A.T. (2019). The MCL1-specific inhibitor S63845 acts synergistically with venetoclax/ABT-199 to induce apoptosis in T-cell acute lymphoblastic leukemia cells. *Leukemia* *33*, 262–266.

- Lin, K.H., Winter, P.S., Xie, A., Roth, C., Martz, C.A., Stein, E.M., Anderson, G.R., Tingley, J.P., and Wood, K.C. (2016). Targeting MCL-1/BCL-XL Forestalls the Acquisition of Resistance to ABT-199 in Acute Myeloid Leukemia. *Sci. Rep.* 6.
- Litaudon, M., Bousserouel, H., Awang, K., Nosjean, O., Martin, M.-T., Dau, M.E.T.H., Hadi, H.A., Boutin, J.A., Sévenet, T., and Guéritte, F. (2009). A Dimeric Sesquiterpenoid from a Malaysian *Meiogyne* as a New Inhibitor of Bcl-xL/BakBH3 Domain Peptide Interaction $\pm$. *J. Nat. Prod.* 72, 480–483.
- Liu, H., Eksarko, P., Temkin, V., Haines, G.K., Perlman, H., Koch, A.E., Thimmapaya, B., and Pope, R.M. (2005). Mcl-1 Is Essential for the Survival of Synovial Fibroblasts in Rheumatoid Arthritis. *J. Immunol.* 175, 8337–8345.
- Liu, R., Liu, L., Yang, X., and Fang, H. (2019). Discovery and development of 1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline-3-carboxylic acid derivatives as Bcl-2/Mcl-1 inhibitors. *Bioorganic Chem.* 88, 102938.
- Liu, X., Dai, S., Zhu, Y., Marrack, P., and Kappler, J.W. (2003). The Structure of a Bcl-xL/Bim Fragment Complex. *Immunity* 19, 341–352.
- Liu, X.-H., Yu, E.Z., Li, Y.-Y., and Kagan, E. (2006). HIF-1 α has an anti-apoptotic effect in human airway epithelium that is mediated via Mcl-1 gene expression. *J. Cell. Biochem.* 97, 755–765.
- Llambi, F., Moldoveanu, T., Tait, S.W.G., Bouchier-Hayes, L., Temirov, J., McCormick, L.L., Dillon, C.P., and Green, D.R. (2011). A Unified Model of Mammalian BCL-2 Protein Family Interactions at the Mitochondria. *Mol. Cell* 44, 517–531.
- Lockshin, R.A., and Williams, C.M. (1965). Programmed cell death—V. Cytolytic enzymes in relation to the breakdown of the intersegmental muscles of silkworms. *J. Insect Physiol.* 11, 831–844.
- Lockshin, R.A., and Zakeri, Z. (2007). Cell death in health and disease. *J. Cell. Mol. Med.* 11, 1214–1224.
- Loureiro, A., Nogueira, E., Azoia, N.G., Sárria, M.P., Abreu, A.S., Shimanovich, U., Rollett, A., Härmark, J., Hebert, H., Guebitz, G., et al. (2015). Size controlled protein nanoemulsions for active targeting of folate receptor positive cells. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 135, 90–98.
- Lucendo, E., Sancho, M., Lolicato, F., Javanainen, M., Kulig, W., Leiva, D., Duarte, G., Andreu-Fernández, V., Mingarro, I., and Orzáez, M. (2020). Mcl-1 and Bok transmembrane domains: Unexpected players in the modulation of apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 117, 27980–27988.
- Luedtke, D.A., Niu, X., Pan, Y., Zhao, J., Liu, S., Edwards, H., Chen, K., Lin, H., Taub, J.W., and Ge, Y. (2017). Inhibition of Mcl-1 enhances cell death induced by the Bcl-2-selective inhibitor ABT-199 in acute myeloid leukemia cells. *Signal Transduct. Target. Ther.* 2.
- Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C., and Wang, X. (1998). Bid, a Bcl2 Interacting Protein, Mediates Cytochrome c Release from Mitochondria in Response to Activation of Cell Surface Death Receptors. *Cell* 94, 481–490.
- Lutz, R.J. (2000). Role of the BH3 (Bcl-2 homology 3) domain in the regulation of apoptosis and Bcl-2-related proteins. *Biochem. Soc. Trans.* 28, 51–56.
- Luzi, E., Papucci, L., Schiavone, N., Donnini, M., Lapucci, A., Tempestini, A., Witort, E., Nicolin, A., and Capaccioli, S. (2003). Downregulation of bcl-2 expression in lymphoma cells by bcl-2 ARE-targeted modified, synthetic ribozyme. *Cancer Gene Ther.* 10, 201–208.

MacKenzie, S.H., and Clark, A.C. (2012). Death by Caspase Dimerization. In *Protein Dimerization and Oligomerization in Biology*, J.M. Matthews, ed. (New York, NY: Springer New York), pp. 55–73.

Maghsoudi, N., Zakeri, Z., and Lockshin, R.A. (2012). Programmed cell death and apoptosis--where it came from and where it is going: from Elie Metchnikoff to the control of caspases. *Exp. Oncol.* *34*, 146–152.

Magrath, I. (1990). The Pathogenesis of Burkitt's Lymphoma. In *Advances in Cancer Research*, (Elsevier), pp. 133–270.

Maiuri, M.C., Zalckvar, E., Kimchi, A., and Kroemer, G. (2007). Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *8*, 741–752.

Malheiros, A., Cechinel Filho, V., Schmitt, C.B., Yunes, R.A., Escalante, A., Svetaz, L., Zacchino, S., and Delle Monache, F. (2005). Antifungal activity of drimane sesquiterpenes from *Drimys brasiliensis* using bioassay-guided fractionation. *J. Pharm. Pharm. Sci. Publ. Can. Soc. Pharm. Sci. Soc. Can. Sci. Pharm.* *8*, 335–339.

Marcucci, G., Moser, B., Blum, W., Stock, W., Wetzler, M., Kolitz, J.E., Thakuri, M., Carter, T., Stuart, R.K., and Larson, R.A. (2007). A phase III randomized trial of intensive induction and consolidation chemotherapy ± oblimersen, a pro-apoptotic Bcl-2 antisense oligonucleotide in untreated acute myeloid leukemia patients >60 years old. *J. Clin. Oncol.* *25*, 7012–7012.

Mason, K.D., Carpinelli, M.R., Fletcher, J.I., Collinge, J.E., Hilton, A.A., Ellis, S., Kelly, P.N., Ekert, P.G., Metcalf, D., Roberts, A.W., et al. (2007). Programmed Anuclear Cell Death Delimits Platelet Life Span. *Cell* *128*, 1173–1186.

Mazzaferro, S., Bouchemal, K., and Ponchel, G. (2013). Oral delivery of anticancer drugs III: formulation using drug delivery systems. *Drug Discov. Today* *18*, 99–104.

Mehlen, P., and Tauszig-Delamasure, S. (2014). Dependence receptors and colorectal cancer. *Gut* *63*, 1821–1829.

