



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

Ecole Doctorale BioSE (Biologie – Santé – Environnement)

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE

Mention : « Sciences de la Vie et de la Santé »

par François Jean André GAASCHT

Découverte, identification et caractérisation de molécules d'origine naturelle capables de cibler les voies de transduction, de prolifération, d'inflammation et de mort cellulaire dans des cellules cancéreuses.

Le 20 décembre 2013

Membres du jury :

Rapporteurs :	M. Artur SILVA	Professeur, Université de Aveiro, Portugal
	M. Milen GEORGIEV	Professeur, Institut de Microbiologie, Académie des Sciences, Bulgarie
Examineurs :	M. Claus JACOB	Professeur, Universität des Saarlandes, Allemagne
	M. Norbert LATRUFFE	Professeur, Université de Bourgogne, Laboratoire Biochimie du Peroxysome, Inflammation et Métabolisme Lipidique, Dijon
	M. Mario DICATO	Professeur, Centre Hospitalier de Luxembourg
	M. Marc DIEDERICH	Professeur, Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire du Cancer, Luxembourg. Directeur de thèse
	M^{me} Denyse BAGREL	Professeur, Université de Lorraine, Laboratoire Structure et Réactivité des Systèmes Moléculaires Complexes, Metz. Co – directrice de thèse
Membres invités :	M. Gilbert KIRSCH	Professeur, Université de Lorraine, Laboratoire Structure et Réactivité des Systèmes Moléculaires Complexes, Metz.
	M^{me} Claudia CERELLA	Docteur, Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire du Cancer, Luxembourg.

Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire du Cancer, Hôpital Kirchberg, 9, Rue Edward Steichen
L-2540 Luxembourg, Grand-Duché de Luxembourg

UMR 7565, SRSMC – Laboratoire Structure et Réactivité des Systèmes Moléculaires Complexes, Université de Lorraine, Faculté des Sciences et Techniques, Université de Lorraine, F-54506 Vandoeuvre les Nancy, France

Les travaux présentés dans ce mémoire ont été réalisés
au « Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire du cancer »
de la Fondation de « Recherche Cancer et Sang »
à l'Hôpital Kirchberg, Luxembourg

Ce travail n'aurait pu aboutir sans le soutien financier :
De l'Union Européenne (ITN "RedCat" 215009, Interreg IVa project "Corena")
de l'association « Recherches Scientifiques Luxembourg (RSL) »
de l'association « Action LIONS « Vaincre le Cancer » »
de la Fondation « Recherche Cancer et Sang (FRCS) »
du « Télévie Luxembourg »
et de l'association « Een Häerz fir Kriibskrank Kanner
(un cœur pour les enfants atteints d'un cancer) »

Remerciements

Après ces quelques années, je tiens à remercier les personnes qui ont participé de près ou de loin à l'aboutissement de ce travail, ainsi que les gens qui m'ont apporté leur soutien à tout point de vue pour mener à bien ce projet de doctorat.

Je tiens à remercier en premier lieu, le Professeur Marc Diederich de m'avoir permis d'effectuer ma thèse au sein du laboratoire LBMCC. Marc, je te remercie de m'avoir accueilli au sein de ta formidable équipe, de m'avoir intégré au projet RedCat et d'avoir mis à ma disposition tous les moyens pour assurer la réussite de cette thèse.

Je remercie également le Professeur Denyse Bagrel qui en sa qualité de co – directrice de thèse et par sa bienveillance a permis la réussite de ce projet par son énergie débordante et ses encouragements.

Je voudrais aussi remercier le Professeur Mario Dicato, Président de la Fondation Recherche Cancer et Sang de m'avoir permis de réaliser ma thèse au sein de sa fondation et d'avoir accepté d'être membre de mon jury.

Je remercie le Docteur Marie – Hélène Teiten qui fut ma *mère scientifique* pendant toutes ces années et surtout grâce à qui je n'en serais pas là aujourd'hui. Merci MH !

Un merci particulier aussi au Docteur Claudia Cerella, *mia zia italiana* qui m'a permis de progresser même si cela a nécessité quelques sushis et pas mal de *schiaffi*.

Je remercie les Professeurs Artur Silva et Milen Georgiev d'avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse.

Je remercie aussi les Professeurs Claus Jacob, Norbert Latruffe et Gilbert Kirsch d'avoir accepté de figurer dans mon jury de thèse.

Je remercie les membres actuels du laboratoire et particulièrement, Anthoula pour avoir apporté un supplément de belgitude au labo, « *Yo give me eleven* » ; Cindy notre grande sœur à tous les thésards avec toujours un paquet de bonbons à disposition ; Michael pour les

discussions et les *Gromperkichelcher* partagés ; Le « Père » Franck pour ses prêches et pour m'avoir converti au Western – Blot ; Anne, mon ex – voisine de paillasse et Florian mon nouveau voisin, largement moins sexy que Anne mais qui compense avec son humour à tendance ailurophile ; Carole dont son encombrement spatial est inversement proportionnel à sa sympathie ; sans oublier Sébastien, Cristina, Laurent, Flavia et Stefania.

Je souhaite également remercier les personnes que j'ai côtoyé durant toutes ces années de thèse et en particulier Monika pour m'avoir fait partager sa maîtrise de l'HPLC et pour nos discussions sur la philosophie et la culture indienne ; Estelle pour m'avoir aidé à sacrifier mes plantes et pour nos chocolats chauds et nos cappuccino les samedi après – midis, Tommy mon « frère black » ainsi que Fabienne, Elodie, Marc Schumi, Emilie, Cyril, Noémie, Richard, Christina Grigo, Serge, Guillaume, Tom, Jenny, Barbora, Shéhérazade, Mathilde, Jessica et Carmela.

Je tiens également à remercier les membres du projet RedCat comme Clemens, Nathaniel, Sergio, Vincent, Torsten, Peter, Zhanjie, Oualid, Awais, et tous les autres partenaires mais également les personnes formidables rencontrées grâce à ce programme comme Eric de l'équipe du Professeur Regnouf de Vains, merci à vous tous pour cette incroyable expérience aussi bien scientifique, culturelle que sociale.

Je remercie également mes amis et mes proches et plus particulièrement André et Martine, mes parents, de même que mes grands – parents et mon frère Arnaud qui par leurs sacrifices et leurs actes mais surtout par leur soutien et encouragement m'ont permis d'en arriver là où je suis aujourd'hui et avec qui j'ai passé des moments inoubliables que ce soit ici ou hors des frontières

Merci à vous tous !

*All life is an experiment,
The more experiments you make the better*

- Ralph Waldo Emerson -

Publications liées à cette thèse

Publications originales

Gaascht, F., Teiten, M.H., Cerella, C., Bagrel, D., Dicato, M., and Diederich, M. (2014).

Plumbagin-induced modulatory effects on redox status in leukaemia cancer cells

Int J Oncol (*manuscript en préparation*).

Teiten, M.H., **Gaascht, F.**, Cronauer, M., Henry, E., Dicato, M., and Diederich, M. (2011).

Anti-proliferative potential of curcumin in androgen-dependent prostate cancer cells occurs through modulation of the Wnt signaling pathway. Int J Oncol 38, 603-611.

Revues

Gaascht, F., Dicato, M., and Diederich, M. (2013). **Venus Flytrap (*Dionaea muscipula* Solander ex Ellis) Contains Powerful Compounds that Prevent and Cure Cancer.**

Frontiers in Oncology 3, 202.

Teiten, M.H., **Gaascht, F.**, Dicato, M., and Diederich, M. (2013). **Anticancer bioactivity of compounds from medicinal plants used in European Medieval traditions.** Biochem Pharmacol.

Teiten, M.H., **Gaascht, F.**, Dicato, M., and Diederich, M. (2012). **Targeting the wnt signaling pathway with natural compounds as chemopreventive or chemotherapeutic agents.** Curr Pharm Biotechnol 13, 245-254.

Zwergel, C., **Gaascht, F.**, Valente, S., Diederich, M., Bagrel, D., and Kirsch, G. (2012). **Aurones: interesting natural and synthetic compounds with emerging biological potential.** Nat Prod Commun 7, 389-394.

Teiten, M.H., **Gaascht, F.**, Eifes, S., Dicato, M., and Diederich, M. (2010). **Chemopreventive potential of curcumin in prostate cancer.** Genes Nutr 5, 61-74.

**Gaascht, F., Teiten, M.H., Schumacher, M., Dicato, M., and Diederich, M. (2010).
Approche végétale dans le traitement des leucémies. Correspondances en Onco-
hématologie V, 102-108.**

Autres publications

Articles

Ebrahim, W., Aly, A.H., Wray, V., Mandi, A., Teiten, M.H., **Gascht, F.**, Orlikova, B., Kassack, M.U., Lin, W., Diederich, M., *et al.* (2013). **Embellicines A and B: absolute configuration and NF-kappaB transcriptional inhibitory activity.** Journal of medicinal chemistry 56, 2991-2999.

Juncker, T., Cerella, C., Teiten, M.H., Morceau, F., Schumacher, M., Ghelfi, J., **Gascht, F.**, Schnekenburger, M., Henry, E., Dicato, M., *et al.* (2011). **UNBS1450, a steroid cardiac glycoside inducing apoptotic cell death in human leukemia cells.** Biochem Pharmacol 81, 13-23.

Editoriaux

Schumacher, M., Juncker, T., Schnekenburger, M., **Gascht, F.**, and Diederich, M. (2011). **Natural compounds as inflammation inhibitors.** Genes Nutr 6, 89-92.

Activités scientifiques

Présentations orales

New natural compounds of *Dionaea muscipula* as anticancer agents

Natural Products and related Redox Catalysts: Basic Research and Applications in Medicine and Agriculture meeting,

Aveiro, Portugal, 25 – 27 novembre 2012

Natural compounds of *Dionaea muscipula* as anticancer agents

Séminaire BIOPROLOR/CORENA,

Nancy, France, 20 octobre 2010

Communications par affiche

New natural compounds of *Dionaea muscipula* as anticancer agents.

F. Gaascht, C. Cerella, M. Jain, M.-H. Teiten, M. Schumacher, G. Kirsch, D. Bagrel, M. Dicato, and M. Diederich

Natural Products and related Redox Catalysts: Basic Research and Applications in Medicine and Agriculture meeting,

Aveiro, Portugal, 25 – 27 novembre 2012

Natural compounds of *Dionaea muscipula* as anticancerous agents.

F. Gaascht, M.-H. Teiten, C. Cerella, M. Schumacher, M. Jain, M. Dicato, D. Bagrel and M. Diederich

Natural Anticancer Drugs 2012,

Olomouc, République Tchèque, 30 juin – 4 juillet 2012

Natural compounds of *Dionaea muscipula* as anticancerous agents.

F. Gaascht, M.-H. Teiten, C. Cerella, M. Schumacher, M. Jain, M. Dicato, D. Bagrel and M. Diederich

Redox and Inflammation signaling 2012, RedCat Meeting on Redox Catalysis from Chemistry to Biology,

Luxembourg, 25 – 27 janvier 2012

Natural compounds of *Dionaea muscipula* as anticancerous agents.

F. Gaascht, M.-H. Teiten, C. Cerella, M. Schumacher, M. Jain, M. Dicato, D. Bagrel and M. Diederich

International PSE Symposium on “Phytochemicals in nutrition and health”,

Bari, Italie, 27 – 30 septembre 2011

Anti-proliferative potential of curcumin in androgen dependent prostate cancer cells happens through the modulation of the Wnt signaling pathway.

M.-H. Teiten, F. Gaascht, M. Cronauer, E. Henry, M. Dicato and M. Diederich

Séminaire Télévie 2010,

Bruxelles, Belgique, 7 décembre 2010

Chemopreventive potential of curcumin on prostate cancer.

M.-H. Teiten, F. Gaascht, M. Dicato, M. Diederich

15th World Congress on Advances in Oncology and 13th International Symposium on Molecular Medicine,

Loutraki, Grèce, 7 – 9 octobre, 2010

Natural compounds of *Dionaea muscipula* as anticancerous agents.

F. Gaascht, M.-H. Teiten, C. Cerella, M. Schumacher, M. Jain, M. Dicato, D. Bagrel and M. Diederich

Corena Network, Seminar on Health promoting compounds in plants,

Centre Gabriel Lippmann, Luxembourg, 7 mai 2010

Chemopreventive effect of curcumin on the Wnt signaling pathway in prostate cancer cells .

M.-H. Teiten, F. Gaascht, E. Henry, S Eifes, M Cronauer, M. Dicato, M. Diederich

Inflammation 2010,

Luxembourg, 27 – 30 janvier 2010

Chemopreventive effect of curcumin on the Wingless signaling pathway in prostate cancer cells.

M.-H. Teiten, **F. Gaascht**, E. Henry, S Eifes, M Cronauer, M. Dicato, M. Diederich

Séminaire Télévie 2009,

Gembloux, Belgique, 2 décembre 2009

Autres activités

Réalisation de prospectus pour présenter l'activité du laboratoire pour promouvoir le don de sang de cordon et collecter des dons pour l'activité scientifique au sein du laboratoire.

Réalisation de sites web et maintenance d'une page Facebook pour informer de l'activité scientifique du laboratoire et promouvoir la collecte de dons (<http://www.rsl.lu>, <http://www.fondationrecherche cancer.lu>).

Réalisation de posters de présentation du laboratoire et de vulgarisation scientifique utilisés lors de manifestations professionnelles et d'événements sociaux (Nuits des chercheurs, journées portes ouvertes, remises de prix,...).

Réalisation du site web et membre du comité d'organisation de divers meetings à Luxembourg : Inflammation 2010 (janvier 2010), Meeting RedCat – OSCAR (octobre 2010), Cell Signal – omics (janvier 2011), Redox and Inflammation signaling (janvier 2012).

Participation active à « La Nuit des Chercheurs », événement organisé par la Commission Européenne (Luxembourg, septembre 2010) ainsi qu'à l'organisation et à l'animation de divers ateliers lors de « journées découvertes » au sein du Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire du Cancer à Luxembourg.

Table des matières

1. Introduction	1
1.1 Le cancer.....	1
1.1.1 Les marqueurs biologiques du cancer	1
1.1.2 Le cancer en chiffres	5
1.1.3 Les tumeurs solides, exemple avec le cancer de la prostate	7
1.1.4 Les tumeurs circulantes.....	11
1.2 Exemples de stratégies anti – cancéreuses.....	14
1.2.1 Ciblage de la voie de signalisation Wingless (Wnt)	14
• Découverte de la voie Wingless	14
• Fonctionnement de la voie canonique Wingless	14
• La voie canonique Wnt et le cancer.....	18
1.2.2 Ciblage de la voie de signalisation NF-κB.....	19
• Découverte de la voie NF-κB	19
• Fonctionnement de la voie NF-κB.....	19
• La voie NF-κB, le processus inflammatoire et le cancer	23
1.2.3 Création d'un stress oxydant.....	24
• Les espèces réactives de l'oxygène, le stress oxydant et les antioxydants.....	24
• Les espèces réactives de l'oxygène et le cancer	30
1.2.4 La mort cellulaire	33
• L'apoptose	33
• La catastrophe mitotique.....	38
• L'autophagie	38
• La nécrose et la nécroptose	40
1.3 A la recherche de nouveaux composés anti – cancéreux d'origine naturelle	41
1.3.1 Les métabolites secondaires des plantes	42
• Introduction aux métabolites secondaires.....	42
• La chimioprévention.....	43
1.3.2 La curcumine.....	49
• Les cibles moléculaires de la curcumine	50
• La curcumine et le cancer de la prostate.....	52
1.3.3 Les principaux métabolites secondaires de la dionée	53
• La dionée, plante carnivore.....	53
• Les métabolites secondaires de la dionée	54
1.3.4 Les métabolites secondaires et le stress oxydant	76
2. Objectifs du projet de recherche.....	82
2.1 Caractérisation du potentiel anti – cancéreux de la curcumine dans le cas du cancer de la prostate	82
2.2 Les composés naturels de la <i>Dionaea muscipula</i> comme agents anti-cancéreux.	83
3. Matériel et méthodes.....	85
3.1 Produits et substances utilisés.....	85
3.1.1 Composés d'origine naturelle	85
3.1.2 <i>Dionaea muscipula</i> Solander ex Ellis	85
3.1.3 Etoposide.....	85
3.1.4 N – acétyl – cystéine	85
3.2 Préparation des extraits de plantes	86

3.3	Isolation et identification des composés naturels	88
3.3.1	Purification par HPLC (High Performance Liquid Chromatography).....	88
	• Méthode appliquée pour la purification de l'extrait total de feuilles de <i>Dionaea muscipula</i>	90
3.3.2	Identification des pics du chromatogramme	91
3.3.3	Extraction liquide - liquide.....	91
3.3.4	Analyse des produits par chromatographie sur couche mince	92
3.3.5	La résonance magnétique nucléaire	93
3.4	Lignées cellulaires cancéreuses et cellules saines	94
3.4.1	Lignées cancéreuses adhérentes	94
3.4.2	Lignées cancéreuses en suspension.....	95
3.4.3	Isolation des cellules saines	96
3.4.4	Culture et entretien des différentes lignées cellulaires.....	96
	• Lignées adhérentes.....	96
	• Lignées myéloïdes.....	97
3.5	Traitement des cellules	97
3.5.1	Traitement des cellules mononuclées du sang périphériques	97
3.5.2	Traitement des cellules cancéreuses adhérentes	97
3.5.3	Traitement des cellules cancéreuses en suspension	97
3.6	Evaluation de la viabilité cellulaire par le test d'exclusion au bleu trypan	98
3.7	Extraction et dosage des protéines	98
3.7.1	Récupération des culots cellulaires	98
3.7.2	Extraction des protéines totales.....	98
3.7.3	Extraction des facteurs nucléaires et cytoplasmiques	100
3.8	Analyse de l'expression des protéines par Western – Blot.....	103
3.8.1	Préparation des échantillons.....	103
3.8.2	Migration et préparation des échantillons	103
3.9	Transfections transitoires.....	108
3.10	Cytométrie en flux.....	110
3.10.1	Analyse du type de mort cellulaire	110
3.10.2	Analyse du cycle cellulaire	111
3.10.3	Analyse de l'incorporation intra – cellulaire de plumbagine.....	111
3.10.4	Analyse de l'efflux de la plumbagine	112
3.10.5	Analyse de la génération d'espèces réactives de l'oxygène	113
3.11	Microscopie à fluorescence.....	114
	• Localisation et incorporation de composés naturellement fluorescents.....	114
	• Analyse du type de mort cellulaire induit	115
3.12	Mesure du niveau de glutathion cellulaire.....	115
3.13	PCR quantitative en temps réel.....	115
3.13.1	Extraction des ARN totaux	115
3.13.2	Transcription inverse	116
3.13.3	PCR quantitative en temps réel.....	116
3.14	Statistiques.....	119
4.	Résultats	120
4.1	Effet de la curcumine sur la voie Wnt dans le cancer de la prostate	120

4.1.1	Localisation intra – cellulaire de la curcumine dans les lignées prostatiques	120
4.1.2	Effet de la curcumine sur la viabilité cellulaire des lignées prostatiques	121
4.1.3	Mort des cellules cancéreuses prostatiques induite par la curcumine.....	122
4.1.4	Effet de la curcumine sur la prolifération cellulaire.....	123
	• Effet de la curcumine sur le cycle cellulaire des cellules cancéreuses prostatiques.....	123
	• Effet de la curcumine sur des marqueurs de prolifération et de régulation du cycle cellulaire	125
4.1.5	Effet de la curcumine sur la voie de signalisation Wnt.....	127
	• Effet de la curcumine sur l'activité transcriptionnelle β – caténine/Tcf – 4	127
	• Effet de la curcumine sur l'expression de protéines cibles de la voie Wnt	128
	• Effet de la curcumine sur l'activation de l'activité transcriptionnelle β -caténine/ Tcf-4 par la	
	surexpression d'une forme β -caténine mutée	129
	• Effet de la curcumine sur les protéines effectrices de la voie Wnt.....	131
4.2	La plumbagine, métabolite secondaire de la <i>Dionaea muscipula</i> comme agent	
	anti – cancéreux.....	133
4.2.1	Préparation d'extraits méthanoliques <i>Dionaea muscipula</i> Solander ex Ellis	133
4.2.2	Effet de l'extrait méthanolique total de feuilles de <i>Dionaea muscipula</i> sur la viabilité	
	cellulaire de plusieurs lignées cancéreuses.....	133
4.2.3	Etude de la localisation intra-cellulaire de l'extrait total de feuilles de <i>Dionaea muscipula</i>	
	dans les cellules K562 et de son effet sur leur taille et leur morphologie	134
4.2.4	Purification et identification des composés de l'extrait total de feuilles de <i>Dionaea</i>	
	<i>muscipula</i>	138
	• Purification de l'extrait méthanolique de feuilles de <i>Dionaea muscipula</i> par HPLC préparative	138
	• Identification par HPLC analytique des différents pics du chromatogramme de l'extrait	
	méthanolique de feuilles de <i>Dionaea muscipula</i> par comparaison à des substances de références	139
	• Effet cytotoxique des différentes fractions d'intérêt isolées par HPLC préparative à partir de	
	l'extrait total de <i>Dionaea muscipula</i>	142
4.2.5	Fractionnement des fractions cytotoxiques d'intérêt F14-16.....	146
	• Fractionnement par HPLC préparative	146
	• Fractionnement par extraction liquide – liquide.....	146
	• Analyse de la pureté des sous – fractions	147
	• Analyse du potentiel cytotoxique des sous – fractions organique et aqueuse F14 – 16	148
4.2.6	Identification par RMN de la plumbagine comme composant majeur de la fraction	
	d'intérêt.....	149
4.2.7	Effet de la plumbagine pure commerciale sur une sélection de lignées leucémiques et sur	
	des cellules saines.....	157
4.2.8	Mort des cellules U937 et Raji induite par la plumbagine.....	159
4.2.9	Mesure des espèces réactives de l'oxygène induites par la plumbagine dans les cellules	
	Raji et U937.....	164
4.2.10	Incorporation et localisation de la plumbagine dans les cellules Raji et U937	167
4.2.11	Effet de la plumbagine sur le niveau intra – cellulaire de GSH des cellules Raji et U937	
	171	
5.	Discussion.....	173
5.1	Effet de la curcumine sur la voie Wnt dans le cancer de la prostate	173
5.2	La plumbagine, agent métabolite secondaire de la <i>Dionaea muscipula</i> comme	
	agent anti-cancéreux.....	177
6.	Conclusion & Perspectives	182
6.1	Effet de la curcumine sur la voie Wnt dans le cancer de la prostate	182

6.2 La plumbagine, métabolite secondaire de la <i>Dionaea muscipula</i> comme agent anti-cancéreux	184
6.3 Conclusion générale	185
7. Bibliographie	186
8. Annexes	228

Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
ALL	<i>Acute Lymphoblastic Leukemia</i>
AML	<i>Acute Myelogeneous Leukemia</i>
AMP	Adénosine monophosphate
AMPK	<i>5' adenosine monophosphate – activated protein kinase</i>
APAF-1	<i>Apoptotic Peptidase Activating Factor 1</i>
APC	<i>Adenomatous Polyposis Coli</i>
APT	<i>Attached Proton Test</i>
ARNm	Acide ribonucléique messager
ARNnc	Acide ribonucléique non codant
ATP	Adénosine triphosphate
Bad	<i>Bcl – 2 antagonist of cell death</i>
BAFF	<i>B – cell activating factor</i>
Bak	<i>Bcl – 2 homologous Antagonist/Killer</i>
Bax	Bcl – 2 – associated X protein
Bcl-2	<i>B – cell leukemia/lymphoma 2</i>
Bcl-9	<i>B – cell CLL/lymphoma 9</i>
Bcl-xL	<i>B – cell lymphoma extra large</i>
Bid	<i>BH3 – interacting domain death agonist</i>
Bim	<i>Bcl – 2 – like protein 11</i>
BLC	<i>B Lymphocyte Chemoattractant</i>
β -TrCP1	β -transducin repeat containing protein 1
cAMP	AMP cyclique
CDK	Cyclin – dependent kinase
CD40L	<i>Cluster of Differentiation 40 Ligand</i>
CBP	<i>CREB – binding protein</i>
CCM	Chromatographie sur Couche Mince
CK1 α	<i>Casein kinase 1 alpha</i>
CLL	<i>Chronic Lymphocytic Leukemia</i>
CMFDA	diacétate de 5 – chlorométhylfluorescéine
CML	<i>Chronic Myelogenous Leukemia</i>

COSY	<i>Correlation spectroscopy</i>
COX-2	<i>Cyclooxygenase 2</i>
CREB	<i>cAMP Response Element-Binding</i>
CtBP	<i>C – terminal binding protein</i>
Ctrl	Contrôle
DD	<i>Death Domain</i>
DED	<i>Death Effector Domain</i>
DISC	<i>Death – inducing signaling complex</i>
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DR	<i>Death Receptor</i>
Dsh	Dishevelled
DTT	Dithiothréitol
EDTA	<i>Ethylene diamine tetra acetic acid</i>
EGCG	Epigallocatechine – 3 – gallate
EGTA	<i>Ethylene glycol tetra acetic acid</i>
ERK1/2	<i>Extracellular – signal – Regulated Kinase 1/2</i>
ERO	Espèce réactive de l'oxygène
F	Fraction chromatographique
FADD	<i>Fas – Associated protein with Death Domain</i>
FITC	Fluorescéine isothiocyanate
FOXO3	<i>Forkhead box protein O3</i>
FTICR	<i>Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance</i>
GPx	<i>Glutathion Peroxidase</i>
GR	<i>Glutathion Reductase</i>
Grx	Glutarédoxine
GrxR	Glutarédoxine réductase
GSH	Glutathion
GSK-3 β	Glycogène synthétase kinase 3 beta
GSSH	Glutathion oxydé
GST	Glutathion – S – transferase
IAP	<i>Inhibitor of apoptosis</i>
H ₂ DCFDA	Diacétate de 2',7'-dichlorofluorescéine
HBP	Hypertrophie Bénigne de la Prostate
HBP1	<i>HMG box repressor protein 1</i>

HDAC	Histone deacétylase
HER2	<i>Human Epidermal growth factor Receptor 2</i>
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple – Bond Correlation</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
HTLV-1	<i>Human T-cell leukemia virus I</i>
IC ₅₀	Concentration inhibitrice à 50%
ICAM	<i>Inter – Cellular Adhesion Molecule</i>
IKK	<i>Inhibitor of Kappa B Kinase</i>
IL-6	Interleukine 6
iNOS	<i>inducible Nitric Oxide Synthase</i>
IP	Iodure de propidium
IκB	<i>Inhibitor of kappa B</i>
ITC	<i>Isothermal Titration Calorimetry</i>
LC/MS	Liquid Chromatography – Mass Spectrometry
LC – 3 II	<i>Microtubule – associated Protein 1 Light Chain 3 Isoform B</i>
LPS	Lipopolysaccharide
LRP 5/6	<i>Low – density lipoprotein receptor – related protein 5/6</i>
MALDI-TOF	<i>Matrix – Assisted Laser Desorption/Ionization – Time Of Flight</i>
MAPK	<i>Mitogen – activated protein kinase</i>
Mcl-1	<i>Myeloid Cell Leukemia 1</i>
MMP	<i>Matrix metalloprotease</i>
M – PER	<i>Mammalian Protein Extraction Reagent</i>
mTor	<i>mammalian Target of rapamycin</i>
NAC	<i>N – acétyl – L – cystéine</i>
NADPH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate (forme réduite)
NC	Non cytotoxique
ND	Non déterminable
NEMO	<i>Nuclear Factor – κB essential modulator</i>
NF – κB	<i>Nuclear factor kappa B</i>
NIK	<i>Nuclear Factor – κB - inducing kinase</i>
NRF2	<i>Nuclear factor erythroid 2 – Related Factor 2</i>
OPA	o – phtalaldéhyde
PARP	<i>Poly Adenosine Diphosphate Ribose Polymerase</i>

PBMC	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PBS – T	<i>Phosphate Buffered Saline with Tween</i>
PCNA	<i>Proliferating Cell Nuclear Antigen</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PMSF	<i>Phenylmethylsulphonyl fluoride</i>
PSA	<i>Prostate Specific Antigen</i>
Puma	<i>p53 upregulated modulator of apoptosis</i>
PVDF	<i>Polyfluorure de vinylidène</i>
Pygo	<i>Pygopus</i>
Qsp	<i>Quantité suffisante pour</i>
RA	<i>Récepteurs aux androgènes</i>
RANKL	<i>Receptor Activator of Nuclear factor Kappa – B Ligand</i>
RMN	<i>Résonance magnétique nucléaire</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
SDS – PAGE	<i>SDS – PolyAcrylamid Gel Electrophoresis</i>
Ser	<i>Sérine</i>
SIDA	<i>Syndrome de l'immunodéficience acquise</i>
SOD	<i>Superoxyde dismutase</i>
SVF	<i>Sérum de veau fœtal</i>
TAB 1/2	<i>TGF – beta – activated kinase 1/2</i>
Tcf	<i>T – cell factor</i>
Thr	<i>Thréonine</i>
TIMP	<i>Tissue Inhibitor of MetalloProtease</i>
TLR	<i>Toll – like receptor</i>
TNF- α	<i>Tumor Necrosis Factor alpha</i>
Tot	<i>Extrait total</i>
TRAF2	<i>Tumor Necrosis Factor Receptor – Associated Factor 2</i>
TRAIL	<i>Tumor Necrosis Factor – related apoptosis-inducing ligand</i>
TRADD	<i>Tumor necrosis factor Receptor type 1 – Associated Death Domain</i>
Trx	<i>Thiorédoxine</i>
UV	<i>Ultraviolet</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>

Wnt

XIAP

Wingless

X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein

1. Introduction

1.1 Le cancer

1.1.1 Les marqueurs biologiques du cancer

Le développement d'un cancer consiste en la transformation d'une cellule normale en une cellule maligne. Ce processus se produit en plusieurs étapes et reflète les différentes altérations génétiques subies par la cellule. Ce processus peut être comparé à une évolution Darwinienne, dans laquelle chaque modification génétique conférerait un avantage à la protéine mutée, provoquant ainsi la transformation d'une cellule saine en une cellule cancéreuse. En réalité, ce mécanisme est très complexe, ce qui confère à chaque cancer des particularités qui lui sont propres. Hanahan et Weinberg (Hanahan and Weinberg, 2000, 2011; Heng et al., 2011) suggèrent que le cancer est une manifestation de dix altérations physiologiques (Figure 1) qui ensemble caractérisent les cellules cancéreuses.

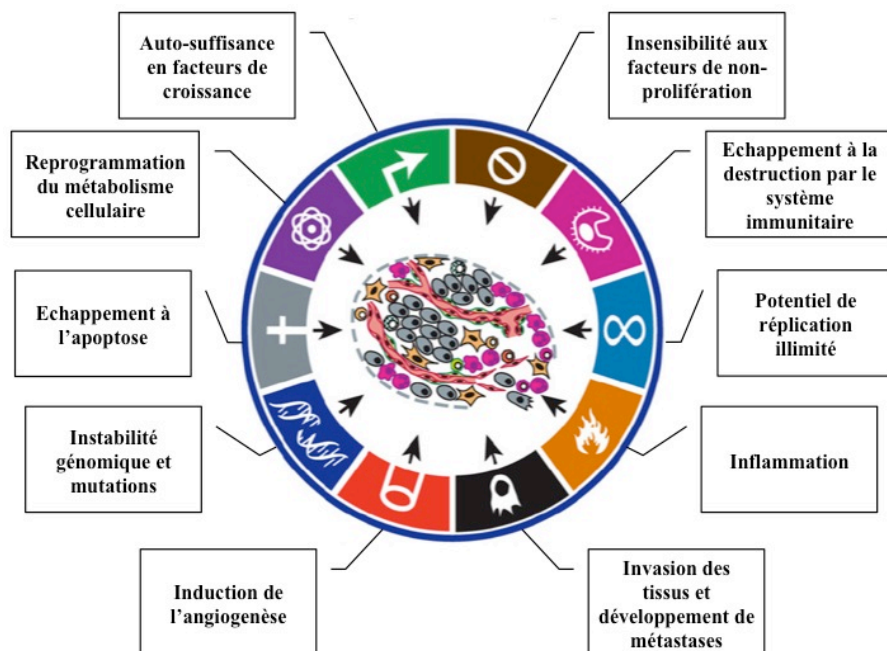


Figure 1 : Schéma récapitulatif des différents événements conduisant à la transformation d'une cellule saine en une cellule cancéreuse.

Le mécanisme de cancérisation d'une cellule pourrait s'expliquer par 10 événements qui sont l'auto-suffisance en facteurs de croissance, l'insensibilité aux facteurs anti-prolifératifs, l'échappement à la destruction par le système immunitaire, un potentiel de réplication illimité, l'inflammation, l'invasion des tissus et la formation de métastases, l'induction de l'angiogenèse, une instabilité génomique et des mutations, l'échappement à l'apoptose et la reprogrammation du métabolisme cellulaire. D'après (Hanahan and Weinberg, 2011) avec modifications

- **L'acquisition d'une auto-suffisance en facteurs de croissance**

Pour s'activer et entrer en mitose, une cellule normale a besoin de facteurs de croissance sécrétés par les cellules environnantes. Les cellules cancéreuses ont développé trois stratégies leur permettant d'entrer en phase de division cellulaire en l'absence de ce type de facteurs. Elles ont tout d'abord acquis la capacité de sécréter des facteurs de croissance auxquels elles sont elle-même sensibles, c'est-à-dire qu'elles mettent en route un système autocrine, une sorte de « feed-back » positif. La seconde stratégie consiste en la surexpression de récepteurs aux facteurs de croissance. En effet, une cellule saine exprime un nombre restreint de récepteurs aux signaux de prolifération du fait de sa grande sensibilité à des doses infimes de molécules signal. Une augmentation de ces récepteurs rend la cellule hypersensible à des signaux extra-cellulaires de croissance et entraîne une prolifération cellulaire excessive. La troisième stratégie est de loin la plus complexe, puisqu'il s'agit de perturbations touchant les voies de signalisation intra-cellulaires régulant la prolifération cellulaire et déclenchant une réponse inappropriée à un signal pourtant correct.

- **L'acquisition d'une insensibilité aux facteurs de non-prolifération**

Dans le même ordre d'idée que précédemment, il existe des signaux d'anti-prolifération sécrétés par les cellules environnantes afin de maintenir la cellule dans un état quiescent. Différentes mutations peuvent toucher des protéines impliquées dans cette régulation et lever ainsi la « dormance » de la cellule et la rendre apte à se diviser.

- **L'acquisition d'une capacité à échapper à l'apoptose**

La progression de la population tumorale dépend de sa capacité à proliférer mais également de la perte de son potentiel de mort cellulaire programmée (perte de l'apoptose). La résistance à l'apoptose peut être acquise de nombreuses façons, parmi lesquelles la plus répandue est l'inactivation du gène suppresseur de tumeur p53 par mutation récessive.

- **L'acquisition d'un potentiel de réplication sans limites**

La grande majorité, voire quasiment toutes les cellules somatiques de mammifères sont limitées à un nombre fixe de divisions estimé à environ 60. En effet, lors de chaque réplication du matériel génétique, l'ADN polymérase est incapable de répliquer l'extrémité des chromosomes. Ainsi il est admis que lors de chaque mitose, environ 50 à 100 paires de bases sont perdues à jamais. Dans près de 90% des cancers, les cellules cancéreuses ont comme recours de ré-exprimer la télomérase dans le but d'empêcher la perte de ce matériel génétique et de contrer ainsi le processus de mort programmée.

- **L'acquisition d'une capacité à induire l'angiogenèse**

L'oxygène et les nutriments véhiculés par les vaisseaux sanguins sont nécessaires au bon développement de toutes cellules, y compris à celui d'une cellule cancéreuse. Pour pouvoir survivre, une cellule doit être située au maximum à 100 µm d'un vaisseau sanguin. C'est pourquoi, pour grandir, les tumeurs détournent à leur profit la capacité du corps à construire de nouveaux vaisseaux (angiogenèse). Le développement et la formation des vaisseaux sanguins s'effectuent de façons différentes dans chaque type de tumeur. Les tumeurs peuvent ainsi induire des événements altérant la transcription de gènes conduisant à une soudaine augmentation de l'expression d'un facteur activant l'angiogenèse tel le VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) ou bien à une diminution de la synthèse de régulateurs négatifs de l'angiogenèse telle la thrombospondine.

- **Le développement d'une capacité à envahir les tissus et à développer des métastases**

La majorité des cancers ont la faculté d'envoyer dans l'organisme, et ce parfois à très grande distance, des cellules capables d'envahir d'autres tissus où elles trouveront les nutriments nécessaires à leur développement et où elles formeront des métastases. Près de 90% des décès par cancer sont causés par ces métastases. Ce phénomène de migration cellulaire est extrêmement complexe, peu défini à l'heure actuelle et diffère dans chaque type de cancer. Il fait suite à deux grands changements au sein de la cellule. Le premier consiste en la perte ou la perturbation de molécules impliquées dans l'adhésion cellulaire telles les intégrines ou les E-cadhérines suite à une répression de leur transcription ou bien à une protéolyse de leur domaine extra-cellulaire. Le second changement se traduit par l'augmentation de protéases extra-cellulaires soit par une surproduction de ces dernières ou par une diminution de leurs inhibiteurs (TIMP, *Tissue Inhibitor of Metalloproteinase*). Ces différentes protéases ont pour effet de dégrader la matrice cellulaire et de permettre ainsi la libération de la cellule.

- **L'instabilité génomique et les mutations**

L'acquisition de mutations au niveau de l'ADN (Acide désoxyribonucléique) est sans nul doute le premier des marqueurs cancéreux puisque tous les autres marqueurs caractérisant une cellule cancéreuse dépendent de celui-ci. La carcinogenèse est rendue possible par une accumulation de mutations qui sont encore plus agressive lorsqu'elles altèrent la machinerie de réparation de l'ADN.

- **L'inflammation comme stimulateur de la carcinogenèse**

Les pathologistes ont depuis longtemps remarqué que les tissus cancéreux étaient infiltrés par des cellules du système immunitaire et avaient certaines caractéristiques de tissus touchés par une inflammation. Les recherches récentes ont montré que le phénomène d'inflammation chronique peut être lié au cancer. Lors du processus inflammatoire, les cellules immunitaires libèrent des cytokines comme des facteurs de croissance, des agents permettant la migration cellulaire ou bien encore des espèces réactives de l'oxygène qui peuvent stimuler la carcinogenèse.

- **La reprogrammation du métabolisme cellulaire**

Du fait de leur forte activité, les cellules cancéreuses ont un besoin accru en énergie par rapport aux cellules saines. Les cellules cancéreuses reprogramment leur métabolisme pour l'orienter vers le phénomène de glycolyse. Elles augmentent l'incorporation et le métabolisme du glucose en sur-exprimant les transporteurs glucose et les enzymes de la glycolyse. De plus, une partie du glucose est détournée afin de servir à la synthèse d'autres biomolécules comme les nucléotides et les acides aminés.

- **La capacité à échapper à la destruction par les cellules immunitaires**

Afin de survivre, les cellules tumorales se doivent d'échapper à leur détection et à leur anéantissement par le système immunitaire. Au sein de leur environnement hostile, les cellules cancéreuses sécrètent des facteurs (espèces réactives de l'oxygène, cytokines) qui perturbent le bon fonctionnement des cellules immunitaires. Il semble également qu'il y ait une sélection naturelle des cellules cancéreuses les moins immunogènes, les plus immunogènes étant détectées et éliminées par le système immunitaire.

1.1.2 Le cancer en chiffres

Aujourd'hui, le cancer est devenu un problème de santé public avec 12,7 millions de nouveaux cas détectés par an 7,6 millions de décès dénombrés en 2008. Dans 56% des cas et dans 74% des décès, ceux-ci ont lieu dans les pays pauvres et dans les pays en voie de développement. Dans les pays industrialisés comme les Etats-Unis, un décès sur quatre est causé par un cas de cancer. En Europe, les cancers les plus répandus sont les cancers de la prostate chez l'homme et du sein chez la femme, suivis dans les deux cas par le cancer du poumon, du colon et du rectum (Figure 2). En Europe, on estime que pour l'année 2013, plus de 1,3 millions de personnes mourront du cancer. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (<http://www.who.int/topics/cancer/en/index.html>), 30% des décès par cancers sont directement liés à un mauvais mode de vie et à un environnement pollué. Ainsi, avoir une alimentation équilibrée et riches en fruits et légumes, pratiquer une activité physique régulière, vivre dans un environnement sain et bannir le tabac et l'alcool de notre mode de vie, sont des facteurs qui diminuent le risque de développer un cancer (Jemal et al., 2011; Malvezzi et al., 2013; Siegel et al., 2012).

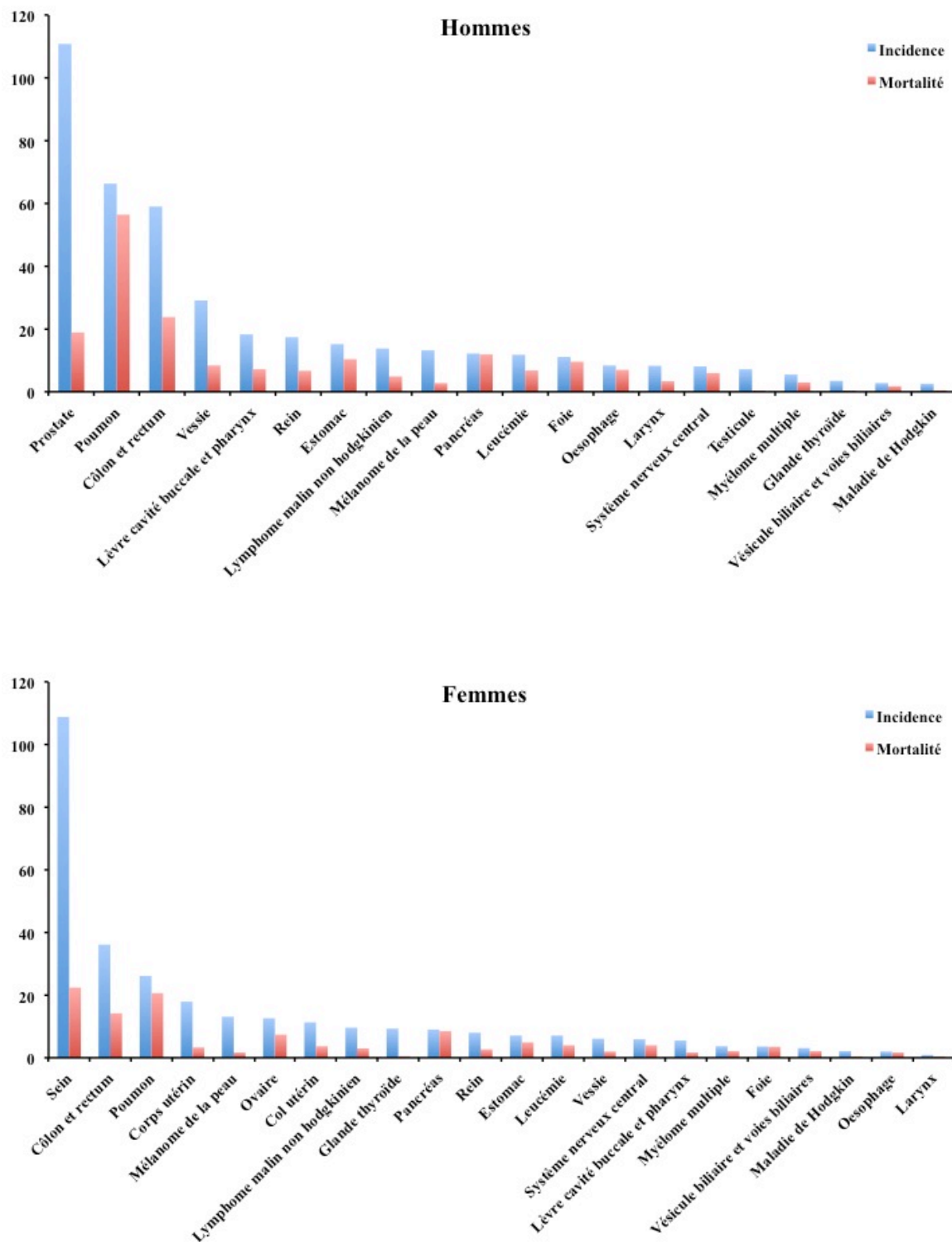


Figure 2 : Estimation de l'incidence et de la mortalité des cancers dans l'Union Européenne en 2012.

Estimation de l'incidence et de la mortalité des cancers les plus répandus dans l'Union Européenne en 2012. Le taux est standardisé sur l'âge par 100 000 habitants. Les graphiques ont été générés à partir des données obtenues auprès de l'Observatoire Européen du Cancer (<http://eco.iarc.fr>).

1.1.3 Les tumeurs solides, exemple avec le cancer de la prostate

- **Les tumeurs solides**

Une tumeur solide est un cancer formant une masse individualisée. La physiologie d'une tumeur diffère de celle d'un tissu sain sur de nombreux aspects (Brown and Giaccia, 1998; Tredan et al., 2007). Le terme « tumeur solide » s'applique par opposition au terme « tumeur circulante » (voir point 1.1.4). Les tumeurs solides sont classés en 3 grandes catégories en fonction du type cellulaire dont elles émergent :

- Les sarcomes se développent à partir du tissu conjonctif, osseux ou musculaire.
- Les lymphomes se développent au niveau des ganglions lymphatiques.
- Les carcinomes se développent au niveau des cellules glandulaires (adénocarcinome) et épithéliales (carcinome épidermoïde).

- **Le cancer de la prostate**

Le cancer de la prostate est le cancer rencontré le plus fréquemment dans la population masculine âgée des pays industrialisés. Ce type de cancer n'est que peu répandu en Asie et en Orient, assez répandu en Europe et très répandu aux États-Unis. Il touche 8 hommes sur 100 000 en Inde et jusqu'à 120 sur 100 000 aux États-Unis (Aggarwal, 2008).

Au Grand-Duché de Luxembourg, le cancer de la prostate est le cancer le plus fréquemment rencontré chez les hommes. C'est également la 3^{ème} cause de décès par cancer chez ces derniers après les cancers de l'intestin et du poumon (Registre morphologique des tumeurs du Grand-Duché de Luxembourg, <http://www.cancer-registry.lu>). En France, le cancer de la prostate est le type de cancer le plus fréquemment rencontré chez l'homme (il représente environ 33% des cancers) et constitue la 2^{ème} cause de décès par cancer (Figure 3).

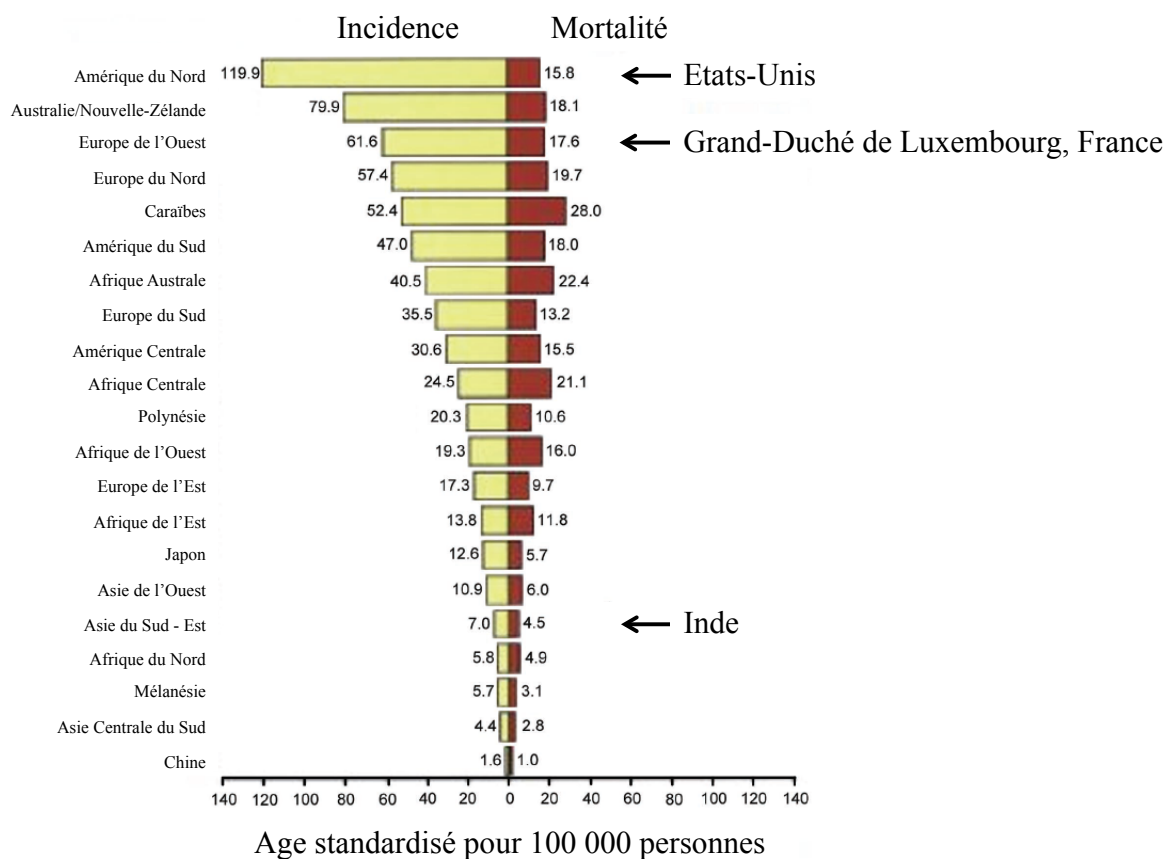


Figure 3 : Incidence et mortalité du cancer de la prostate au niveau mondial en 2002.

Comme le montre ce graphique, le cancer de la prostate est peu répandu en Asie, assez répandu en Europe de l'Ouest et très répandu aux Etats-Unis. D'après (Parkin et al., 2005) avec modifications.

La prostate

La prostate est un organe reproducteur masculin, de la grosseur d'une noix, localisé en dessous de la vessie et qui entoure l'urètre. Pour son développement et son bon fonctionnement, la prostate a besoin d'une hormone androgène, la testostérone. Le rôle principal de cette glande exocrine est la production d'une partie du liquide séminal. Cet organe assure également la synthèse de l'antigène spécifique de la prostate (*Prostate Specific Antigen*, PSA). Le PSA est une protéase à sérine de 237 acides aminés dont le rôle physiologique est de permettre la liquéfaction du liquide séminal. Dans le cas d'un homme ayant une prostate saine, la quantité de PSA présente dans le sang est très faible (concentration inférieure à 4 ng/mL de sang). Mais en cas d'adénocarcinome prostatique, la lame basale sur laquelle repose les cellules épithéliales sécrétrices de la prostate est rompue et

permet ainsi une libération plus importante de PSA dans la circulation sanguine (el-Shirbiny, 1994).

Récemment, un nouvel antigène spécifique du cancer de la prostate a été découvert et est utilisé depuis peu comme moyen de dépistage. Le gène DD3 ou DD3^{PCA3} a été identifié par la comparaison du transcriptome de cellules saines à celui de cellules cancéreuses de la prostate. Le gène DD3 s'est révélé être largement surexprimé dans les tissus malades. Son expression n'est spécifique qu'au cancer de la prostate. Par ailleurs, le séquençage de ce gène a permis de révéler la présence d'une grande densité de codons stop suggérant ainsi que DD3 code pour un très petit ARNm et puisse agir comme un ARN non-codant (ARNnc) (Bussemakers et al., 1999).

Le dosage de la quantité de PSA et de PCA3 sont utilisés comme moyen de dépistage du cancer de la prostate et serviront de signe avertisseur pour procéder à d'autres examens (touché rectal ou biopsie) qui permettront au praticien de poser un diagnostic définitif (Balk et al., 2003).

En dépit du développement de nouvelles techniques de diagnostic (symptômes cliniques, toucher rectal, dosage du PSA, échographie, biopsie) et de nouveaux traitements (ultrasons HIFU (*High Intensity Focused Ultrasound*), cryoablation), on meurt encore du cancer de la prostate de nos jours. Ces décès sont souvent liés à une détection trop tardive ne permettant plus un traitement efficace.

Evolution tumorale de la prostate

À la naissance, la prostate est d'une taille relativement réduite. Sa croissance débute à la puberté et atteint la taille d'une noix. Vers l'âge de 40 ans et pour une raison encore inconnue actuellement, la prostate subit une seconde phase de croissance. Cette prolifération bénigne des cellules appelée hypertrophie bénigne de la prostate (HBP) peut provoquer une constriction de l'urètre pouvant conduire à l'apparition de douleurs et de troubles urinaires. Aujourd'hui, l'HBP peut être traitée par la prise de médicaments ou dans certains cas par une opération chirurgicale. C'est au moment de cette soudaine croissance cellulaire que peuvent apparaître des cas de proliférations incontrôlées de la prostate, signes de manifestation du développement d'un cancer de la prostate.

Les hormones androgènes sont nécessaires au bon développement et au bon fonctionnement de la prostate. Cependant ces molécules jouent également un rôle d'initiateur et de promoteur de la carcinogenèse. Le stade le plus avancé du cancer de la prostate est, quant à lui, devenu

androgène indépendant puisqu'il ne requiert pas d'hormones androgènes pour sa survie et sa progression.

Certains cas de cancer de la prostate se développent de façon silencieuse sans que le patient n'exprime de symptômes tout au long de sa vie, même dans les cas de forme agressive de cancer de la prostate pourtant capables de se propager jusque dans les vésicules séminales, le rectum et la vessie et de développer des métastases au niveau des poumons, os, ganglions lymphatiques et au niveau d'autres organes.

Ainsi, le processus de transformation progressive d'une tumeur bénigne de la prostate en une tumeur résistante à l'hormonothérapie passe par les stades de lésion pré-néoplasique, de tumeur localisée et de tumeur avec métastases (Bostwick, 1996) (Figure 4).

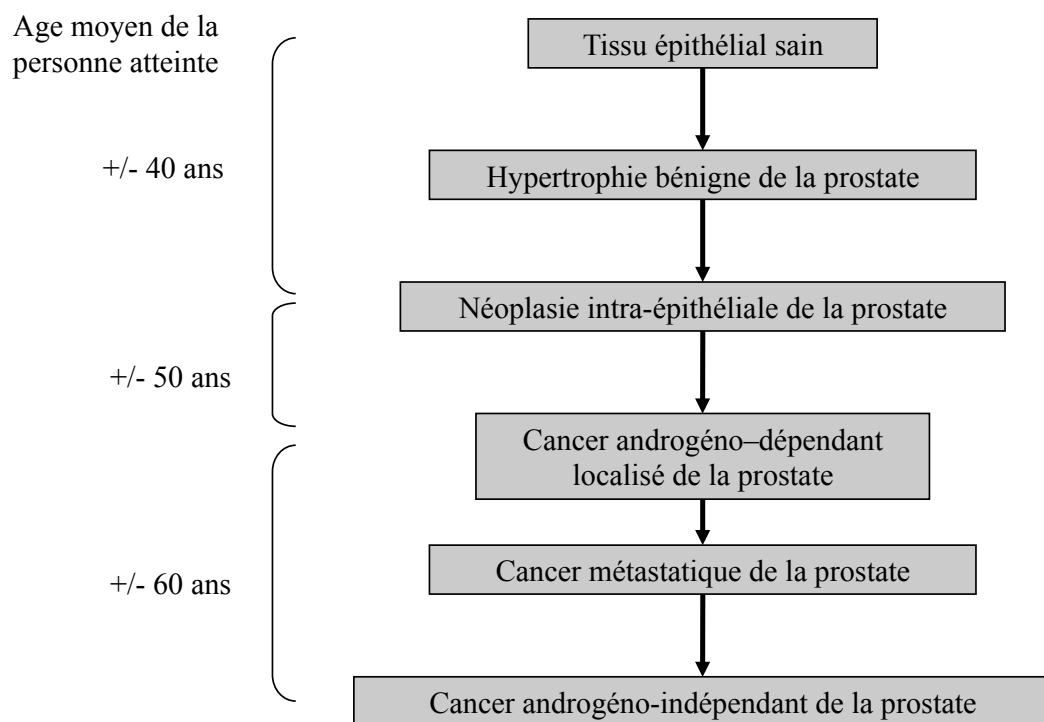


Figure 4 : Modèle du développement de la cancérogenèse prostatique.

Ce schéma montre les différentes étapes qui conduisent à l'apparition d'un cancer de la prostate. D'après (Bostwick, 1996) avec modifications.

Etiologie du cancer de la prostate

Le développement d'un cancer de la prostate peut être lié à différents facteurs; à savoir l'âge, l'hérédité d'une mutation autosomique dominante, une prédisposition génétique à développer ce type de cancer (Kote-Jarai et al., 2008) ou bien encore à la fréquence d'éjaculation (Dimitropoulou et al., 2009) ou à une inflammation de la prostate provoquée par une infection par des agents pathogènes (bactéries, champignons, mycobactéries) (De Marzo et al., 2007).

L'une des autres causes du développement du cancer de la prostate sont les carcinogènes. Des rongeurs nourris pendant 52 semaines avec une alimentation contenant un carcinogène hétérocyclique que l'on retrouve dans la viande et le poisson grillé ont développé un carcinome de prostate dans 18 cas sur 27 alors que dans le groupe de rongeurs témoins aucun cas positif n'a été détecté (Shirai et al., 1997).

Par ailleurs, le mode de vie des hommes des pays industrialisés et plus particulièrement leur mauvais régime alimentaire (consommation de produits riches en graisses animales, de produits laitiers et de viande rouge en grande quantité) augmenteraient le risque de développer un cancer de la prostate (Alexander et al., 2010; Ramis et al., 2011; Richman et al., 2011; Schulz et al., 2003).

Ainsi une alimentation adaptée pourrait permettre de prévenir l'apparition et le développement du cancer de la prostate.

1.1.4 Les tumeurs circulantes

Les hémopathies malignes sont des cancers affectant certaines cellules sanguines comme les érythrocytes, les leucocytes et les plaquettes.

Dans le cas des cancers circulants, on distingue deux catégories, à savoir les lymphomes et les leucémies. Les lymphomes sont des cancers dont l'origine se trouve au niveau des organes lymphoïdes secondaires (rate, thymus et les ganglions lymphatiques). Les leucémies quant à elles, trouvent leur origine au niveau de la moelle osseuse et touchent les cellules au niveau de l'hématopoïèse, le processus de formation des cellules sanguines.

Les lymphomes peuvent être classés en deux types, les lymphomes Hodgkiniens et les lymphomes « non Hodgkiniens ». Les lymphomes Hodgkiniens se caractérisent par la présence de cellules de Reed Sternberg qui sont des cellules malignes à noyau multinucléé dérivées des lymphocytes B alors que les lymphomes « non Hodgkiniens » s'en trouvent dépourvus. Par exemple, le lymphome de Burkitt est un lymphome « non Hodgkinien »

provoqué par le virus d'Epstein Barr et qui touche les lymphocytes B conduisant à une translocation chromosomique qui active l'oncogène c-myc (Kuppers and Hansmann, 2005; Molyneux et al., 2012).

Les leucémies peuvent être classées en quatre catégories distinctes selon le type de cellules atteintes : les cellules lymphocytaires (lymphocytes B, T et NK) pour les leucémies lymphoïdes et les leucémies myéloïdes pour les granulocytes (neutrophiles, éosinophiles et basophiles). Ces deux types de leucémies peuvent encore être subdivisés en fonction de la vitesse de prolifération des cellules leucémiques. Une prolifération lente des cellules leucémiques sera dite « chronique » alors qu'une prolifération rapide sera dite « aigüe ». Bien évidemment, la diversité des modifications génétiques touchant les tissus hématopoïétiques et lymphoïdes et le type de cellule est telle que ce type de cancer ne peut se limiter à quatre catégories. L'Organisation Mondiale de la Santé a donc élaboré un système de classification qui tient compte à la fois de la morphologie des cellules, des symptômes de la personne atteinte, du phénotypage (expression des marqueurs membranaires) ou encore des mutations touchant ces cellules (Vardiman, 2010).

- **La leucémie myéloïde aigüe**

La leucémie myéloïde aigüe (*Acute myeloid leukemia* (AML)) est la leucémie la plus fréquente chez les adultes. Le taux d'incidence est le plus élevé dans les pays industrialisés et au niveau mondial, il est de 2,6 pour 100 000 habitants. Les personnes atteintes d'une Trisomie 21 ont également plus de probabilités d'en être atteinte. Les études statistiques montrent également que pour certaines ethnies, un enfant né d'un père de plus de 35 ans a plus de probabilité de développer une leucémie myéloïde aigüe. Le taux de mortalité est plus élevé chez les hommes que chez les femmes. Des traitements chimiques et des transplantations permettent aujourd'hui la guérison (Deschler and Lubbert, 2006; Pollyea et al., 2011).

- **La leucémie myéloïde chronique**

La leucémie myéloïde chronique (*Chronic myeloid leukemia* (CML)) est un cancer affectant les cellules souches du sang. C'est une maladie rare avec une incidence de 1 ou 2 nouveaux cas découverts par an pour 100 000 habitants. Cette pathologie est très répandue chez les personnes âgées mais peut toucher les personnes de tout âge. Elle touche plus fréquemment les hommes que les femmes et il semble que ces dernières résistent mieux face à cette

maladie. Apparemment, il n'existe pas de prédisposition géographique ni raciale vis-à-vis de la leucémie myéloïde chronique (Hehlmann et al., 2007 ; Sawyers, 1999).

Ce cancer du sang est causé par la fusion des deux gènes, le gène ABL porté par le chromosome 9 et le gène BCR situé au niveau du chromosome 22. Découvert en 1960, ce nouveau chromosome chimérique, appelé chromosome Philadelphia code pour la protéine oncogénique BCR-ABL, une tyrosine kinase cytoplasmique activée de façon constitutive et capable d'activer plusieurs voies de signalisation cellulaires impliquées dans la différenciation et la prolifération (Nowell, 2007; Ren, 2005).

- **La leucémie lymphoïde aigüe**

La leucémie lymphoïde ou lymphoblastique aigüe (*Acute lymphoblastic leukemia (ALL)*) est la leucémie la plus fréquemment rencontrée chez les enfants. Il a également été montré que dans certains cas les origines de la maladie sont prénatales et imputables aux parents et que moins de 5% des cas sont dus à une prédisposition génétique. Chez les adultes, il est fréquent de trouver le chromosome Philadelphia. Les traitements actuels, dont principalement la transplantation de moelle osseuse, permettent la guérison dans 80% des cas (Pui et al., 2008).

- **La leucémie lymphoïde chronique**

La leucémie lymphoïde chronique (*Chronic lymphoid leukemia (CLL)*), est la forme de leucémie la plus rencontrée chez les adultes. C'est une maladie hétérogène provoquée souvent par des délétions au niveau des chromosomes 11 et 17 et qui affecte les lymphocytes B. La leucémie lymphoïde chronique peut être traitée par différents traitements médicamenteux, par des anticorps monoclonaux ou bien encore par chirurgie (Chiorazzi et al., 2005; Motta et al., 2009).

1.2 Exemples de stratégies anti – cancéreuses

1.2.1 Ciblage de la voie de signalisation Wingless (Wnt)

- **Découverte de la voie Wingless**

En 1982, Nusse et Varmus ont découvert chez la souris le gène *Int-1* (intégration 1) comme étant un site d'intégration préférentiel du virus murin de tumeur mammaire (Nusse and Varmus, 1982). Les travaux menés sur ce gène par Rijsewijk et coll. en 1987 (Rijsewijk et al., 1987) ont révélé que ce gène était un orthologue du gène *Drosophila wingless* (*wg*) de la drosophile (*Drosophila melanogaster*) découvert 7 ans auparavant par Nüsslein-Volhard and Wieschaus et qu'il est impliqué dans la mise en place de la polarité segmentaire lors du développement embryonnaire (Nüsslein-Volhard and Wieschaus, 1980). Le nom Wingless, abrégé Wnt, dérive du nom de ces deux gènes orthologues, *Wg* et *Int-1*.

- **Fonctionnement de la voie canonique Wingless**

L'activation de la voie de signalisation Wnt est fortement impliquée tant dans l'initiation que dans la progression de différents types de cancers incluant celui de la prostate. Cette voie de signalisation décrit un réseau complexe de protéines faisant notamment intervenir la β -caténine.

La β -caténine a été initialement identifiée comme étant un constituant structural des jonctions adhérentes intervenant dans l'adhésion des cellules entre elles. Cette cohésion cellulaire est médiée par l'interaction homotypique de dimères d'E – cadhérine (une protéine trans – membranaire) au niveau de leur partie extra-cellulaire N – terminale. Dans le cytoplasme, la β -caténine et l' α -caténine se lient au niveau de la partie C-terminale de l'E – cadhérine et assurent ainsi le lien avec les filaments d'actine, constituants majeurs du cytosquelette de la cellule (Ozawa et al., 1989). Plus tard, la β -caténine, cytoplasmique et nucléaire, a été décrite comme un effecteur potentiel de la voie Wnt (Chesire and Isaacs, 2003).

En absence de signal, c'est-à-dire de ligand Wnt, la concentration de β -caténine est maintenue à un niveau bas dans le cytoplasme du fait de sa dégradation protéosomale constitutive (Hart et al., 1998). En effet, dans ce cas, il y a formation du complexe composé de l'axine qui permet l'interaction des différents partenaires du complexe entre eux, de la caséine kinase 1 alpha (CK1 α), de la sérine/thréonine kinase glycogène synthétase kinase-3 β (GSK-3 β).

La β -caténine interagit avec ce complexe et est phosphorylée par la caséine kinase 1 au niveau du résidu sérine 45. Cette première phosphorylation est reconnue par la GSK-3 β qui phosphoryle à son tour la β -caténine au niveau de ses résidus sérine et thréonine (Ser 33, Ser 37, Thr 41) localisés sur son extrémité N – terminale. La composition du complexe est complétée par la présence du suppresseur de tumeur *Adenomatous Polyposis Coli* (APC) dont le rôle est de protéger la β -caténine de la déphosphorylation. Cette modification post-traductionnelle entraîne le recrutement de la protéine β -TrCP1 (*β -transducin repeat containing protein*), une enzyme de type E3 ubiquitine ligase qui permet l'ubiquitinylation de la β -caténine et sa dégradation ultérieure par le protéasome 26S. Le facteur de transcription *T-cell factor/lymphoid enhancer factor* (Tcf/Lef) agit dans le noyau comme un répresseur de l'activité transcriptionnelle par le recrutement de co-répresseurs de la transcription (comme par exemple TLE/Groucho, CtBP (*C – terminal Binding Protein*), HBP1 (*HMG Box repressor protein 1*) au niveau des promoteurs des gènes cibles. L'effet répresseur de Groucho est rendu possible grâce à son interaction avec les histones deacétylases (HDAC) (Figure 5).

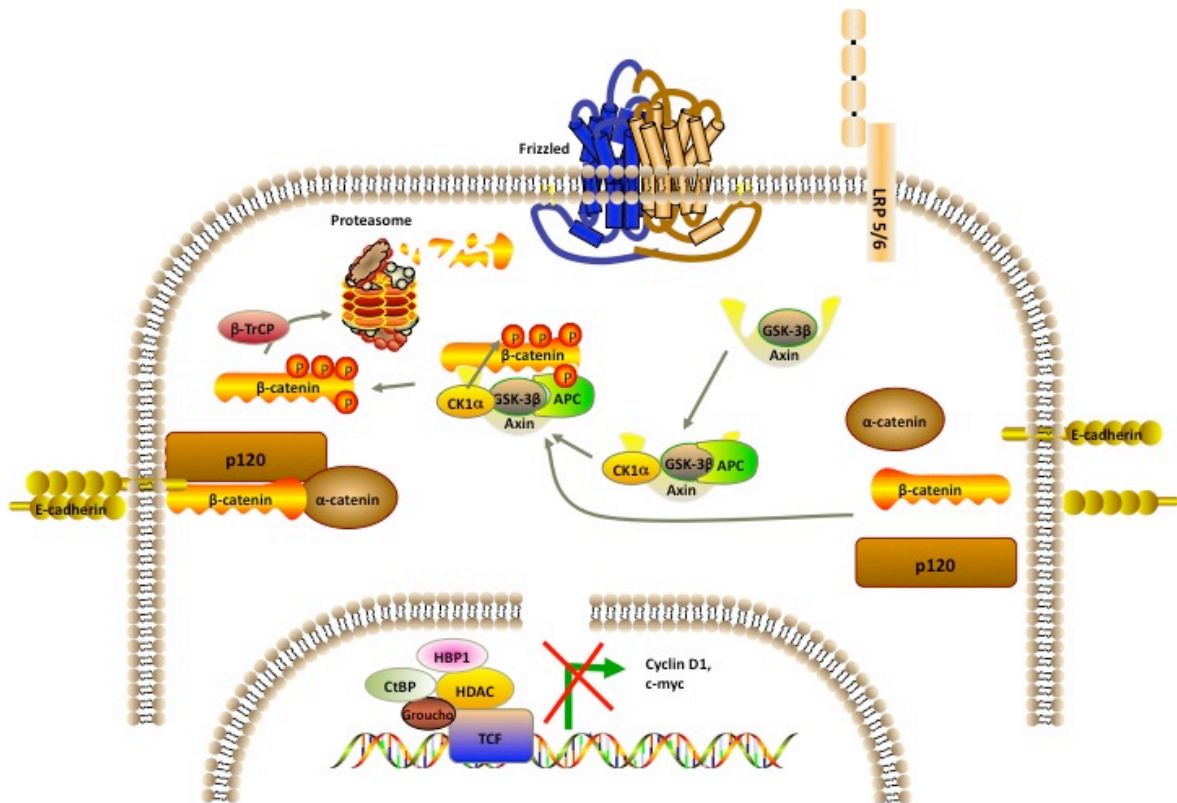


Figure 5 : Schéma de la voie canonique Wnt en absence de ligand.

En absence de signal, la β -caténine est dégradée et la transcription est inactivée. (APC : Adenomatous polyposis coli, β -TrCP1 : β -transducin repeat containing protein 1, CtBP : C-terminal binding protein, CK1 α : Caséine Kinase 1 alpha, GSK-3 β : Glycogène synthase kinase 3 bêta, HBP1 : HMG box repressor protein 1, HDAC : Histone deacetylase, Tcf-4 : T-cell factor 4).

Par contre, lorsque la glycoprotéine signal Wnt se lie à son récepteur membranaire Frizzled et à son co-récepteur LRP 5/6 (*low – density lipoprotein receptor – related protein 5* ou 6) ceci engendre la translocation de l'axine au niveau de la membrane. Dishevelled (Dsh) est à son tour recrutée au niveau de la membrane cytoplasmique par Frizzled. Axine se lie ensuite alors à Dsh et recrute GSK-3 β et CK1 α qui phosphorylent LRP 5/6. Cette phosphorylation déclenche la liaison d'Axine et de GSK-3 β à LRP 5/6 qui inhibe dès lors la formation du complexe responsable de la phosphorylation de la β -caténine. La β -caténine n'est alors plus dégradée par le protéasome et s'accumule dans le cytoplasme avant d'être transloquée dans le noyau.

Cette translocation est permise par B-cell CLL/lymphoma 9 (Bcl-9), une protéine adaptatrice qui oriente la β -caténine vers la protéine Pygopus (Pygo). Dans le noyau, la β -caténine forme alors un complexe avec le facteur de transcription Tcf/Lef rendu possible grâce au

déplacement de Groucho et le recrutement du couple de co-activateurs CBP (*CREB – binding protein*)/p300 (*cyclic AMP response element-binding protein*). Ceci entraîne la mise en place du complexe d'initiation de la transcription de gènes cibles tels les gènes *c-jun*, *c-myc* et *cycline D1* (responsables de la transition entre les phases G1 et S du cycle cellulaire) (Akiyama, 2000; MacDonald et al., 2009; Moon et al., 2002; Morin, 1999; Singh and Agarwal, 2006) (Figure 6).

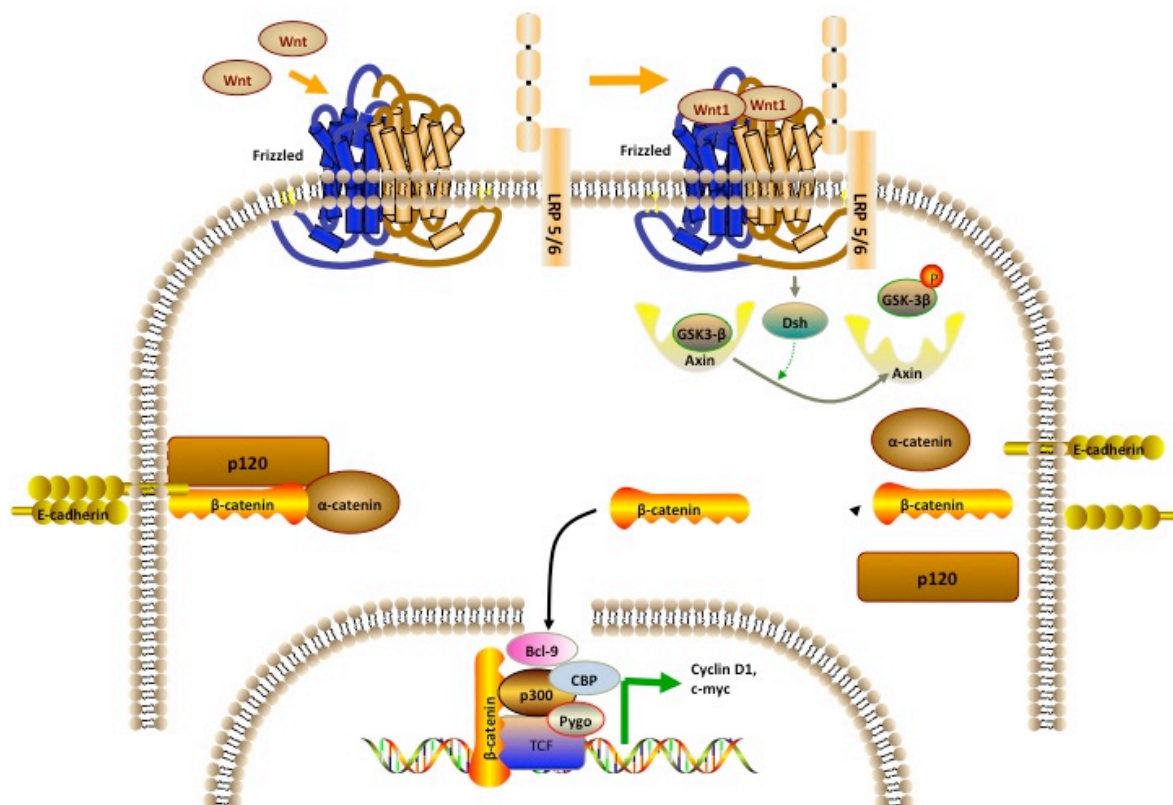


Figure 6 : Schéma de la voie canonique Wnt en présence de ligand.

En présence de ligand, la β -caténine est transloquée vers le noyau où elle permet l'initiation de la transcription. (APC : Adenomatous polyposis coli, α -cat : α -caténine, Bcl-9 : B-cell CLL/lymphoma 9, β -cat : β -caténine, CBP : CREB-binding protein, Dsh : Dishevelled, GSK-3 β : Glycogène synthase kinase 3 bêta, Pygo : Pygossus, Tcf-4 : T-cell factor 4).

- **La voie canonique Wnt et le cancer**

L'activation chronique de la voie de signalisation Wnt est connue pour être impliquée dans le développement d'un grand nombre de cancers. Ainsi, dans près de 5% des cancers de la prostate, l'activité transcriptionnelle de la β -caténine est supérieure à la normale suite à une mutation du domaine de régulation de la β -caténine empêchant ainsi sa phosphorylation et sa dégradation par le complexe GSK-3 β /axine/APC. Ces mutations se traduisent par des substitutions d'acides aminés notamment au niveau des sites de phosphorylation Ser 33, Ser 37, Ser 45 et majoritairement au niveau de Thr 41 altérant ainsi sa phosphorylation par GSK-3 β .

Une substitution, une délétion ou bien une insertion d'un nucléotide au sein du gène codant pour APC peut également provoquer l'insertion d'un codon stop prématuré et donc une protéine tronquée non fonctionnelle dès lors incapable de promouvoir la phosphorylation et la dégradation de la β -caténine et de ce fait sa dégradation. Des mutations au niveau de l'axine ou de la protéine β -TrCP1 ont également été mises en évidence.

Ces différentes modifications géniques ont pour conséquence une transcription constitutive des gènes cibles de la voie de la β -caténine, se traduisant notamment par l'activation permanente de la transcription des gènes c-myc et cycline D1 dans le cas du cancer du colon et donc une prolifération tumorale importante (Chesire and Isaacs, 2003; Gerstein et al., 2002; Morin, 1999; Schulz et al., 2003).

Des travaux menés par Jaiswal et coll., ont montré que la curcumine est capable d'inhiber la voie Wntless au niveau des cellules cancéreuses du colon. En effet, ils ont découvert que cette molécule polyphénolique agit sur le cycle cellulaire des cellules de cancer de colon en provoquant un arrêt du cycle à la transition des phases G2 et M par une voie indépendante des protéines p53 et p21. Par ailleurs, la curcumine induit l'activation de la caspase-3 capable de dégrader la β -caténine, ce qui conduit à une diminution de l'activation de la transcription des gènes cibles par le complexe β -caténine/Tcf-4. Par ailleurs, l'utilisation d'inhibiteurs d'autres voies de dégradation protéiques (protéasome, lysozome,...) a ainsi permis de mettre en évidence qu'en présence de curcumine, la β -caténine est dégradée non pas *via* le protéasome mais par une voie impliquant la caspase-3. Par ailleurs, cette protéolyse de la β -caténine par la caspase-3 conduit à la mort des cellules cancéreuses par apoptose. De plus, la diminution de l'adhésion cellule à cellule due à une diminution de la concentration de la E-cadhérine, après

traitement par la curcumine, perturbe fortement la communication et la croissance cellulaire forçant ainsi la cellule à entrer en apoptose (Jaiswal et al., 2002).

Jusqu'à ce jour, aucune étude concernant l'effet de la curcumine sur la voie Wnt/ β -caténine dans le cancer de la prostate n'a été publiée.

1.2.2 Ciblage de la voie de signalisation NF- κ B

• Découverte de la voie NF- κ B

Le facteur de transcription NF – κ B (*Nuclear Factor Kappa B*) a été découvert en 1986 par Sen et Baltimore en tant que régulateur de l'expression de la chaîne légère kappa (κ) des immunoglobulines dans les lymphocytes B (Sen and Baltimore, 1986). Ce facteur de transcription, conservé tout au long de l'évolution (Baldwin, 1996), est exprimé dans de nombreux autres types cellulaires et dans de nombreuses espèces, dans lesquels il demeure sous forme inactive dans le cytoplasme.

La voie de signalisation NF – κ B peut être activée par de nombreux stimuli externes tels les infections virales (ARN double brin) et bactériennes (lipopolysaccharide, LPS), les rayons UV (ultraviolet) et gamma, mais également par des activateurs endogènes comme les cytokines ou encore par le TNF- α (Pahl, 1999). Selon le type de stimuli, cette activation se produit *via* la voie canonique ou classique ou *via* les voies non-canoniques également appelées voies alternatives.