Ménard, N. (2012). Tensioactifs d'origine naturelle pour la solubilisation de principes actifs : synthèse, physico-chimie et toxicité.

Mencalha, A.L., Binato, R., Ferreira, G.M., Du Rocher, B., and Abdelhay, E. (2012). Forkhead Box M1 (FoxM1) Gene Is a New STAT3 Transcriptional Factor Target and Is Essential for Proliferation, Survival and DNA Repair of K562 Cell Line. *PLoS ONE* *7*, e48160.

Mendes, G.L., Santos, A.R.S., Campos, M.M., Tratsk, K.S., Yunes, R.A., Filho, V.C., and Calixto, J.B. (1998). Anti-hyperalgesic properties of the extract and of the main sesquiterpene polygodial isolated from the barks of *Drymis winteri* (Winteraceae). *Life Sci.* *63*, 369–381.

Mérino, D., Khaw, S.L., Glaser, S.P., Anderson, D.J., Belmont, L.D., Wong, C., Yue, P., Robati, M., Phipson, B., Fairlie, W.D., et al. (2012). Bcl-2, Bcl-xL, and Bcl-w are not equivalent targets of ABT-737 and navitoclax (ABT-263) in lymphoid and leukemic cells. *Blood* *119*, 5807–5816.

Micheau, O. (2003). Cellular FLICE-inhibitory protein: an attractive therapeutic target? *Expert Opin. Ther. Targets* *7*, 559–573.

Michels, J., Obrist, F., Vitale, I., Lissa, D., Garcia, P., Behnam-Motlagh, P., Kohno, K., Wu, G.S., Brenner, C., Castedo, M., et al. (2014). MCL-1 dependency of cisplatin-resistant cancer cells. *Biochem. Pharmacol.* *92*, 55–61.

- Mills, J.R., Hippo, Y., Robert, F., Chen, S.M.H., Malina, A., Lin, C.-J., Trojahn, U., Wendel, H.-G., Charest, A., Bronson, R.T., et al. (2008). mTORC1 promotes survival through translational control of Mcl-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 10853–10858.
- Mohammad, R.M., Goustin, A.S., Aboukameel, A., Chen, B., Banerjee, S., Wang, G., Nikolovska-Coleska, Z., Wang, S., and Al-Katib, A. (2007). Preclinical Studies of TW-37, a New Nonpeptidic Small-Molecule Inhibitor of Bcl-2, in Diffuse Large Cell Lymphoma Xenograft Model Reveal Drug Action on Both Bcl-2 and Mcl-1. *Clin. Cancer Res.* *13*, 2226–2235.
- Montenegro, I., Tomasoni, G., Bosio, C., Quiñones, N., Madrid, A., Carrasco, H., Olea, A., Martinez, R., Cuellar, M., and Villena, J. (2014). Study on the Cytotoxic Activity of Drimane Sesquiterpenes and Nordrimane Compounds against Cancer Cell Lines. *Molecules* *19*, 18993–19006.
- Montero, J., and Letai, A. (2016). Dynamic BH3 profiling-poking cancer cells with a stick. *Mol. Cell. Oncol.* *3*, e1040144.
- Montero, J., Sarosiek, K.A., DeAngelo, J.D., Maertens, O., Ryan, J., Ercan, D., Piao, H., Horowitz, N.S., Berkowitz, R.S., Matulonis, U., et al. (2015). Drug-Induced Death Signaling Strategy Rapidly Predicts Cancer Response to Chemotherapy. *Cell* *160*, 977–989.
- Mori, C., Nakamura, N., Kimura, S., Irie, H., Takigawa, T., and Shiota, K. (1995). Programmed cell death in the interdigital tissue of the fetal mouse limb is apoptosis with DNA fragmentation. *Anat. Rec.* *242*, 103–110.
- Mott, J.L., Kobayashi, S., Bronk, S.F., and Gores, G.J. (2007). mir-29 regulates Mcl-1 protein expression and apoptosis. *Oncogene* *26*, 6133–6140.
- Moujalled, D.M., Pomilio, G., Ghiurau, C., Ivey, A., Salmon, J., Rijal, S., Macrauld, S., Zhang, L., Teh, T.-C., Tiong, I.-S., et al. (2019). Combining BH3-mimetics to target both BCL-2 and MCL1 has potent activity in pre-clinical models of acute myeloid leukemia. *Leukemia* *33*, 905–917.
- Moyzis, A.G., Lally, N.S., Liang, W., Leon, L.J., Najor, R.H., Orogo, A.M., and Gustafsson, Å.B. (2020). Mcl-1-mediated mitochondrial fission protects against stress but impairs cardiac adaptation to exercise. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *146*, 109–120.
- Muzio, M., Salvesen, G.S., and Dixit, V.M. (1997). FLICE Induced Apoptosis in a Cell-free System: Cleavage of caspase zymogens. *J. Biol. Chem.* *272*, 2952–2956.
- Nagata, S. (2005). DNA degradation in development and programmed cell death. *Annu. Rev. Immunol.* *23*, 853–875.
- Naik, E., Michalak, E.M., Villunger, A., Adams, J.M., and Strasser, A. (2007). Ultraviolet radiation triggers apoptosis of fibroblasts and skin keratinocytes mainly via the BH3-only protein Noxa. *J. Cell Biol.* *176*, 415–424.
- Naito, M., Nagashima, K., Mashima, T., and Tsuruo, T. (1997). Phosphatidylserine Externalization Is a Downstream Event of Interleukin-1 β -Converting Enzyme Family Protease Activation During Apoptosis. *Blood* *89*, 2060–2066.
- Nakano, K., and Vousden, K.H. (2001). PUMA, a Novel Proapoptotic Gene, Is Induced by p53. *Mol. Cell* *7*, 683–694.
- Nangia, V., Siddiqui, F.M., Caenepeel, S., Timonina, D., Bilton, S.J., Phan, N., Gomez-Caraballo, M., Archibald, H.L., Li, C., Fraser, C., et al. (2018). Exploiting MCL1 Dependency with Combination MEK + MCL1 Inhibitors Leads to Induction of Apoptosis and Tumor Regression in *KRAS* -Mutant Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancer Discov.* *8*, 1598–1613.

- Newman, D.J., and Cragg, G.M. (2020). Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. *J. Nat. Prod.* 83, 770–803.
- Nguyen, M., Marcellus, R.C., Roulston, A., Watson, M., Serfass, L., Murthy Madiraju, S.R., Goulet, D., Viallet, J., Belec, L., Billot, X., et al. (2007). Small molecule obatoclax (GX15-070) antagonizes MCL-1 and overcomes MCL-1-mediated resistance to apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 19512–19517.
- Nguyen-Khac, F., Borie, C., Callet-Bauchu, E., Eclache, V., and Struski, S. (2016). Cytogenetics in the management of chronic lymphocytic leukemia: an update by the Groupe francophone de cytogénétique hématologique (GFCH). *Ann. Biol. Clin. (Paris)* 74, 561–567.
- Nijhawan, D. (2003). Elimination of Mcl-1 is required for the initiation of apoptosis following ultraviolet irradiation. *Genes Dev.* 17, 1475–1486.
- Nomura, M., Shimizu, S., Sugiyama, T., Narita, M., Ito, T., Matsuda, H., and Tsujimoto, Y. (2003). 14-3-3 Interacts Directly with and Negatively Regulates Pro-apoptotic Bax. *J. Biol. Chem.* 278, 2058–2065.
- Nuñez, G., London, L., Hockenbery, D., Alexander, M., McKearn, J.P., and Korsmeyer, S.J. (1990). Deregulated Bcl-2 gene expression selectively prolongs survival of growth factor-deprived hemopoietic cell lines. *J. Immunol. Baltim. Md* 144, 3602–3610.
- Oberst, A., Ichim, G., and Tait, S.W.G. (2016). Mitochondrial Permeabilization: From Lethality to Vitality. In *Mitochondria and Cell Death*, D.M. Hockenbery, ed. (New York, NY: Springer New York), pp. 213–226.
- O'Brien, S., Moore, J.O., Boyd, T.E., Larratt, L.M., Skotnicki, A., Koziner, B., Chanan-Khan, A.A., Seymour, J.F., Bociek, R.G., Pavletic, S., et al. (2007). Randomized Phase III Trial of Fludarabine Plus Cyclophosphamide With or Without Oblimersen Sodium (Bcl-2 antisense) in Patients With Relapsed or Refractory Chronic Lymphocytic Leukemia. *J. Clin. Oncol.* 25, 1114–1120.
- O'Brien, S.M., Cunningham, C.C., Golenkov, A.K., Turkina, A.G., Novick, S.C., and Rai, K.R. (2005). Phase I to II Multicenter Study of Oblimersen Sodium, a Bcl-2 Antisense Oligonucleotide, in Patients With Advanced Chronic Lymphocytic Leukemia. *J. Clin. Oncol.* 23, 7697–7702.
- Oda, E. (2000a). Noxa, a BH3-Only Member of the Bcl-2 Family and Candidate Mediator of p53-Induced Apoptosis. *Science* 288, 1053–1058.
- Oda, E. (2000b). Noxa, a BH3-Only Member of the Bcl-2 Family and Candidate Mediator of p53-Induced Apoptosis. *Science* 288, 1053–1058.
- Okada, Vaeteewoottacharn, and Kariya (2019). Application of Highly Immunocompromised Mice for the Establishment of Patient-Derived Xenograft (PDX) Models. *Cells* 8, 889.
- Okkenhaug, K., and Burger, J.A. (2015). PI3K Signaling in Normal B Cells and Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL). In *B Cell Receptor Signaling*, T. Kurosaki, and J. Wienands, eds. (Cham: Springer International Publishing), pp. 123–142.
- Oltersdorf, T., Elmore, S.W., Shoemaker, A.R., Armstrong, R.C., Augeri, D.J., Belli, B.A., Bruncko, M., Deckwerth, T.L., Dinges, J., Hajduk, P.J., et al. (2005). An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours. *Nature* 435, 677–681.
- Opferman, J.T. (2005). Obligate Role of Anti-Apoptotic MCL-1 in the Survival of Hematopoietic Stem Cells. *Science* 307, 1101–1104.

- Opferman, J.T., Letai, A., Beard, C., Sorcinelli, M.D., Ong, C.C., and Korsmeyer, S.J. (2003). Development and maintenance of B and T lymphocytes requires antiapoptotic MCL-1. *Nature* *426*, 671–676.
- Opydo-Chanek, M., Gonzalo, O., and Marzo, I. (2017). Multifaceted anticancer activity of BH3 mimetics: Current evidence and future prospects. *Biochem. Pharmacol.* *136*, 12–23.
- Or, C.-H., Chang, Y., Lin, W.-C., Lee, W.-C., Su, H.-L., Cheung, M.-W., Huang, C.-P., Ho, C., and Chang, C.-C. (2016). Obatoclax, a Pan-BCL-2 Inhibitor, Targets Cyclin D1 for Degradation to Induce Antiproliferation in Human Colorectal Carcinoma Cells. *Int. J. Mol. Sci.* *18*, 44.
- Ozturk, B., Argin, S., Ozilgen, M., and McClements, D.J. (2015). Nanoemulsion delivery systems for oil-soluble vitamins: Influence of carrier oil type on lipid digestion and vitamin D3 bioaccessibility. *Food Chem.* *187*, 499–506.
- Pagliari, L.J., Kuwana, T., Bonzon, C., Newmeyer, D.D., Tu, S., Beere, H.M., and Green, D.R. (2005). The multidomain proapoptotic molecules Bax and Bak are directly activated by heat. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *102*, 17975–17980.
- Palacio, J., Agudelo, N.A., and Lopez, B.L. (2016). PEGylation of PLA nanoparticles to improve mucus-penetration and colloidal stability for oral delivery systems. *Curr. Opin. Chem. Eng.* *11*, 14–19.
- Pan, R., Hogdal, L.J., Benito, J.M., Bucci, D., Han, L., Borthakur, G., Cortes, J., DeAngelo, D.J., Debose, L., Mu, H., et al. (2014). Selective BCL-2 Inhibition by ABT-199 Causes On-Target Cell Death in Acute Myeloid Leukemia. *Cancer Discov.* *4*, 362–375.
- Parikh, S.A., Kantarjian, H., Schimmer, A., Walsh, W., Asatiani, E., El-Shami, K., Winton, E., and Verstovsek, S. (2010). Phase II Study of Obatoclax Mesylate (GX15-070), a Small-Molecule BCL-2 Family Antagonist, for Patients With Myelofibrosis. *Clin. Lymphoma Myeloma Leuk.* *10*, 285–289.
- Park, C.-M., Bruncko, M., Adickes, J., Bauch, J., Ding, H., Kunzer, A., Marsh, K.C., Nimmer, P., Shoemaker, A.R., Song, X., et al. (2008). Discovery of an Orally Bioavailable Small Molecule Inhibitor of Prosurvival B-Cell Lymphoma 2 Proteins. *J. Med. Chem.* *51*, 6902–6915.
- Peirs, S., Matthijssens, F., Goossens, S., Van de Walle, I., Ruggero, K., de Bock, C.E., Degryse, S., Canté-Barrett, K., Briot, D., Clappier, E., et al. (2014). ABT-199 mediated inhibition of BCL-2 as a novel therapeutic strategy in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood* *124*, 3738–3747.
- Peng, R., Tong, J.-S., Li, H., Yue, B., Zou, F., Yu, J., and Zhang, L. (2013). Targeting Bax interaction sites reveals that only homo-oligomerization sites are essential for its activation. *Cell Death Differ.* *20*, 744–754.
- Perciavalle, R.M., Stewart, D.P., Koss, B., Lynch, J., Milasta, S., Bathina, M., Temirov, J., Cleland, M.M., Pelletier, S., Schuetz, J.D., et al. (2012). Anti-apoptotic MCL-1 localizes to the mitochondrial matrix and couples mitochondrial fusion to respiration. *Nat. Cell Biol.* *14*, 575–583.
- Perrin, F. (1926). Polarisation de la lumière de fluorescence. Vie moyenne des molécules dans l'état excité. *J. Phys. Radium* *7*, 390–401.
- Peso, L. d. (1997). Interleukin-3-Induced Phosphorylation of BAD Through the Protein Kinase Akt. *Science* *278*, 687–689.
- Phillips, D.C., Xiao, Y., Lam, L.T., Litvinovich, E., Roberts-Rapp, L., Souers, A.J., and Levenson, J.D. (2015). Loss in MCL-1 function sensitizes non-Hodgkin's lymphoma cell lines to the BCL-2-selective inhibitor venetoclax (ABT-199). *Blood Cancer J.* *5*, e368–e368.