• Fonctionnement de la voie NF- κ B

Dans les cellules de mammifères, le facteur de transcription NF – κ B est structuré sous la forme d'un homo ou d'un hétérodimère composé des sous-unités NF - κ B1 (également appelée p50 qui est présente sous la forme du précurseur p105), NF- κ B2 (p52 présente sous la forme du précurseur p100), c-Rel, RelA (p65) et RelB. Ces 5 membres de la famille des facteurs de transcription NF – κ B se caractérisent par la présence d'un domaine d'homologie Rel localisé en position N – terminale qui permet la dimérisation des monomères entre eux ainsi que la liaison à une protéine inhibitrice de la famille I κ B (*Inhibitor of kappa B*). La famille I κ B se compose de 8 membres, à savoir : I κ B α , I κ B β , I κ B γ , I κ B ϵ , I κ B ζ , Bcl-3, p100 et p105 qui, par leur présence, masquent les domaines de translocation nucléaire du dimère NF- κ B et empêchent ainsi sa translocation nucléaire. Le complexe trimérique NF – κ B – I κ B se retrouve donc de façon majoritaire dans le cytoplasme. Le domaine Rel permet également le

transport du dimère NF – κ B vers le noyau et sa liaison à l'ADN au niveau de régions promotrices ou amplificatrices (« enhancer ») des gènes cibles. L'activation du facteur de transcription NF – κ B induit l'expression de gènes cibles impliqués dans de nombreux phénomènes physiologiques et cellulaires tels l'immunité innée et adaptative, l'inflammation, l'angiogenèse, l'apoptose et l'adhésion cellulaire (Gupta et al., 2010). Des perturbations de cette voie sont connues pour être associées à de nombreuses maladies comme le cancer, les maladies cardiovasculaires et inflammatoires mais également le diabète ou bien encore le SIDA (syndrome de l'immunodéficience acquise) (Sethi and Tergaonkar, 2009).

La voie canonique NF- κ B

La voie canonique est stimulée par des cytokines pro-inflammatoires (TNF – α , pour *Tumor necrosis factor alpha*), des récepteurs Toll – like (TLR, pour *Toll-Like Receptor*), des facteurs de croissance ou d'infection virale, qui se lient au niveau de récepteurs spécifiques situés au sein de la membrane plasmique. Ces liaisons conduisent au recrutement d'adaptateurs (tels TRAF) au niveau du domaine cytoplasmique des récepteurs qui activent l'hétérotrimère I κ B kinase (IKK) au niveau du cytoplasme. Cet hétérotrimère est composé de deux sous-unités catalytiques IKK α (IKK1) et IKK β (IKK2) ainsi que de la sous-unité régulatrice IKK γ également appelée NEMO (*NF- κ B essential modulator*). IKK phosphoryle I κ B α au niveau de deux résidus sérine situés en position N – terminale, Ser 32 et Ser 36 ou au niveau des résidus Ser 19 et 23 dans le cas d'I κ B β . Les résidus I κ B phosphorylés se dissocient alors des dimères NF – κ B et sont reconnus par le complexe β -TrCP1 qui poly-ubiquitine le facteur I κ B qui sera dès lors dégradé par le protéasome 26S. Ainsi libéré de son inhibiteur, le facteur de transcription NF – κ B formé des sous-unités p50 et p65 (sous forme d'homo ou d'hétéro – dimères) est transloqué dans le noyau où il se lie à l'ADN au niveau d'un site de liaison κ B de séquence consensus 5' GGGRNWYYCC 3' (R correspond aux purines, Y aux pyrimidines, W à l'adénine ou à la thymine et N correspond à n'importe quelle type de base). Ce site κ B peut être localisé soit au niveau d'un promoteur soit au niveau d'un amplificateur (*enhancer*) d'un gène cible où il permet le recrutement de co-activateurs et de co – répresseurs impliqués dans le processus de la transcription de gènes cibles (Figure 7).

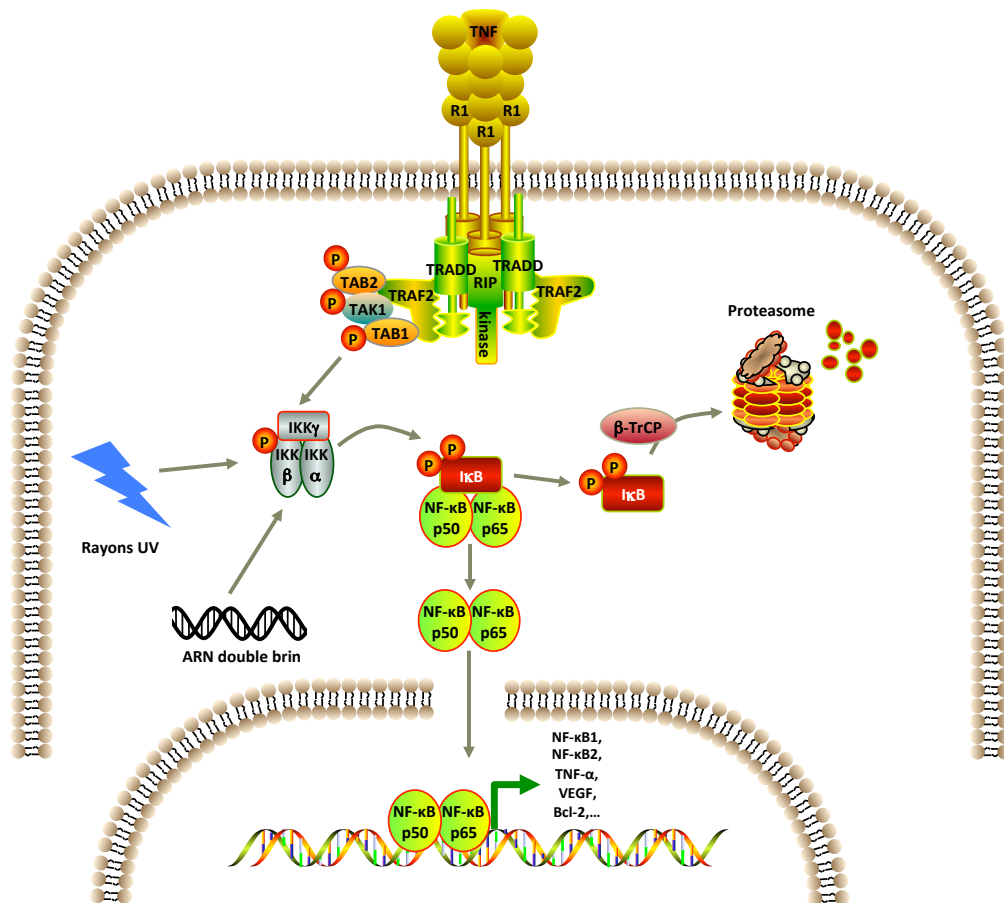


Figure 7: Schéma de la voie canonique NF-κB en présence de ligand.

La liaison du ligand (TNF-α) à son récepteur conduit au recrutement et à l'activation du complexe IKK, qui phosphoryle IκBα qui sera alors dégradé par le protéasome. Le facteur de transcription NF-κB, ainsi libéré de son inhibiteur IκBα, est alors transloqué dans le noyau où il active la transcription de gènes cibles régulées par les sites κB. (β-TrCP : β-transducin repeat containing protein, IKK : IκB kinase, NF-κB : Nuclear factor kappa B, P : groupement phosphate, TAB : TGF-beta-activated kinase, TNF : Tumor Necrosis Factor, TRADD : Tumor necrosis factor receptor type 1-associated DEATH domain, TRAF2 : TNF Receptor-Associated Factor 2).

La voie non-canonique NF- κ B

La voie non-canonique est activée par les membres de la superfamille des cytokines du type TNF (BAFF (*B-cell activating factor*), Lymphotoxine – β , RANKL (*Receptor Activator of Nuclear factor Kappa-B Ligand*), CD40L,...), des protéines virales (Tax du virus HTLV-1 (*Human T-cell Leukemia Virus I*)) ou par la bactérie *Helicobacter pylori*. Ceci conduit à l'activation de la protéine NIK (*NF – κ B - Inducing Kinase*) qui active à son tour le complexe IKK qui, dans ce cas, se compose uniquement de 2 sous-unités IKK α . Le facteur NF – κ B se présente, quant à lui, sous forme d'hétérodimère p100-RelB qui est ensuite maturé en hétérodimère p52-relB grâce à la phosphorylation du dimère IKK α qui provoque le clivage du précurseur p100 en p52. Le complexe p52-RelB est ensuite transloqué vers le noyau où il se fixe au niveau de l'ADN pour activer la transcription de gènes cibles telles les cytokines BAFF ou BLC (*B Lymphocyte Chemoattractant*) (Figure 8) (Sun, 2011).

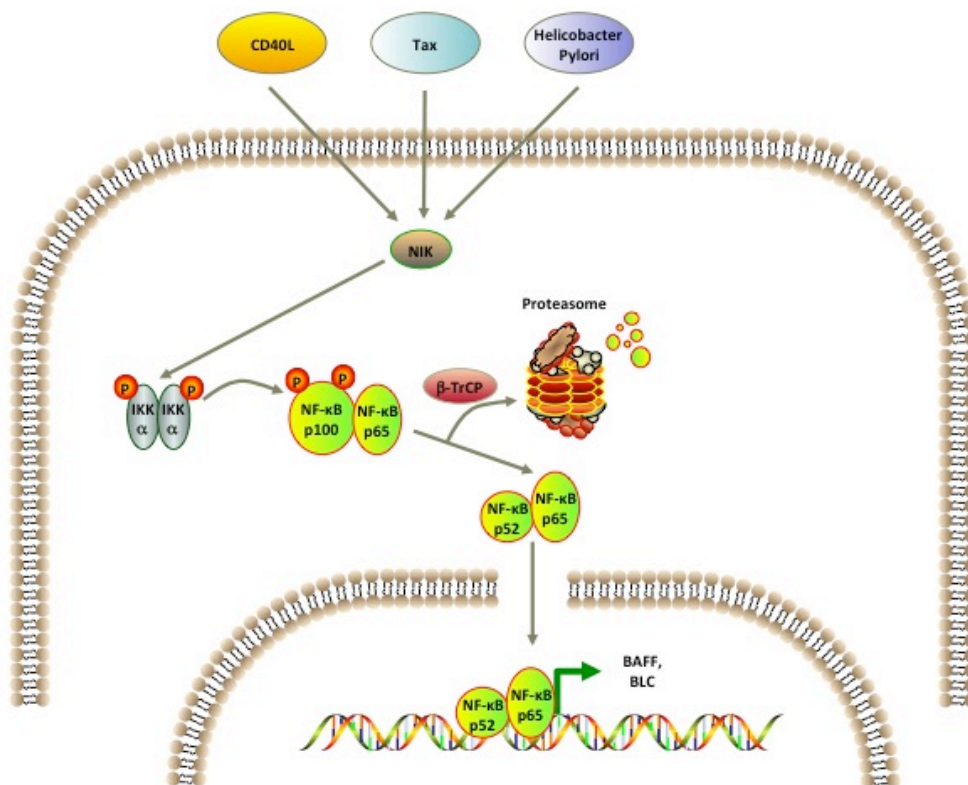


Figure 8: Schéma de la voie non-canonique NF- κ B en présence de ligand.

Après stimulation du récepteur, la protéine p100 est maturée en protéine p52 grâce à l'action de IKK α . Le complexe p52-RelB est alors transloqué au niveau du noyau où il active la transcription de gènes cibles. (β -TrCP : *β -transducin repeat containing protein*, BAFF : *B-cell activating factor*, BLC : *B Lymphocyte Chemoattractant*, IKK : *I κ B kinase*, NF- κ B : *Nuclear factor kappa B*, P : groupement phosphate).

- **La voie NF- κ B, le processus inflammatoire et le cancer**

L'inflammation est un processus naturel de l'immunité innée déclenché en réponse à des agressions externes ou internes. Le mécanisme inflammatoire induit l'activation de cellules du système immunitaire (granulocytes, lymphocytes et monocytes) ainsi que la sécrétion et la libération d'agents responsables de l'inflammation (cytokines, histamine,...).

Le lien entre l'inflammation et le cancer a été soupçonné pour la première fois en 1863 par Rudolf Virchow quand il remarqua que les tumeurs étaient souvent localisées au niveau de sites d'inflammation chronique et qu'il détecta la présence de cellules inflammatoires au niveau des néoplasmes. Cette hypothèse a été confirmée récemment par des études épidémiologiques qui ont révélé que l'inflammation chronique prédispose au cancer et qu'au moins 15% des cas de cancers sont liés au processus inflammatoire (Balkwill and Mantovani, 2001).

Le facteur NF- κ B a été décrit comme étant un élément-clé liant l'inflammation et le cancer (Karin, 2006). Dans des conditions physiologiques normales, l'activation de la voie NF- κ B dans les cellules inflammatoires se produit en réponse à un stimuli par des agents infectieux et induit la synthèse de produits tels des facteurs de croissance (VEGF, IL-8), de régulateur du cycle cellulaire (c-myc, cycline D1) ou de protéines régulatrices de l'apoptose (IAP, Bcl-2) ou de l'adhésion cellulaire (ICAM (*Inter-Cellular Adhesion Molecule*), MMP (*Matrix Metalloprotease*)) qui sont nécessaires à la réparation des tissus lésés. Cette stimulation provoque également l'expression de facteurs auto-stimulants (TNF- α , NF- κ B1, NF- κ B2) qui, dans le cas de cancer ou de cellules saines exposées à des carcinogènes, peuvent sur-activer la voie NF- κ B et contribuer ainsi à la progression tumorale. Par ailleurs, la présence de cellules immunitaires saines au niveau du néoplasme peut contribuer à la progression de la maladie par la sécrétion de cytokines et par la production d'espèces réactives de l'oxygène qui sont de puissants agents mutagènes (Hanahan and Weinberg, 2000, 2011). Enfin, des mutations touchant les différents gènes impliqués dans la voie de signalisation NF – κ B canonique et non-canonique peuvent mener à une dérégulation de l'expression des gènes cibles et à la cancérogénèse (Courtois and Gilmore, 2006; Keats et al., 2007).

Ainsi, du fait de son implication directe ou indirecte dans le processus de cancérogenèse, la voie NF – κ B apparaît comme une cible de premier choix pour la découverte de nouvelles substances anti-cancéreuses.

1.2.3 Création d'un stress oxydant

- **Les espèces réactives de l'oxygène, le stress oxydant et les antioxydants**

Les espèces réactives de l'oxygène (ERO) est un terme qui regroupe les espèces chimiques réactives contenant au moins un atome d'oxygène. Il existe deux grands types d'ERO :

- Les espèces contenant des radicaux libres (espèce chimique contenant un ou plusieurs électrons non-appariés) comme par exemple l'oxygène singulet ($\cdot\text{O}-\text{O}\cdot$), le superoxyde ($\text{O}_2^{\cdot-}$) ou encore le radical hydroxyle ($\text{HO}\cdot$).
- Les espèces non-radicales qui sont très fortement réactives et qui peuvent être transformées en ERO radicalaires tel le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2).

Ces espèces moléculaires, qui réagissent très fortement, par la présence d'électrons de valence non-appariés, sont le produit issu de réductions incomplètes. Les ERO peuvent avoir une origine soit endogène soit exogène. Les ERO exogènes sont formées sous l'influence ou à partir de signaux ou d'agents extérieurs comme par exemple les radiations, la fumée ou l'alcool. Les ERO endogènes quant à elles sont générées de façon permanente par plusieurs mécanismes intra-cellulaires. L'ERO la plus fréquemment rencontrée dans l'organisme est l'anion superoxyde ($\text{O}_2^{\cdot-}$) qui est généré lors du processus de phosphorylation oxydative produit par la chaîne respiratoire au niveau des mitochondries. Les ERO peuvent également être le produit de réactions enzymatiques catalysées par la NAD(P)H réductase, les cyclo-oxygénases et les cytochromes P450. Nombre de ces enzymes sont d'ailleurs souvent sur-exprimés dans de nombreux cas de cancers. Les ERO jouent également un rôle de messenger dans la communication cellulaire mais également en tant qu'effecteurs dans plusieurs mécanismes cellulaires. Ils sont des médiateurs importants dans la communication des cellules du système immunitaire et principalement dans le phénomène d'inflammation. Ils participent à la régulation de la prolifération, la croissance et la différenciation cellulaire (Huo et al., 2009; Sauer et al., 2001). Ils régulent également l'activité de certains enzymes comme des phosphatases, des kinases et l'expression de plusieurs gènes en affectant l'activité de certains facteurs de transcription (NF - κ B, p53) par oxydation de groupements thiols de certains résidus sérine essentiels. Cependant, une trop forte concentration d'ERO peut provoquer des dommages cellulaires comme des mutations au niveau de l'ADN, des oxydations de lipides et de protéines qui peuvent induire la mort de la cellule, notamment par apoptose mais également conduire la cellule dans un processus de carcinogénèse.

Dans le but d'empêcher une trop forte abondance d'ERO tout en maintenant un niveau basal nécessaire à leur bon fonctionnement et à leur survie, les cellules disposent de plusieurs moyens de protection antioxydants. Un antioxydant est un composé ou un système qui retarde l'oxydation en inhibant la formation de radicaux libres par un ou plusieurs mécanismes (Brewer, 2011):

- Élimination des molécules responsables de l'oxydation.
- Chélation d'ions métalliques impliqués dans la formation des espèces réactives.
- Diminuer le niveau d'anion superoxyde ($O_2^{\bullet -}$) pour réduire la formation de peroxydes.
- Bloquer la chaîne de réaction oxydative.
- Diminuer la concentration locale d' O_2 .

Ce système de défense antioxydant se compose de plusieurs d'acteurs. D'un côté, on retrouve des enzymes comme la glutarédoxine et la thioredoxine qui éliminent les ERO par un mécanisme indirect impliquant le glutathion, un tripeptide qui sert de molécule acceptrice. De l'autre côté, l'on retrouve des enzymes comme la catalase, la superoxyde dismutase qui se chargent directement de la conversion des ERO en espèces non – réactives. L'expression et la régulation de ces enzymes se fait d'ailleurs souvent sous l'action directe des ERO, notamment par les voies impliquant les facteurs de transcriptions NRF2 et FOXO3 (Kops et al., 2002; Lee and Johnson, 2004).

Visant à assurer l'équilibre de la balance redox notamment par un effet de tamponnage le couple glutathion réduit (GSH) – glutathion oxydé ou disulfure de glutathion (GSSH) est le moyen le plus répandu. Il est présent à tous les niveaux de la cellule (noyau, mitochondrie, réticulum endoplasmique, cytoplasme) afin d'être toujours prêt à affronter un stress redox. Le glutathion est un tripeptide (acide glutamique, cystéine et glycine) synthétisé en deux étapes enzymatiques ATP-dépendantes et qui joue également un rôle dans la détoxification de la cellule mais également dans le contrôle de certaines voies cellulaires par modification post-traductionnelle (Figure 9) (Circu and Aw, 2012; Lu, 2009).

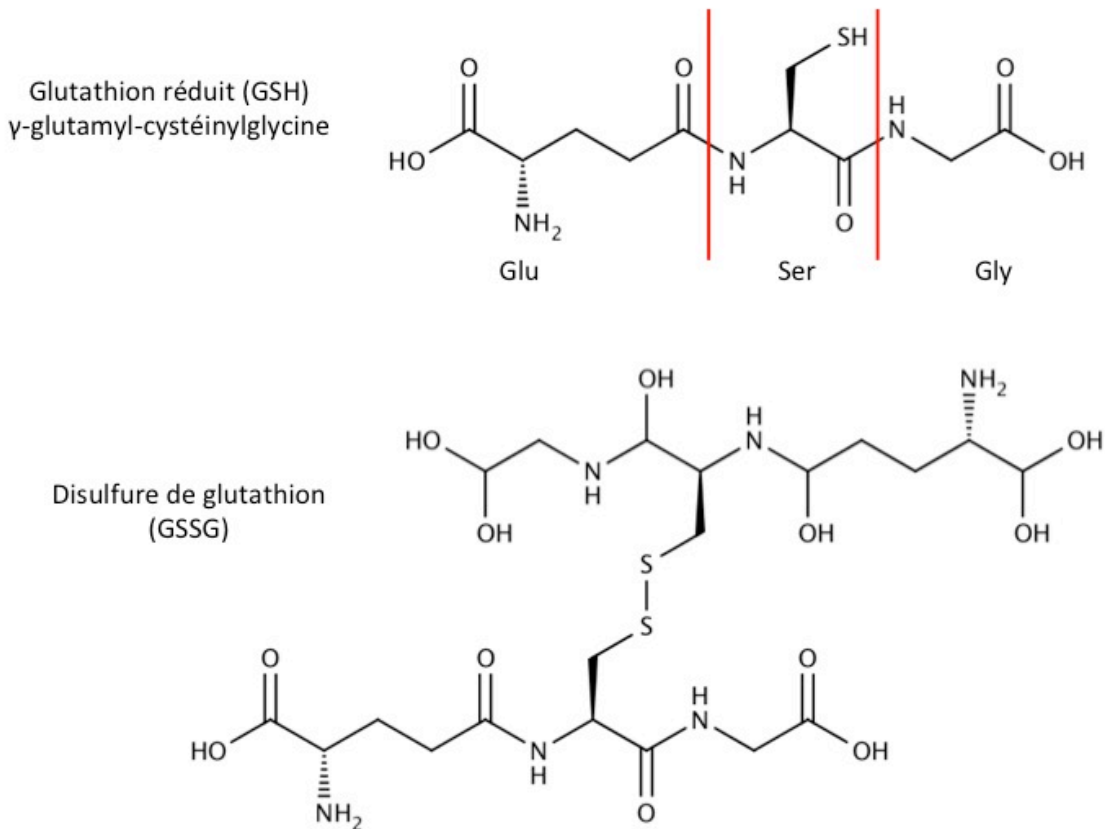


Figure 9 : Structure du Glutathion réduit (GSH) et du disulfure de glutathion (GSSG).

Le glutathion est un tripeptide (γ -glutamyl-cystéinyglycine) qui peut s'oxyder en formant un pont disulfure avec une seconde molécule de glutathion pour former le glutathion disulfure (GSSG). Le groupement thiol peut également être utilisé comme point de branchement avec d'autres partenaires : protéines, molécules exogènes.

La première étape consiste en la condensation de l'acide glutamique à la cystéine par la glutamate-cystéine ligase pour former la γ - glutamylcystéine. Cette première étape peut être sujette à une rétroaction (*feedback*) inhibitrice de la part du glutathion (Seelig et al., 1984). La seconde étape est réalisée par la GSH synthétase qui lie une glycine à la γ - glutamylcystéine pour former la γ - glutamyl - cystéinyglycine ou glutathion (GSH) (Figure 10) (Lu, 2013).

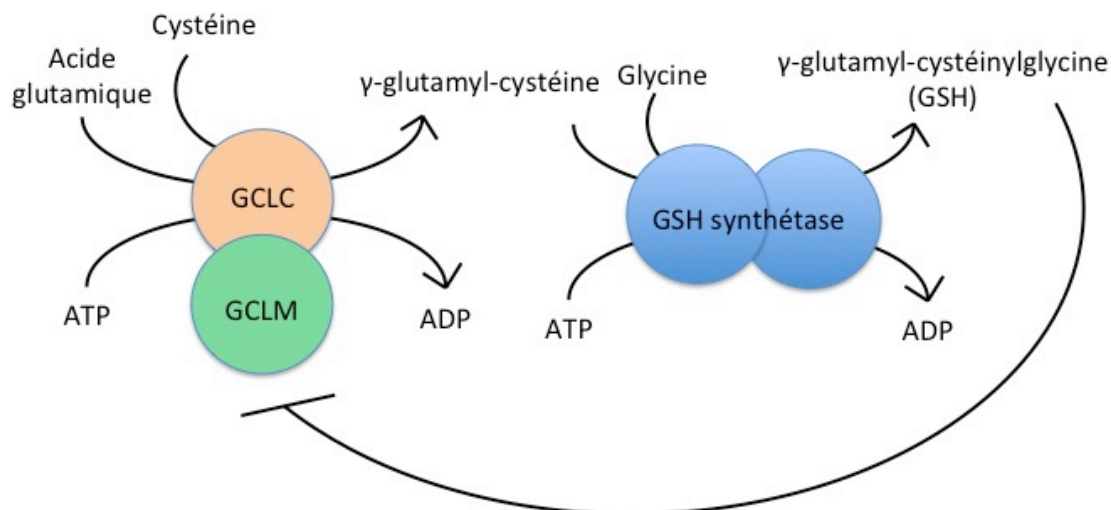


Figure 10 : Synthèse du glutathion (GSH).

Le GSH est synthétisé en deux étapes nécessitant chacune une molécule d'ATP. La glutamate-cystéine ligase est une enzyme dimérique formée d'une sous-unité catalytique (GCLC) et d'une sous-unité modificatrice (GCLM) qui produit de la γ -glutamylcystéine. La GSH synthétase est un homodimère qui catalyse la formation du glutathion par condensation d'une glycine à la γ -glutamylcystéine. La synthèse de GSH est régulée par rétroaction au niveau de la glutamate-cystéine ligase. D'après (Lu, 2013) après modifications.

L'équilibre $2\text{GSH}/\text{GSSG}$ est largement en faveur de la forme réduite GSH (90%) qui se fait grâce à la synthèse continue de GSH, de la réduction du GSSG mais aussi par l'incorporation de GSH extra - cellulaire (Meister and Tate, 1976). Le GSH se retrouve dans tous les compartiments cellulaires, noyau, mitochondries, réticulum endoplasmique et cytoplasme mais à des concentrations variables et il peut être également excrété hors de la cellule. La fonction antioxydante du GSH est rendue possible par deux enzymes : la GSH peroxydase (GPx) et la GSSG réductase (GR). La GSH peroxydase permet la réduction de H_2O_2 par l'oxydation du GSH en GSSG. La GSSG réductase se charge quant à elle de la réduction du GSSG en GSH au dépend du NADPH utilisé comme cofacteur (Figure 11) (Circu and Aw, 2012).

Le glutathion joue également un rôle dans la détoxification de la cellule en protégeant la cellule contre les ERO et les xénobiotiques comme les carcinogènes mais également les agents thérapeutiques en permettant leur élimination. Cette étape est généralement effectuée par des glutathion - S - transférases (GST) qui catalysent la liaison d'une molécule de GSH à un

substrat bien que parfois cette liaison puisse se faire de façon non-enzymatique (Di Pietro et al., 2010; Townsend and Tew, 2003).

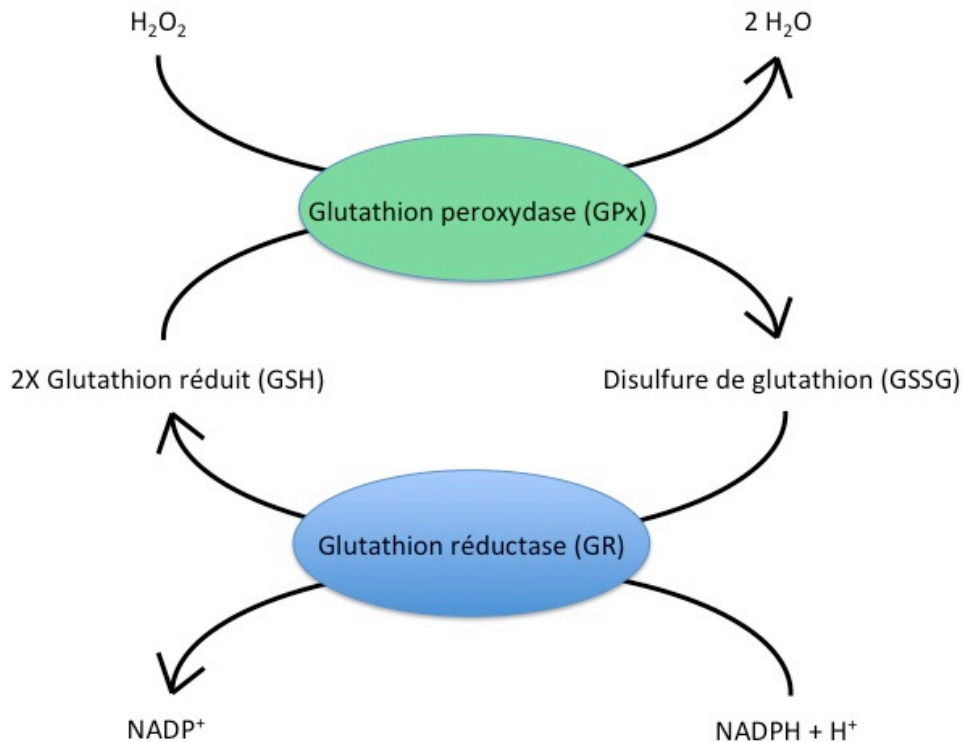


Figure 11 : Oxydation et réduction du système glutathion.

Le glutathion réduit est oxydé en disulfure de glutathion (GSSG) par la glutathion peroxydase (GPx). Le glutathion réduit est régénéré par la glutathion réductase (GR) en utilisant le cofacteur NADPH.

Des protéines antioxydantes comme les thiorédoxines (Trx) et les glutarédoxines (Grx) permettent également le maintien de l'homéostasie redox par la réduction des ponts disulfures de protéines oxydées.

Le système thiorédoxine (Figure 12) (Arner and Holmgren, 2000; Lu and Holmgren, 2013), ubiquitaire des Archées à l'homme, se compose de trois partenaires : la thiorédoxine, la thiorédoxine réductase (TrxR) et le NADPH. Les thiorédoxines possèdent deux résidus cystéine au niveau du site catalytique. Le site catalytique des thiorédoxine réductases est composé d'une cystéine et une sélénocystéine (Nordberg and Arner, 2001). Ce système participe également à la régulation de protéines comme des kinases (Fujino et al., 2006; Schenk et al., 1994) et des facteurs de transcription (NF - κ B, AP - 1) et ce, notamment pour

leur permettre de se lier à l'ADN après réduction (Matthews et al., 1992; Schenk et al., 1994). Les thiorédoxines aident également à la lutte directe contre les ERO en tant que donneurs d'électrons aux peroxyrédoxines, des enzymes antioxydantes réductrices du peroxyde d'hydrogène (Chae et al., 1999). L'expression de ces enzymes est régulée par le facteur de transcription FOXO3 *via* les voies des MAPK, par contrôle de la protéine AMPK (*5' adenosine monophosphate – activated protein kinase*) mais aussi sous l'impulsion du stress oxydant généré par les ERO (Hou et al., 2010; Li et al., 2009b). Bien que luttant contre le stress oxydant, les thiorédoxines peuvent être impliquées dans le processus de carcinogenèse notamment par le fait qu'elles puissent participer à la régulation de nombreux marqueurs du cancer (Arner and Holmgren, 2006).

Le système glutarédoxine (Figure 12) (Fernandes and Holmgren, 2004; Lillig et al., 2008) est redondant du système thiorédoxine car il permet également la réduction de protéines oxydées mais il est complémentaire de celui-ci en ciblant d'autres protéines. Ce système glutathion dépendant utilise le NADPH comme cofacteur mais fait appel à la glutathion réductase, une enzyme homologue des thiorédoxine réductases (Zhong et al., 1998).

La glutarédoxine est également capable de moduler l'activité et la localisation de protéines par deglutathionylation. La S – glutathionylation est une modification post-traductionnelle consistant à l'ajout d'une molécule de GSH au niveau de résidu cystéine de la protéine cible qui peut se produire spontanément dans un environnement riche en glutathion bien que l'on soupçonne que cette modification puisse également être catalysée par la Grx et la GST – P (Dalle-Donne et al., 2009; Gallogly and Mieyal, 2007; Pastore and Piemonte, 2012; Pompella et al., 2003; Shelton et al., 2005). Parmi ces protéines cibles, la thiorédoxine peut être S-glutathionylée ce qui a comme effet de d'inhiber temporairement son activité (Casagrande et al., 2002) de même que pour la caspase 3 ou le facteur de transcription NF-κB qui peuvent voir leurs activités inhibées (Huang et al., 2008; Pineda-Molina et al., 2001).

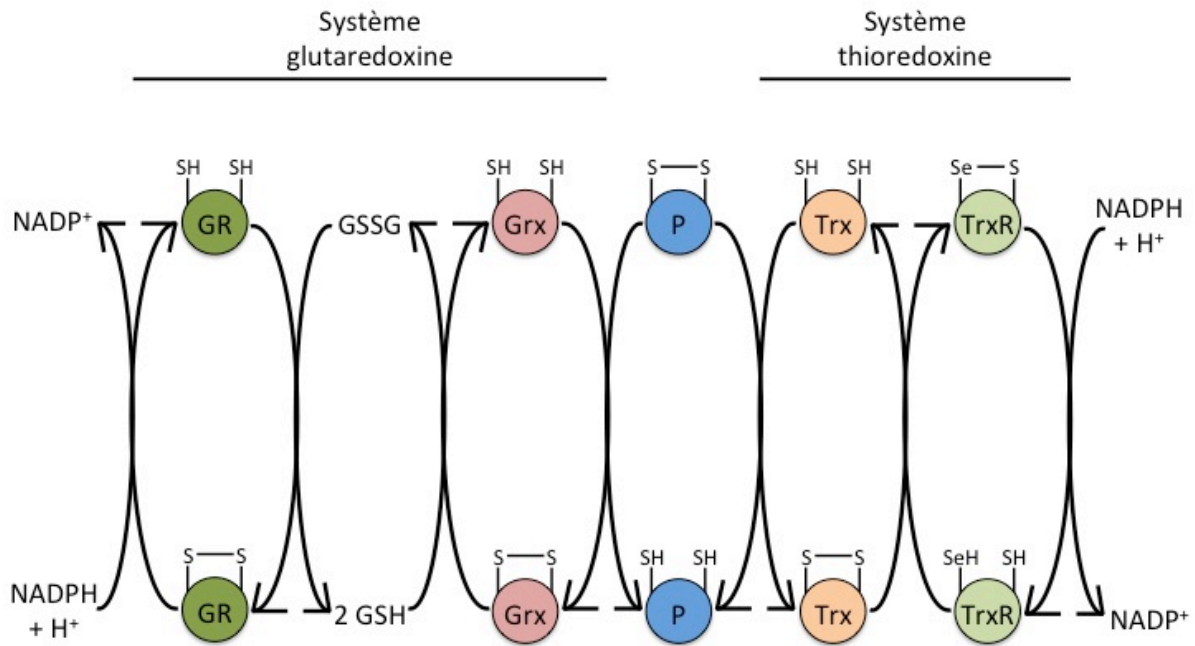


Figure 12 : Représentation schématique des systèmes antioxydants thioredoxine et glutaredoxine.

Les systèmes thioredoxine et glutaredoxine permettent la réduction de protéines oxydées différentes en utilisant le NADPH comme co-facteur. GR : glutathion réductase, Grx : glutaredoxine, P : protéine, Trx : thioredoxine, TrxR : thioredoxine réductase.

Afin de lutter contre le stress oxydant, la cellule fait également appel à des enzymes telles que la superoxyde dismutase (SOD), les catalases (présentes uniquement dans les peroxysomes), ou encore les peroxydases qui se chargent de l'élimination directe des ERO sans faire appel au glutathion. Un autre moyen de défense dont peut disposer la cellule face aux ERO sont les molécules anti - oxydantes exogènes provenant de l'alimentation comme par exemple la vitamine C, les polyphénols et les flavonoïdes et d'autres molécules d'origine végétale. Cet aspect sera développé ultérieurement (voir point 1.3.4).

- **Les espèces réactives de l'oxygène et le cancer**

Les stress redox répétés peuvent être responsables de l'apparition et du développement de plusieurs maladies dont les cancers. Les ERO sont connus pour être capable de provoquer la formation d'adduits ADN - protéines, des coupures simple ou double brin de l'ADN mais également de provoquer des mutations au niveau de l'ADN. L'une des mutations les plus

connues et l'oxydation de la guanine en 8 oxo-guanine qui aura pour conséquence que celle-ci soit reconnue comme une thymine. L'ADN mitochondrial situé à proximité du site de génération des ERO et qui code les gènes de la chaîne respiratoire peut être la cible de mutations, ce qui peut avoir comme conséquence la synthèse de protéines mutées et la formation de complexes défailants de la chaîne respiratoire (Indo et al., 2007; Ishikawa et al., 2008). Certains électrons pourront dès lors fuir ou s'échapper des complexes de la chaîne respiratoire et être capturés par de l'oxygène et former ensuite des radicaux superoxyde et qui peuvent dès lors être convertis en d'autres formes d'ERO. Ceci est un peu à voir comme un cercle vicieux, c'est à dire que ces ERO vont à leur tour induire des mutations qui mèneront à accroître plus encore la production d'ERO. Autre origine, l'oxydation de protéines catalytiques ou structurales au niveau de leurs résidus sérine essentiels aura pour conséquence une modification de leur activité. Des kinases, phosphatases ou facteurs de transcription contrôlant des voies impliquées dans l'angiogenèse, la prolifération ou la formation de métastases peuvent être la cible d'oxydation, perturber ces voies et induire un phénomène de carcinogenèse (Ferraro et al., 2006; Lei et al., 2011; Saunders et al., 2010; Xia et al., 2007).

Des recherches ont également montré que les cellules cancéreuses ont un niveau bien plus élevé en ERO ($O_2^{\cdot -}$, H_2O_2 ,...) que leurs cellules saines correspondantes (Aykin-Burns et al., 2009; Lim et al., 2005; Yeh et al., 2005a). Un métabolisme élevé, des chaînes respiratoires défailantes, des altérations génétiques et des biomolécules oxydées font que ces cellules tumorales vivent sous un stress oxydant permanent. Afin d'éviter de basculer en apoptose comme le ferait normalement une cellule saine, elles ont acquis des moyens de défense antioxydants supplémentaires. La surexpression du glutathion est souvent utilisée ainsi que la surexpression d'enzymes telle que la superoxyde dismutase ou encore la catalase (Dhar et al., 2011; Hu et al., 2005; Huang et al., 2001; Lincoln et al., 2003; Perry et al., 1993; Russo et al., 1986 ; Skrzycki et al., 2009; Zhou and Du, 2012).

Cependant, vivantes sous la pression constante d'un stress oxydant, il semblerait que les cellules cancéreuses soient plus vulnérables que les cellules saines à une augmentation de ce stress par des agents anti-cancéreux capable d'augmenter le niveau d'ERO ou de diminuer le système de défense antioxydant (Figure 13). Ainsi, l'utilisation de composés générateurs d'ERO (1), l'inhibition d'enzymes antioxydants (2) ou ayant la capacité à pouvoir tamponner l'oxydation (3) ou capable d'agir sur ces trois cibles permet d'induire spécifiquement la mort des cellules cancéreuses (Pelicano et al., 2004; Trachootham et al., 2009).

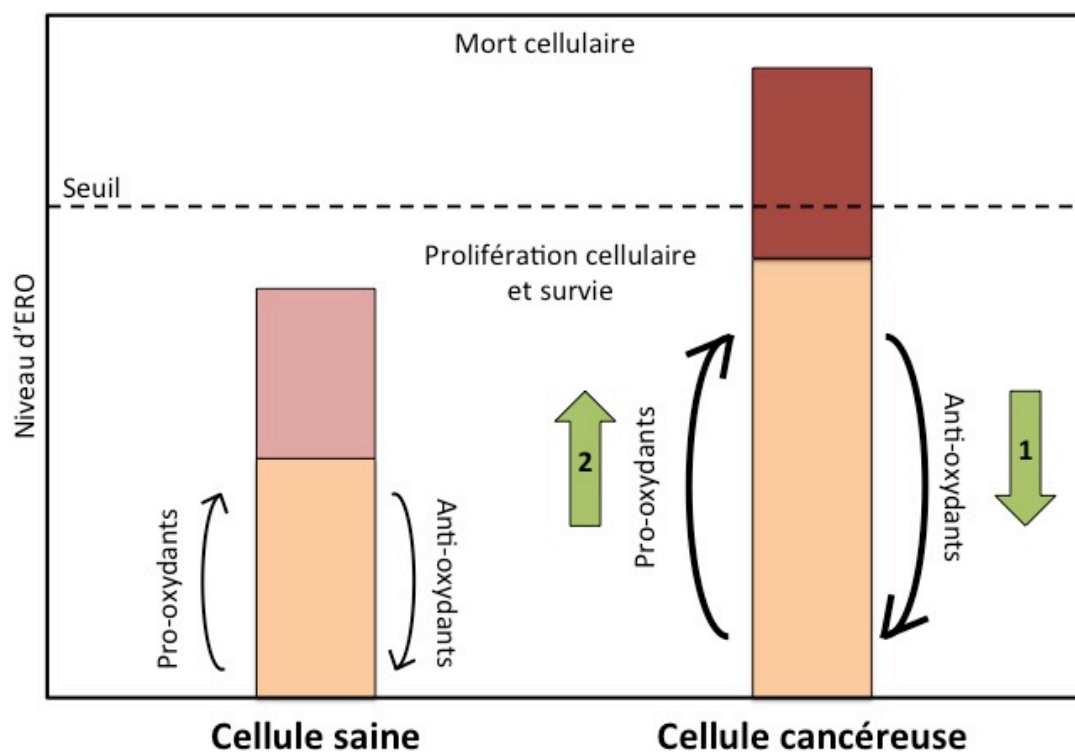


Figure 13 : Modèle permettant d’expliquer l’intérêt des composés anti – cancéreux régulant le niveau d’ERO.