- Piché, A., Grim, J., Rancourt, C., Gómez-Navarro, J., Reed, J.C., and Curiel, D.T. (1998). Modulation of Bcl-2 protein levels by an intracellular anti-Bcl-2 single-chain antibody increases drug-induced cytotoxicity in the breast cancer cell line MCF-7. *Cancer Res.* 58, 2134–2140.
- Pihán, P., Carreras-Sureda, A., and Hetz, C. (2017). BCL-2 family: integrating stress responses at the ER to control cell demise. *Cell Death Differ.* 24, 1478–1487.
- Piret, J.-P., Minet, E., Cosse, J.-P., Ninane, N., Debacq, C., Raes, M., and Michiels, C. (2005). Hypoxia-inducible Factor-1-dependent Overexpression of Myeloid Cell Factor-1 Protects Hypoxic Cells against tert-Butyl Hydroperoxide-induced Apoptosis. *J. Biol. Chem.* 280, 9336–9344.
- Prukova, D., Andera, L., Nahacka, Z., Karolova, J., Svaton, M., Klanova, M., Havranek, O., Soukup, J., Svobodova, K., Zemanova, Z., et al. (2019). Cotargeting of BCL2 with Venetoclax and MCL1 with S63845 Is Synthetically Lethal *In Vivo* in Relapsed Mantle Cell Lymphoma. *Clin. Cancer Res.* 25, 4455–4465.
- Pun, J., Anderson, C., and Ford, J. (2018). Comprendre la leucémie et le lymphome (The Leukemia & Lymphoma Society of Canada).
- Puthalakath, H., Huang, D.C., O'Reilly, L.A., King, S.M., and Strasser, A. (1999). The Proapoptotic Activity of the Bcl-2 Family Member Bim Is Regulated by Interaction with the Dynein Motor Complex. *Mol. Cell* 3, 287–296.
- Puthalakath, H., O'Reilly, L.A., Gunn, P., Lee, L., Kelly, P.N., Huntington, N.D., Hughes, P.D., Michalak, E.M., McKimm-Breschkin, J., Motoyama, N., et al. (2007). ER Stress Triggers Apoptosis by Activating BH3-Only Protein Bim. *Cell* 129, 1337–1349.
- Qian, J., Voorbach, M.J., Huth, J.R., Coen, M.L., Zhang, H., Ng, S.-C., Comess, K.M., Petros, A.M., Rosenberg, S.H., Warrior, U., et al. (2004). Discovery of novel inhibitors of Bcl-xL using multiple high-throughput screening platforms. *Anal. Biochem.* 328, 131–138.
- Qiu, L., Dong, C., and Kan, X. (2018). Lymphoma-targeted treatment using a folic acid-decorated vincristine-loaded drug delivery system. *Drug Des. Devel. Ther. Volume 12*, 863–872.
- Ramsey, H.E., Fischer, M.A., Lee, T., Gorska, A.E., Arrate, M.P., Fuller, L., Boyd, K.L., Strickland, S.A., Sensintaffar, J., Hogdal, L.J., et al. (2018). A Novel MCL1 Inhibitor Combined with Venetoclax Rescues Venetoclax-Resistant Acute Myelogenous Leukemia. *Cancer Discov.* 8, 1566–1581.
- Rasmussen, M.L., Kline, L.A., Park, K.P., Ortolano, N.A., Romero-Morales, A.I., Anthony, C.C., Beckermann, K.E., and Gama, V. (2018). A Non-apoptotic Function of MCL-1 in Promoting Pluripotency and Modulating Mitochondrial Dynamics in Stem Cells. *Stem Cell Rep.* 10, 684–692.
- Reed, J.C., Zha, H., Aime-Sempe, C., Takayama, S., and Wang, H.G. (1996). Structure-function analysis of Bcl-2 family proteins. Regulators of programmed cell death. *Adv. Exp. Med. Biol.* 406, 99–112.
- Rennebeck, G., Martelli, M., and Kyprianou, N. (2005). Anoikis and Survival Connections in the Tumor Microenvironment: Is There a Role in Prostate Cancer Metastasis?: Figure 1. *Cancer Res.* 65, 11230–11235.
- Reymond, J.-L. (2015). The Chemical Space Project. *Acc. Chem. Res.* 48, 722–730.
- Ribatti, D. (2018). An historical note on the cell theory. *Exp. Cell Res.* 364, 1–4.
- Richter-Larrea, J.A., Robles, E.F., Fresquet, V., Beltran, E., Rullan, A.J., Agirre, X., Calasanz, M.J., Panizo, C., Richter, J.A., Hernandez, J.M., et al. (2010). Reversion of epigenetically mediated BIM silencing overcomes chemoresistance in Burkitt lymphoma. *Blood* 116, 2531–2542.