Les ERO sont nécessaires au bon fonctionnement cellulaire mais en raison des diverses mutations, les cellules cancéreuses ont un niveau plus élevé en ERO que les cellules saines. Afin de pouvoir survivre en situation de stress oxydant permanent, les cellules cancéreuses ont augmenté leurs défenses anti – oxydantes. Leur taux d’ERO étant plus proche du seuil de tolérance que celui des cellules saines, une simple augmentation de ce taux par une diminution des défenses anti-oxydantes (flèche 1) ou par une augmentation du niveau d’ERO (flèche 2), voire les deux de façon concomitante, pourrait tuer de façon sélective les cellules cancéreuses. D’après (Trachootham et al., 2009) avec modifications.

1.2.4 La mort cellulaire

Le terme « mort cellulaire » désigne l'ensemble des événements conduisant à la destruction de la cellule. Actuellement, il existe 4 différents types de mort connus avec la nécrose ou nécroptose, l'apoptose, l'autophagie et la catastrophe mitotique (Kroemer et al., 2009).

- **L'apoptose**

L'apoptose est un mécanisme de mort cellulaire programmée qui met en jeu de nombreux acteurs protéiques pro et anti – apoptotiques. L'apoptose est un mécanisme important dans le développement embryonnaire (destruction de la membrane interdigitale), dans la lutte contre les infections mais surtout dans l'homéostasie de l'organisme en permettant l'élimination des cellules à risque. L'apoptose peut être déclenchée par des signaux extrinsèques (niveau membranaire) et/ou intrinsèques (niveau mitochondrial). Parmi les signaux extracellulaires, on peut notamment citer les cytokines, tel le TNF – alpha ou le ligand Fas. Dans les signaux intracellulaires induisant l'apoptose, on peut notamment citer les anomalies génomiques induites par les UV ou les ERO, les agents chimiques et chimiothérapeutiques.

Les molécules clé de l'apoptose sont les caspases qui tirent leur nom de l'anglais « *cysteinyl – aspartate – cleaving protease* ». Ces protéases à cystéine sont présentes sous forme de zymogènes et n'acquièrent leur activité qu'après auto-activation ou par protéolyse en cascade par une autre caspase. Le rôle de ces protéases est d'hydrolyser les protéines essentielles au fonctionnement cellulaire comme la PARP (Poly (ADP Ribose) polymérase, une enzyme impliquée dans la réparation de l'ADN, des protéines du cytosquelette (Grutter, 2000; Shi, 2002). L'induction de l'apoptose provoque des changements cellulaires dont certains sont morphologiques. Ceux-ci sont notamment la condensation de la chromatine, la fragmentation du noyau, le clivage de l'ADN en fragments réguliers et une exportation sur la face externe de la cellule de phospholipides habituellement localisés au niveau de la membrane interne, la phosphatidylsérine. L'apoptose est un type de mort cellulaire que l'on pourrait qualifier de « propre » car contrairement à la nécrose, il ne conduit pas à la libération de constituants internes de la cellule du fait de la formation de corps apoptotiques qui sont phagocytés par les cellules du système immunitaire et qui donc n'engendrent pas de réactions inflammatoires (Fulda and Debatin, 2006; Vermeulen et al., 2005).

La voie intrinsèque :

La voie intrinsèque (Figure 14) gravite autour de la mitochondrie, plus exactement au niveau de ses membranes. Dans la voie intrinsèque il se produit une perte de la perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie et une perte de son potentiel membranaire. Ceci va provoquer la libération du cytochrome c contenu jusqu'à présent dans la mitochondrie vers le cytoplasme où il participe à la formation du complexe apoptosome qui se compose également de la protéine APAF-1 (*Apoptotic Peptidase Activating Factor 1*) et de la pro-caspase-9 (Henshall et al., 2001a). Ce complexe active la pro-caspase 9 en caspase 9 effectrice qui elle-même converti la pro-caspase-3 en caspase-3 qui ira protéolyser ses cibles.

Le contrôle de cette voie repose sur la balance molécules pro-apoptotiques – molécules anti-apoptotiques. Parmi les molécules pro – apoptotique, on peut citer les protéines Bax (*Bcl – 2 associated protein*) et Bak (*Bcl – 2 homologous antagonist killer*), Bim (*Bcl – 2 – like protein 11*), Bad (*Bcl – 2 antagonist of cell death*), Bid (*BH3 – interacting domain death agonist*), Noxa et Puma (*p53 upregulated modulator of apoptosis*). Dans les molécules anti-apoptotiques, on retrouve les protéines Bcl-2 (*B – cell leukemia/lymphoma 2*), Bcl-xL (*B – cell lymphoma extra large*) et Mcl-1 (*Myeloid Cell Leukemia 1*). Toutes ces protéines appartiennent à la même famille, la famille Bcl-2 qui présentent en commun au moins un domaine BH (*Bcl-2 Homology Domain*) permettant la dimérisation de ces molécules entre elles. Les molécules anti-apoptotiques possèdent quatre domaines BH, quant aux molécules pro-apoptotiques, elles en possèdent trois (Bax et Bak) ou un seul domaine (Bim, Bad, Bid, Noxa et Puma) (Burlacu, 2003).

En temps normal, les protéines anti – apoptotiques (Bcl-2, Bcl-xL) forment des hétérodimères avec la protéine pro – apoptotique Bax, celle-ci se retrouve séquestrée et ne peut pas se lier à Bak pour induire l'apoptose (Cheng et al., 2001). La diminution des protéines anti-apoptotiques permet l'homo et l'hétérodimérisations des protéines pro – apoptotiques entre-elles tels les complexes oligomériques Bax/Bak, Bak/Bak, Bax/Bax. Ces homodimères se fixent ensuite au niveau de la membrane mitochondriale externe où ils provoquent la formation de pores qui conduisent au relargage du cytochrome c (Gross et al., 1998; Korsmeyer et al., 2000).

La voie extrinsèque est interconnectée à la voie intrinsèque suite au clivage par la caspase 8 de Bid en t-Bid (*truncated Bid*), qui active la formation des hétérodimères Bax/Bak,

permettant la libération du cytochrome c, à la formation de l'apoptosome et à l'activation de la cascade des caspases (Burlacu, 2003; Henshall et al., 2001b).

La voie extrinsèque :

La voie extrinsèque (Figure 14) repose sur des récepteurs membranaires surnommés « récepteurs de mort » tels les récepteurs Fas, TRAIL-R1/R2 (*TNF – Related Apoptosis Inducing Ligand*) ou encore TNFR – 1 (*Tumor Necrosis Factor Receptor 1*). Ces récepteurs ont comme caractéristique commune un domaine intracellulaire appelé « *Death Domain* » (DD). Activés par leurs ligands respectifs, ces récepteurs déclenchent la formation des complexes protéiques DISC (*Death inducing silencing complex*) qui leur sont propres.

Ces complexes sont composés de protéines adaptatrices (FADD (*Fas-Associated protein with Death Domain*) pour le récepteur Fas, et TRADD (*Tumor Necrosis Factor Receptor type 1-Associated Death Domain*) pour le récepteur TNFR – 1)) se liant au récepteur membranaire par l'intermédiaire du domaine « *Death Domain* ». Ces complexes recrutent ensuite la pro-caspase 8 ou 10 par l'intermédiaire de deux « *Death Effector Domain* » (DED) portés à la fois par la pro-caspase et le complexe DISC. Cette interaction active les caspases, qui son tour active les caspases effectrices de l'apoptose, les caspases 3, 6, 7 et 9. On distingue deux types d'apoptose extrinsèque:

- Le type I lorsqu'il y a suffisamment de caspase 8 pour activer directement la caspase 3.
- Le type II qui se met en place lorsque le niveau de caspase 8 est insuffisant pour activer la caspase 3 et qui fait dès lors appel à un système d'amplification impliquant la mitochondrie pour activer cette dernière caspase. La caspase 8 active par clivage la protéine pro-apoptotique Bid en t-Bid, lui permettant de perméabiliser la membrane mitochondriale après interaction avec le couple Bax et Bak et permettant ainsi la libération du cytochrome c nécessaire à l'activation de la caspase 3 (Henshall et al., 2001b).

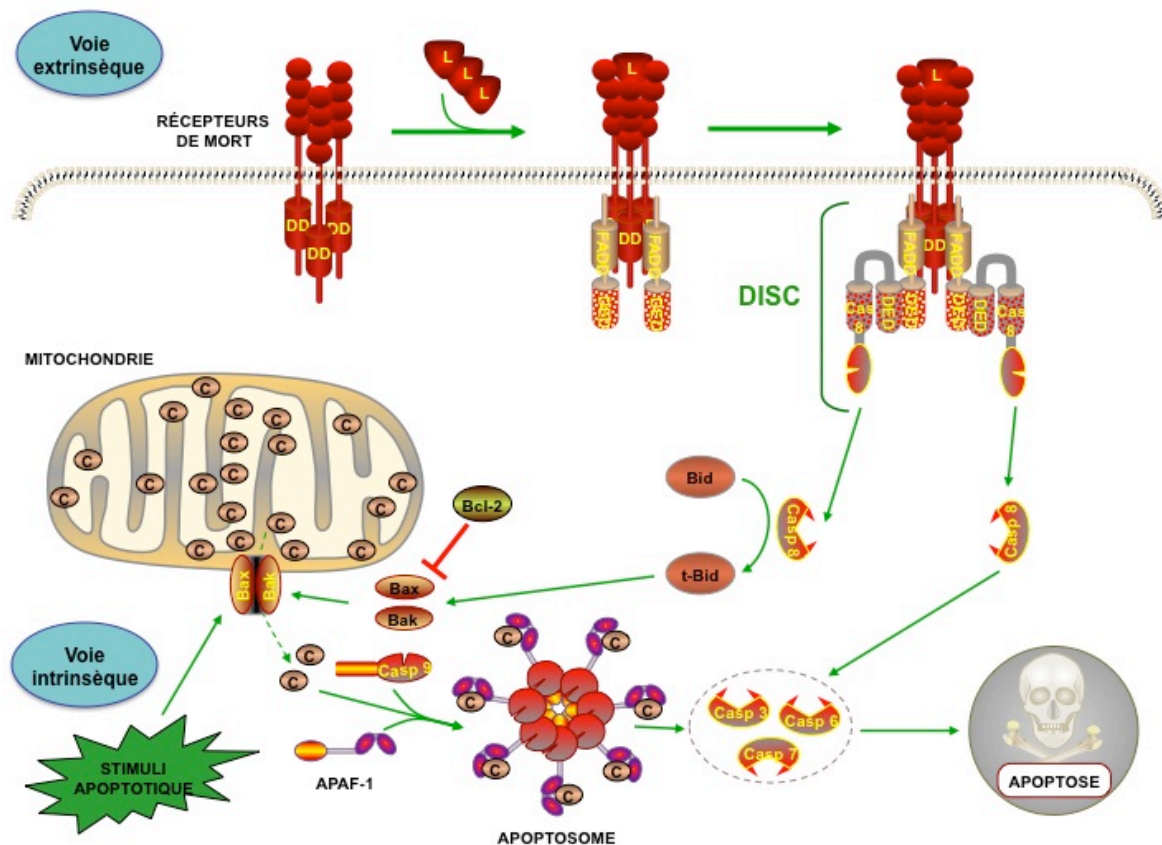


Figure 14 : Les voies intrinsèque et extrinsèque de l'apoptose.

Schéma synthétique montrant les voies extrinsèque et intrinsèque de l'apoptose et leur interconnexion par l'intermédiaire de la protéine Bid. La voie extrinsèque est activée par un signal extérieur (ligand) alors que l'activation de la voie intrinsèque nécessite un signal interne (stress, dommages au niveau de l'ADN,...). C : cytochrome c, Casp : Caspase, DD : Death Domain, DED : Death Effector Domain, DISC : Death Inducing Signaling Complex, FADD Fas-Associated protein with Death Domain, L : ligand.

Les espèces réactives de l'oxygène et l'apoptose

D'un côté, les ERO sont surtout connus pour conduire à la formation de dommages et de mutations au niveau de l'ADN, ce qui a pour effet d'induire la mort de la cellule par apoptose par la voie intrinsèque. Une diminution du niveau de GSH pouvant intervenir soit par son oxydation en GSSG, ou sa complexation avec un partenaire ou bien encore par son efflux hors de la cellule voir hors de la mitochondrie sont des phénomènes connus pour induire la mort des cellules par apoptose. On sait également que la baisse de GSH intracellulaire induit également l'activation de voies MAPK impliquées dans le processus d'apoptose mais sans que l'on en connaisse actuellement le mécanisme.

L'oxydation des pores de relargage du cytochrome c au niveau de la membrane mitochondriale par les ERO peut provoquer l'ouverture et l'augmentation intracellulaire de cytochrome c et donc déclencher l'apoptose. La S – glutathiolation, cette modification post-traductionnelle, peut également mener à l'activation de protéines pro-apoptotiques ou à l'inhibition des protéines anti-apoptotiques. Par exemple, l'inactivation de l'activité kinase de IKK par S – glutathiolation inhibe la voie NF – κ B et provoque la mort par apoptose.

Cependant, si les ERO peuvent induire la mort des cellules par apoptose, ce sont également des molécules pouvant bloquer la mort des cellules par apoptose, permettant ainsi leur survie. Ainsi, il a été démontré que l'oxydation et la S-glutathiolation de sérines catalytique des caspases provoque leur inactivation (Circu and Aw, 2010, 2012; Mates and Sanchez-Jimenez, 2000; Simon et al., 2000).

- **La catastrophe mitotique**

La catastrophe mitotique, est, quant à elle, mise en place lorsque la cellule n'arrive pas au terme de sa mitose ou lorsque celle-ci se déroule de façon anarchique. Elle résulte de la combinaison de déficiences au niveau des points de contrôle du cycle cellulaire (points de contrôle de la structure de l'ADN et de l'assemblage du fuseau mitotique) et de dommages cellulaires mais peut également être provoquée par des stress physiques ou chimiques ainsi que par des molécules thérapeutiques ciblant les microtubules. La voie extrinsèque de l'apoptose joue également un rôle majeur dans ce phénomène (Castedo et al., 2004; Vakifahmetoglu et al., 2008). Un désassemblage du fuseau mitotique et un arrêt du cycle cellulaire à la transition G2/M ont été mis en évidence dans les cellules humaines MCF-7 de cancer du sein traitées à la curcumine (Holy, 2002).

- **L'autophagie**

L'autophagie est un phénomène qui se caractérise par la séquestration d'organites et de protéines par des autophagosomes et par la dégradation de leur contenu après fusion avec des lysosomes. Cet événement qui se produit en période de stress ou de privation de nutriments conduit à la dégradation des protéines et organites superflus qui serviront de matières premières pour maintenir le métabolisme cellulaire. A l'heure actuelle, on distingue trois grands types d'autophagie :

- Macro – autophagie consiste en la formation d'autophagosomes autour d'une région cellulaire ou d'organites. Ces autophagosomes vont ensuite fusionner aux lysosomes pour former des autophagolysosomes où le contenu sera dégradé par les hydrolases.
- Micro – autophagie est l'engloutissement direct de molécules du cytoplasme directement par le lysosome.
- Autophagie régulée par les protéines chaperonnes n'implique que la dégradation de protéines portant un motif qui est reconnu par le complexe HSC70. Après reconnaissance et fixation, le complexe oriente la protéine cible vers le lysosome où celle-ci est transloquée et hydrolyser.

L'autophagie n'est pas un phénomène de mort directement en soi, c'est plutôt un mécanisme de défense que peut mettre en place la cellule saine ou cancéreuse face à un stress de courte période. Cependant, si ce stress ou cette privation de nutriments perdure sur une plus longue période, l'autophagie peut aboutir à la mort par apoptose ou par nécrose de la cellule (Eisenberg-Lerner et al., 2009; Fimia and Piacentini, 2010; Jin and White, 2007; Mathew et al., 2007).

Des résultats récents ont montré que les ERO sont capables d'induire le processus d'autophagie. Bien qu'il subsiste encore beaucoup d'interrogations à l'heure actuelle, notamment sur les cibles des ERO et sur les voies de signalisation impliquées, il semble que ce soit l'oxydation de certaines protéines impliquées dans le processus d'autophagie qui en soit la cause (Azad et al., 2009; Scherz-Shouval and Elazar, 2011; Scherz-Shouval et al., 2007).

Des travaux récents ont révélé que la curcumine est capable de bloquer *in vitro* et *in vivo* la prolifération de gliomes en provoquant un blocage du cycle cellulaire à la transition G2/M qui débouche sur une induction de l'autophagie suite à l'activation des kinases ERK1/2 (*Extracellular signal-regulated kinases 1/2*) et à l'augmentation de l'expression de LC3 II (*Microtubule – associated Protein 1 Light Chain 3 Isoform B*) (Aoki et al., 2007; Shinojima et al., 2007).

- **La nécrose et la nécroptose**

La nécrose a été souvent écrite comme un type de mort non-contrôlée et qui n'est que très peu étudiée. La mort par nécrose déclenchée par blessure ou traumatisme aboutit à la lyse des cellules et à la libération de leur contenu cytoplasmique dans l'environnement extra-cellulaire et qui déclenche un processus d'inflammation. Ce mécanisme se caractérise par une augmentation de la concentration de calcium cytoplasmique, d'ERO et une diminution de l'ATP. Cependant, les recherches récentes ont démontré que dans certains cas ce type de mort cellulaire apparaît comment étant sous régulation d'où sa nouvelle appellation « nécroptose ». (Fulda, 2013; Golstein and Kroemer, 2007; McCall, 2010; Proskuryakov et al., 2003).

1.3 A la recherche de nouveaux composés anti – cancéreux d’origine naturelle

Depuis l’aube des temps, l’Homme a cherché à se protéger et à se soigner de toutes les blessures et maladies qu’il pouvait rencontrer. Partout à travers le Monde, les médecines traditionnelles ont tiré leurs premiers remèdes et traitements à partir de la Nature environnante, qu’elle soit terrestre ou aquatique. Utilisés par les chamans, sorciers, marabouts, guérisseurs et « hommes médecine » des médecines traditionnelles d’Europe, d’Asie, d’Amérique, d’Océanie et d’Afrique directement, en infusion ou sous forme d’onguent sans que leur mode d’action ne soient compris, les molécules d’origine naturelle sont aujourd’hui isolées, identifiées et étudiées par les scientifiques. Ainsi, aujourd’hui avec les découvertes scientifiques et l’amélioration des technologies, les décoctions et les cataplasmes de plantes préparés par le guérisseur ont fait place à la radiothérapie et aux molécules produites industriellement par voie chimique et prescrites par le médecin (Azaizeh et al., 2010; Maher, 1999; Orlikova and Diederich, 2012; Sawadogo et al., 2012; Teiten et al., 2013a).

Le traitement du cancer a poussé à la recherche et au développement de médicament anti-cancéreux. Présents dans notre pharmacopée, on peut citer le Paclitaxel, un inhibiteur de la dépolymérisation des microtubules isolé à partir de l’écorce de l’if (*Taxus brevifolia*), l’étoposide, un inhibiteur de topoisomérase II, du cisplatine un agent chélateur des brins d’ADN ou encore de l’Imatinib (Gleevec), un inhibiteur de la tyrosine kinase chimérique BCR-ABL (<http://www.cancer.gov/cancertopics/druginfo/alphalist>).

Cependant l’apparition de phénomènes de résistance vis-à-vis des traitements actuels dans le cas du cancer mais aussi dans le cas d’autres pathologies et infections (Andersson and Hughes, 2010; Baguley, 2010; Johnson et al., 2011; Pfaller, 2012), l’apparition de nouvelles maladies et épidémies comme le SIDA, la maladie d’Alzheimer ou grippe aviaire (Friesen et al., 2006; Morens and Fauci, 2012; Morse, 1995) ainsi que les effets secondaires de certains médicaments (Hartmann et al., 2009; Monsuez et al., 2010; Ruiz-Irastorza et al., 2010) et la diversité génétique des cancers appellent à l’amélioration des traitements actuels mais aussi à la découverte de nouvelles substances thérapeutiques.

Les recherches scientifiques ont montré que les organismes vivants comme les micro-organismes mais aussi les plantes ou encore les lichens sont capables de synthétiser des milliers de molécules diverses qui leurs sont propres. On peut facilement se représenter ces

organismes vivants comme de petites usines pharmaceutiques capables de produire allègrement ces substances alors que ces composés, que l'on nomme « métabolites secondaires » peuvent parfois être difficilement synthétisables en laboratoire du fait de leurs structures parfois complexes, du coût de production ou du rendement de leurs synthèses. La diversité des substances produites est tellement vaste qu'elle peut faire apparaître des substances à laquelle le chercheur n'aurait peut être même jamais pensé (Rao and Ravishankar, 2002).

Enfin, les connaissances scientifiques actuelles en biotechnologie permettent à l'homme de cultiver ces organismes en laboratoire sous parfait contrôle (*in vitro*, bioréacteurs) mais également de pouvoir modifier et de contrôler la synthèse des composés désirés (protéines thérapeutiques, vaccins, antibiotiques,...) grâce au génie génétique (organismes génétiquement modifiés) (Bock and Warzecha, 2010; Giddings et al., 2000; Oksman-Caldentey and Inze, 2004; Sourrouille et al., 2009; Xu et al., 2012).

La Nature regorge donc de nombreuses substances originales et innovantes qui peuvent être dotées de propriétés thérapeutiques intéressantes pour l'Homme et qui ne demandent qu'à être décrites ou améliorées. De plus, la découverte de nouveaux environnements a mené à la découverte de nouvelles espèces vivantes et donc à encore plus de nouvelles molécules inconnues qui cachent peut être d'incalculables potentiels thérapeutiques.

1.3.1 Les métabolites secondaires des plantes

• Introduction aux métabolites secondaires

Le terme « métabolite secondaire » s'applique à toutes les biomolécules présentes dans un organisme et qui ne participent pas aux processus essentiels à la survie de celui-ci (métabolisme primaire) comme par exemple le métabolisme, la croissance ou la reproduction et qui a recours quant à lui aux acides nucléiques, aux protéines, aux glucides et aux lipides. Présents dans tous les organismes des règnes vivants (Archées, Bactéries, Protistes, Mycètes, Végétaux et Animaux), ces molécules non-essentiels sont classées selon leur voie de biosynthèse. Structurellement très différents et parfois très complexes, les métabolites secondaires ne sont parfois présent qu'en très faible pourcentage (< 1% de la masse de carbone) dans l'organisme. La synthèse de ces produits est très fortement influencée par les facteurs environnementaux (nature du sol, ensoleillement, climat) mais également par le niveau de développement de l'organisme. La production de certains de ces composés ne s'active qu'après élicitation (attaque d'un pathogène, stress thermique, blessure,...). Les recherches ont également montré que les métabolites secondaires ne sont pas toujours

produits par l'organisme (hôte) lui même mais par des organismes hébergés par celui-ci (symbiote) comme dans des relations de symbiose. Les métabolites secondaires ont comme rôle la survie de l'organisme dans son environnement. Certains permettent aux plantes de se protéger contre les prédateurs, les herbivores, les pathogènes ou encore contre d'autres plantes pour l'accès aux ressources (lumière, eau et substances nutritives). D'autres métabolites permettent, quant à eux, de résister au stress environnemental (sécheresse, carences en nutriments), de capturer de proies (venins des arthropodes et des serpents), d'attirer des insectes pollinisateurs (couleurs et odeurs) ou d'assurer la symbiose avec d'autres organismes. A ce jour, plus de 200 000 métabolites secondaires différents ont été découverts et décrits. Certains ont été détournés de leur utilisation première par l'homme et ont aujourd'hui trouvé des applications commerciales en tant que colorants, médicaments ou encore insecticides (Bourgaud et al., 2001; Hartmann, 2007; Heinen and da Veiga, 2011; Jain and Kumar, 2012; Namdeo, 2007).

- **La chimioprévention**

La chimioprévention est une méthode de prophylaxie qui consiste à utiliser des molécules d'origine synthétique ou naturelle ne présentant pas d'effet létal mais qui permettent d'empêcher, voir de bloquer l'apparition et le développement de certaines maladies dont les cancers.

Bon nombre de ces substances naturelles sont des métabolites secondaires, capables d'interagir sur la modulation des signaux mitogènes, de survie cellulaire, d'apoptose, de régulation du cycle cellulaire, d'angiogenèse ou encore sur des processus intervenant dans le développement de métastases, se retrouvent naturellement au sein même de notre alimentation, notamment dans les fruits et les légumes. Parmi ces agents naturels, on peut notamment citer les flavonoïdes (carottes), les isothiocyanates (choux), les lycopènes (tomates), les indoles, les organosulfures (ail) et les polyphénols (curcuma) (Figure 15) (Surh, 2003).

Les isothiocyanates, trouvés dans les légumes de la famille des Brassicacées (choux, brocolis, navets,...), peuvent stimuler l'activité d'enzymes impliquées dans la détoxification des produits carcinogènes. La vitamine C, présente en grande quantité dans les agrumes (oranges, citrons et pamplemousses), est capable de protéger la membrane et l'ADN de la cellule contre les dommages oxydatifs mais également de stimuler l'activité d'enzymes de détoxification. Le β -carotène des carottes, papayes et potirons a la capacité de protéger les cellules contre les

dommages dus aux radicaux libres. L'épigallocatechine-3-gallate ou EGCG, une molécule contenue dans le thé vert, est l'une des molécules nutritionnelles les plus puissantes capables de contrecarrer l'angiogenèse et la formation de métastases nécessaires à l'invasion des tissus sains par les cellules cancéreuses (Figure 16). La curcumine (curcuma) est, quant à elle, majoritairement reconnue comme la molécule aux propriétés anti-inflammatoires les plus puissantes (Gaascht et al., 2010; Jankun et al., 1997; Mehta et al., 2010; Singh and Agarwal, 2006; Steinmetz and Potter, 1996).

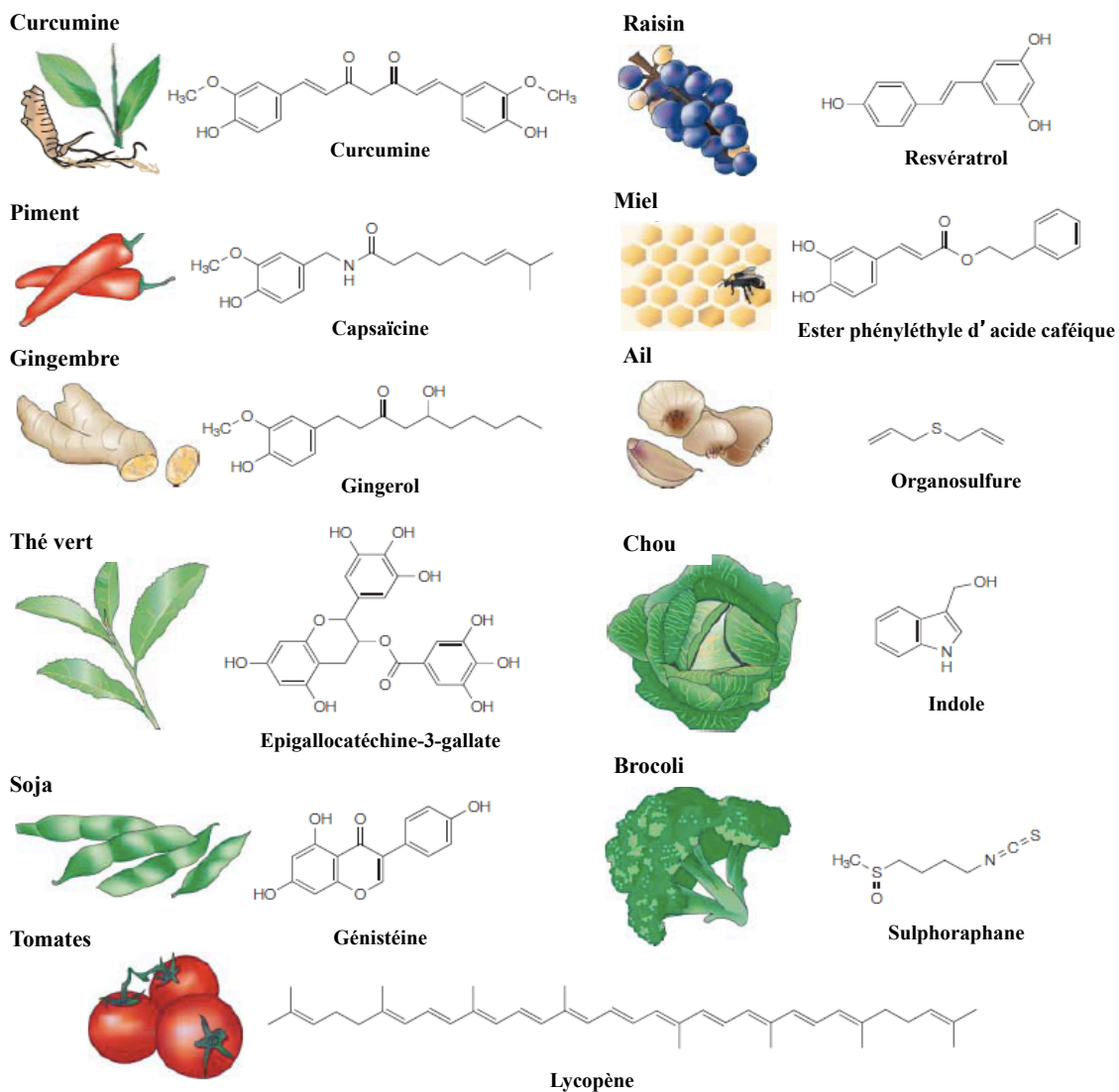


Figure 15 : Représentation schématique de molécules chimiopréventives d'origine naturelle et de leur source.

D'après (Surh, 2003).

Ces agents chimiopréventifs se retrouvent également dans les préparations alimentaires ayant comme ingrédients de base des fruits ou des légumes. Ainsi, il a été démontré que la molécule polyphénolique resvératrol, que l'on retrouve notamment dans le vin rouge, est un excellent agent chimiopréventif contre le cancer du foie (Bishayee et al., 2009). Le cacao et les produits chocolatés sont également une grande source de molécules bioactives. Ils sont connus pour leur richesse en catéchines et en procyanidines, des molécules de la famille des flavonoïdes ayant des effets inhibiteurs sur différents processus de cancérogenèse (Maskarinec, 2009).

Bien que la cuisson ait un effet délétère sur la quantité de certaines molécules chimiopréventives thermosensibles contenues dans les légumes, les fruits et les épices, leur cuisson en présence d'huile, notamment d'huile d'olive, permet d'augmenter la biodisponibilité de ces molécules suite à un processus de micellisation. Ainsi, l'absorption des caroténoïdes contenus dans les carottes crues n'est que de 29% alors que ce taux passe à 52% lorsque ces mêmes légumes ont été cuisinés avec de l'huile (Hornero-Méndez and Minguéz-Mosquera, 2007).

Une autre étude a également démontré que la biodisponibilité du lycopène est bien meilleure dans la sauce tomate que dans une quantité équivalente de tomates crues ingérées. Cette nette augmentation de la biodisponibilité serait liée au hachage et la cuisson qui lysent énormément de cellules et permettent ainsi une plus grande libération de lycopène. L'adjonction d'huile lors de la préparation de la sauce tomate augmente également la biodisponibilité de ce métabolite secondaire chimiopréventif (Gartner et al., 1997).

En conclusion, une consommation équilibrée et régulière d'aliments contenant des agents protecteurs (fruits, légumes, épices) tout en réduisant les aliments à haute teneur en matière grasse, les produits laitiers et la viande rouge diminue de façon significative le risque de développer un cancer (Kirsh et al., 2007; Sutcliffe et al., 2007) et améliore l'efficacité de nombreux traitements médicamenteux, chimiothérapeutiques et radiothérapeutiques (Singh and Agarwal, 2006).

Les végétaux à caractère « non alimentaire » constituent également une source attractive de molécules présentant un potentiel chimiopréventif intéressant. Le latex de l'arbre tropical *Calotropis procera* contient des cardénolides, substances hautement toxiques ayant la capacité d'influencer les pulsations cardiaques. Des modifications de la structure chimique de ces cardénolides permettent de diminuer leur toxicité et d'accroître leur potentiel anti-

cancéreux. C'est par exemple le cas de la molécule UNBS1450, un cardenolide modifié qui diminue la prolifération cellulaire tout en détruisant les cellules cancéreuses par un mécanisme de mort cellulaire par autophagie (Juncker et al., 2009).

Le margousier ou neem (*Azadirachta indica*), arbre originaire d'Inde utilisé dans la médecine traditionnelle indienne (médecine ayurvédique) depuis des millénaires, présente quant à lui aussi un potentiel insecticide, des propriétés anti-bactériennes, chimiopréventives et anti-inflammatoires. L'azadirachtine, un terpénoïde isolé à partir des graines de neem est capable d'inhiber l'activation du facteur de transcription NF- κ B (*Nuclear Factor Kappa B*) impliqué dans les processus inflammatoires et d'induire la mort des cellules cancéreuses K562 (Schumacher et al., 2010).

Les plantes carnivores sont utilisées depuis des centaines d'années en médecine traditionnelle partout autour du Monde. En Europe et en Amérique du Nord, des décoctions de *Pinguicula vulgaris* ou de *Drosera rotundifolia* étaient administrées aux personnes atteintes de toux dans des cas de coqueluche, bronchite et asthme en raison de leurs propriétés expectorantes et anti-tussives. Aujourd'hui encore, ce type de plante entre dans la préparation de sirops pour soigner la toux. Le suc frais sécrété par les feuilles de ce drosera est également utilisé en application locale sur les verrues (Ellingwood and Lloyd, 1919; Lloyd and Felter, 1898; Moerman, 1998; Remington and Wood, 1918). En Amérique du Nord, les racines et les feuilles de la *Sarracenia purpurea* étaient utilisées par les populations locales pour leurs propriétés diurétique et laxative ainsi que pour le traitement de la fièvre, de la toux et du diabète et des maladies infectieuses comme la variole, la rougeole et la scarlatine. Des décoctions de plantes étaient également prescrites aux femmes enceintes pour faciliter le travail, pour prévenir les maladies post-natales et l'absence de cycle menstruel (Muhammad et al., 2012). En Inde et dans le Sud Est de l'Asie, les urnes de la *Nepenthes khasiana* sont utilisées dans la médecine traditionnelle. Le liquide des jeunes urnes fermées ou les urnes réduites en poudre sont utilisés pour le traitement des douleurs stomacales, les problèmes de vision, les troubles urinaires, les maladie de la peau et les maladies infectieuses (malaria, lèpre, cholera) (Behera et al., 2007; Kayang et al., 2003; Kumar, 2002; Prasad and Jeeva, 2009; Shin et al., 2007).

Le monde marin regorge lui aussi de molécules à caractère chimiopréventif et à action anti-tumorale. Parmi ces substances marines d'origine animale ou végétale, nous pouvons citer, par exemple, l'hétéronémine, l'hemiasterline (éponges), la kahalalide F. (limace de mer), les

naphtopyrones (échinoderme) et les amphidinolides (algues) (Folmer et al., 2008b; Mayer and Gustafson, 2008; Molinski et al., 2009).

L'hétéronémine, un sesterterpénoïde isolé à partir d'une famille d'éponges marines (*Hyrtios sp.*) est capable d'inhiber l'activation de NF- κ B requis pour l'expression de gènes impliqués dans la prolifération, la survie cellulaire ainsi que dans les phénomènes de résistances aux traitements. Cette molécule polycyclique marine est également capable d'induire un arrêt du cycle cellulaire ainsi que la mort des cellules K562 par apoptose (Schumacher et al., 2009).

Isolées à partir d'une extraction méthanolique d'un échinoderme originaire des îles Fidji, *Comanthus parvicirrus*, deux naphtopyrones se sont révélées être d'excellents inhibiteurs de l'activation de la voie NF- κ B induite par le TNF- α par inhibition de l'activité enzymatique de la kinase IKK- β (Folmer et al., 2008a).

Les différents isomères de l'hémiasterline, un tripeptide isolé à partir d'éponges marines (*Hemiasterella sp.*, *Auletta sp.*, *Cymbastella sp.*), sont dotés de propriétés cytotoxiques vis-à-vis de plusieurs lignées tumorales humaines et murines de par leur capacité à remodeler le cytosquelette lors de la mitose et à bloquer ainsi les cellules en phase M du cycle cellulaire (Anderson et al., 1997).

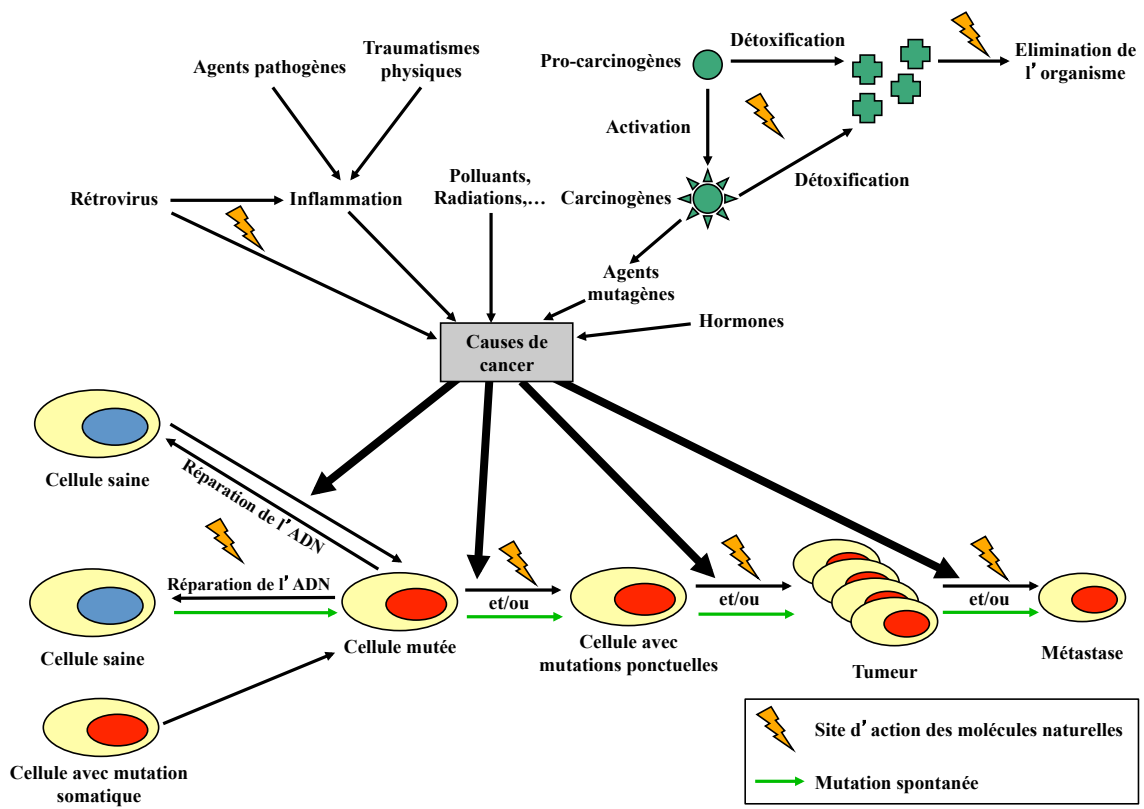


Figure 16 : Représentation schématique des sites d'action potentiels des agents chimiopréventifs au cours du développement du cancer.

1.3.2 La curcumine

La curcumine (diféruoylméthane) est un pigment jaune naturel issu de la racine du curcuma (*Curcuma longa*), une plante originaire d'Asie (Figure 17). Cet épice entre dans la composition du curry mais également dans la composition de nombreuses autres préparations alimentaires où elle est principalement utilisée comme colorant (E100). Cette molécule polyphénolique, utilisée depuis des siècles dans les médecines traditionnelles chinoise et ayurvédique pour soigner aussi bien des maladies respiratoires que des douleurs abdominales, est reconnue de nos jours pour ses nombreuses propriétés biologiques au niveau cardiovasculaire et hépatique mais également pour son potentiel anti-inflammatoire, anti-microbien, anti-viral, anti-oxydatif, anti-prolifératif et anti-cancéreux (Aggarwal et al., 2007b; Duvoix et al., 2005). Les travaux menés sur des animaux ou des patients ont mis en évidence l'absence de toxicité de la curcumine même à très forte dose (Goel et al., 2008).

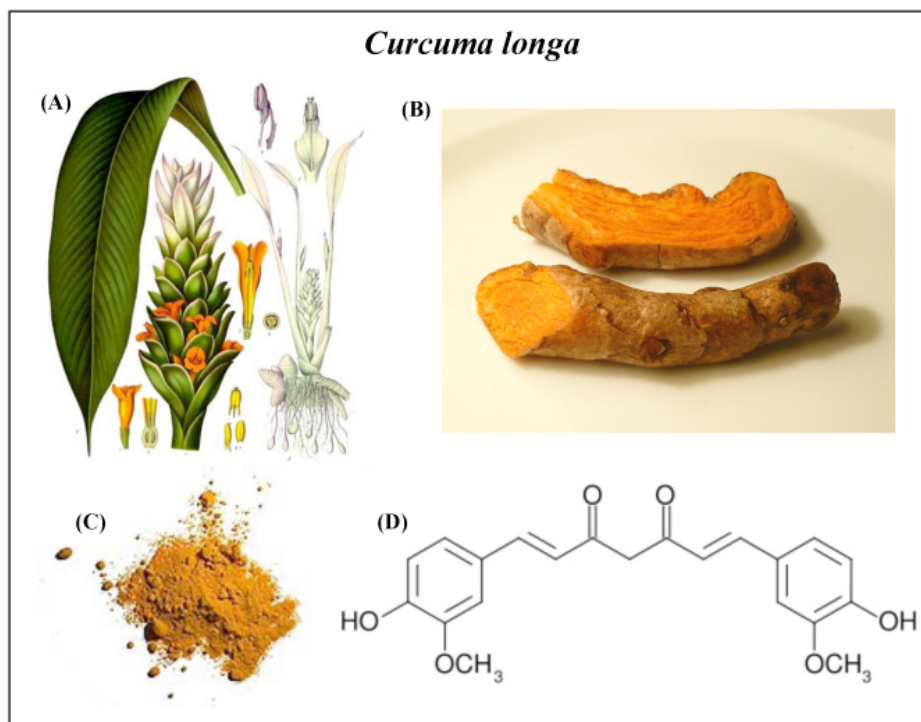


Figure 17 : La curcumine.

Le curcuma (*Curcuma longa*) est une plante originaire d'Inde (A). Son rhizome (B), une fois broyé donne une épice qui entre dans la préparation du curry (C). La curcumine qui en est extraite, est une molécule polyphénolique, le diféruoylméthane (D).

- **Les cibles moléculaires de la curcumine**

La curcumine interagit physiquement avec de nombreuses cibles intra-cellulaires, tant au niveau protéique que nucléaire, ce qui lui permet d'influencer de nombreuses voies biochimiques et cascades de signalisation (Goel et al., 2008; Teiten et al., 2013b; Teiten et al., 2010). Elle apparaît notamment comme étant un puissant inhibiteur de nombreux facteurs de transcription qui influencent l'expression de gènes impliqués dans l'inflammation, la survie et la prolifération cellulaire, ainsi que dans l'invasion des tissus et l'angiogenèse (Aggarwal et al., 2007b; Blasius et al., 2004; Blasius et al., 2006; Zhou et al., 2011).

Le potentiel anti-inflammatoire de la curcumine se traduit par sa capacité à inhiber l'activation du facteur de transcription NF- κ B impliqué dans les phénomènes de résistance à la chimiothérapie (Bharti et al., 2003; Reuter et al., 2009).

La curcumine est également connue pour sa capacité à inhiber la synthèse de protéases de la matrice susceptibles de permettre l'invasion tissulaire ou bien encore, pour sa capacité à activer la cascade des caspases tout en inhibant la synthèse des protéines anti-apoptotiques de type Bcl-2, conduisant ainsi à l'induction de la mort de la cellule tumorale par apoptose (Duvoix et al., 2003a; Duvoix et al., 2003b; Kunnumakkara et al., 2008; Reuter et al., 2008).

Cette molécule naturelle est également un puissant inhibiteur de l'expression du VEGF, molécule stimulant l'angiogenèse, un processus indispensable pour le développement des tumeurs solides (Arbiser et al., 1998).

De nombreux rapports suggèrent également que la curcumine est un bon inhibiteur de la voie Wntless (Wnt), impliquée dans la régulation d'éléments clés du développement de nombreux tissus et notamment dans les cancers de l'estomac, du colon, de l'intestin et de la prostate. Son mécanisme d'action est lié à une réduction de la quantité de protéines β -caténine et Tcf-4 au niveau nucléaire (Jaiswal et al., 2002; Park et al., 2005b) (Figure 18).

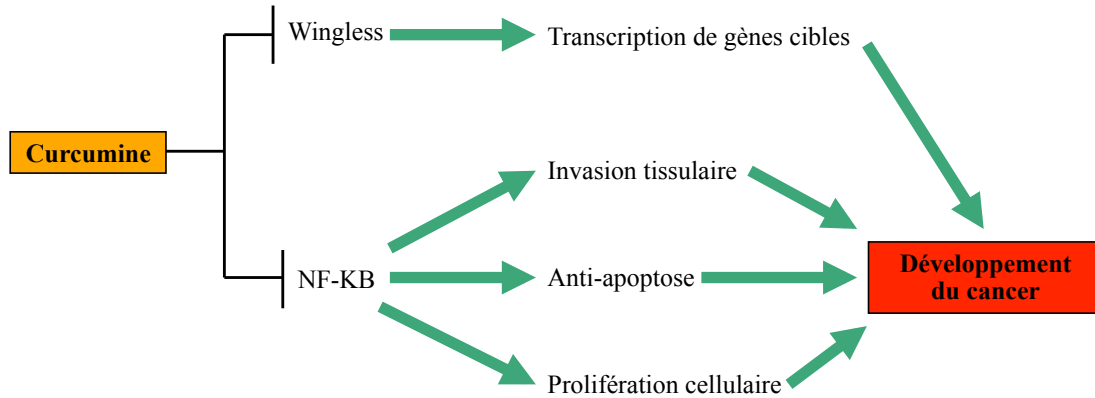


Figure 18 : Représentation schématique du mode d'action de la curcumine sur le cancer de la prostate.

La curcumine est capable d'inhiber les voies de signalisation Wnt et NF-κB impliquées dans le processus de carcinogénèse. D'après (Thangapazham et al., 2006) avec modifications.

Ainsi, de par ses différents potentiels d'action, cette molécule naturelle est reconnue comme étant un élément important dans la chimioprévention du cancer. Elle présente en effet un potentiel hautement pléiotrope qui lui permet d'interagir à tous les stades (initiation, progression et promotion) de la carcinogénèse (Aggarwal et al., 2007b; Thangapazham et al., 2006).

L'apoptose et la curcumine

L'apoptose, un des quatre mécanismes menant à la mort cellulaire, peut être déclenché par des signaux extrinsèques (niveau membranaire) et/ou intrinsèques (niveau mitochondrial) induits par la curcumine (de Bruin and Medema, 2008; Karmakar et al., 2006; Reuter et al., 2008).

Les signaux intrinsèques générés par la curcumine provoquent une augmentation des protéines pro-apoptotiques (Bim, Bax, Bak, Puma et Noxa) et une diminution des protéines anti-apoptotiques (XIAP, Bcl-2, Bcl-xL). Ceci induit la perméabilisation des pores mitochondriaux ainsi que la libération de cytochrome c qui conduisent à l'activation de l'apoptosome (caspase-9/apaf-1/cytochrome c) et au clivage des pro-caspases -3, -6 et -7, de PARP qui entraîne la mort de la cellule (Cao et al., 2007; Song et al., 2005; Tian et al., 2008).

La curcumine est également capable de provoquer l'apoptose de certaines cellules *via* la voie extrinsèque suite à l'activation des récepteurs membranaires Fas et TRAIL (*TNF – related*

apoptosis – inducing ligand) qui débouche sur l'assemblage du complexe DISC composé de Fas, FADD et des caspases -8 et -10 (Anto et al., 2002; Bush et al., 2001; Moragoda et al., 2001). La voie extrinsèque converge vers la voie intrinsèque suite au clivage de Bid, à la libération du cytochrome c et à l'activation de la cascade des caspases.

- **La curcumine et le cancer de la prostate**

Différents travaux réalisés sur des lignées cellulaires issues du cancer de la prostate ont mis en évidence le potentiel anti-prolifératif, anti-angiogénique et pro-apoptotique de la curcumine (Teiten et al., 2010).

En effet, la curcumine est capable de bloquer la prolifération cellulaire et d'induire l'apoptose des cellules prostatiques tumorales androgéno-dépendantes et indépendantes mais reste sans effet sur les cellules épithéliales prostatiques saines (Dorai et al., 2000; Mukhopadhyay et al., 2001; Shankar and Srivastava, 2007).

Des résultats similaires ont été obtenus *in vivo* concernant la croissance et la mort cellulaire par apoptose de cellules tumorales prostatiques implantées dans des souris athymiques (Dorai et al., 2001). La curcumine diminue en effet, l'expression de la cycline D1 mais augmente celle de p21 et p27, des inhibiteurs des CDK (*Cyclin – dependent Kinase*) impliquées dans la régulation du cycle cellulaire (Aggarwal et al., 2007a; Mukhopadhyay et al., 2002). Cette molécule naturelle induit également la diminution de l'expression des protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-xL (Aggarwal, 2008) et active celle des protéines pro – apoptotiques pro – caspase – 3 et pro – caspase – 8. Elle est également responsable de l'inhibition du facteur de transcription NF-κB, du clivage de la protéine PARP ainsi que de la condensation de la chromatine dans les deux types de lignées de tumeurs de prostate étudiées. Les cellules androgéno-dépendantes se révèlent cependant les plus sensibles au traitement (Mukhopadhyay et al., 2001).

Le potentiel anti – angiogénique de la curcumine, se traduit, quant à lui, par la modulation de l'expression du VEGF tant *in vitro* qu'*in vivo* (Arbiser et al., 1998; Gururaj et al., 2002).

D'autres voies de signalisation cellulaire sont également affectées par le traitement des cellules prostatiques tumorales par la curcumine. Ainsi, cette molécule naturelle joue un rôle d'antagoniste au niveau des récepteurs aux androgènes (Zhang et al., 2007). Elle réduit également de façon drastique l'expression de protéines normalement sur – exprimées dans le

cancer de la prostate telle la protéine HER2 (*Human Epidermal growth factor Receptor 2*), un récepteur aux facteurs de croissance (Hong et al., 1999; Jung et al., 2007b) ainsi que l'expression du facteur de croissance autocrine IL – 6 (Cho et al., 2007). Finalement, le potentiel anti-cancéreux de la curcumine a été lié à sa capacité de blocage des voies de signalisation médiées par mTOR (*the mammalian target of rapamycin*) (Beevers et al., 2006; Yu et al., 2008).

1.3.3 Les principaux métabolites secondaires de la dionée

- **La dionée, plante carnivore**

La dionée (*Dionaea muscipula* Solander ex Ellis), la seule espèce du genre *Dionaea*, est une plante carnivore qui pousse dans les terrains marécageux des états de la Caroline du Sud et du Nord des Etats – Unis (Figure 19). Afin de survivre dans ces milieux pauvres en nutriments azotés, elle a développé des pièges actifs lui permettant d'attraper de petites proies (insectes, araignées) qui lui serviront de source d'azote. La plante attire ses proies grâce à un nectar sécrété par des glandes localisées au niveau de la face interne du piège et par un motif attractif ultraviolet visible par les insectes. Quand la future proie touche un poil sensitif du piège, un mouvement d'ions est généré, ce qui provoque un gradient osmotique qui modifie la taille et la forme de certaines cellules spécialisées de la feuille – piège (Jürgens et al., 2009; Kurup et al., 2013; Poppinga et al., 2013; Volkov et al., 2008; Volkov et al., 2013; Volkov et al., 2012). Une fois le piège refermé sur la proie, d'autres glandes, elles aussi localisées au niveau de la partie interne du piège, sécrètent un liquide digestif acide contenant une batterie d'enzymes (protéases, nucléases, phosphatases et amylases) permettant la digestion de la proie. Les nutriments ainsi libérés sont alors réabsorbés par la plante grâce à ces mêmes glandes digestives (Krol et al., 2012; Scala et al., 1969).



Figure 19 : Plants de *Dionaea muscipula* Solander ex Ellis en culture.

- **Les métabolites secondaires de la dionée**

La *Dionaea muscipula* a fait, elle aussi, l'objet d'étude en recherche bio – médicale moderne. L'isolation et l'identification des différents métabolites secondaires (naphtoquinones, flavonoïdes et acides phénoliques) (Figure 20 et Figure 22) de cette plante ont montré que celle-ci synthétise différentes molécules thérapeutiques dont certains agents anti-cancéreux intéressants (Gaascht et al., 2013; Kovacik et al., 2012; Krolicka et al., 2006; Nagata and Ebizuka, 2002; Pakulski and Budzianowski, 1996a; Pakulski and Budzianowski, 1996b; Tokunaga et al., 2004).

Les molécules phénoliques

Le terme « phénol » ou « polyphénol » est défini chimiquement comme une molécule qui possède au moins un noyau aromatique sur lequel est présent un groupement hydroxyle. Si la molécule ne possède qu'un seul groupement c'est une molécule phénolique ; si plusieurs groupements sont présents, elle est dite « polyphénolique ». Dans les plantes, ces molécules ont des rôles de protection contre les rayons ultraviolets, contre les pathogènes tels les champignons, bactéries, insectes et nématodes. Ce type de molécule joue également des rôles comme messagers, comme pigments ou encore comme facteurs de croissance (Lattanzio et al., 2006).

L'acide ellagique

L'acide ellagique (Figure 20) est une molécule polyphénolique synthétisée par la *Dionaea* mais aussi par de nombreuses autres plantes comme le grenadier (*Punica granatum*) ainsi que par les arbres à petits fruits (myrtilles, mûriers, framboisiers) ou encore le noyer (*Juglans* sp.) (Aguilera-Carbo et al., 2008; Cardona et al., 2009; Huang et al., 2012; Pakulski and Budzianowski, 1996a; Pellati et al., 2013). Du fait de leur goût astringent, l'acide ellagique et autres tanins sont des molécules de défense contre les herbivores et autres parasites en ayant un effet négatif sur la digestibilité de la plante (Muller-Scharer et al., 2004; Wang et al., 2012b). Ce sont également des molécules dotées de propriétés anti-bactériennes (Hancock et al., 2010; Quave et al., 2012).

L'acide ellagique est un agent anti – cancéreux qui est capable de réduire l'activité et d'inhiber la voie PI3K/Akt (Umesalma and Sudhandiran, 2011; Wang et al., 2012a), Wnt (Anitha et al., 2013), et NF – κ B en interférant avec la liaison du facteur de transcription à l'ADN et de diminuer l'expression de gènes cibles contrôlés par cette voie (Edderkaoui et al., 2008).

Une diminution de l'expression de NF- κ B, COX-2, iNOS (*inducible Nitric Oxide Synthase*), du TNF- α et de IL-6 a pu être observée dans une étude *in-vivo* menée avec un modèle inductible de cancer de colon chez le rat (Umesalma and Sudhandiran, 2010, 2011).

Ce métabolite secondaire est également capable de diminuer l'activité tyrosine kinase du VEGFR-2 et de la topoisomérase II humaine par son ancrage au niveau du site de fixation de l'ATP comme l'ont montré les expériences *in – vitro* et les simulations d'amarrage moléculaire (*docking*) (Furlanetto et al., 2012; Wang et al., 2012a).

L'acide ellagique est capable de diminuer la prolifération des cellules endothéliales de veine du cordon ombilical (HUVEC) et de plusieurs types de cellules cancéreuses (prostate, sein, pancréas,...) de façon dose – dépendante (Edderkaoui et al., 2008; Malik et al., 2011; Vicinanza et al., 2013; Wang et al., 2012a). Ce potentiel anti – prolifératif a été démontré sur des xénogreffes de cancer du sein (Wang et al., 2012a).

C'est également un agent cytotoxique qui induit la mort des cellules cancéreuses par apoptose par relargage du cytochrome c, diminution de la protéine anti – apoptotique Bcl-2, augmentation de la protéine pro – apoptotique Bax, clivage de la poly(ADP-ribose) polymérase (PARP)-1, et activation des caspases 3, 6, 8 et 9 (Alfredsson et al., 2013; Edderkaoui et al., 2008; Hagiwara et al., 2010; Ho et al., 2013a; Malik et al., 2011). Il

empêche la mort des cellules saines mononuclées du sang périphérique d'une mort par apoptose induite par H₂O₂ (Jung et al., 2007a ; Khanduja et al., 2006).

L'acide gallique

L'acide gallique (Figure 20) a été isolé à partir des fleurs de l'oranger amer (*Citrus aurantium*), du marrube (*Marrubium persicum*), dans les fruits de l'haritaki (*Terminalia chebula*), l'acalypha (*Acalypha australis*), dans les pleurotes (*Pleurotus* sp.), les grains de raisins (*Vitis* sp.), la myrthe groseille (*Rhodomyrtus tomentosa*), le framboisier de Ceylan (*Rubus niveus*), dans le sorgho blanc ou encore dans les carottes (Afify Ael et al., 2012; Atri et al., 2013; Hamedeyazdan et al., 2012; Karimi et al., 2012; Lai et al., 2013; Pellati et al., 2013; Sultana et al., 2010; Weidner et al., 2013; Xiao et al., 2013). Ce tannin qui est susceptible d'être relargué par les parties aériennes de la plante est un nématicide qui possède également des propriétés anti – bactérienne et anti – fongique (Chanwitheesuk et al., 2007; Nguyen et al., 2013; Sultana et al., 2010).

Décrit dans de nombreux articles comme un agent anti-cancéreux affectant de nombreuses cibles (Verma et al., 2013), l'acide gallique induit la formation de dommages à l'ADN (Liu et al., 2013a), inhibe entre autre la voie NF – κ B (Ho et al., 2010; Liao et al., 2012). Ce composé diminue ainsi l'expression de protéines cibles comme par exemple de la molécule pro – inflammatoire cyclo-oxygénase (COX)-2 et des interleukines (Chandramohan Reddy et al., 2012; Choi et al., 2009).

Dans les cellules K562, elle inhibe la tyrosine chimère BCR – ABL (Chandramohan Reddy et al., 2012) et bloque l'activité de Akt/small GTPase dans les cellules humaines de carcinome gastrique AGS (Ho et al., 2013b). Dans des cellules d'ostéosarcomes humaines, U-2OS et MNNG/HOS, l'acide gallique augmente l'activité de p38 et ERK 1/2 et diminue celle de JNK (Liang et al., 2012).

L'acide gallique est capable de diminuer la prolifération de plusieurs lignées cancéreuses humaines (ostéosarcome, gliome) (Liang et al., 2012; Lu et al., 2010) et ce notamment en provoquant un arrêt du cycle cellulaire des cellules leucémique humaine K562 en G0/G1 en diminuant le niveau de cycline D et E (Chandramohan Reddy et al., 2012). Une étude menée avec des modèles murins TRAMP de cancer de la prostate nourris avec de la nourriture enrichie en acide gallique a montré les mêmes résultats. L'analyse par Western-Blot des tissus de ces mêmes souris a révélé une diminution des protéines cdc2, CDK2, CDK4, CDK6 et des cyclines B1 et E (Raina et al., 2008).

Ce métabolite secondaire provoque une diminution dose – dépendante de la croissance tumorale dans des modèles de souris nues BALB/c chez qui les expériences d’immunohistochimie ont révélé une diminution de l’expression de PCNA et CD31 (Liang et al., 2012).

L’acide gallique est inhibiteur de l’angiogenèse, de la migration et de l’invasion tissulaire (Liao et al., 2012; Liu et al., 2011; Lu et al., 2010). Un traitement par l’acide gallique a conduit à une diminution du développement des métastases chez des modèles de souris nues ont confirmé les résultats obtenus *in vitro* (Ho et al., 2013b).

L’acide gallique active également la mort par apoptose de cellules cancéreuses par la voie des caspases en augmentant le niveau de protéines pro – apoptotiques (cytochrome c cytoplasmique, Bax, Bak,...) et en diminuant le niveau de molécules anti – apoptotiques (Bcl-2) (Chandramohan Reddy et al., 2012; Liang et al., 2012). Ce métabolite secondaire semble également activer la mort par apoptose par un mécanisme indéterminé indépendant de la voie des caspases (Lo et al., 2010).

Des études de pharmacocinétique ont révélé que l’acide gallique est rapidement absorbé par l’organisme et métabolisé sous différentes formes après deux heures et est détecté à un niveau micro – molaire dans les plasma, une concentration plus basse que les concentrations utilisées pour plusieurs études. Une étude menée chez des buveurs de thé noir a révélé qu’après 3 heures, l’organisme élimine l’acide gallique sous neuf formes différentes à travers la voie urinaire (Hodgson et al., 2000; Shahrzad et al., 2001).

La vanilline

La vanilline (Figure 20) est probablement l’une des molécules odorantes les plus connues et l’une des plus utilisées par les industries alimentaires, chimiques et dans la parfumerie. Isolée en 1858 par Goble à partir de la vanille (*Vanilla planifolia*), la vanilline est également présente dans d’autres plantes (pommes de terre, *Ficus microcarpa*,...) (Ao et al., 2008; Cottle and Kolattukudy, 1982).

De nos jours, la vanilline est principalement synthétisée ou produite par les industries chimique et biotechnologique qui utilisent des champignons ou des bactéries (Kaur and Chakraborty, 2013; Lesage-Meessen et al., 2002; Walton et al., 2003; Walton et al., 2000). En plus d’être un métabolite secondaire odorant, la vanilline possède des propriétés anti – fongiques et anti – bactériennes (Boonchird and Flegel, 1982; Yemis et al., 2011).

Cette molécule aromatique influence de nombreuses voies et phénomènes qui influencent l'apparition et le développement du cancer. La vanilline est une molécule anti – oxydante (Tai et al., 2011) qui empêche la phosphorylation de Akt et reste sans effet sur la phosphorylation de Met et ERK mais inhibe la phosphatidylinositol kinase de type 3 (PI3K) (Lirdprapamongkol et al., 2010). Un pré – traitement par la vanilline des cellules cancéreuses provoque un blocage de l'activité transcriptionnelle de la voie NF- κ B, ce qui souligne une fois de plus le caractère anti – cancéreux de ce composé (Liang et al., 2009; Lirdprapamongkol et al., 2010).

Le potentiel anti – angiogénique de cette molécule a été démontré par des expériences menées sur des membranes chorio – allantoïques d'œufs de poulets (Lirdprapamongkol et al., 2009).

C'est aussi un agent anti – prolifératif qui empêche l'invasion tissulaire en inhibant la production de protéases. Dans des cellules humaines de cancer colorectal HT-29, une faible concentration de vanilline induit un arrêt du cycle cellulaire à la transition G0/G1 des cellules, alors qu'une concentration plus élevée bloque les cellules en G2/M (Ho et al., 2009).

A concentration non – toxique, la vanilline inhibe la croissance des cellules d'adénocarcinome mammaire de souris, de carcinome du foie humain et diminue également l'activité et l'expression de la MMP-9 et par conséquent la migration et l'invasion tissulaire (Cheng et al., 2007; Liang et al., 2009; Lirdprapamongkol et al., 2005). Ces résultats ont été confirmés par des expériences menées *in vivo* avec ces mêmes cellules injectées à des souris BALB/c qui ont montré une diminution du nombre de métastases au niveau des poumons alors que des expériences similaires conduites avec l'acide vanillique ne se sont pas montrées concluantes (Lirdprapamongkol et al., 2005).

La vanilline est un agent cytotoxique qui induit la mort par apoptose des cellules HeLa par voie extrinsèque induite par TRAIL (Lirdprapamongkol et al., 2010), des cellules HT-29 et des cellules normales NIH/3T3 avec respectivement une concentration de 400 μ g/mL pour les cellules cancéreuses et de 1000 μ g/mL pour les cellules saines (Ho et al., 2009).

Des études pharmacocinétiques sur des modèles de rats ont démontré que la vanilline a relativement une bonne biodisponibilité. D'autres études ont révélé que 24 heures après ingestion, la vanilline est métabolisée principalement sous forme de conjugués glucuronide et sulfate et qu'après 48 heures, la totalité de la dose de vanilline est retrouvée sous différentes formes dont la vanilline elle même (Beaudry et al., 2010; Strand and Scheline, 1975).

L'acide protocatéchuique

Décrite dans de nombreux articles comme agent thérapeutique contre diverses maladies, l'acide protocatéchuique (Figure 20) a été identifié dans des plantes telles que l'oseille de Guinée (*Hibiscus sabdariffa*), les rhizomes des plantes du genre *Homalomena*, chez *Spatholobus suberectus* et *Alpinia oxyphylla* (Chen et al., 2011a; Lin et al., 2011b; Qing et al., 2012; Tanaka et al., 2011; Tang et al., 2012).

Aucune propriété génotoxique de l'acide protocatéchuique n'a pu être détectée lorsqu'il a été testé sur des drosophiles. Cependant, il a montré certaines activités anti – génotoxiques induites par le peroxyde d'hydrogène et une activité cytotoxique vis – à – vis de cellules cancéreuses (Anter et al., 2011).

C'est une molécule qui a pour effet d'inhiber la voie NF- κ B (Lin et al., 2011a) mais d'activer par phosphorylation les voies p38 et c-Jun N-terminal kinase (JNK) (Yip et al., 2006), cette dernière induisant notamment l'expression d'enzymes anti – oxydantes (GSH reductase et glutathion peroxydase) (Vari et al., 2011).

Il est aussi capable d'inhiber la migration et la prolifération des cellules de lignées cancéreuses de sein, poumon, prostate (Yin et al., 2009), ainsi que des cellules humaines d'adénocarcinome de l'estomac à des doses non – toxiques en agissant sur l'expression et l'activité de la MMP-2 au travers de la voie Ras/Akt. Ces propriétés anti – proliférative et anti – métastatique ont été confirmées par des études menées *in vivo* avec des souris modèles pour le mélanome (Lin et al., 2011a).

Cet acide phénolique induit la mort par apoptose des cellules leucémiques, de cancer de sein, poumon, foie, prostate,...(Anter et al., 2011; Yin et al., 2009) bien qu'il ait été également montré qu'un pré-traitement par la *N* – acétyl – L – cystéine (NAC) bloque le potentiel apoptotique de l'acide protocatéchuique dans des cellules de carcinome hépatique HepG2 (Yip et al., 2006).

L'acide caféique

Présent dans les grains de raisins (*Vitis* sp.), de grenade (*Punica granatum*), de café, dans le miel, la paquerette (*Bellis perennis*) et l'hysope (*Hyssopus officinalis*), l'acide caféique (Figure 20) est un métabolite secondaire qui possède des propriétés anti-bactérienne et anti-fongique (Aziz et al., 1998; Sato et al., 2011; Scognamiglio et al., 2012; Weidner et al., 2013).

L'acide caféique est une molécule anti – inflammatoire par sa capacité à diminuer l'activité transcriptionnelle de la voie NF- κ B, STAT3 et de diminuer l'expression de molécules impliquées dans les processus de cancérogenèse comme l'inflammation, l'angiogenèse ou bien encore la survie cellulaire (Jung et al., 2007a; Moon et al., 2009; Nardini et al., 2001).

Cette molécule est connue pour agir comme un inhibiteur de la méthylation de l'ADN en inhibant la méthyltransférase 1 (DNMT1) (Lee and Zhu, 2006). Il génère la formation d'ERO, la peroxydation des lipides et la diminution des enzymes anti-oxydantes superoxyde dismutase (SOD), catalase (CAT) et diminue le niveau de la glutathion peroxydase (GPx) et du glutathion (GSH) lui même (Rajendra Prasad et al., 2011).

Parmi plusieurs petits acides phénoliques testés pour leur effet anti-prolifératif sur une lignée de cancer humain du sein, l'acide caféique s'est révélé être le plus prometteur. Des analyses supplémentaires ont montré que tous les composés induisaient la mort par apoptose *via* la voie Fas/FasL (Kampa et al., 2004). Ce métabolite secondaire diminue la prolifération d'une manière temps – dépendante et il induit un arrêt du cycle cellulaire (Jaganathan, 2012) ainsi qu'à la mort des cellules cancéreuses par apoptose (Rajendra Prasad et al., 2011) et empêche la mort par apoptose des cellules saines mononuclées du sang périphérique (Jung et al., 2007a; Khanduja et al., 2006).

L'acide caféique est également un composé capable d'inhiber la migration des cellules cancéreuses, l'angiogenèse et la formation de métastases (Chung et al., 2004; Jung et al., 2007a; Lansky et al., 2005; Yang et al., 2013).

Cependant, il est intéressant de souligner que l'acide chlorogénique, un analogue de l'acide caféique présent chez la Dionée, peut être hydrolysé en acide caféique et être très bien absorbé par les cellules intestinales. Des études *in vitro* et *in vivo* ont montré que dans des cellules Caco-2, l'acide caféique possède un potentiel anti – oxydant plus puissant que celui de l'acide chlorogénique. Cette différence peut être expliquée par le fait que la cellule incorpore plus d'acide caféique que d'acide chlorogénique. L'acide caféique est connu comme étant métabolisé par les bactéries intestinales. Cependant des études ont montré que l'acide caféique peut être détecté ainsi que d'autres métabolites dérivés dans le sang de rats 6 heures après ingestion. Une autre étude a montré que 95% de l'acide caféique est absorbé et que 11% de l'acide caféique ingéré est excrété par les urines (Azuma et al., 2000; Gonthier et al., 2003; Olthof et al., 2001; Peppercorn and Goldman, 1971; Sato et al., 2011).

L'acide chlorogénique

L'acide chlorogénique (Figure 20) a été isolé dans de nombreux fruits et plantes comme la mirabelle et la prune (*Prunus domestica*), le chèvrefeuille du Japon (*Lonicera japonica*), la pomme, chez *Eucommia ulmodies* ainsi que les grains de café (Bouayed et al., 2007; Hulme, 1953; Li et al., 2005; Moores et al., 1948; Stacewicz-Sapuntzakis et al., 2001; Zhang et al., 2008). L'acide chlorogénique est un métabolite secondaire impliqué dans la défense contre les parasites, les herbivores, les champignons ou encore les virus (Friend et al., 1973; Hoover et al., 1998; Ikonen et al., 2001; Leiss et al., 2009).

L'acide chlorogénique est un agent pro – oxydant interagissant avec le glutathion (Panzella et al., 2003) qui induit des dommages à l'ADN dans les fibroblastes sains humains de poumon MRC5 et dans les cellules cancéreuses de poumon A549. Cet acide augmente le niveau de la topoisomérase I et II dans les deux lignées bien que l'effet soit plus marqué dans les cellules cancéreuses (Burgos-Moron et al., 2012). D'un autre côté, ce composé peut également agir comme agent anti – oxydant en diminuant le risque de dommage à l'ADN telles les coupures de brins par l'augmentation du niveau de GST et du glutathion (Bouayed et al., 2007; Feng et al., 2005; Granado-Serrano et al., 2007; Rathod et al., 2013).

C'est un inhibiteur reconnu des voies de signalisation cellulaire NF- κ B, Wnt et MAPK (Feng et al., 2005; Xu et al., 2013a) ainsi que de la kinase chimérique BCR – ABL (Bandyopadhyay et al., 2004; Rakshit et al., 2010).

Cette molécule est reconnue comme un agent cancéreux également doté de propriétés anti – proliférative et anti – invasive (Liu et al., 2013b; Yagasaki et al., 2000). Des cellules Caco-2 humaines d'adénocarcinome de colon traitées par de l'acide chlorogénique voient leur prolifération réduite. Des observations au microscope ont révélé que ces cellules arboraient une morphologie anormale en comparaison aux cellules non-traitées (Thurow and Lee, 2012). L'acide chlorogénique réduit également l'invasion tissulaire en inhibant l'activité des MMPs (Jin et al., 2005; Lee et al., 2012b).

Bien qu'il puisse parfois ne pas avoir d'effet cytotoxique sur la lignée HepG2, ce métabolite secondaire induit la mort par apoptose des cellules cancéreuses leucémiques, par conversion des pro – caspases en caspases actives (Bandyopadhyay et al., 2004; Liu et al., 2013b; Rakshit et al., 2010; Ramos et al., 2005; YANG et al., 2012).

L'acide chlorogénique a une très faible biodisponibilité mais est toujours détecté jusqu'au niveau du petit intestin. Il est détecté dans le plasma des rats sous forme de trace avec d'autres

métabolites 6 heures après absorption. Une autre étude a donné les mêmes résultats, où l'acide chlorogénique a un taux d'absorption de 33% et est détecté seulement sous forme de trace dans les urines. Les études ont montré que l'acide chlorogénique comparé à son analogue, l'acide caféique, est bien moins absorbé par l'organisme. Le métabolisme de l'acide chlorogénique produit de l'acide caféique et de l'acide férulique, deux autres métabolites secondaire également présent chez la *Dionaea muscipula* (Azuma et al., 2000; Gonthier et al., 2003; Olthof et al., 2001).

L'acide férulique

L'acide férulique (Figure 22) a été identifié dans les graines de raisins (*Vitis* sp.), le riz brun, mais également la farine de blé, l'ananas, ou encore dans le créosotier (*Larrea divaricata*). L'acide férulique est un agent allélopathique (substance qui favorise ou défavorise la croissance des organismes environnants) qui agit comme un inhibiteur de la germination des graines (Hudson et al., 2000; Li et al., 2010; Lv et al., 2012; Palacio et al., 2012; Rasmussen and Einhellig, 1977; Shahidi and Perera, 2013; Smith and Harris, 2001; Weidner et al., 2013; Zhao and Moghadasian, 2008).

Ce métabolite est un agent possédant des propriétés anti – oxydantes (Itagaki et al., 2009). Un pré – traitement par l'acide férulique protège contre les dommages à l'ADN induits par des radiations γ dans les hépatocytes de culture primaire de rat (Srinivasan et al., 2006) ainsi que dans les leucocytes de sang périphériques et de moelle osseuse chez les souris. Il augmente la survie des souris jusqu'à une dose de 6 Gy de radiations γ (Graf, 1992; Maurya and Devasagayam, 2013). L'acide férulique augmente également de façon significative le niveau d'enzymes anti – oxydantes, de glutathion dans les hépatocytes de rats (Srinivasan et al., 2006). Il peut également agir comme agent pro – oxydant en augmentant le niveau d'ERO (Lee, 2005).

Ce métabolite secondaire réduit la prolifération cellulaire (Kampa et al., 2004) par blocage du cycle cellulaire (Janicke et al., 2011) et réduit l'expression de métallo – protéases impliquées dans l'invasion tissulaire dans les cas de cancer (Staniforth et al., 2012).

L'acide férulique induit la mort de cellules cancéreuses (Kampa et al., 2004; Lee, 2005) mais un traitement des cellules saines mononuclées du sang périphérique par l'acide férulique les protège d'une mort par apoptose induite par H_2O_2 (Jung et al., 2007a; Khanduja et al., 2006).

Des études *in vivo* menées avec un modèle de rat inductible pour le cancer mammaire nourri avec des compléments d'acide férulique empêche le développement du cancer dans 80% des cas même si le mécanisme exact reste inexpliqué (Baskaran et al., 2010). D'autres études menées avec un modèle de rat inductible pour un cancer de la peau ont montré qu'une administration orale d'acide férulique empêche totalement le développement du cancer alors qu'une application sur la peau reste sans effet (Alias et al., 2009).

L'acide férulique est absorbé par l'intestin et est détecté dans le sang de rats et de patients humains. Des études complémentaires ont montré que l'acide férulique peut être absorbé très rapidement tout le long du tractus digestif et être détecté dans le plasma après 10 minutes et que moins de 1% de l'acide férulique ingéré est retrouvé dans les feces de rats. Il peut être métabolisé dans le foie sous les formes conjuguées glucuronides, sulfates et sulfo-glucuronides par différents enzymes qui réduisent également sa biodisponibilité (Li et al., 2012a; Zhao and Moghadasian, 2008).

L'acide salicylique

Déjà utilisé sans qu'ils le connaissent par les Grecs et les Egyptiens pour traiter et calmer les douleurs, ce composé a été isolé pour la première fois par Buchner en 1898 à partir de l'écorce du saule. Son nom lui vient du mot latin « *Salix* » qui signifie saule. L'acide salicylique (Figure 20) a été identifié comme le principal métabolite de l'acide acétylsalicylique, le principe actif de l'aspirine. L'acide salicylique est une phytohormone qui joue un rôle important dans le système immunitaire de la plante, dans la thermogénèse (production de chaleur), formation des nodules radiculaires mais aussi dans des processus essentiels comme le métabolisme, la floraison et la germination. Du fait de son rôle important, l'acide salicylique est trouvé dans la plupart des plantes (An and Mou, 2011; Durner et al., 1997; Fuster and Sweeny, 2011; Hayat et al., 2007; Raskin, 1992; Vlot et al., 2009).

L'acide salicylique a été décrit comme un inhibiteur d'histone acétyl – transférase et comme agent anti – inflammatoire. Comme son dérivé, l'acide acétyl salicylique, ce composé phénolique inhibe la voie NF- κ B et diminue l'expression de gènes cibles impliqués dans la prolifération (Cycline D1, COX-2), la survie (Bcl-2, Bcl-xL) ou encore l'invasion (MMP-9) (Stevenson et al., 1999; Sung et al., 2008; Vlot et al., 2009). En condition normoxique, il diminue la phosphorylation de ERK 1/2 mais reste sans effet en condition hypoxique (Zitta et al., 2012).

Des expériences *in vitro* on montré que l'acide salicylique inhibe la 6 – phosphofructo – 1 – kinase, une enzyme clé de la glycolyse. Il provoque la dissociation de la structure quaternaire de l'enzyme en dimères inactifs. Testé sur des cellules MCF-7, l'acide salicylique inhibe la 6 – phosphofructo – 1 – kinase, provoquant ainsi une diminution de la consommation du glucose cellulaire et une diminution de la viabilité cellulaire (Spitz et al., 2009).

Cet acide phénolique réduit la prolifération des cellules cancéreuses (Viljoen et al., 1995). Dans le cas de cellules Caco-2, l'acide salicylique n'a pas d'effet sur la prolifération mais il augmente l'activité des caspases 3 et 7 en condition normoxique. A l'inverse, en condition hypoxique, il diminue la prolifération et augmente l'activité des caspases 3 et 7 (Zitta et al., 2012).

Plusieurs études cliniques qui ont analysé l'effet de l'acide salicylique sur des patients atteints de cancer colorectaux ont démontré qu'une dose de 75mg d'aspirine par jour durant plusieurs années en diminue l'incidence et la mortalité (Rothwell et al., 2010).