- Riedell, P.A., and Smith, S.M. (2018). Double hit and double expressors in lymphoma: Definition and treatment. *Cancer* 124, 4622–4632.
- Rihak, K.J., Bissember, A.C., and Smith, J.A. (2018). Polygodial: A viable natural product scaffold for the rapid synthesis of novel polycyclic pyrrole and pyrrolidine derivatives. *Tetrahedron* 74, 1167–1174.
- Rinkenberger, J.L., Horning, S., Klocke, B., Roth, K., and Korsmeyer, S.J. (2000). Mcl-1 deficiency results in peri-implantation embryonic lethality. *Genes Dev.* 14, 23–27.
- Rosén, J., Gottfries, J., Muresan, S., Backlund, A., and Oprea, T.I. (2009). Novel Chemical Space Exploration via Natural Products. *J. Med. Chem.* 52, 1953–1962.
- Rostagno, M.A., and Prado, J.M. (2013). Natural Product Extraction: Principles and Applications.
- S. Soderquist, R., and Eastman, A. (2016). BCL2 Inhibitors as Anticancer Drugs: A Plethora of Misleading BH3 Mimetics. *Mol. Cancer Ther.* 15, 2011–2017.
- Sabattini, E., Bacci, F., Sagrmoso, C., and Pileri, S.A. (2010). WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues in 2008: an overview. *Pathologica* 102, 83–87.
- Sakahira, H., Enari, M., and Nagata, S. (1998). Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature* 391, 96–99.
- Salvador-Gallego, R., Mund, M., Cosentino, K., Schneider, J., Unsay, J., Schraermeyer, U., Engelhardt, J., Ries, J., and García-Sáez, A.J. (2016). Bax assembly into rings and arcs in apoptotic mitochondria is linked to membrane pores. *EMBO J.* 35, 389–401.
- Salvesen, G.S., and Duckett, C.S. (2002). IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 401–410.
- Sattler, M., Liang, H., Nettesheim, D., Meadows, R.P., Harlan, J.E., Eberstadt, M., Yoon, H.S., Shuker, S.B., Chang, B.S., Minn, A.J., et al. (1997). Structure of Bcl-xL/ -Bak Peptide Complex: Recognition Between Regulators of Apoptosis. *Science* 275, 983–986.
- Scaffidi, C., Schmitz, I., Krammer, P.H., and Peter, M.E. (1999). The Role of c-FLIP in Modulation of CD95-induced Apoptosis. *J. Biol. Chem.* 274, 1541–1548.
- Schwickart, M., Huang, X., Lill, J.R., Liu, J., Ferrando, R., French, D.M., Maecker, H., O'Rourke, K., Bazan, F., Eastham-Anderson, J., et al. (2010). Deubiquitinase USP9X stabilizes MCL1 and promotes tumour cell survival. *Nature* 463, 103–107.
- Sebbagh, M., Renvoizé, C., Hamelin, J., Riché, N., Bertoglio, J., and Bréard, J. (2001). Caspase-3-mediated cleavage of ROCK I induces MLC phosphorylation and apoptotic membrane blebbing. *Nat. Cell Biol.* 3, 346–352.
- Seca, A.M.L., and Pinto, D.C.G.A. (2019). Biological Potential and Medical Use of Secondary Metabolites. *Med. Basel Switz.* 6.
- Seguy, L. (Submitted). Safe non-hemolytic nanoemulsions as template for intravenous administration of hydrophobic APIs.
- Seiller, C., Maiga, S., Touzeau, C., Bellanger, C., Kervoëlen, C., Descamps, G., Maillet, L., Moreau, P., Pellat-Deceunynck, C., Gomez-Bougie, P., et al. (2020). Dual targeting of BCL2 and MCL1 rescues myeloma cells resistant to BCL2 and MCL1 inhibitors associated with the formation of BAX/BAK hetero-complexes. *Cell Death Dis.* 11.

- Shamas-Din, A., Kale, J., Leber, B., and Andrews, D.W. (2013). Mechanisms of action of Bcl-2 family proteins. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5, a008714.
- Shore, G., and Warr, M. (2008). Unique Biology of Mcl-1: Therapeutic Opportunities in Cancer. *Curr. Mol. Med.* 8, 138–147.
- Shultz, L.D., Goodwin, N., Ishikawa, F., Hosur, V., Lyons, B.L., and Greiner, D.L. (2014). Human Cancer Growth and Therapy in Immunodeficient Mouse Models. *Cold Spring Harb. Protoc.* 2014, pdb.top073585-pdb.top073585.
- Sieghart, W., Losert, D., Strommer, S., Cejka, D., Schmid, K., Rasoul-Rockenschaub, S., Bodingbauer, M., Crevenna, R., Monia, B.P., Peck-Radosavljevic, M., et al. (2006). Mcl-1 overexpression in hepatocellular carcinoma: A potential target for antisense therapy. *J. Hepatol.* 44, 151–157.
- Singh, J., Petter, R.C., Baillie, T.A., and Whitty, A. (2011). The resurgence of covalent drugs. *Nat. Rev. Drug Discov.* 10, 307–317.
- Siu, K.T., Huang, C., Panaroni, C., Mukaiharu, K., Fulzele, K., Soucy, R., Thorburn, C., Cidado, J., Drew, L., Chattopadhyay, S., et al. (2019). BCL2 blockade overcomes MCL1 resistance in multiple myeloma. *Leukemia* 33, 2098–2102.
- Slomp, A., and Peperzak, V. (2018). Role and Regulation of Pro-survival BCL-2 Proteins in Multiple Myeloma. *Front. Oncol.* 8.
- Sly, L.M., Hingley-Wilson, S.M., Reiner, N.E., and McMaster, W.R. (2003). Survival of *Mycobacterium tuberculosis* in Host Macrophages Involves Resistance to Apoptosis Dependent upon Induction of Antiapoptotic Bcl-2 Family Member Mcl-1. *J. Immunol.* 170, 430–437.
- Smits, C., Czabotar, P.E., Hinds, M.G., and Day, C.L. (2008). Structural Plasticity Underpins Promiscuous Binding of the Prosurvival Protein A1. *Structure* 16, 818–829.
- Souers, A.J., Levenson, J.D., Boghaert, E.R., Ackler, S.L., Catron, N.D., Chen, J., Dayton, B.D., Ding, H., Enschede, S.H., Fairbrother, W.J., et al. (2013). ABT-199, a potent and selective BCL-2 inhibitor, achieves antitumor activity while sparing platelets. *Nat. Med.* 19, 202–208.
- Spinner, S., Crispatsu, G., Yi, J.-H., Munkhbaatar, E., Mayer, P., Höckendorf, U., Müller, N., Li, Z., Schader, T., Bendz, H., et al. (2016). Re-activation of mitochondrial apoptosis inhibits T-cell lymphoma survival and treatment resistance. *Leukemia* 30, 1520–1530.
- Steimer, D.A., Boyd, K., Takeuchi, O., Fisher, J.K., Zambetti, G.P., and Opferman, J.T. (2009). Selective roles for antiapoptotic MCL-1 during granulocyte development and macrophage effector function. *Blood* 113, 2805–2815.
- Stennicke, H.R., Jürgensmeier, J.M., Shin, H., Deveraux, Q., Wolf, B.B., Yang, X., Zhou, Q., Ellerby, H.M., Ellerby, L.M., Bredesen, D., et al. (1998). Pro-caspase-3 Is a Major Physiologic Target of Caspase-8. *J. Biol. Chem.* 273, 27084–27090.
- Strasser, A. (2019). MCL-1 inhibitors (Estoril (Portugal)).
- Subramaniam, D., Natarajan, G., Ramalingam, S., Ramachandran, I., May, R., Queimado, L., Houchen, C.W., and Anant, S. (2008). Translation inhibition during cell cycle arrest and apoptosis: Mcl-1 is a novel target for RNA binding protein CUGBP2. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 294, G1025–1032.