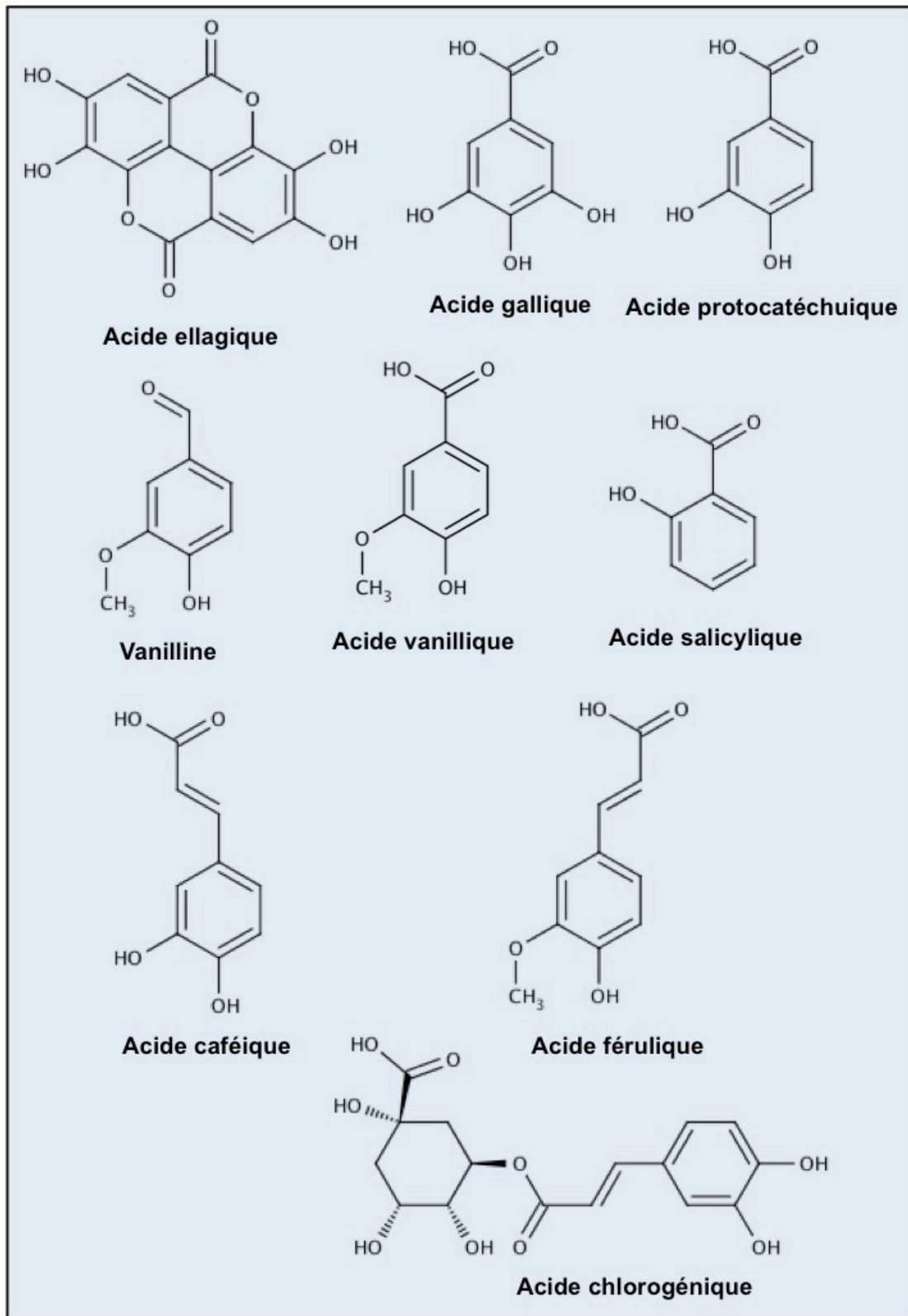


Figure 20 : Structures chimiques des métabolites secondaires d'origine phénolique de la *Dionaea muscipula*.

Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des métabolites secondaires de la famille des polyphénols dont la structure se compose d'au moins 15 atomes de carbone organisés en une structure de base appelée phényl-benzopyrone de forme (C6-C3-C6). Dans ce type de structure, un noyau aromatique à 6 carbones est lié par 3 atomes de carbone à une autre structure aromatique à 6 carbones. Ce groupe de molécules est divisé en plusieurs sous-groupes selon leurs formulations chimiques. On y retrouve ainsi les flavonols (quercétine, myricétine et le kaempferol), les flavones, les flavanones, les anthocyanidines, les flavanols, les dihydrochalcones, les dihydroflavonols et les chalcones. Du fait de leur variabilité structurale, leurs rôles dans les plantes sont des plus divers. Certains agissent comme agents protecteurs contre les rayons ultraviolets, d'autres contre les pathogènes et les parasites comme insecticides, fongicides et vermicides ou encore contre les herbivores. D'autres enfin agissent comme molécules de signalisation ou aident les plantes à survivre dans des conditions de stress (période de sécheresse, environnement pauvres en nutriments) (Treutter, 2006).

La quercétine

La quercétine (Figure 21) est une molécule dotée de propriétés anti-bactériennes présente dans les fleurs de l'oranger amer (*Citrus aurantium*), les épilobes (*Epilebium* sp.), la *Nepenthes gracilis*, le faux mimosa (*Leucaena leucocephala*), dans la *Sarracenia purpurea*, le caprier (*Capparis spinosa*) et les piments (*Capsicum* sp.) (Aung et al., 2002; Karimi et al., 2012; Krolicka et al., 2008; Lowry et al., 1984; Meckelmann et al., 2013; Muhammad et al., 2013; Stolarczyk et al., 2013; Tlili et al., 2011). Dans la plante, la quercétine agit comme une molécule de défense et comme agent stimulant la croissance. C'est un répulsif vis-à-vis des nématodes, un agent anti-microbien, un inducteur de la formation des nodosités racinaires, un agent allélopathique et un attracteur d'hyphes pour les relations de symbiose avec certains champignons (Weston and Mathesius, 2013).

Concernant ses propriétés biologiques comme agent anti-cancéreux, la quercétine a été l'objet de nombreuses études (Murakami et al., 2008). Ce flavonoïde a la capacité d'interagir directement avec l'ADN et de générer des ERO (Bishayee et al., 2013).

Des expériences *in vitro* ont montré qu'une concentration de 2 μ M de quercétine est suffisante pour diminuer de 80% l'activité de 16 kinases dont la plupart sont impliquées dans le contrôle de processus mitotiques (Boly et al., 2011).

La quercétine inhibe l'activité transcriptionnelle de la voie Wingless (Wnt) en diminuant la concentration nucléaire de β -caténine dans les cellules de cancer du colon SW480 et diminue l'expression de gènes cibles régulés par cette voie (Park et al., 2005a; Shan et al., 2009). Elle agit également comme un inhibiteur des voies MAPK ERK et p38 qui contrôlent l'expression de molécules pro – inflammatoires et nécessaires à la formation de métastases (Cho et al., 2003; Ying et al., 2009).

Elle inhibe la voie NF- κ B en modulant l'expression des sous-unités p-50 et p-65, de IKK β , phospho-I κ B et de l'ubiquitine (Vidya Priyadarsini et al., 2010). Utilisée en combinaison avec le 5 – fluorouracil (5 – FU) sur des cellules de cancer de l'œsophage, la quercétine augmente la toxicité et le pourcentage de cellules en apoptose comparé à la quercétine ou au 5-FU seul. Cet effet combiné est expliqué selon les auteurs par la diminution de l'expression de phospho – I κ B α provoquée par la quercétine (Chuang-Xin et al., 2012).

La quercétine agit comme activateur des voies ERK, JNK et Akt, qui sont impliquées dans l'expression de protéines jouant un rôle dans la mort cellulaire par apoptose (Ishikawa and Kitamura, 2000; Lin et al., 2008a; Nguyen et al., 2004).

Ce flavonol est un agent anti – prolifératif qui diminue l'expression de facteurs de croissance (Labbe et al., 2009; Senthilkumar et al., 2010) et est capable d'induire un arrêt du cycle cellulaire à la transition G2/M notamment par une diminution du niveau de cycline B1 et CDK1 dans les cellules de cancer de colon et de sein (Park et al., 2005a; Shan et al., 2009) ainsi que dans des cellules HeLa (Bishayee et al., 2013; Jeong et al., 2009b; Vidya Priyadarsini et al., 2010).

En tant qu'agent anti – métastatique, la quercétine agit également de façon négative sur l'expression des MMPs (Vijayababu et al., 2006) ainsi que sur des facteurs impliqués dans le processus d'angiogenèse (Igura et al., 2001; Xiao et al., 2011).

Du fait de ses effets sur de nombreuses voies impliquées dans le processus de cancérogenèse, la quercétine est capable d'induire la mort des cellules tumorales. Elle déclenche la mort par apoptose après activation de la caspase 3 et de la caspase 9 (Granado-Serrano et al., 2006), par la voie intrinsèque *via* un mécanisme dépendant de p-53 (Vidya Priyadarsini et al., 2010) ou encore après dépolarisation de la membrane mitochondriale, et le relargage de cytochrome c au niveau du cytoplasme (Bishayee et al., 2013; Senthilkumar et al., 2010). Ces observations ont été validées par des Western – Blots, qui ont montré une augmentation des protéines pro – apoptotiques de la famille Bcl-2 (Bax, Bak and Bad), de Apaf-1, du cytochrome c cytosolique et une diminution des protéines anti – apoptotiques de la famille Bcl-2 (Bcl-2, Mcl-1) (Bishayee et al., 2013 ; Nguyen et al., 2004; Senthilkumar et al., 2010;

Vidya Priyadarsini et al., 2010). Spagnuolo et ses collaborateurs ont par ailleurs démontré que la mort par apoptose dans les cellules U937 provoquée par la diminution de Mcl-1 est directement liée à la stabilité de son ARNm et à la dégradation de la forme protéique suite à un traitement par la quercétine (Spagnuolo et al., 2011).

Une large étude menée sur une population d'origine suédoise a montré que la prise de quercétine diminue les risques de développer un adénocarcinome gastrique. Cet effet protecteur est surtout renforcé chez les femmes qui fument (Ekstrom et al., 2011). La quercétine a également été l'objet de plusieurs essais cliniques sur des patients atteints de cancer. Son effet a été analysé sur 130 patients cancéreux en comparaison avec de la rutine (quercétole 3-O-rutinoside) et du Sulindac (NCT00003365). Des essais de phase clinique I ont montré que la quercétine inhibe la phosphorylation de certaines protéines, elle diminue le niveau de l'antigène de cancer 125 (CA-125) de patientes atteintes d'un cancer des ovaires réfractaires au cisplatine et elle diminue le niveau de l'alpha foetoprotéine de patientes atteintes de carcinome hépatocellulaire (Ferry et al., 1996). La quercétine est également testée cliniquement en compagnie de la genistéine pour évaluer leurs effets sur le niveau d'antigène spécifique de prostate chez de patients atteint de ce type de cancer (NCT01538316). Des études pharmacocinétiques menées sur des humains et des rats ont montré que la quercétine a une très faible biodisponibilité. Chez les humains, après une ingestion d'environ 87 mg de quercétine, la concentration retrouvée au niveau du plasma n'est que de 344 nanoM après 3 heures. Les résultats ont également montré que dans l'organisme, la quercétine n'est pas présente sous sa forme aglycone libre mais est métabolisée pour être retrouvée sous formes de dérivés conjugués à l'acide glucuronique ou au sulfate. Cependant, après des analyses supplémentaires, il s'est avéré que ces dérivés possèdent toujours une activité antioxydante bien que atténuée par rapport à la quercétine aglycone (Barve et al., 2009; Manach et al., 1998; Manach et al., 1995). Sesink *et al.*, ont également montré que les protéines ABCg2 et Mrp2 (Multidrug resistance-associated protein 2), deux transporteurs ABC (ATP-binding cassette) impliqués dans la résistance du cancer du sein sont aptes à pomper hors de la cellule la quercétine sous sa forme aglycone et sous ses formes conjuguées, ce qui pourrait dès lors expliquer la faible biodisponibilité de ce métabolite secondaire (Sesink et al., 2005).

La myricétine

La myricétine (Figure 21) est un analogue de la quercétine présent dans de nombreuses plantes comme par exemple *Limonium axillare*, *Jatropha curcas*, le cyprès japonais (*Chamaecyparis obtusa*), *Leucaena leucocephala* et dans de nombreuses baies (Bashir et al., 1994; Hakkinen et al., 1999; Lowry et al., 1984; Oskoueian et al., 2011; Tian et al., 2012b). Dans les plantes, la myricétine agit comme molécule de défense. Elle est relarguée par les racines et agit comme répulsif vis-à-vis des nématodes. C'est également un agent qui induit la formation de nodosités radiculaires (Weston and Mathesius, 2013).

Ce flavonol possède des propriétés anti – bactériennes (Krolicka et al., 2008) et anti – cancéreuses qui la rendent capable d'inhiber la mutagenèse induite par les carcinogènes comme par exemple le benzo(a)pyrene (Huang et al., 1983) et elle protège également des dommages à l'ADN (Duthie et al., 1997). Une inhibition de l'ADN polymérase mammalienne et de la topoisomérase II humaine par la myricétine a également été démontré par des expériences *in vitro* (Shiomi et al., 2013).

C'est une molécule qui protège les cellules saines du stress oxydant en diminuant leur niveau en ERO (Kang et al., 2010b; Priyadarsini and Nagini, 2012) mais qui agit comme molécule pro – oxydante en induisant de la formation des ERO dans les cellules cancéreuses (Bishayee et al., 2013; Lee et al., 2010b).

Comme ses analogues la quercétine et le kaempférol, elle peut activer ou inactiver les voies de signalisations du type MAPK. Des recherches récentes ont également montré qu'une dose non – létale de myricétine diminue l'activité de la kinase PI3K dans les cellules pancréatiques cancéreuses MIA PaCa-2, Panc-1 et S2-013 (Phillips et al., 2011). Elle inhibe la phosphorylation de Akt mais augmente la phosphorylation de p38 (Sun et al., 2012) ou de ERK (Nguyen et al., 2004; Shih et al., 2009) mais peut également inhiber ces dernières (Granado-Serrano et al., 2006; Min et al., 2007). Elle agit aussi comme un inhibiteur la voie Wnt et la voie NF- κ B (Min et al., 2007; Senthilkumar et al., 2011).

Des études complémentaires ont révélé que la myricétine inhibe également la prolifération des cellules cancéreuses humaines par arrêt du cycle cellulaire à la transition G2/M (Shiomi et al., 2013) par diminution de la cycline B1 et de Cdc2 (Ma et al., 2004; Sun et al., 2012) mais également en inhibant la synthèse de facteurs de croissance comme le EGF (Epidermal growth factor) ou encore le VEGF (Huynh et al., 2003; Pratheeshkumar et al., 2012).

Cette molécule flavonoïque diminue également la synthèse et l'expression des protéases impliqués dans la formation des métastases (Ko et al., 2005; Sun et al., 2012; Vijayababu et

al., 2006) ainsi que le processus d'angiogenèse (Pratheeshkumar et al., 2012; Xiao et al., 2011).

Une régression de la croissance des tumeurs après traitement par la myricétine et une diminution du nombre de métastases ont par ailleurs été observées sur des modèles de souris (Phillips et al., 2011; Sun et al., 2012).

Ce métabolite secondaire induit l'apoptose des cellules HCT-116 (Shiomi et al., 2013), T-24 (Sun et al., 2012), des cellules pancréatiques cancéreuses MIA PaCa-2, Panc-1 et S2-013 (Phillips et al., 2011), des cellules pancréatiques cancéreuses *via* l'activation de la caspase 3 et de la caspase 9 (Zwolak et al., 2008) et des cellules leucémiques humaines HL-60 au travers d'une voie de mort cellulaire indépendante des ERO (Morales and Haza, 2012).

Dans des modèles de rats, la myricétine est capable d'inhiber l'activité du cytochrome P450 dans le foie et dans l'intestin et de ce fait d'augmenter la biodisponibilité du tamoxifène, un médicament utilisé pour traiter le cancer du sein. Des résultats similaires ont également été obtenus avec la doxorubicine (Choi et al., 2011; Li et al., 2011).

Le kaempférol

Le kaempférol (Figure 21) est un flavonol identifié dans de nombreuses plantes telles que la *Nepenthes gracilis*, les piments (*Capsicum* sp.), *Gynura medica*, la fougère (*Pteridium aquilinum*) et le *Ginkgo biloba* (Aung et al., 2002; Calderon-Montano et al., 2011; Chen et al., 2013; Kang et al., 2010a; Meckelmann et al., 2013; Tan et al., 2013). Impliqué dans la défense de la plante, le kaempférol a été décrit comme un répulsif vis-à-vis des nématodes, un inhibiteur du développement de leurs œufs et comme agent allélopathique (Weston and Mathesius, 2013).

Les propriétés anti-cancéreuses du kaempférol ont été l'objet de nombreux articles scientifiques (Calderon-Montano et al., 2011; Chen and Chen, 2013). C'est une molécule capable de générer un stress oxydant en augmentant le niveau d'ERO (Jeong et al., 2009a) par la diminution du niveau d'expression d'enzymes anti – oxydantes (Sharma et al., 2007).

En tant qu'agent anti – cancéreux, le kaempférol inhibe la phosphorylation de Akt (Jeong et al., 2009a), décroît le niveau de ERK phosphorylé (Jeong et al., 2009a; Luo et al., 2012b) mais peut aussi bien stimuler l'activation de ERK par phosphorylation (Kim et al., 2008).

Le kaempférol inhibe la prolifération de cellules cancéreuses (Kang et al., 2010a; Luo et al., 2011) mais également la sécrétion de VEGF et le processus d'angiogenèse (Luo et al., 2012b).

Luo *et al.*, ont également développé différentes nano-particules à base kaempférol et ont testé leur effet sur des cellules cancéreuses et des cellules saines. Les nanoparticules PEO (poly(ethylene oxide)) - PPO (poly(propylene oxide)) - PEO poly(ethylene oxide) diminuent la viabilité à la fois des cellules saines et des cellules malades. A l'opposé les nanoparticules (PLGA) (Poly(DL-lactic acid-co-glycolic acid)) possèdent une cytotoxicité sélective envers les cellules cancéreuses. Comparé au kaempférol, ces nanoparticules de kaempférol possèdent une cytotoxicité supérieure (Luo et al., 2012a).

L'inhibition de la prolifération par le kaempférol provoque la mort des cellules cancéreuses par apoptose par voie extrinsèque mais également par la voie intrinsèque (Huang et al., 2010; Kang et al., 2010a; Luo et al., 2011; Nguyen et al., 2003).

Des études pharmacocinétiques menées *in vivo* sur des humains et des rats ont révélé que le kaempferol est principalement absorbé par l'intestin grêle et est métabolisé sous formes glucurono- et sulfo – conjuguées dans le foie. Les résultats ont montré que le kaempferol possède une mauvaise biodisponibilité (2%) et qu'après ingestion de plusieurs milligrammes de kaempferol, celui-ci est seulement détecté à un niveau nano-molaire dans le plasma alors que la majorité des études ont été menées en utilisant des concentrations de l'ordre du micro – molaire (Barve et al., 2009; Calderon-Montano et al., 2011; Li et al., 2012b). Il a été montré que le kaempferol peut être converti en sa molécule analogue, la quercétine par l'enzyme CYP1A1 chez les rats (Silva et al., 1997). Bien que les cellules cancéreuses soient capables d'éliminer les composés comme la quercétine, il a été montré par Sesink *et al.*, que le kaempferol bloque l'efflux de la quercétine provoqué par Bcrp par un mécanisme d'inhibition compétitive (An and Mou, 2011; Sesink et al., 2005). A partir de là, il a été montré que le kaempférol augmente l'effet du cisplatine dans des cellules du cancer des ovaires et de l'étoposide dans des modèles de rats (Li et al., 2009a; Luo et al., 2010).

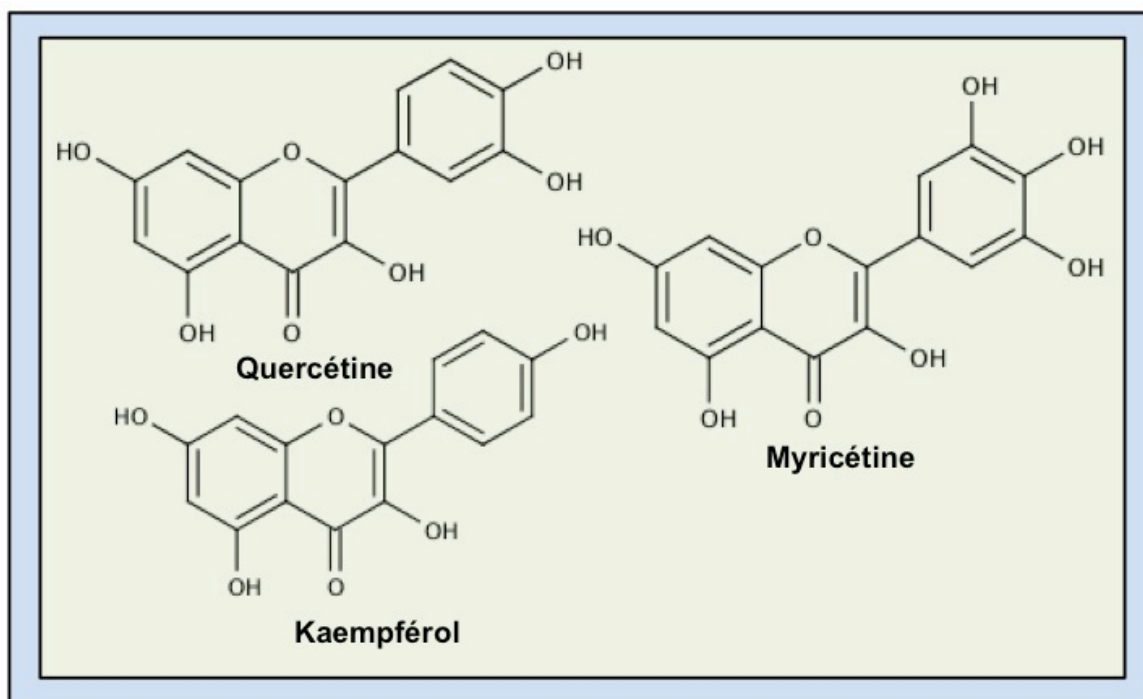


Figure 21 : Structures chimiques de flavonoïdes présents chez la *Dionaea muscipula*.

Afin de souligner que les flavonoïdes sont des molécules phénoliques, celles – ci ont été représentées avec un bord bleu, couleur utilisée dans ce manuscrit comme couleur de fond pour représenter les cellules phénoliques.

Les naphtoquinones et molécules associées

Ces molécules pigmentaires dérivant de la voie de synthèse des phénols sont largement répandues dans les plantes, les lichens, les champignons et les micro-organismes. Dans les plantes, ils agissent comme bactéricides, insecticides, fongicides et agent allélopathiques (substance qui promeut ou empêche la croissance d'organismes environnants) (Babula et al., 2009; Babula et al., 2006; Gu et al., 2004).

La plumbagine

La plumbagine (Figure 22) est une naphtoquinone de couleur jaune dotée de propriétés anti-bactériennes, anti-fongiques, anti-inflammatoires et anti-cancéreuses. Cette molécule tire son nom de la plante dans laquelle elle a été découverte, le *Plumbago zeylanica* (Hsieh et al., 2005) mais elle est également présente dans de nombreuses autres plantes comme *Limonium axillare*, les noyers (*Juglans* sp.) (Bashir et al., 1994; Binder et al., 1989; Hedin et al., 1980; Raj et al., 2011) ainsi que dans d'autres plantes carnivores comme la *Nepenthes khasiana*, *Nepenthes gracilis* ou encore la *Drosera binata* (Aung et al., 2002; Eilenberg et al., 2010;

Marczak et al., 2005). Les racines de cette plante étaient déjà utilisées depuis des siècles dans la médecine traditionnelle indienne pour leurs propriétés cardiotoniques, hépatoprotectives et neuroprotectives (Tilak et al., 2004). Dans la dionée, la plumbagine assure un rôle de protection vis-à-vis des prédateurs et des parasites (Tokunaga et al., 2004).

La plumbagine une molécule pro – oxydante qui induit la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) (Lee et al., 2012a; Padhye et al., 2012), des clivages de l'ADN et l'inhibition de la topoisomérase II (Kawiak et al., 2007). C'est également une molécule dotée de propriétés anti – oxydantes (Kumar et al., 2013) capable d'inhiber la polymérisation des microtubules en se liant directement au niveau du site de fixation de la colchicine de la tubuline (Acharya et al., 2008). La plumbagine est aussi un inhibiteur du transporteur ABCG2 (multidrug resistance-linked ATP binding cassette drug), une protéine responsable de l'efflux de substances exogènes hors de la cellule dans des cas de cancers (Shukla et al., 2007).

Cette naphthoquinone agit sur de nombreuses voies cellulaires impliquées dans les processus de cancérogenèse en régulant l'expression de gènes anti-apoptotiques (*Bcl-2*, *Bcl-xL*, *survivine*,...) et de gènes régulant la prolifération cellulaire (*Cycline D1*) et l'angiogénèse (*Matrix metalloprotease 9 (MMP-9)*, *VEGF*) ou encore de molécules pro – inflammatoires (*COX-2*) (Hsu et al., 2006 ; Sandur et al., 2006; Subramaniya et al., 2011).

Suivant le modèle d'étude pour son potentiel anti – cancéreux, elle peut avoir un effet activateur, inhibiteur ou ne pas avoir d'effet sur une même voie de signalisation. Décrite comme une molécule inhibitrice de la voie NF- κ B (Hsu et al., 2006 ; Sandur et al., 2006) et la protéine kinase GSK-3 impliquée dans la voie Wnt, elle bloque également la voie Akt, dans les lignées cancéreuses humaines MCF-7 et MDA-MB-231 du cancer du sein (Kuo et al., 2006) et dans les cellules H460 de cancer de poumon (Gomathinayagam et al., 2008). Dans certaines lignées cancéreuses, elle active à la fois JNK et à la fois p38 (Gomathinayagam et al., 2008) alors que dans d'autres lignées cancéreuses, la plumbagine active JNK et ERK 1/2 mais reste sans effet sur p38 (Wang et al., 2008). Dans les cellules saines pré-adipocytaires 3T3-L1 de souris, par contre elle s'est montrée capable d'activer à la fois Akt et à la fois ERK 1/2 (Yang et al., 2010).

La plumbagine est connue pour sa capacité à induire un arrêt du cycle cellulaire à la transition G2/M et à provoquer la mort par apoptose dans de nombreuses lignées cancéreuses (leucémie, mélanome, poumon,...) (Gomathinayagam et al., 2008; Hsu et al., 2006 ; Sandur et al., 2006; Wang et al., 2008).

Ce métabolite secondaire est également décrit comme un agent inducteur de l'apoptose dans plusieurs types de cancer comme le celui de la prostate, du colon, du sein ou encore les leucémies (K.A et al., 2013; Kawiak et al., 2012; Padhye et al., 2012; Powolny and Singh, 2008; Subramaniya et al., 2011; Xu and Lu, 2010).

Dans les cellules K562, cette molécule naturelle augmente l'expression des récepteurs membranaires de mort DR4 et DR5, ce qui se résulte par une sensibilité accrue à TRAIL (*TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand*) et à une diminution de la viabilité cellulaire. Les résultats obtenus par amarrage moléculaire (docking) montrent que la plumbagine se positionne au niveau du complexe ligand – récepteur formé de TRAIL et DR5 ce qui contribue à provoquer la mort par apoptose *via* la voie extrinsèque (Sun and McKallip, 2011). La plumbagine peut également induire l'apoptose des cellules cancéreuses par la voie intrinsèque (Kawiak et al., 2012).

Des expériences menées *in vivo* sur des souris ont confirmé que la plumbagine inhibe la croissance des tumeurs et le nombre de métastases par inhibition de l'expression de plusieurs marqueurs comme les MMP2 et 9 et le VEGF dans des cas de cancer des ovaires et de la prostate (Hafeez et al., 2013; Sinha et al., 2013).

Du point de vue pharmacocinétique, la plumbagine possède une biodisponibilité d'environ 40% et elle peut être détectée à un niveau micro – molaire une heure après administration chez des rats vivants conscients et libres de leurs mouvements (Hsieh et al., 2006).

Les dérivés de la plumbagine

Des dérivés de la plumbagine ont également été isolés à partir de la *Dionaea muscipula* par plusieurs groupes. Un dimère de plumbagine, la 8,8'-biplumbagine (Figure 22) également appelée marinone a été isolée à partir de la plante carnivore mais elle a aussi été découverte dans d'autres plantes dont *Plumbago zeylanica* et *Diospyros maritima* (Lin et al., 2003; Whitson et al., 2012). Testée pour ses effets anti-tumoraux potentiels sur les lignées cancéreuses KB, LNCaP, Lu1, K562, Raji, Jurkat, Vero, Calu-1, HeLa et Wish, la marinone a montré un fort pouvoir anti-prolifératif vis – à – vis de ces lignées (Gu et al., 2004; Lin et al., 2003). Présente chez la Dionée mais également chez d'autres plantes comme *Diospyros maritima* et les plantes carnivores *Nepenthes* sp., et *Drosophyllum lusitanicum* (Budzianowski et al., 2002; Eilenberg et al., 2010; Higa et al., 1998; Likhitwitayawuid et al., 1998), la drosérone (Figure 22) isolée par Kreher *et al.*, ainsi que la 3-chloroplumbagine (Figure 22) et l'hydroplumbagine 4-O- β -glucopyranoside (Figure 22) (Kreher et al., 1990) n'ont pas encore pour le moment été testées pour identifier leurs propriétés biologiques. Miyoshi *et al.*, ont

également rapporté l'isolation d'une autre naphtoquinone, la diomuscinone (Figure 22) et d'une molécule dérivée, la diomuscipulone (Figure 22) toujours en présence de plumbagine au niveau des racines de la Dionée (Miyoshi et al., 1984). Récemment, la diomuscinone a été isolée à partir de *Diospyros wallichii* (Salae et al., 2010) mais aucune de ses trois substances n'a pour le moment été étudiée pour tenter d'identifier leurs propriétés thérapeutiques.

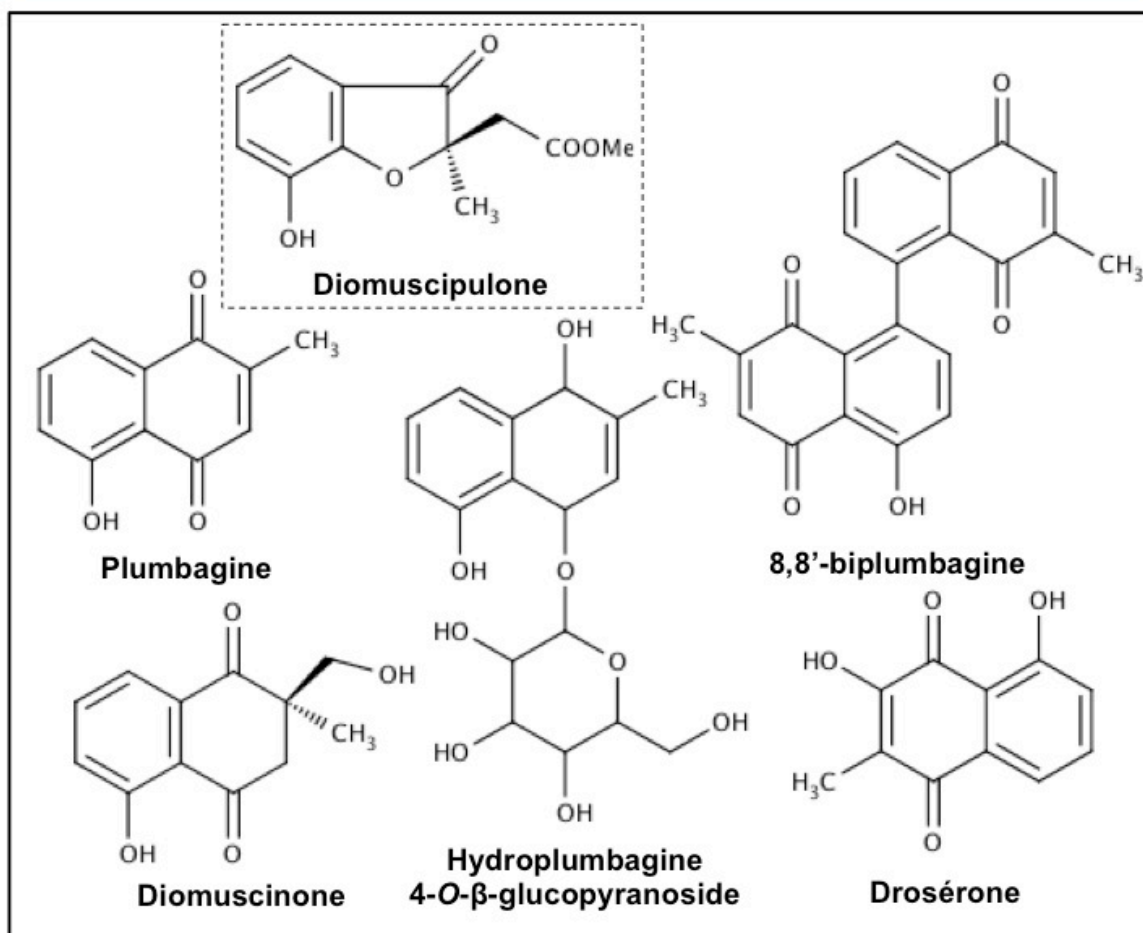


Figure 22 : Structures chimiques de naphtoquinones et de dérivés présents chez la *Dionaea muscipula*.

Isolée en même temps que la plumbagine et la diomuscinone, la diomuscipulone n'est pas à proprement parlé une naphtoquinone mais une molécule dérivée de cette classe.

1.3.4 Les métabolites secondaires et le stress oxydant

Les plantes ont développé leurs propres molécules de défenses anti-oxydantes afin de lutter contre le stress oxydatif pouvant être généré par des ERO endogènes et exogènes (induit par la chaleur et les rayons ultraviolets). Ces métabolites secondaires sont dotés de propriétés anti-oxydantes, notamment par la présence de groupements phénol (Figure 23). L'efficacité de cette propriété est influencée par le nombre et la disposition de ces groupements. Plus la molécule possède de groupements phénols, plus celle – ci possède une activité anti – oxydante efficace. Cependant, du fait de la diversité chimique et structurale, certains de ces composés phénoliques sont également dotés de propriétés pro – oxydantes (Gheldof and Engeseth, 2002; Hernandez et al., 2009; Lupea et al., 2008; Martin-Cordero et al., 2012).

Les quinones sont une autre classe de molécules d'origine naturelle ou synthétique connues comme responsables de la formation d'ERO grâce à leur radical semi – quinone (hydroquinone substituée d'un atome d'hydrogène et de son électron). Dans l'organisme, les quinones peuvent être produits à partir de l'oxydation des flavonoïdes, des molécules de nature phénolique (Figure 23). En plus d'oxyder les biomolécules, les quinones sont également capables de se lier fortement au GSH suite à l'action de la GST mais également de façon non-enzymatique comme le fait la plumbagine et son analogue la juglone. Tout comme la plumbagine, elles sont aussi capables de provoquer la déplétion du GSH par oxydation de celui-ci pour former du GSSG et de se lier à d'autres protéines *via* leurs résidus cystéine (Awad et al., 2002; Awad et al., 2000 ; Bolton et al., 2000; Hayes et al., 2005; Inbaraj and Chignell, 2004; Sawahata and Neal, 1983; Tu et al., 2011).

Parfois transformés avant leur absorption dans notre alimentation, ces molécules peuvent continuer à exercer leur rôle de défense et de protection dans notre organisme. Cependant, des modifications ayant lieu après absorption peuvent modifier les propriétés physico-chimiques et biologiques de certaines de ces molécules. Des réactions peuvent ainsi altérer en bien ou en mal la biodisponibilité ou encore la réactivité de certaines substances. Beaucoup de ces modifications font intervenir des partenaires biologiques de l'organisme comme par exemple les enzymes de détoxification qui sont par ailleurs surexprimés dans les cancers ou encore par la flore intestinale. Ainsi, certains métabolites secondaires, dotés à la base de propriétés anti – oxydantes tels les phénols peuvent être transformés par oxydation en molécule pro-oxydantes comme des quinones (Figure 23). Ces deux propriétés sont dès lors très intéressantes dans la

lutte contre le cancer (Brewer, 2011; Chen et al., 2010; Downie et al., 2005; Jacob et al., 2011; McDonald et al., 2001; Ziech et al., 2012).

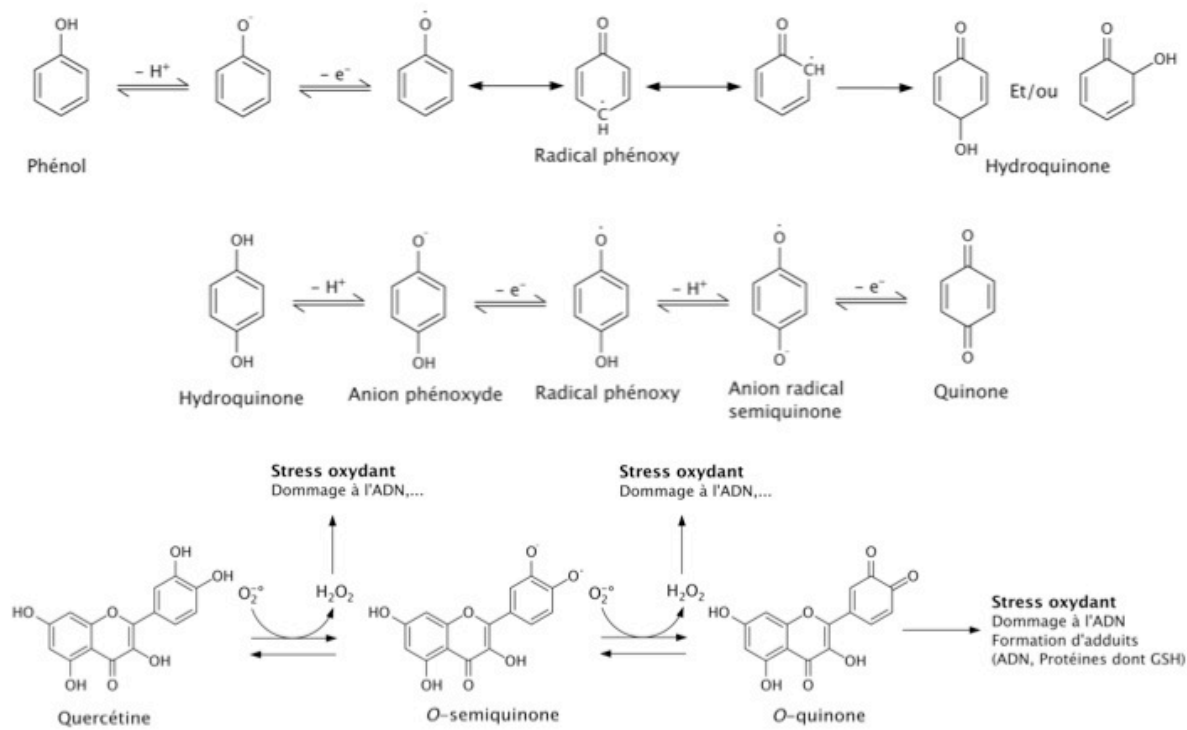


Figure 23 : Mécanisme d'oxydation d'une molécule phénolique en quinone : exemple de la quercétine.

L'oxydation du phénol conduit à la formation de quinone en plusieurs étapes notamment en ayant recours aux cytochromes P450 réductases. Les différents intermédiaires de la réaction sont également source d'espèces réactives de l'oxygène qui peuvent induire un stress oxydant, provoquer des dommages à l'ADN et oxyder des protéines et des lipides.

La quercétine (Figure 24) est une molécule que l'on retrouve dans de nombreuses espèces végétales et qui est largement connue pour ses propriétés anti-oxydantes. Elle réduit les dommages à l'ADN, la peroxydation des lipides et le niveau d'ERO, elle est capable d'inhiber la voie NF- κ B induite par H_2O_2 en empêchant la ligation du facteur de transcription à l'ADN (Chang et al., 2006; Kosinova et al., 2012; Musonda and Chipman, 1998; Zhang et al., 2011). La quercétine possède également des propriétés pro-oxydantes, ainsi il a été montré que celle-ci est sujette à une oxydation enzymatique qui catalyse sa transformation en quinone (Figure

23). Sous cette nouvelle forme, elle acquiert une capacité à provoquer la formation d'ERO, à provoquer des dommages à l'ADN, à diminuer la concentration intracellulaire de GSH notamment par oxydation et à peroxyder les lipides (Galati et al., 2001; Metodiewa et al., 1999; Sahu and Washington, 1991).

La plumbagine (Figure 24) est une naphthoquinone connue pour déclencher dans de nombreux types de cancers solides et circulants la mort par apoptose dépendante de la formation d'ERO. Cet effet pouvant être totalement annihilé par un pré – traitement par la NAC (Lee et al., 2012a; Powolny and Singh, 2008; Sun and McKallip, 2011; Tian et al., 2012a; Wang et al., 2008; Xu and Lu, 2010; Xu et al., 2013b).

Bien qu'à l'heure actuelle, seule l'activité pro – oxydante a pu être observée dans des cas de cancers humains, la plumbagine s'est révélée être également dotée d'une propriété anti – oxydante chez *Escherichia coli*. Ainsi, une concentration de 120 μM de cette naphthoquinone permet de diminuer le niveau de radicaux libres générés par irradiation et diminue ainsi le taux de mutations chez cette bactérie. L'analyse par micro-puces à ADN a révélé que cette propriété anti – oxydante est due à l'augmentation de la superoxyde dismutase (SOD) (Kumar et al., 2013).

Le mécanisme de formation des ERO induit par la plumbagine a été analysé sur des kératinocytes humains HaCaT. Les enzymes de type cytochrome P450 réductase réduisent la naphthoquinone en semi – quinone radicalaire qui participe à la formation des ERO (anion superoxyde et H_2O_2) (Inbaraj and Chignell, 2004). Une autre équipe a également exclu que la source des ERO soit le complexe mitochondrial I ou la NADPH oxydase (Checker et al., 2010).

La plumbagine est capable d'agir sur l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme des ERO mais sans réelle tendance bien nette car elle diminue ou augmente l'expression des enzymes anti – oxydantes ainsi que leur activité. Ainsi par exemple dans une même cellule, elle diminue l'expression de la catalase et de la SOD mitochondriale mais augmente celle de la glutathion peroxydase (Powolny and Singh, 2008). Elle peut également inhiber l'activité de la SOD mais rester sans effet sur l'activité de la catalase dans des cellules de cancer de la prostate (Powolny and Singh, 2008) Dans des lymphocytes de souris, la plumbagine n'a pas d'effet sur la SOD mais augmente l'activité de la catalase (Checker et al., 2010).

La plumbagine provoque la déplétion du GSH et parfois sans même agir sur les niveaux et les activités des enzymes anti – oxydantes (SOD, catalase) (Seshadri et al., 2011). Elle provoque l'oxydation du GSH en GSSG (Powolny and Singh, 2008) parfois de manière non –

enzymatique (Checker et al., 2010) et peut également se conjuguer directement au GSH par l'intermédiaire de son carbone numéro 3 (Checker et al., 2010; Inbaraj and Chignell, 2004).

Les isothiocyanates (Figure 24), métabolites secondaires présents notamment chez les Brassicacées (choux), sont absorbés par l'organisme sous forme hétéroside (condensation d'ose et de substance non glucidique), et convertis en aglycone sous l'action de la myrosinase (enzyme présent chez la plante). Les isothiocyanates réagissent avec les fonctions thiol et amine des biomolécules et peuvent en modifier leur activité et leur expression (Lin et al., 2011c). Les recherches ont montré que ces molécules, comme par exemple le sulforaphane (Figure 24), peuvent notamment augmenter le niveau des ERO par inhibition de certains complexes et enzymes de la chaîne respiratoire mitochondriale (Chen et al., 2011b; Singh et al., 2005; Xiao et al., 2010), et de diminuer le niveau de GSH, mais ceci nécessite parfois une forte concentration. En plus de ces propriétés pro-oxydantes, les isothiocyanates sont également des antioxydants par leur capacité à augmenter le niveau de GSH à inhiber la thioredoxine réductase, la glutathion réductase et la GST et ce, généralement à faible dose (Cheung and Kong, 2010; Hu et al., 2007; Syed Alwi et al., 2012; Valgimigli and Iori, 2009; Zhang, 2000).

Le xanthohumol (Figure 24), présent dans le houblon (*Humulus lupulus*) est un chalconoïde doté de propriétés anti-oxydantes mais également propriétés pro-oxydantes par la stimulation de la production d'ERO qui provoque la mort des cellules cancéreuses par apoptose (Del Mar Blanquer-Rossello et al., 2013; Festa et al., 2011; Strathmann et al., 2010). Grâce à son groupement cétone, ce métabolite secondaire modifie par oxydation l'activité de certains enzymes (MMP) et facteurs de transcription (NF- κ B) en agissant sur leurs résidus cystéine (Harikumar et al., 2009; Monteghirfo et al., 2008).

Les polyphénols du thé comme les catéchines (Figure 24) sont surtout connus pour leurs propriétés anti – oxydantes par leur capacité à augmenter l'expression des défenses anti – oxydantes telles que la superoxyde dismutase et le glutathion et ainsi diminuer le risque de dommages au niveau de l'ADN et des protéines (Basu et al., 2013; Henning et al., 2012; Simos et al., 2012). Des études ont également montré le caractère pro-oxydant des catéchines par leur capacité à augmenter la concentration intra-cellulaire en ERO. Ainsi, ces molécules sont capables d'inhiber la glutathion peroxydase (GPx) et d'oxyder des protéines (Forester and Lambert, 2011; Lambert and Elias, 2010; Li et al., 2010; Lu et al., 2011).

Présents dans l'ail et les champignons shiitake, les diallyl polysulfides (Figure 24) tels que le diallyltrisulfide et le diallyltétrasulfide sont des molécules pro – oxydantes qui peuvent réagir avec les groupements thiol de certaines protéines. Ces S-thiolations provoquent des modifications au niveau des protéines et des enzymes mais également un basculement du pool de GSH en GSSG en stimulant l'activité de la glutathion peroxydase (GPx) (Perchellet et al., 1986). Le diallyl trisulfide (Figure 24) provoque la mort par apoptose des cellules de cancer de prostate *via* la voie intrinsèque en diminuant exclusivement les protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-xL mais en ne modulant pas le niveau des protéines pro-apoptotique Bax et Bak bien que celles-ci jouent un rôle important dans la mort des cellules par apoptose. Des recherches ont également montré que plus le nombre d'atomes de soufre de la molécule est important, plus la molécule génère des ERO (Kim et al., 2007; Munday et al., 2003; Yi et al., 2010). Certaines molécules présentes dans l'ail âgé ont cependant montré des effets anti-oxydants, comme par exemple la S-allylcystéine et la S-allylmercaptocystéine (Figure 24). Ici aussi également, le pouvoir anti-oxydant augmente avec le nombre d'atomes de soufre (Borek, 2001; Imai et al., 1994).

Par sa structure contenant de nombreuses doubles liaisons pouvant être oxydées, le lycopène (Figure 24) que l'on retrouve dans la tomate joue un rôle préventif en protégeant les lipides membranaires de la peroxydation et l'ADN de dommages (Matos et al., 2000; Porrini and Riso, 2000). Il possède d'intéressantes propriétés anti-oxydantes et anti – cancéreuses par sa capacité à stimuler la synthèse d'enzymes de détoxification (GST) et à stimuler également le cycle redox du glutathion et d'enzymes impliquées dans la synthèse de celui-ci tel que la glutathion peroxydase et la glutathion réductase (Bhuvaneswari et al., 2001; Kelkel et al., 2011). Il est moins connu cependant que le lycopène peut agir comme molécule pro – oxydante après qu'il ait été exposé aux rayons ultraviolets (Yeh et al., 2005b).

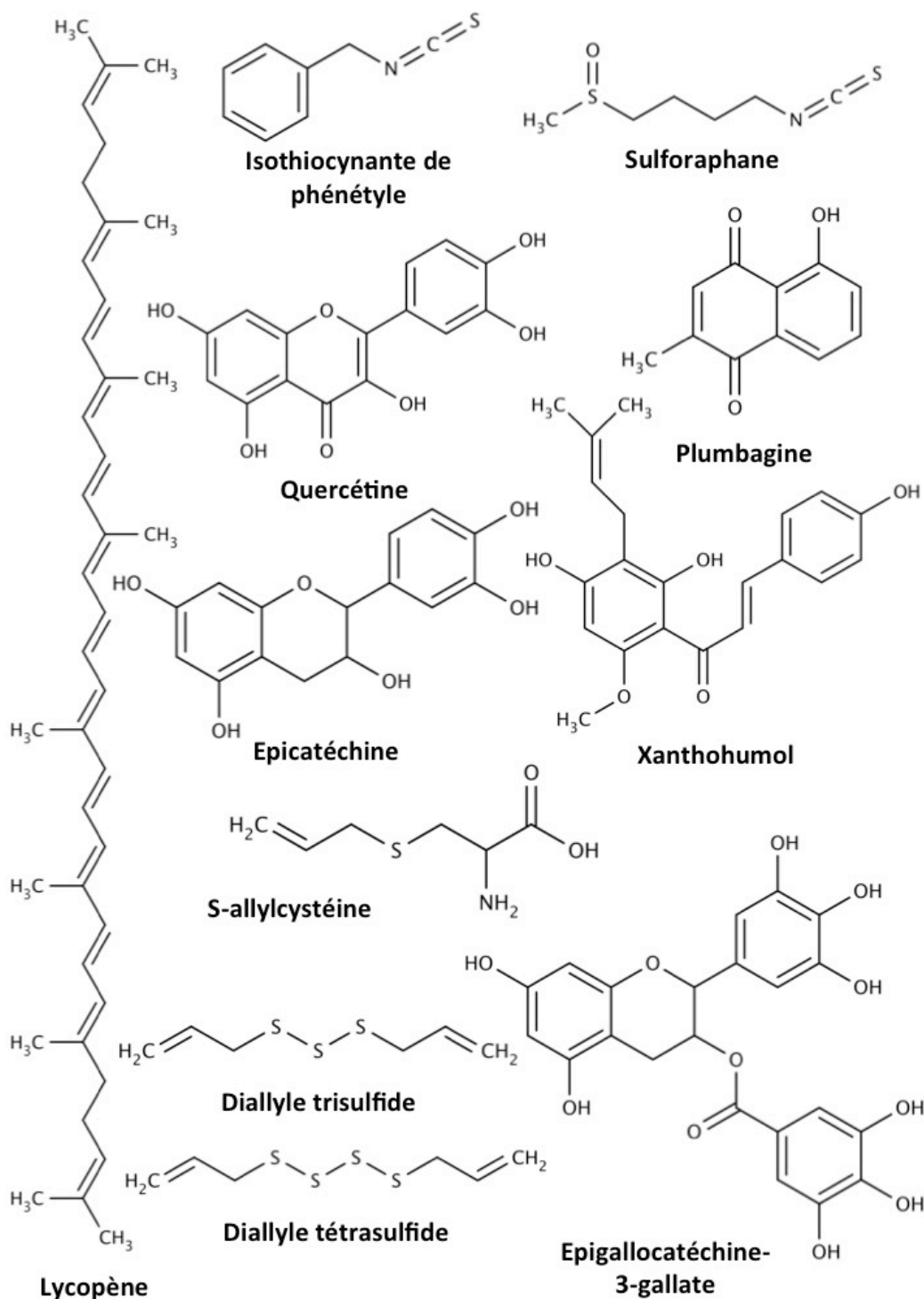


Figure 24 : Structures de quelques molécules naturelles anti – cancéreuses capables d’agir sur le niveau d’ERO.

Certaines molécules d’origine naturelle possèdent à la fois des propriétés anti-oxydantes et des propriétés pro – oxydantes. L’oxydation des molécules anti – oxydantes phénoliques dont font partie les flavonoïdes (quercétine, épicatechine,...) les transforme en hydroquinone et enfin en quinone qui sont des molécules dotées de propriétés pro – oxydantes.

2. Objectifs du projet de recherche

Comme présenté dans ce manuscrit, le cancer est devenu un problème de santé au niveau mondial. Il est possible pour tout un chacun de prévenir l'apparition et le développement du cancer en abordant un mode de vie sain. Les substances naturelles dérivées de plantes, d'animaux et de micro-organismes ont toujours été la principale source de principes actifs pour la médecine sans véritable compréhension de leur mode de fonctionnement. Les produits naturels sont des candidats intéressants pour le développement des futurs médicaments anti – cancéreux.

Nous nous intéresserons d'une part à mettre en évidence de nouvelles propriétés anti – cancéreuses de substances déjà connues et d'une autre part nous tenterons d'identifier une ou plusieurs molécules anti – cancéreuses d'origine naturelle.

2.1 Caractérisation du potentiel anti – cancéreux de la curcumine dans le cas du cancer de la prostate

Le développement du cancer de la prostate présente une longue période initiale de latence puisqu'il évolue lentement et se développe pendant des années avant qu'il ne soit détecté. La chimioprévention apparaît donc comme une alternative très intéressante pour prévenir l'apparition de cellules cancéreuses ou pour éliminer les cellules prostatiques saines déjà transformées en cellules tumorales. La curcumine semble être un excellent candidat chimiopréventif dans la lutte contre le développement du cancer de la prostate puisque cette molécule polyphénolique a déjà montré ses capacités à inhiber certains oncogènes, certaines cyclines et à bloquer des mécanismes de survie cellulaire dans ce type de cancer. Elle est également connue pour inhiber la voie Wnt dans différents cancers mais à l'heure actuelle aucune étude n'a encore été publiée concernant un potentiel effet de la curcumine sur la voie Wnt/ β -caténine fortement impliquée dans la progression du cancer de la prostate.

L'hypothèse de ce projet de recherche consiste à évaluer l'effet de la curcumine sur la voie de signalisation Wnt dans des lignées cellulaires issues de cancer de la prostate aux stades androgéno-sensible et androgéno-indépendant.

1. Dans un premier temps, nous déterminerons la sensibilité des différentes lignées à un traitement par la curcumine selon une cinétique de temps et de concentration.

2. Dans un second temps, nous évaluerons l'effet de la curcumine sur la prolifération cellulaire des cellules prostatiques. Tout d'abord par une étude du cycle cellulaire par cytométrie en flux (marquage à l'iodure de propidium) puis par une étude par PCR (*Polymerase Chain Reaction*) quantitative en temps réel de gènes cibles impliqués dans la prolifération cellulaire (*Cycline B1*, *PCNA*) et de l'expression des protéines correspondantes par Western-Blot.
3. Dans un troisième temps, nous évaluerons l'effet de la curcumine sur la voie de signalisation Wingless selon la démarche suivante :
 - nous évaluerons l'impact du traitement par la curcumine sur l'activité transcriptionnelle β -caténine/Tcf-4. Nous réaliserons des transfections transitoires de plasmides rapporteurs (TOPFlash/FOPFlash) ainsi que de vecteurs d'expression pbCAT codant pour une β -caténine mutée.
 - nous évaluerons l'impact de la curcumine sur l'expression de protéines cibles (c-myc, cycline D1) ainsi que de protéines impliquées dans la cascade de signalisation Wingless telles la β -caténine, phospho β -caténine, Tcf-4, CBP et p300.

2.2 Les composés naturels de la *Dionaea muscipula* comme agents anti-cancéreux

L'émergence de résistances dans les différentes pathologies déjà connues (cancers, infections bactériennes) mais également l'apparition de nouvelles maladies (maladie d'Alzheimer, maladie de Parkinson, SIDA,...), ainsi que les effets secondaires de certains médicaments et la diversité génétique des cancers poussent à la découverte de nouvelles molécules anti – cancéreuses et à l'amélioration de l'efficacité des molécules déjà connues. Comme l'ont montré les médecines traditionnelles, les organismes naturels sont une grande source de molécules à potentiel anti – cancéreux.

Pour développer ce projet de recherche qui consiste en la recherche, l'identification et la caractérisation de nouvelles molécules thérapeutiques chez la plante carnivore *Dionaea muscipula*, notre démarche sera la suivante :

1. Dans un premier temps, nous préparerons des extraits méthanoliques des différentes parties (feuilles et racines) des plants de *Dionaea muscipula*.
2. Dans un second temps, nous déterminerons la sensibilité de différentes lignées cellulaires cancéreuses à un traitement avec les différents extraits méthanoliques selon une cinétique de temps et de concentration.
3. Dans un troisième temps, nous procéderons au fractionnement, à la purification et à l'identification des molécules possédant un potentiel anti – cancéreux intéressant contenues dans les extraits totaux.
4. Dans un quatrième temps, nous mettrons en évidence les propriétés anti – cancéreuses de molécules identifiées ainsi que leurs modes d'action.

3. Matériel et méthodes

3.1 Produits et substances utilisés

3.1.1 Composés d'origine naturelle

Les substances naturelles utilisées [acide ellagique (E2250), curcumine (C1386), myricétine (70050), plumbagine (P7262) et quercétine (Q4951),] pour les expériences et les différentes analyses présentées dans ce manuscrit ont été achetées auprès de la société Sigma – Aldrich (Bornem, Belgique).

3.1.2 *Dionaea muscipula* Solander ex Ellis

Les plants de *Dionaea muscipula* Solander ex Ellis sont issues de ma collection personnelle, cultivés dans une serre sous conditions tempérées (Arlon, Belgique, 49° 41' N 05° 49' E) ont été collectés durant les mois de septembre et d'octobre de l'année 2009.

3.1.3 Etoposide

L'étoposide phosphate ou VP-16 (Sigma – Aldrich, E1383) est un agent cytotoxique inhibiteur de la topoisomérase II humaine. Il forme un complexe tertiaire avec l'ADN et la topoisomérase, empêchant celle-ci d'utiliser son activité de ligation des brins d'ADN et laissant provoquant ainsi des coupures simples et doubles brins de l'ADN. L'étoposide est couramment utilisé comme un contrôle positif de l'apoptose (cellules U937 traitées pendant 4 heures à une concentration de 100 μM) mais également comme contrôle positif de phosphorylation (cellules U937 traitées pendant 2 heures à une concentration de 50 μM).

3.1.4 *N* – acétyl – cystéine

La *N* – acétyl – cystéine (NAC) (Sigma – Aldrich, Bornem, Belgique) est un dérivé de la cystéine sur laquelle est greffé un groupement acétyle (COCH_3) au niveau de l'atome d'azote. C'est un composé organosulfuré naturel que l'on retrouve également dans l'ail. La NAC est une molécule dotée de propriétés antioxydantes couramment utilisée dans la recherche scientifique. Par son groupement thiol elle est capable de piéger les radicaux libres et de réduire les ponts disulfures des protéines oxydées. Précurseur du GSH, la NAC augmente en cas de besoin la concentration intra-cellulaire de celui-ci en stimulant sa synthèse et son incorporation. Des recherches ont également montré qu'un traitement par la NAC provoque des changements morphologiques et biochimiques comme une variation dans le profil de phosphorylation de certaines protéines et dans certains cas de leur activité, ainsi qu'une

diminution de la prolifération et une tendance à la différenciation (Kelly, 1998; Lee et al., 2013; Paranjpe et al., 2007; Parasassi et al., 2010; Sato et al., 2009).

3.2 Préparation des extraits de plantes

La plante est nettoyée et les parties mortes sont éliminées. Après plusieurs lavages à l'eau distillée, la plante est fractionnée en différentes parties (feuille – pétiole et racine). Les différentes étapes de préparation qui suivent sont réalisées dans un environnement le moins lumineux et le moins chaud possible afin d'éviter les transformations et les modifications chimiques pouvant être causées par la chaleur, la lumière et plus spécialement par les rayons ultraviolets sur les molécules contenues dans la plante.

Les différentes parties de la plante sont ensuite mises à sécher pendant 2 jours dans un four à 30°C. Le matériel sec est alors grossièrement haché avec des ciseaux et réduit en poudre à l'aide d'un mortier et d'un pilon. Une quantité connue de plante broyée est alors mise à macérer à température ambiante dans du méthanol sous agitation pendant 3 jours à raison de 2,5 g de matériel sec pour 100 mL de solvant. Chaque jour, le méthanol est récupéré et est remplacé par du méthanol frais. Le méthanol récupéré est débarrassé de ses impuretés par filtration (papier filtre Whatman n°1) et est conservé à l'obscurité à 4°C.

Au bout de ces 3 jours, l'ensemble du méthanol récupéré est filtré à travers une membrane en nylon HNWP 0,45 µm (Millipore, Bruxelles, Belgique) afin d'éliminer les grosses particules qui pourraient boucher la colonne ainsi que les capillaires de l'HPLC. Le filtrat est transvasé dans un ballon d'évaporation et le méthanol est ensuite éliminé par distillation grâce à un évaporateur rotatif (Rotavapor R-210, Buchi) à une température de 40°C sous pression réduite (Vacuum controler V-855 Buchi, Vacuum pump V-700 Buchi) et à l'abri de la lumière directe afin d'empêcher la décomposition des composants thermolabiles et des composants sensibles à la lumière.

Les conditions de distillation utilisées sont reprises dans le tableau ci-dessous (Tableau 1).

Tableau 1 : Conditions d'évaporation utilisées pour la concentration des extraits méthanoliques.

Solvant	Température du bain marie (°C)	Température du réfrigérant à eau (°C)	Pression (mbar)
Eau	40	0	23
Méthanol	40	0	122

Le dépôt sec est remis en suspension dans un volume minimum de méthanol et est transféré dans des tubes Eppendorf noirs. Ceux-ci sont ensuite placés dans un évaporateur centrifuge sous vide (RC 1010/RCT 60, Jouan) afin d'éliminer les dernières traces de méthanol. Le culot sec est alors remis en suspension dans du DMSO (diméthylsulfoxyde) à une concentration de 100 mg/mL, aliquoté et est conservé à -20°C à l'abri de la lumière jusqu'à son utilisation (Figure 25).

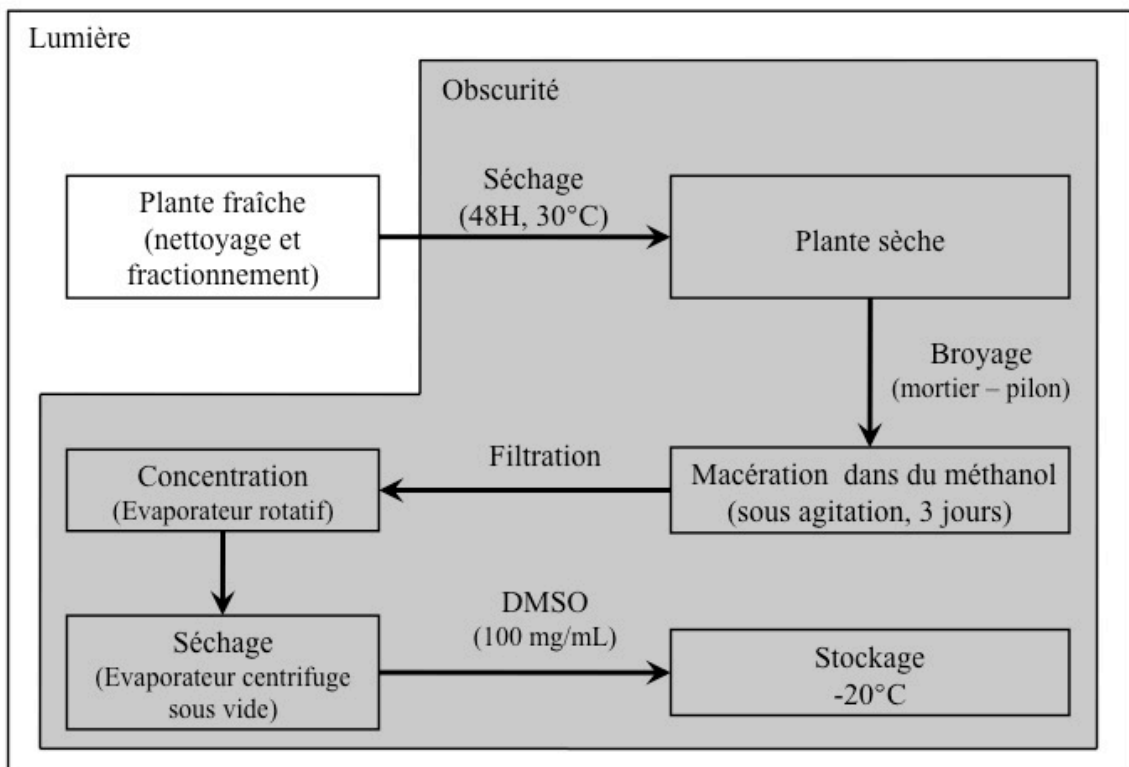


Figure 25 : Schéma récapitulatif du protocole de préparation des extraits de plante.

3.3 Isolation et identification des composés naturels

3.3.1 Purification par HPLC (High Performance Liquid Chromatography)

La chromatographie en phase liquide à haute performance est une technique permettant la séparation des différents constituants d'un mélange en fonction de leurs propriétés physico-chimiques.

Le mélange à séparer est injecté grâce à une seringue dans un injecteur puis poussé par le solvant (appelé phase liquide) grâce à une pompe à travers la colonne (appelée phase stationnaire). Le choix de la taille, de la structure interne et de la température de la colonne ainsi que le choix de la phase liquide (choix de la vitesse du flux du ou des solvants et du gradient dans le cas échéant) jouent un rôle important sur la résolution de séparation des différents constituants du mélange.

Dans notre démarche expérimentale, nous utilisons une chromatographie en phase inverse. Elle s'effectue avec une matrice apolaire nécessitant l'emploi d'un éluant polaire qui permet la séparation des molécules du mélange en fonction de leur hydrophobicité.

La matrice de la colonne est hydrophobe, elle se compose de petites billes de silice (diamètre de l'ordre du μm) sur lesquelles sont greffées des chaînes alkyles linéaires d'une longueur de 18 atomes de carbone (C18). Les molécules hydrophobes sont alors adsorbées en établissant des interactions hydrophobes avec les chaînes hydrophobes de la phase stationnaire. Les molécules sont retenues jusqu'au moment où l'hydrophobicité de la phase liquide devient plus importante que celle de la phase stationnaire. A ce moment, les molécules sont désorbées de la matrice et éluées avec la phase liquide. Les molécules les plus hydrophiles sont éluées les premières et les molécules les plus hydrophobes sont éluées les dernières. A la sortie de la colonne, un splitter oriente une petite fraction du fluide vers le spectromètre de masse et le reste du flux vers le détecteur à ultraviolets (UV).

Le détecteur à UV permet la détection de substances capables d'absorber dans le spectre UV (100 – 400 nm) et visible (400 – 800 nm). L'appareil est donc capable de mesurer l'absorption de la lumière en balayant la totalité de la gamme spectrale comprise entre 190 et 450 nm et ce, pour permettre une meilleure détection des substances.

Après être passé dans le détecteur à UV, le flux est récupéré dans un collecteur de fractions qui a été préalablement programmé pour permettre la récupération d'une fraction en fonction du temps. Les données obtenues par le spectromètre de masse et le détecteur à UV sont collectées par un ordinateur et traitées pour apparaître sous la forme d'un chromatogramme (Figure 26).

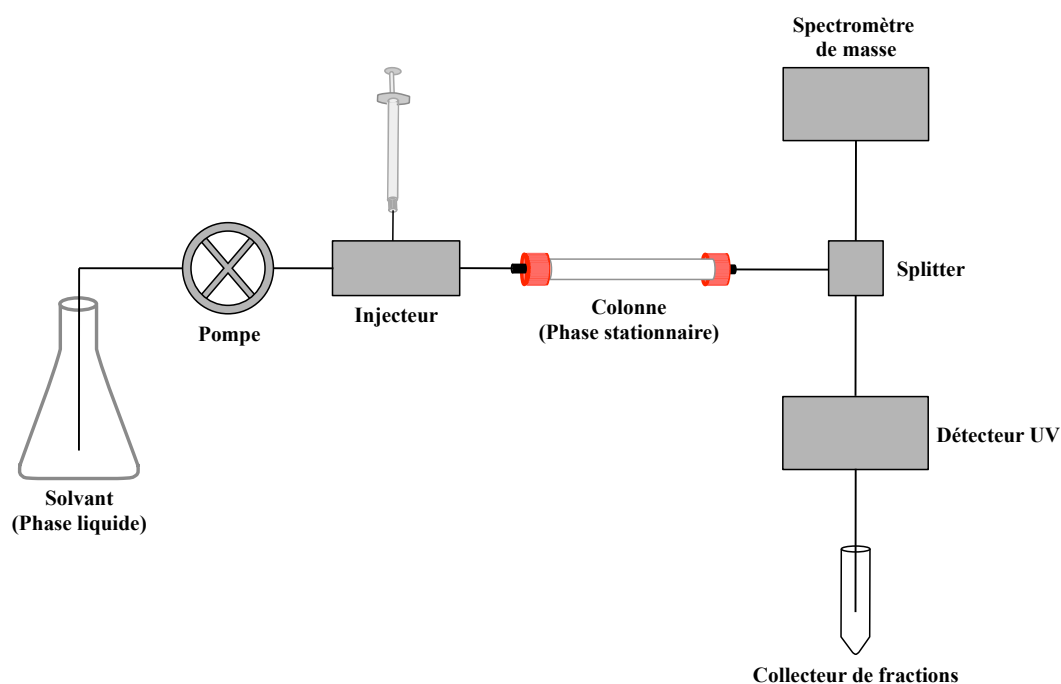


Figure 26 : Schéma simplifié du principe de fonctionnement de l'HPLC.

L'échantillon est injecté grâce à une seringue dans l'injecteur à partir duquel il est entraîné vers la colonne (phase stationnaire) grâce à un flux de solvant (phase liquide). La colonne permet la séparation des molécules contenues dans l'échantillon en fonction de leurs propriétés physico-chimiques. Le splitter oriente une petite partie du flux vers le spectromètre de masse et l'autre vers le détecteur à UV. Après leur passage dans le détecteur à UV, les fractions sont récupérées grâce à un collecteur de fractions. Les données obtenues sont collectées par un ordinateur.

- **Méthode appliquée pour la purification de l'extrait total de feuilles de *Dionaea muscipula***

L'appareil HPLC utilisé pour la séparation de l'extrait méthanolique de feuilles de *Dionaea muscipula* est un appareil de type 1200 Series (Agilent Technologies). L'opération commence par l'injection de 1mL d'extrait dans l'injecteur grâce à une seringue. La colonne utilisée est une colonne Agilent Prep – C18 (21,2 x 150 mm, 5 µm) (Agilent Technologies) à température ambiante. La phase mobile polaire, ayant une vitesse de 2 mL/min, est constituée d'un gradient d'élution par palier composé d'eau et de méthanol (Tableau 2).

Tableau 2 : Gradient d'élution par palier eau – méthanol utilisé pour le fractionnement de l'extrait méthanolique total de feuilles de *Dionaea muscipula*.

Etape	Temps (min)	Solvant (%)		Flux (mL/min)
		Eau	Méthanol	
1	0	100	0	2
2	50	100	0	2
3	60	80	20	2
4	110	80	20	2
5	120	60	40	2
6	170	60	40	2
7	180	40	60	2
8	230	40	60	2
9	240	20	80	2
10	290	20	80	2
11	300	0	100	2
12	320	0	100	2

Le spectromètre de masse couplé à l'HPLC est un appareil de type Agilent 6140 Quadrupole LC/MS (Agilent Technologies).

Le collecteur de fractions, protégé de la lumière, est thermostaté à 4°C et programmé pour collecter une fraction toutes les 10 minutes.

Les chromatogrammes présentés dans ce manuscrit correspondent à ceux obtenus à une longueur d'onde de 254 nm, afin de cibler de façon spécifique les composés présents dans notre échantillon qui comportent des cycles aromatiques au niveau de leur structure.

Après analyse du chromatogramme, les fractions collectées à une absorbance et un temps d'éluion similaires sont regroupées entre-elles. Le solvant (eau – méthanol) est éliminé par évaporation sous pression réduite à une température de 40°C grâce à un évaporateur rotatif (Rotavapor R-210, Buchi). Les conditions de distillation utilisées sont reprises dans le tableau ci-dessus (Tableau 2). Après évaporation grâce à l'évaporateur rotatif, les différents échantillons sont préparés de la même façon que détaillée plus haut pour la préparation de l'extrait méthanolique total de feuilles de *Dionaea muscipula*.

3.3.2 Identification des pics du chromatogramme

L'identification des différents pics du chromatogramme obtenus après fractionnement de l'extrait total de feuilles est réalisé par comparaison avec les chromatogrammes des différentes substances pures déjà connues dans la dionée. La plumbagine, la quercétine, la myricétine et l'acide ellagique ont été injectées chacune à leur tour dans l'HPLC et on été soumises à la même méthode que celle appliquée pour la séparation de l'extrait total de feuilles de *Dionaea muscipula*. En comparant le chromatogramme de chaque substance pure au chromatogramme de l'extrait total, il est possible de déterminer à quel pic du chromatogramme de l'extrait total correspond la substance pure injectée.

3.3.3 Extraction liquide - liquide

Les fractions cytotoxiques d'intérêt composées d'un mélange eau - méthanol ont ensuite été fractionnées par extraction liquide-liquide par un mélange dichlorométhane – eau (fraction d'intérêt) grâce à une ampoule à décanter. La première phase collectée est la phase organique (dichlorométhane). Le solvant organique est ensuite débarrassé de l'eau résiduelle par séchage avec du MgSO₄ et celui-ci est ensuite évaporé grâce à un évaporateur rotatif. La seconde phase collectée, la phase aqueuse est quant à elle évaporée par lyophilisation (Figure 27).

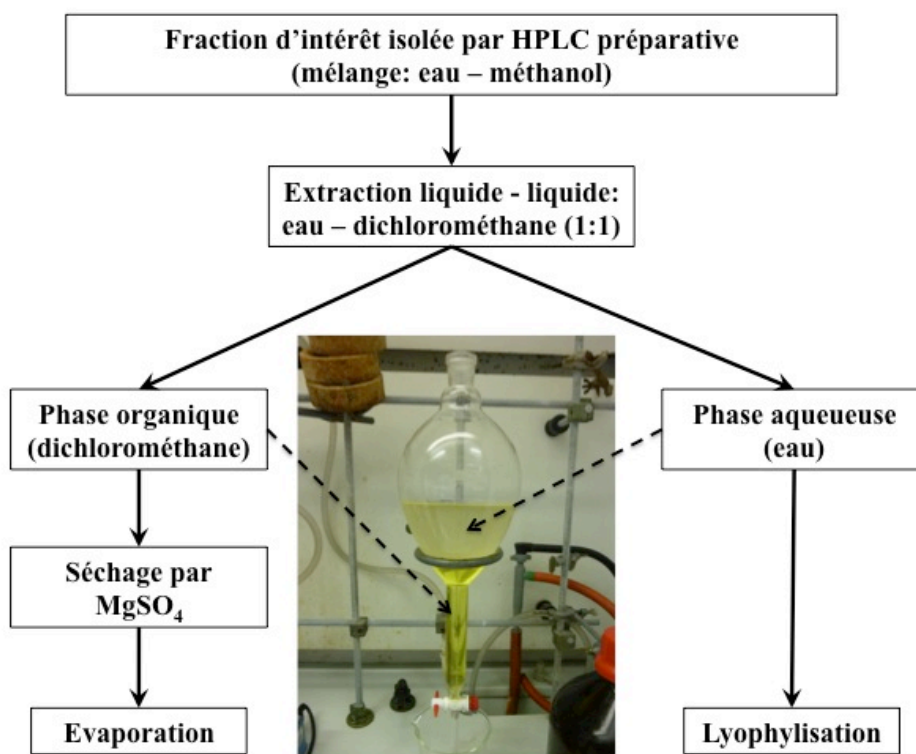


Figure 27 : Schéma récapitulatif du protocole d'extraction liquide-liquide.

3.3.4 Analyse des produits par chromatographie sur couche mince

La chromatographie sur couche mince (CCM), également appelée chromatographie planaire est une méthode qui permet l'analyse de la composition d'un mélange par la séparation de ses constituants, l'analyse de la pureté et/ou l'identification d'une substance par comparaison avec la substance de référence. Cette méthode physique est basée sur la différence d'affinité de substances vis – à – vis d'une phase stationnaire et d'une phase mobile.

Brièvement, quelques gouttes d'un mélange ou d'une substance pure solubilisés dans un solvant sont appliquées sur un support solide (phase stationnaire, adsorbant). Ensuite la base de ce support est placée dans une cuve remplie de la phase mobile qui peut être soit un solvant unique soit un mélange de plusieurs solvants (eau, méthanol, hexane, dichlorométhane,...). La phase mobile ou éluant migre vers le haut de la phase stationnaire par capillarité en entraînant avec elle les substances déposées. Les substances migrent à une hauteur qui dépend de leur affinité avec le solvant mais aussi de leur affinité avec le support.

Les CCM ont été conduites sur des plaques de silice 60F 254 (Merck) et ont été révélées ou bien sous exposition sous une lampe à UV (254 nm) ou bien avec du permanganate de potassium (KMnO₄).

3.3.5 La résonance magnétique nucléaire

La résonance magnétique nucléaire (RMN) est une des techniques qui permet l'analyse structurale de molécules chimiques principalement organiques.

Il existe plusieurs types de RMN mais les plus couramment utilisées sont la RMN ¹H et ¹³C.

La RMN ¹H renseigne sur le nombre et l'entourage des protons contenus dans la molécule. La RMN ¹³C renseigne quant à elle sur le nombre et les arrangements des atomes de carbone de la molécule.

L'échantillon à analyser est dissout dans un solvant deutéré (chloroforme, DMSO, eau,...), à savoir du méthanol dans notre cas afin que les protons contenus dans celui-ci n'apparaissent pas dans le spectre de RMN ¹H et est ensuite transféré dans un tube en verre borosilicaté. Le tube est ensuite placé dans un spectromètre RMN pour y effectuer les mesures.

Les mesures de RMN présentées dans ce manuscrit (RMN monodimensionnelles du proton (¹H) et du carbone (¹³C) et RMN bidimensionnelles COSY (*Correlation Spectroscopy*) HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Coherence*), HMBC (*Heteronuclear Multiple-Bond Correlation*)) ont été effectuées au sein du Laboratoire de Méthodologie RMN de l'Université de Lorraine par Monsieur Mehdi Yemloul. L'interprétation des résultats obtenus ont été réalisés de façon totalement indépendante par les Professeurs Peter Proksch (Université de Düsseldorf – Allemagne) et Marcel Jaspars (Université de Aberdeen – Ecosse).

3.4 Lignées cellulaires cancéreuses et cellules saines

3.4.1 Lignées cancéreuses adhérentes

La lignée LNCaP androgéno-dépendante, a été établie en 1977 à partir d'une métastase située dans un ganglion lymphatique d'un homme de 50 ans présentant un adénome prostatique (Horoszewicz et al., 1983). Cette lignée se caractérise notamment par l'expression de récepteurs aux androgènes, de la protéine p53 sauvage fonctionnelle ainsi que par la non-expression de la voie Wnt.

La lignée 22rv1 androgéno-sensible, dérivée d'une xéno greffe de carcinome humain de prostate implantée dans des souris athymiques castrées (Sramkoski et al., 1999). Cette lignée se caractérise notamment par l'expression de récepteurs aux androgènes et de la protéine p53 mutée mais fonctionnelle ainsi que par une faible activation/expression de la voie Wnt.