- Sun, Y., Zhao, Y., Zhao, X., Lee, R.J., Teng, L., and Zhou, C. (2017). Enhancing the Therapeutic Delivery of Oligonucleotides by Chemical Modification and Nanoparticle Encapsulation. *Molecules* **22**, 1724.
- Sundararajan, R., Cuconati, A., Nelson, D., and White, E. (2001). Tumor Necrosis Factor- α Induces Bax-Bak Interaction and Apoptosis, Which Is Inhibited by Adenovirus E1B 19K. *J. Biol. Chem.* **276**, 45120–45127.
- Suzuki, M., Youle, R.J., and Tjandra, N. (2000). Structure of Bax. *Cell* **103**, 645–654.
- Swinney, D.C., and Anthony, J. (2011). How were new medicines discovered? *Nat. Rev. Drug Discov.* **10**, 507–519.
- Szlavik, Z., Csekei, M., Paczal, A., Szabo, Z.B., Sipos, S., Radics, G., Proszenyak, A., Balint, B., Murray, J., Davidson, J., et al. (2020). Discovery of S64315, a Potent and Selective Mcl-1 Inhibitor. *J. Med. Chem.*
- Tagawa, H., Karnan, S., Suzuki, R., Matsuo, K., Zhang, X., Ota, A., Morishima, Y., Nakamura, S., and Seto, M. (2005). Genome-wide array-based CGH for mantle cell lymphoma: identification of homozygous deletions of the proapoptotic gene BIM. *Oncogene* **24**, 1348–1358.
- Tahir, S.K., Smith, M.L., Hessler, P., Rapp, L.R., Idler, K.B., Park, C.H., Levenson, J.D., and Lam, L.T. (2017). Potential mechanisms of resistance to venetoclax and strategies to circumvent it. *BMC Cancer* **17**.
- Tait, S.W.G., and Green, D.R. (2010). Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**, 621–632.
- Tao, Z.-F., Hasvold, L., Wang, L., Wang, X., Petros, A.M., Park, C.H., Boghaert, E.R., Catron, N.D., Chen, J., Colman, P.M., et al. (2014). Discovery of a Potent and Selective BCL-X_L Inhibitor with *in Vivo* Activity. *ACS Med. Chem. Lett.* **5**, 1088–1093.
- Taylor, R.C., Cullen, S.P., and Martin, S.J. (2008). Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 231–241.
- Thanki, K., Gangwal, R.P., Sangamwar, A.T., and Jain, S. (2013). Oral delivery of anticancer drugs: Challenges and opportunities. *J. Controlled Release* **170**, 15–40.
- Thomas, L.W., Lam, C., and Edwards, S.W. (2010). Mcl-1; the molecular regulation of protein function. *FEBS Lett.* **584**, 2981–2989.
- Thomas, R.L., Roberts, D.J., Kubli, D.A., Lee, Y., Quinsay, M.N., Owens, J.B., Fischer, K.M., Sussman, M.A., Miyamoto, S., and Gustafsson, A.B. (2013a). Loss of MCL-1 leads to impaired autophagy and rapid development of heart failure. *Genes Dev.* **27**, 1365–1377.
- Thomas, S., Quinn, B.A., Das, S.K., Dash, R., Emdad, L., Dasgupta, S., Wang, X.-Y., Dent, P., Reed, J.C., Pellecchia, M., et al. (2013b). Targeting the Bcl-2 family for cancer therapy. *Expert Opin. Ther. Targets* **17**, 61–75.
- Tomasina, J., Lheureux, S., Gauduchon, P., Rault, S., and Malzert-Fréon, A. (2013a). Nanocarriers for the targeted treatment of ovarian cancers. *Biomaterials* **34**, 1073–1101.
- Tomasina, J., Poulain, L., Abeilard, E., Giffard, F., Brotin, E., Carduner, L., Carreiras, F., Gauduchon, P., Rault, S., and Malzert-Fréon, A. (2013b). Rapid and soft formulation of folate-functionalized nanoparticles for the targeted delivery of triptentone in ovarian carcinoma. *Int. J. Pharm.* **458**, 197–207.

- Toshiyuki, M., and Reed, J.C. (1995). Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* 80, 293–299.
- Touzeau, C., Ryan, J., Guerriero, J., Moreau, P., Chonghaile, T.N., Le Gouill, S., Richardson, P., Anderson, K., Amiot, M., and Letai, A. (2016). BH3 profiling identifies heterogeneous dependency on Bcl-2 family members in multiple myeloma and predicts sensitivity to BH3 mimetics. *Leukemia* 30, 761–764.
- Trivigno, D., Essmann, F., Huber, S.M., and Rudner, J. (2012). Deubiquitinase USP9x Confers Radioresistance through Stabilization of Mcl-1. *Neoplasia* 14, 893–IN4.
- Tron, A.E., Belmonte, M.A., Adam, A., Aquila, B.M., Boise, L.H., Chiarparin, E., Cidado, J., Embrey, K.J., Gangl, E., Gibbons, F.D., et al. (2018). Discovery of Mcl-1-specific inhibitor AZD5991 and preclinical activity in multiple myeloma and acute myeloid leukemia. *Nat. Commun.* 9.
- Tse, C., Shoemaker, A.R., Adickes, J., Anderson, M.G., Chen, J., Jin, S., Johnson, E.F., Marsh, K.C., Mitten, M.J., Nimmer, P., et al. (2008). ABT-263: A Potent and Orally Bioavailable Bcl-2 Family Inhibitor. *Cancer Res.* 68, 3421–3428.
- Tsujimoto, Y., Cossman, J., Jaffe, E., and Croce, C. (1985). Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science* 228, 1440–1443.
- Turkson, J., and Jove, R. (2000). STAT proteins: novel molecular targets for cancer drug discovery. *Oncogene* 19, 6613–6626.
- Tyson-Capper, A., and Gautrey, H. (2018). Regulation of Mcl-1 alternative splicing by hnRNP F, H1 and K in breast cancer cells. *RNA Biol.* 15, 1448–1457.
- Tzung, S.-P., Kim, K.M., Basañez, G., Giedt, C.D., Simon, J., Zimmerberg, J., Zhang, K.Y.J., and Hockenbery, D.M. (2001). Antimycin A mimics a cell-death-inducing Bcl-2 homology domain 3. *Nat. Cell Biol.* 3, 183–191.
- Upton, J.-P., Austgen, K., Nishino, M., Coakley, K.M., Hagen, A., Han, D., Papa, F.R., and Oakes, S.A. (2008). Caspase-2 Cleavage of BID Is a Critical Apoptotic Signal Downstream of Endoplasmic Reticulum Stress. *Mol. Cell. Biol.* 28, 3943–3951.
- Uren, R.T., Iyer, S., and Kluck, R.M. (2017). Pore formation by dimeric Bak and Bax: an unusual pore? *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 372, 20160218.
- Valent, P., Sadovnik, I., Eisenwort, G., Herrmann, H., Bauer, K., Mueller, N., Sperr, W.R., Wicklein, D., and Schumacher, U. (2020). Redistribution, homing and organ-invasion of neoplastic stem cells in myeloid neoplasms. *Semin. Cancer Biol.* 60, 191–201.
- Vandenberg, C.J., and Cory, S. (2013). ABT-199, a new Bcl-2-specific BH3 mimetic, has in vivo efficacy against aggressive Myc-driven mouse lymphomas without provoking thrombocytopenia. *Blood* 121, 2285–2288.
- Vander Heiden, M.G., and Thompson, C.B. (1999). Bcl-2 proteins: regulators of apoptosis or of mitochondrial homeostasis? *Nat. Cell Biol.* 1, E209–E216.
- Veis, D.J., Sorenson, C.M., Shutter, J.R., and Korsmeyer, S.J. (1993). Bcl-2-deficient mice demonstrate fulminant lymphoid apoptosis, polycystic kidneys, and hypopigmented hair. *Cell* 75, 229–240.
- Vela, L., Gonzalo, O., Naval, J., and Marzo, I. (2013). Direct Interaction of Bax and Bak Proteins with Bcl-2 Homology Domain 3 (BH3)-only Proteins in Living Cells Revealed by Fluorescence Complementation. *J. Biol. Chem.* 288, 4935–4946.

Venderova, K., and Park, D.S. (2012). Programmed cell death in Parkinson's disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2.

Verdine, G.L. (1996). The combinatorial chemistry of nature. *Nature* 384, 11–13.

Verhagen, A.M., Ekert, P.G., Pakusch, M., Silke, J., Connolly, L.M., Reid, G.E., Moritz, R.L., Simpson, R.J., and Vaux, D.L. (2000). Identification of DIABLO, a Mammalian Protein that Promotes Apoptosis by Binding to and Antagonizing IAP Proteins. *Cell* 102, 43–53.

Villunger, A. (2003). p53- and Drug-Induced Apoptotic Responses Mediated by BH3-Only Proteins Puma and Noxa. *Science* 302, 1036–1038.

Vogler, M., Butterworth, M., Majid, A., Walewska, R.J., Sun, X.-M., Dyer, M.J.S., and Cohen, G.M. (2009). Concurrent up-regulation of BCL-XL and BCL2A1 induces approximately 1000-fold resistance to ABT-737 in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 113, 4403–4413.

Vogler, M., Dinsdale, D., Dyer, M.J.S., and Cohen, G.M. (2013). ABT-199 selectively inhibits BCL2 but not BCL2L1 and efficiently induces apoptosis of chronic lymphocytic leukaemic cells but not platelets. *Br. J. Haematol.* 163, 139–142.

Wang, H. (2004). Apoptosis-Inducing Factor Substitutes for Caspase Executioners in NMDA-Triggered Excitotoxic Neuronal Death. *J. Neurosci.* 24, 10963–10973.

Wang, X. (2015). The Role of MCL-1 in the Heart: Gateway from Life to Death. University of Tennessee Health Science Center.

Wang, G., Nikolovska-Coleska, Z., Yang, C.-Y., Wang, R., Tang, G., Guo, J., Shangary, S., Qiu, S., Gao, W., Yang, D., et al. (2006). Structure-Based Design of Potent Small-Molecule Inhibitors of Anti-Apoptotic Bcl-2 Proteins. *J. Med. Chem.* 49, 6139–6142.

Wang, J.L., Zhang, Z.J., Choksi, S., Shan, S., Lu, Z., Croce, C.M., Alnemri, E.S., Korngold, R., and Huang, Z. (2000). Cell permeable Bcl-2 binding peptides: a chemical approach to apoptosis induction in tumor cells. *Cancer Res.* 60, 1498–1502.

Wang, J.-M., Chao, J.-R., Chen, W., Kuo, M.-L., Yen, J.J.-Y., and Yang-Yen, H.-F. (1999). The Antiapoptotic Gene mcl-1 Is Up-Regulated by the Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Signaling Pathway through a Transcription Factor Complex Containing CREB. *Mol. Cell. Biol.* 19, 6195–6206.

Wang, X., Bathina, M., Lynch, J., Koss, B., Calabrese, C., Frase, S., Schuetz, J.D., Reh, J.E., and Opferman, J.T. (2013). Deletion of MCL-1 causes lethal cardiac failure and mitochondrial dysfunction. *Genes Dev.* 27, 1351–1364.

Wani, M.C., Taylor, H.L., Wall, M.E., Coggon, P., and McPhail, A.T. (1971). Plant antitumor agents. VI. Isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *J. Am. Chem. Soc.* 93, 2325–2327.

Watanabe, T., Ichikawa, A., Saito, H., and Hotta, T. (1996). Overexpression of the *MDM2* Oncogene in Leukemia and Lymphoma. *Leuk. Lymphoma* 21, 391–397.

Wei, A.H., Roberts, A.W., Spencer, A., Rosenberg, A.S., Siegel, D., Walter, R.B., Caenepeel, S., Hughes, P., McIver, Z., Mezzi, K., et al. (2020). Targeting MCL-1 in hematologic malignancies: Rationale and progress. *Blood Rev.* 100672.

Wei, D., Zhang, Q., Schreiber, J.S., Parsels, L.A., Abulwerdi, F.A., Kausar, T., Lawrence, T.S., Sun, Y., Nikolovska-Coleska, Z., and Morgan, M.A. (2015). Targeting Mcl-1 for Radiosensitization of Pancreatic Cancers. *Transl. Oncol.* 8, 47–54.

- Wertz, I.E., Kusam, S., Lam, C., Okamoto, T., Sandoval, W., Anderson, D.J., Helgason, E., Ernst, J.A., Eby, M., Liu, J., et al. (2011). Sensitivity to antitubulin chemotherapeutics is regulated by MCL1 and FBW7. *Nature* 471, 110–114.
- Whelan, R.S., Kaplinskiy, V., and Kitsis, R.N. (2010). Cell Death in the Pathogenesis of Heart Disease: Mechanisms and Significance. *Annu. Rev. Physiol.* 72, 19–44.
- Wiels, J., Fellous, M., and Tursz, T. (1981). Monoclonal antibody against a Burkitt lymphoma-associated antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 78, 6485–6488.
- Willis, S.N., Chen, L., Dewson, G., Wei, A., Naik, E., Fletcher, J.I., Adams, J.M., and Huang, D.C.S. (2005). Proapoptotic Bak is sequestered by Mcl-1 and Bcl-xL, but not Bcl-2, until displaced by BH3-only proteins. *Genes Dev.* 19, 1294–1305.
- Wong, R.S. (2011). Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 30.
- Wuillème-Toumi, S., Robillard, N., Gomez, P., Moreau, P., Le Gouill, S., Avet-Loiseau, H., Harousseau, J.-L., Amiot, M., and Bataille, R. (2005). Mcl-1 is overexpressed in multiple myeloma and associated with relapse and shorter survival. *Leukemia* 19, 1248–1252.
- Yang, T., Kozopas, K.M., and Craig, R.W. (1995). The intracellular distribution and pattern of expression of Mcl-1 overlap with, but are not identical to, those of Bcl-2. *J. Cell Biol.* 128, 1173–1184.
- Yang-Yen, H.-F. (2006). Mcl-1: a highly regulated cell death and survival controller. *J. Biomed. Sci.* 13, 201–204.
- Yeh, C.-H., Moles, R., and Nicot, C. (2016). Clinical significance of microRNAs in chronic and acute human leukemia. *Mol. Cancer* 15.
- Youssef, S.F., Elnaggar, Y.S., and Abdallah, O.Y. (2018). Elaboration of polymersomes versus conventional liposomes for improving oral bioavailability of the anticancer flutamide. *Nanomed.* 13, 3025–3036.
- Yuan, J. (1993). The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 β -converting enzyme. *Cell* 75, 641–652.
- Yuan, J. (2009). Neuroprotective strategies targeting apoptotic and necrotic cell death for stroke. *Apoptosis* 14, 469–477.
- Yuan, Y., Gao, Y., Zhao, J., and Mao, L. (2008). Characterization and stability evaluation of β -carotene nanoemulsions prepared by high pressure homogenization under various emulsifying conditions. *Food Res. Int.* 41, 61–68.
- Zack, T.I., Schumacher, S.E., Carter, S.L., Cherniack, A.D., Saksena, G., Tabak, B., Lawrence, M.S., Zhang, C.-Z., Wala, J., Mermel, C.H., et al. (2013). Pan-cancer patterns of somatic copy number alteration. *Nat. Genet.* 45, 1134–1140.
- Zalipsky, S., Mullah, N., and Qazen, M. (2004). Preparation of poly(ethylene glycol)-grafted liposomes with ligands at the extremities of polymer chains. *Methods Enzymol.* 387, 50–69.
- Zangemeister-Wittke, U., Leech, S.H., Olie, R.A., Simões-Wüst, A.P., Gautschi, O., Luedke, G.H., Natt, F., Häner, R., Martin, P., Hall, J., et al. (2000). A novel bispecific antisense oligonucleotide inhibiting both bcl-2 and bcl-xL expression efficiently induces apoptosis in tumor cells. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 6, 2547–2555.

Zha, J., Harada, H., Yang, E., Jockel, J., and Korsmeyer, S.J. (1996). Serine Phosphorylation of Death Agonist BAD in Response to Survival Factor Results in Binding to 14-3-3 Not BCL-XL. *Cell* 87, 619–628.

Zhai, D., Godoi, P., Sergienko, E., Dahl, R., Chan, X., Brown, B., Rascon, J., Hurder, A., Su, Y., Chung, T.D.Y., et al. (2012). High-Throughput Fluorescence Polarization Assay for Chemical Library Screening against Anti-Apoptotic Bcl-2 Family Member Bfl-1. *J. Biomol. Screen.* 17, 350–360.

Zhang, H., Nimmer, P., Rosenberg, S.H., Ng, S.-C., and Joseph, M. (2002). Development of a high-throughput fluorescence polarization assay for Bcl-xL. *Anal. Biochem.* 307, 70–75.

Zhang, H., Nimmer, P.M., Tahir, S.K., Chen, J., Fryer, R.M., Hahn, K.R., Iciek, L.A., Morgan, S.J., Nasarre, M.C., Nelson, R., et al. (2007). Bcl-2 family proteins are essential for platelet survival. *Cell Death Differ.* 14, 943–951.

Zhang, H., Wu, Q., and Berezin, M.Y. (2015). Fluorescence anisotropy (polarization): from drug screening to precision medicine. *Expert Opin. Drug Discov.* 10, 1145–1161.

Zhao, X., Zhang, Z., Moreira, D., Su, Y.-L., Won, H., Adamus, T., Dong, Z., Liang, Y., Yin, H.H., Swiderski, P., et al. (2018). B Cell Lymphoma Immunotherapy Using TLR9-Targeted Oligonucleotide STAT3 Inhibitors. *Mol. Ther.* 26, 695–707.

Zhong, Q., Gao, W., Du, F., and Wang, X. (2005). Mule/ARF-BP1, a BH3-Only E3 Ubiquitin Ligase, Catalyzes the Polyubiquitination of Mcl-1 and Regulates Apoptosis. *Cell* 121, 1085–1095.

Ziegler, U., and Groscurth, P. (2004). Morphological Features of Cell Death. *Physiology* 19, 124–128.

Zou, H., Henzel, W.J., Liu, X., Lutschg, A., and Wang, X. (1997). Apaf-1, a Human Protein Homologous to *C. elegans* CED-4, Participates in Cytochrome c-Dependent Activation of Caspase-3. *Cell* 90, 405–413.

(2007). Les marchés de la biodiversité (IRD Éditions).

(2008). Sensitization of Cancer Cells for Chemo/Immuno/Radio-therapy.

(2012). Bioisosteres in Medicinal Chemistry: BROWN:BIOISOSTERES MED CH O-BK (Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA).

Titre : Caractérisation et études précliniques d'un nouvel inhibiteur naturel de MCL-1

Mots clés : Protéines de la famille BCL-2 / Apoptose / Inhibiteur de MCL-1 / Lymphomes B

Résumé : Les protéines de la famille BCL-2 jouent un rôle majeur dans l'homéostasie cellulaire de par leur implication dans le processus apoptotique qui se fait à travers des interactions dynamiques entre les membres pro- et anti-apoptotiques composant cette famille. Parmi les membres anti-apoptotiques, MCL-1 est très fréquemment surexprimé dans les tumeurs où il est impliqué dans leur développement tout comme dans les résistances aux traitements de chimiothérapies ou de radiothérapies. Des inhibiteurs synthétiques ciblant cette protéine anti-apoptotique ont déjà été développés, certains étant même en évaluation clinique.

Dans ce contexte, notre but était de réaliser le développement pré-clinique d'un inhibiteur naturel de MCL-1. Les produits naturels jouent un rôle très important dans le développement de nouvelles molécules thérapeutiques. En effet, depuis les années 1940, 75% des 175 molécules utilisées dans le traitement du cancer sont soit des molécules naturelles, soit des dérivés de molécules naturelles. Nous avons donc isolé et purifié un nouveau composé, le NA1-115-7 puis nous avons évalué son efficacité *in vitro*, son mécanisme d'action (molécule suicide / BH3-mimétique) afin de pour pouvoir le tester *in vivo* grâce à l'utilisation de nano-émulsions.

Title : Characterization and preclinical studies of a new natural inhibitor of MCL-1

Keywords : BCL-2 proteins family / Apoptosis / MCL-1 inhibitor / B lymphomas

Abstract : Proteins of the BCL-2 family play a major role in cellular homeostasis since they regulate apoptotic cell death through dynamic interactions between the anti- and pro-apoptotic members. Over-expression of anti-apoptotic members (BCL-2, BCL-xL, MCL-1...), and particularly MCL-1, participates in the development of tumors as well as in their resistance to chemotherapy or radiotherapy treatments. Synthetic inhibitors targeting this anti-apoptotic protein have therefore been developed, some of which being currently in clinical trials. In this context, our goal is to obtain natural inhibitors of the BCL-2 family, and more specifically of MCL-1. Natural products are playing a significant role in drug discovery and development processes. Since the 1940's, 75% of the 175 small molecules used in cancer therapy are either natural products or derivatives of natural products. We have isolated and purified a new compound called NA1-115-7, evaluated its efficiency *in vitro* and characterized its mechanism of action (suicide molecule / BH3-mimetic) before testing it *in vivo*, thanks to a nano-emulsion formulation.