La lignée DU145 androgéno-indépendante, établie par Stone en 1975 (Stone et al., 1978) est issue d'un tissu métastatique cérébral issu d'un patient de 69 ans atteint d'un cancer de la prostate. Cette lignée se caractérise par l'absence d'expression de récepteurs aux androgènes, par une faible réponse à l'activation de la voie Wnt ainsi que par l'expression de la protéine p53 sous forme mutée.

La lignée PC-3 androgéno – indépendante, a été établie post – mortem à partir de métastases situées dans la moelle osseuse d'un patient de 62 ans atteint d'un cancer de la prostate de grade IV (Kaighn et al., 1979) Cette lignée se caractérise par l'absence d'expression de récepteurs aux androgènes et de la protéine p53 ainsi que par une très forte réponse à l'activation de la voie Wnt.

La lignée cellulaire HT-29 a été établie en 1964 à partir d'un adénocarcinome de colon développé par une femme de 44 ans de type caucasien (Fogh and Trempe, 1975). La lignée HT-29 est connue pour exprimer deux protéines APC tronquées au niveau carboxy terminal (Morin et al., 1996).

La lignée cellulaire A549 a été isolée en 1972 à partir de la tumeur de poumon d'un homme de 58 ans de type caucasien (Giard et al., 1973).

La lignée MDA-MB-231 a été obtenue à partir de l'épanchement pleural d'une femme de 51 ans de type caucasien atteinte d'un cancer du sein (Cailleau et al., 1974).

La lignée cellulaire Saos-2 a été établie à partir du sarcome ostéogénique primaire d'une fille de type caucasien de 11 ans en 1973 (Fogh and Trempe, 1975).

3.4.2 Lignées cancéreuses en suspension

La lignée cellulaire humaine K562 (American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA)) a été établie à partir de cellules du liquide pleural d'une patiente atteinte d'une leucémie myéloïde chronique en phase blastique terminale (Lozzio and Lozzio, 1975). Ces cellules de type érythroblaste peuvent se différencier vers l'une des trois lignées circulantes suivantes: érythroblaste, granulocytaire ou monocytaire. Elle est caractérisée par la présence du chromosome de Philadelphie, anomalie cytogénétique résultant d'une translocation réciproque entre les gènes Abl du chromosome 9 et Bcr du chromosome 22. De cette fusion est synthétisée la protéine hybride Bcr – Abl à activité tyrosine kinase capable de perturber de nombreux processus cellulaires.

La lignée cellulaire HL-60 a été établie en 1976 à partir du sang périphérique d'une patiente de 35 ans atteinte d'une leucémie myéloïde aigue (Collins et al., 1977). Cette lignée se caractérise notamment par une absence des chromosomes 5 et 8 (Gallagher et al., 1979).

La lignée cellulaire Jurkat a été établie à partir du sang périphérique d'un garçon de 14 ans atteint d'une leucémie lymphoblastique aigue (Schneider et al., 1977).

La lignée cellulaire Raji a été établie à partir de la maxillaire gauche d'un enfant de type africain de 12 ans atteint d'un lymphome de Burkitt (Pulvertaft, 1964).

La lignée cellulaire U937 a été isolée en 1974 à partir d'un épanchement pleural d'un homme de 37 ans atteint d'un lymphome histiocytaire (Sundstrom and Nilsson, 1976).

3.4.3 Isolation des cellules saines

Les cellules saines (cellules mononucléaires du sang périphérique, PBMC pour *Peripheral Blood Mononuclear Cells*) ont été isolées à partir de concentrés leuco-plaquettaire gracieusement donnés par la Croix Rouge Luxembourgeoise en utilisant la méthode de centrifugation sur gradient de Ficoll (GE Healthcare, Diegem, Belgique). Un volume de 30 mL de concentré leuco-plaquettaire dilué à raison de 1/3 dans du PBS à température ambiante est délicatement déposé sur un volume de 10 mL de Ficoll. Les tubes sont ensuite mis à centrifuger pendant 30 minutes à 500 g à température ambiante. Les cellules de sang périphérique (monocytes et lymphocytes) qui se retrouvent à l'interface (la phase supérieure contenant le plasma et la phase inférieure

Les cellules mononucléaires du sang périphérique sont ensuite énumérées grâce à une lame de Malassez et mise en culture à une concentration de 4×10^6 cellules/mL dans du milieu RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*) 1640 additionné de 10% de sérum de veau fœtal (SVF) inactivé (Lonza BioWhittaker) et supplémenté d'un mélange d'antibiotiques et d'antifongiques (pénicilline 100 U/mL, streptomycine 100 µg/mL et fungizone 10 µL/mL) (Lonza BioWhittaker) dans une étuve thermostatée à 37°C, saturée en humidité et contenant 5% de CO₂.

3.4.4 Culture et entretien des différentes lignées cellulaires

La culture des différentes lignées s'effectue dans du milieu RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*) 1640 additionné de 10% de sérum de veau fœtal (SVF) inactivé (Lonza BioWhittaker) et supplémenté d'un mélange d'antibiotiques et d'antifongiques (pénicilline 100 U/mL, streptomycine 100 µg/mL et fungizone 10 µL/mL) (Lonza BioWhittaker) dans une étuve thermostatée à 37°C, saturée en humidité et contenant 5% de CO₂.

- **Lignées adhérentes**

Les cellules de cancer de la prostate, de colon, de poumon, et de sein sont des cellules adhérentes cultivées en monocouche. Ces cellules sont détachées du fond de la boîte de culture à l'aide de trypsine, une protéase à sérine capable de cliver certaines protéines de surface et de la matrice extracellulaire.

L'action de la trypsine est inactivée par l'ajout de milieu de culture et la suspension cellulaire ainsi obtenue est centrifugée à 350 g pendant 7 minutes. Le surnageant est éliminé et le culot cellulaire est remis en suspension dans du milieu de culture. La population cellulaire est

évaluée à l'aide d'un hématimètre de type Malassez et réensemencée à la concentration adéquate.

- **Lignées myéloïdes**

Les cellules HL-60, Jurkat, K562, Raji et U937 sont des cellules circulantes qui se cultivent en suspension. L'entretien de ces cellules est réalisé tous les deux à trois jours. Les cellules sont centrifugées à 350 g pendant 7 minutes à température ambiante, comptées à l'aide d'un hématimètre de type Malassez et réensemencées à une concentration de 200 000 cellules/mL.

3.5 Traitement des cellules

3.5.1 Traitement des cellules mononuclées du sang périphériques

24 heures après leur isolation et leur mise en culture, les cellules mononuclées du sang périphérique sont énumérées à l'aide d'un hématimètre de type Malassez, diluées à une concentration de 2×10^6 cellules/mL dans du milieu RPMI supplémenté avec 10% de SVF, 1% d'antibiotiques et traitées selon différentes conditions de concentration et de temps avec le composé d'intérêt. Du fait de leur impossibilité à proliférer, les expériences menées avec des cellules mononuclées du sang périphérique ne dépasseront pas une durée de plus de 48 heures.

3.5.2 Traitement des cellules cancéreuses adhérentes

La veille du traitement, les cellules cancéreuses adhérentes sont énumérées à l'aide d'un hématimètre de type Malassez et réensemencées à la concentration adéquate. Le jour du traitement, le milieu est éliminé et est remplacé par du milieu frais (RPMI supplémenté avec 10% de SVF, 1% d'antibiotiques). Les cellules adhérentes, en phase exponentielle de croissance, sont incubées en présence de différentes concentrations de composé pour différentes durées de traitement, allant jusqu'à une durée maximale de 72 heures.

3.5.3 Traitement des cellules cancéreuses en suspension

La veille du traitement, les cellules cancéreuses en suspension sont énumérées à l'aide d'un hématimètre de type Malassez et réensemencées à une concentration de 2×10^5 cellules/mL. Le jour du traitement, les cellules cancéreuses sont remises en phase exponentielle de croissance (2×10^5 cellules/mL) dans un milieu frais (RPMI supplémenté avec 10% de SVF, 1% d'antibiotiques). Les cellules sont ensuite incubées en présence de différentes

concentrations de composé pour différentes durées de traitement, allant jusqu'à une durée maximale de 72 heures.

L'effet des traitements a été comparé aux échantillons contrôles, c'est à dire traités avec un volume identique de solvant seul, le diméthylsulfoxyde (DMSO).

Les cellules traitées ou non, sont ensuite utilisées directement (viabilité, transfection, microscopie, cytométrie en flux) ou récupérées en culot cellulaire en vue de l'extraction ultérieure des protéines ou des acides nucléiques.

3.6 Evaluation de la viabilité cellulaire par le test d'exclusion au bleu trypan

La viabilité cellulaire a été évaluée par le test d'exclusion au bleu trypan après traitement des cellules avec différentes concentrations de produit et pendant différents temps. Seules les cellules mortes, ayant perdu leur intégrité membranaire, sont colorées par le bleu trypan alors que les cellules vivantes restent imperméables à ce colorant. Les cellules négatives et positives au bleu trypan sont dénombrées à l'aide d'un hématimètre de type Malassez. Cette technique permet à la fois de déterminer la cytotoxicité d'un composé mais également d'analyser la prolifération cellulaire.

3.7 Extraction et dosage des protéines

3.7.1 Récupération des culots cellulaires

Après traitement, le milieu de culture ainsi que les cellules détachées par grattage dans du PBS (*Phosphate Buffered Saline*) froid, dans le cas de cellules adhérentes ; sont collectés et centrifugés pendant 7 minutes à 290 g à température ambiante. Les culots cellulaires sont repris dans 800 µL de PBS froid et centrifugés pendant 4 minutes à 400 g. Après élimination du surnageant, les culots secs sont conservés à -20°C jusqu'au jour de leur utilisation.

Ces échantillons serviront pour les extractions d'ARN (RT – PCR) et des facteurs protéiques totaux, nucléaires et cytoplasmiques (Western – Blot).

3.7.2 Extraction des protéines totales

Les facteurs nucléaires et cytoplasmiques sont extraits à partir de culots cellulaires par lyse à l'aide d'un tampon composé de M – PER (*Mammalian Protein Extraction Reagent*) (Perbio)

(solution hypertonique), d'inhibiteurs de protéases « cOmplete » (Roche) et de phosphatases « PhosSTOP » (Roche) (Tableau 3).

Tableau 3 : Composition du tampon utilisé pour l'extraction des protéines totales.

	Concentration finale	Volume à ajouter pour 1mL de tampon
Orthovanadate de sodium	1 mM	/
Fluorure de sodium	5 mM	/
PMSF (200 nM)	1 mM	5 µL
PhosSTOP 10X	/	100 µL
cOmplete 25X	/	40 µL
M – PER	/	Qsp 1 mL

Les culots, ainsi remis en suspension, sont mis sous agitation à 4°C pendant 10 minutes, puis centrifugés à 14 000 rcf pendant 15 minutes à 4°C afin d'éliminer les débris cellulaires. Le surnageant contenant les protéines totales est conservé à -80°C (Figure 28).

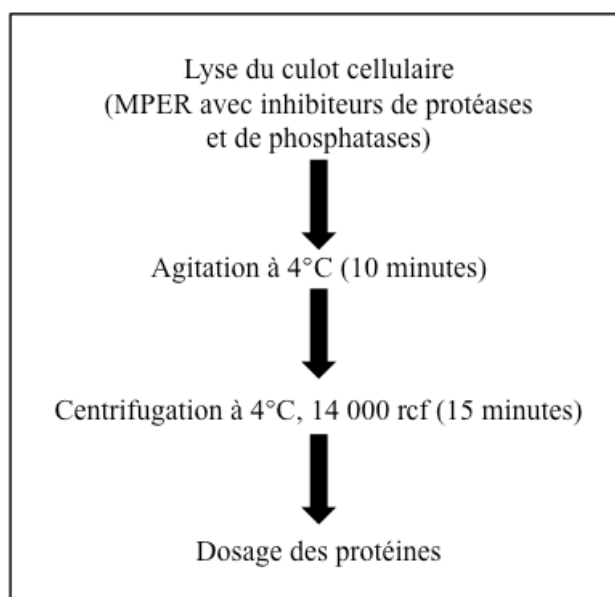


Figure 28 : Schéma récapitulatif du protocole d'extraction des protéines totales.

3.7.3 Extraction des facteurs nucléaires et cytoplasmiques

Les facteurs nucléaires et cytoplasmiques sont extraits à partir de culots cellulaires traités ou non, selon la méthode décrite par Schreiber *et al.* (Schreiber et al., 1989). Les culots sont remis en suspension dans du tampon A (Tableau 4) additionné d'inhibiteur de phosphatases « PhosSTOP » (Roche) et incubés sur la glace pendant 15 minutes. Après l'ajout d'IGEPAL, un détergent non-ionique, les échantillons sont centrifugés à 16 000 g à 4°C pendant 30 secondes. Le surnageant contenant les facteurs cytoplasmiques est récupéré et stocké à -80°C. Les culots, remis en suspension dans du tampon C (Tableau 4) en présence d'inhibiteurs de phosphatases « PhosSTOP » (Roche), sont mis sous agitation pendant 15 minutes à 4°C, puis centrifugés pendant 5 minutes à 9 000 g à 4°C. Le surnageant, contenant les protéines nucléaires, est récupéré et conservé à -80°C (Figure 29).

Le dosage de la quantité de protéines contenues dans chaque échantillon est déterminé par la méthode de Bradford (Bradford, 1976).

Tableau 4 : Composition des tampons A et C utilisés pour l'extraction des facteurs cytoplasmiques et nucléaires.

	Tampon A	Tampon C
Hepes pH 7,9	10 mM	20 mM
KCl	10 mM	/
NaCl	/	0,4 M
EDTA	0,1 mM	1 mM
EGTA	0,1 mM	1 mM
DTT	1 mM	1 mM
PMSF	0,5 mM	1 mM
O – Phenanthroline	1 mM	1 mM
Aprotinine	2 µg/mL	2 µg/mL
Leupeptine	30 µg/mL	30 µg/mL
Pepstatine	15 µg/mL	15 µg/mL
Glycérol	/	4%
Eau mQ	Qsp 10 mL	Qsp 10 mL

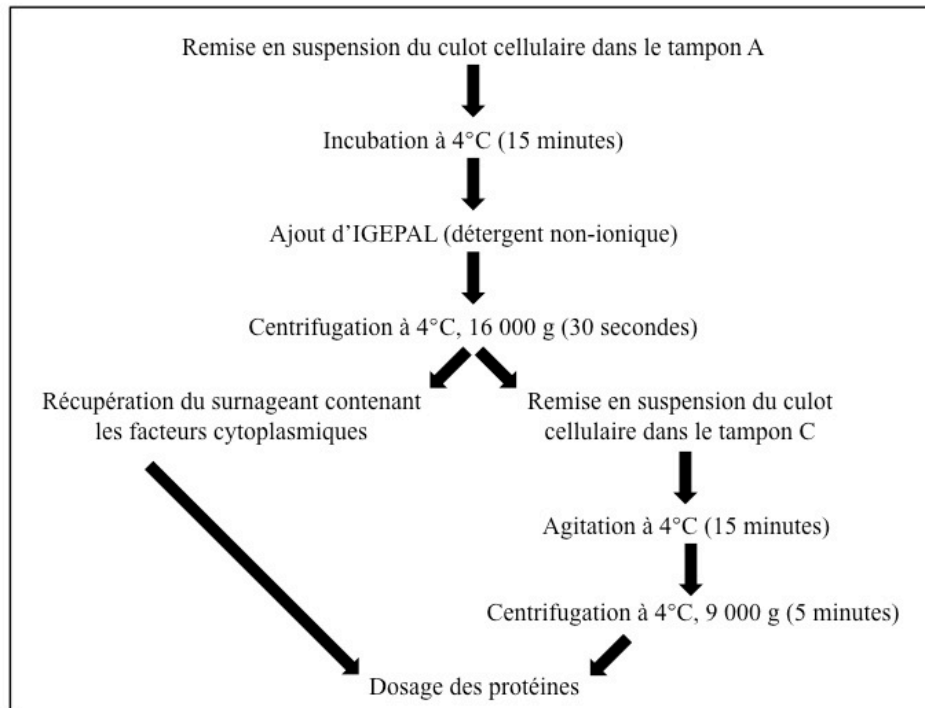


Figure 29 : Schéma récapitulatif du protocole d'extraction des protéines nucléaires et cytoplasmiques.

3.8 Analyse de l'expression des protéines par Western – Blot

Le Western – Blot (ou immunoblot) est une technique permettant de mettre en évidence la présence et le niveau d'expression de protéines dans les extraits protéiques. Les protéines sont tout d'abord séparées selon leur poids moléculaire par électrophorèse sur gel de polyacrylamide SDS – PAGE (*SDS – PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*). La protéine d'intérêt est ensuite détectée par l'utilisation d'un anticorps spécifique (Burnette, 1981; Renart et al., 1979).

3.8.1 Préparation des échantillons

Un volume d'extraits protéiques comprenant une quantité donnée de protéines additionnées de dodécylsulfate de sodium (SDS) est mélangé à volume équivalent de « loading buffer ». Le SDS charge négativement les protéines. Le « loading buffer », est quant à lui, composé de β – mercaptoéthanol, glycérol et de bleu de bromophénol. Ces composés servent, respectivement à dénaturer les structures secondaires des protéines par réduction des ponts disulfures, à faciliter le dépôt des échantillons dans les puits et à permettre de visualiser la migration des protéines dans le gel.

La dénaturation des échantillons est réalisée par chauffage à 100°C pendant 5 minutes.

3.8.2 Migration et préparation des échantillons

Les échantillons protéiques sont chargés dans le gel d'électrophorèse composé du gel de concentration permettant de concentrer les protéines et du gel de séparation qui permet, quant à lui, de séparer les protéines en fonction de leur poids moléculaire. La migration se fait sous un courant constant de 200 volts pendant 1 heure dans du tampon d'électrophorèse 1X.

Après migration, les protéines sont transférées sur une membrane de PVDF (Polyfluorure de vinylidène), préalablement activée par du méthanol et du tampon de transfert 1X. Après le transfert sous voltage constant (100 volts) pendant au moins 40 minutes, la membrane est saturée en protéines dans une solution de tampon PBS – Tween (PBS – T) contenant du lait ou de la BSA (voir Tableau 5 pour les conditions). Les membranes sont ensuite incubées en présence de l'anticorps primaire dilué dans du PBS – T lait ou de PBS – T BSA selon l'anticorps. Après lavage dans du PBS – T, la membrane est incubée en présence d'un anticorps secondaire spécifique couplé à un enzyme (peroxydase de raifort) et dilué à la concentration voulue dans du PBS – T lait 5%. Les concentrations et les conditions d'incubation des anticorps sont répertoriées dans le tableau suivant (Tableau 5).

Tableau 5 : Tableau des conditions d'incubation des anticorps primaires et secondaires utilisés pour les expériences de Western – Blot.

Protéine ciblée	Fournisseur	Origine animale	Conditions d'incubation	
			Anticorps primaire	Anticorps secondaire
Actine β	Sigma Aldrich # A5441	Souris	1/ 20 000 PBS-T lait 5% 1h à température ambiante	1/ 20 000 PBS-T lait 5% 1h à température ambiante
AMPK α	Cell Signaling # 2603	Lapin	1/1000 PBS-T BSA 5% 1 nuit à 4°C	1/ 4 000 PBS-T BSA 5% 1h à température ambiante
Phospho – AMPK α (Thr 172)	Cell Signaling # 2535	Lapin	1/1000 PBS-T BSA 5% 1 nuit à 4°C	1/ 4 000 PBS-T BSA 5% 1h à température ambiante
β -caténine	Cell Signaling # 9582	Lapin	1/ 1 000 PBS-T lait 5% 1 nuit à 4°C	1/ 2 000 PBS-T lait 5% 1h à température ambiante
Bcl-xL	BD Biosciences # 610212	Lapin	1/ 1 000 PBS-T lait 5% 1 nuit à 4°C	1/ 4 000 PBS-T lait 5% 1h à température ambiante
c-myc	BD Biosciences # 551101	Souris	1/250 PBS-T lait 5% 1h à température ambiante	1/ 1 000 PBS-T lait 5% 1h à température ambiante
Caspase 3	Santa Cruz SC 56053	Souris	1/ 1 000 PBS-T lait 5% 1 nuit à 4°C	1/ 4 000 PBS-T lait 5% 1h à température ambiante
Caspase 7	Cell Signaling # 9494	Souris	1/ 1 000 PBS-T lait 5% 1 nuit à 4°C	1/ 2 000 PBS-T lait 5% 1h à température ambiante
Caspase 8	Cell Signaling # 9746	Souris	1/1000 PBS-T BSA 5% 1 nuit à 4°C	1/ 4 000 PBS-T lait 5% 1h à température ambiante
Caspase 9	Cell Signaling # 9502	Lapin	1/ 1 000 PBS-T lait 5% 1 nuit à 4°C	1/ 5 000 PBS-T lait 5% 1h à température ambiante

CBP	Santa Cruz SC 369	Souris	1/ 500 PBS-T lait 5% 1 nuit à 4°C	1/ 6 000 PBS-T BSA 5% 1h à température ambiante
Cycline B1	Millipore #05-372	Souris	1/ 1 000 PBS-T lait 5% 1 nuit à 4°C	1/ 4 000 PBS-T BSA 5% 1h à température ambiante
Cycline D1	Santa Cruz SC 718	Lapin	1/ 2 000 PBS-T lait 5% 1 nuit à 4°C	1/ 4 000 PBS-T lait 5% 1h à température ambiante
FOXO3	Bethyl Laboratories	Lapin	1/ 10 000 PBS-T BSA 5% 1h à température ambiante	1/ 10 000 PBS-T BSA 5% 1h à température ambiante
GST- π	BD Biosciences 610718	Souris	1/ 10 000 PBS-T lait 5% 1h à température ambiante	1/ 10 000 PBS-T lait 5% 1h à température ambiante
JNK	Santa Cruz SC 571	Lapin	1/ 1 000 PBS-T lait 5% 1h à température ambiante	1/ 4 000 PBS-T lait 5% 1h à température ambiante
Phospho – JNK	Cell Signaling # 9251S	Lapin	1/1000 PBS-T BSA 2,5% 1 nuit à 4°C	1/4 000 PBS-T BSA 2,5% 1h à température ambiante
LC3B	Sigma 7543	Lapin	1/ 1 000 PBS-T lait 5% 2h à température ambiante	1/ 5 000 PBS-T lait 5% 1h à température ambiante
Mcl-1	Cell Signaling # 4572S	Lapin	1/1000 PBS-T BSA 5% 1 nuit à 4°C	1/4 000 PBS-T lait 5% 1h à température ambiante
Nrf2	Santa Cruz SC 722	Lapin	1/ 500 PBS-T lait 5% 1 nuit à 4°C	1/1 000 PBS-T lait 5% 1h à température ambiante
p38	Santa Cruz SC 7972	Lapin	1/2000 PBS-T BSA 5% 1 nuit à 4°C	1/5 000 PBS-T BSA 5% 1h à température ambiante
Phospho – p38	Cell Signaling # 9211S	Lapin	1/2000 PBS-T BSA 5% 1 nuit à 4°C	1/4 000 PBS-T BSA 5% 1h à température ambiante

p300	Millipore #05-257	Souris	1/ 500 PBS-T lait 5% 1 nuit à 4°C	1/ 2 500 PBS-T lait 5% 1h à température ambiante
PARP	Santa Cruz SC 7150	Lapin	1/ 2 000 PBS-T lait 5% 1 nuit à 4°C	1/ 5 000 PBS-T lait 5% 2h à température ambiante
PCNA	Santa Cruz SC 9857	Lapin	1/20 000 PBS-T lait 5% 1 nuit à 4°C	1/30 000 PBS-T lait 5% 1h à température ambiante
Phospho- histone H3	Millipore #06-570	Lapin	1/1000 PBS-T BSA 5% 1 nuit à 4°C	1/ 2 000 PBS-T lait 5% 1h à température ambiante
Survivine	R&D system # AF886	Lapin	1/ 2 000 PBS-T lait 5% 1 nuit à 4°C	1/ 6 000 PBS-T BSA 5% 1h à température ambiante
Tcf-4	Cell Signaling # 2569S	Lapin	1/1 000 PBS-T BSA 5% 1 nuit à 4°C	1/ 2 000 1h à température ambiante

Les membranes sont lavées dans du tampon PBS – T puis mises en présence du substrat de la peroxydase «ECL Plus» (Amersham Biosciences) qui sera transformé par l'enzyme en un produit chimioluminescent qui pourra être détecté après exposition sur un film photographique (Amersham Hyperfilm ECL, GE Healthcare) ou par une caméra (ImageQuant LAS 4000 Mini, GE Healthcare).

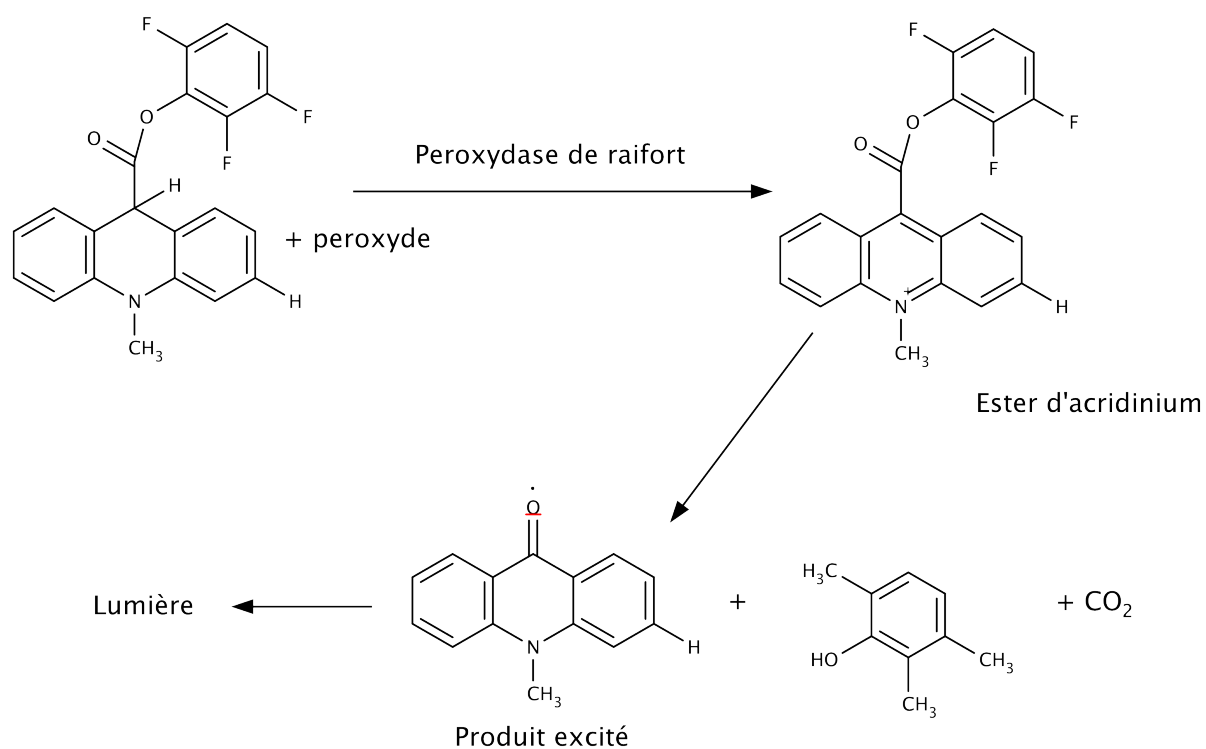


Figure 30 : Schéma réactionnel du kit «ECL Plus» (Amersham Biosciences).

La réaction enzymatique du kit «ECL Plus» (Amersham Biosciences) permet la formation d'un produit chimioluminescent pouvant être détecté après exposition sur un film photographique ou à l'aide d'une caméra.

3.9 Transfections transitoires

La technique de transfection transitoire réalisée par électroporation à l'aide du système « Gene Pulser II » (Biorad), applique une décharge électrique qui induit la formation de pores membranaires, par lesquels l'ADN plasmidique pénètre à l'intérieur de la cellule (Figure 31).

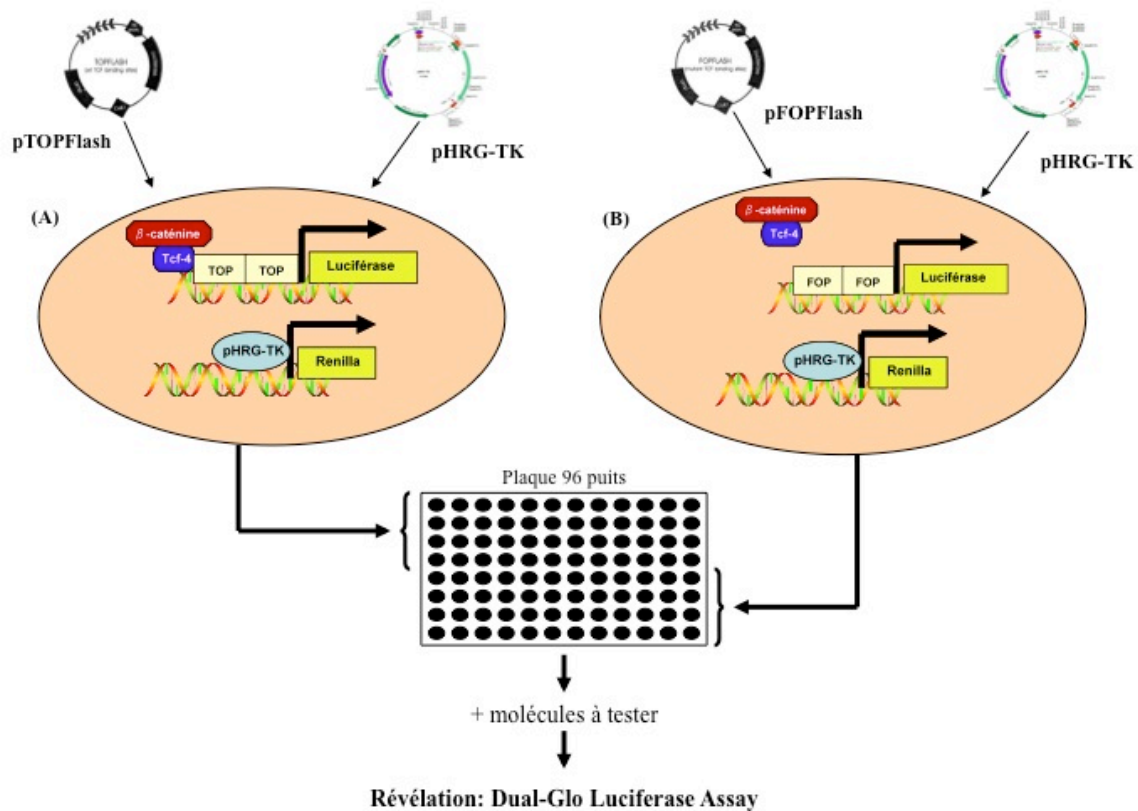


Figure 31 : Principe de la transfection transitoire selon Barket *et al.* (Barker and Clevers, 2006).

Pour chaque transfection, 3,75 millions de cellules sont électroporées en présence de 5 µg de plasmide d'intérêt et 5 µg de plasmide standardisant pHRG – TK (Promega) exprimant la luciférase Rénilla à taux constant. Les plasmides rapporteurs utilisés sont les plasmides pTOPFlash (TOP) (Référence 21-170, Upstate Bioguest) et pFOPFlash (FOP) (Référence 21-169, Upstate Bioguest), dont le gène rapporteur luciférase est placé sous la dépendance d'un promoteur thymidine kinase en amont duquel se trouvent trois copies de site de liaison sauvage ou muté pour le facteur de transcription Tcf-4. Le vecteur d'expression S33Y code, quant à lui pour une forme tronquée de la β-caténine dans laquelle la sérine en position 33 est substituée par une tyrosine (Figure 32).

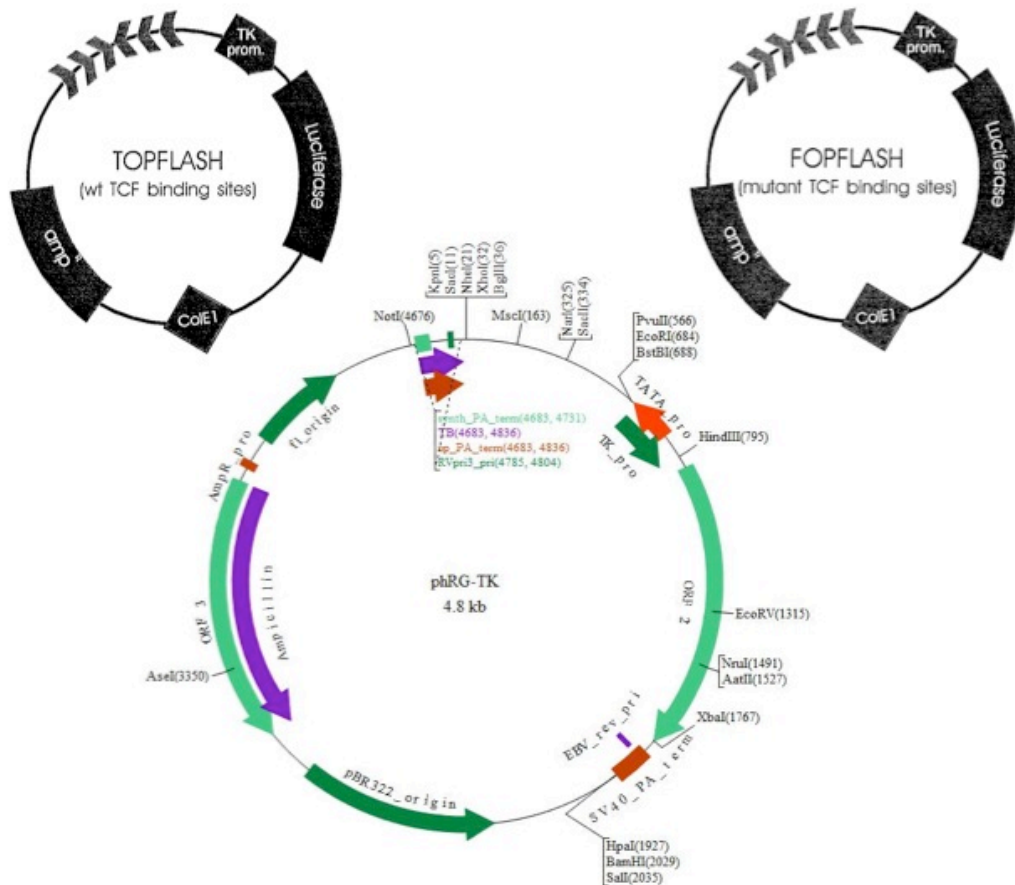


Figure 32 : Cartes des plasmides pTOPFlash, pFOPFlash et phRG-TK.

L'électroporation est effectuée sous courant (250 V/cm) et fréquence (975 µF) constants. 48 heures après transfection, les cellules sont traitées avec différentes concentrations de curcumine pendant 24 heures. A l'issue du traitement, les activités luciférase et Rénilla sont mesurées grâce au système « Dual – Glo Luciferase assay » (Promega) (

Figure 33) sur un luminomètre (Berthold). Le rapport de l'activité luciférase Firefly par rapport à l'activité luciférase Rénilla est calculé pour les deux types de transfection TOP et FOP, puis les résultats sont exprimés en ration TOP/FOP.

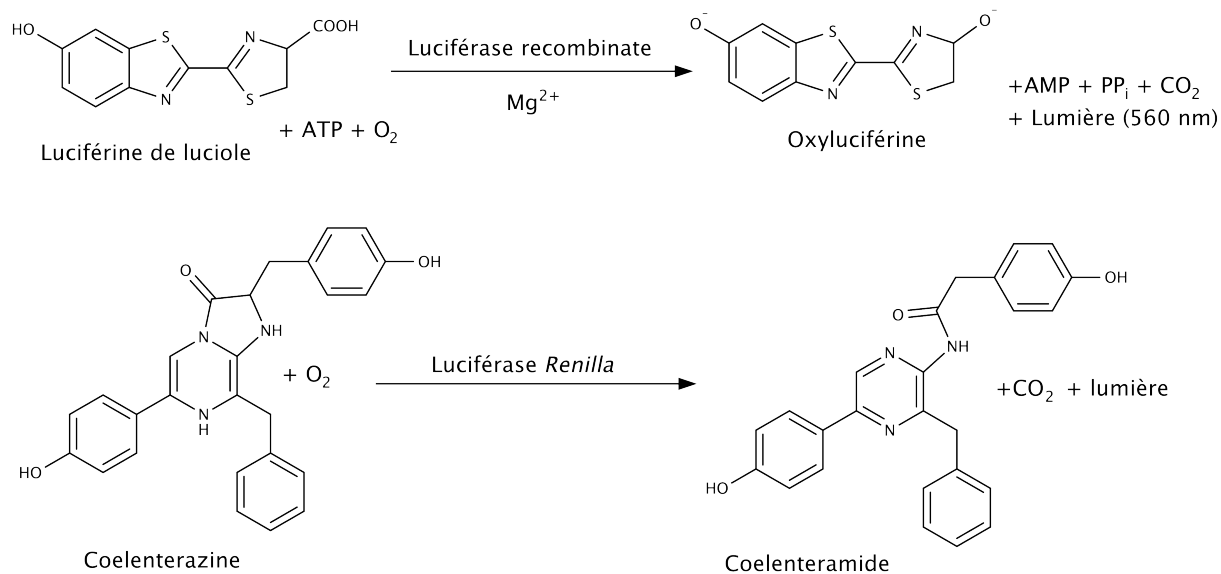


Figure 33 : Principe de fonctionnement du kit « Dual-Glo Luciferase assay » (Promega).

3.10 Cytométrie en flux

La cytométrie de flux est une technique de caractérisation qualitative et quantitative de cellules ou molécules entrainées par un flux liquide jusqu'à un faisceau laser. La lumière réémise par diffusion ou fluorescence permet de quantifier de façon relative un marqueur et/ou de classer une population cellulaire selon des critères pré-établis.

3.10.1 Analyse du type de mort cellulaire

L'analyse du type de mort cellulaire par cytométrie de flux (FACSCalibur, Becton Dickinson, San José, USA) a été réalisée sur des cellules traitées et marquées par la suite avec de l'iodure de propidium (marqueur de la nécrose) et de l'annexine V couplée à un marqueur, le FITC (*Fluoresceine isothiocyanate*). L'annexine V possède une affinité vis – à – vis de la phosphatidylsérine, un phospholipide connue pour étant localisée sur la membrane externe des cellules engagées dans la voie par mort par apoptose.

Brièvement, après traitement, 1 million de cellules à analyser sont lavées deux fois avec du PBS froid et remis en suspension dans du tampon de fixation. Les cellules sont ensuite mises à incuber à température ambiante pendant 15 minutes à l'obscurité avec de l'iodure de propidium et de l'annexine V couplée à du FITC. Les différents échantillons sont ensuite

analysés par cytométrie en flux. L'analyse de cytométrie en flux est réalisée à l'aide du logiciel « Cell Quest » pour 10 000 événements/échantillon. Les données obtenues sont ensuite analysées avec l'aide du logiciel « FlowJo 8.8.7».

3.10.2 Analyse du cycle cellulaire

L'analyse du cycle cellulaire par cytométrie de flux (FACSCalibur, Becton Dickinson, San José, USA) a été réalisée selon la procédure standard de marquage à l'iodure de propidium, un agent intercalant de l'ADN (Gray and Coffino, 1979). Après les différents traitements avec différentes concentrations de composé et à différents temps, les cellules sont lavées avec du PBS froid puis fixées avec une solution froide d'éthanol à 70% pendant 30 minutes. L'ADN est ensuite marqué à l'iodure de propidium (1 µg/mL) dans une solution de PBS contenant de la ribonucléase A (100 µg/mL). Les événements sont analysés statistiquement à l'aide du logiciel « Cell Quest » puis à l'aide du logiciel « FlowJo 8.8.7».

3.10.3 Analyse de l'incorporation intra – cellulaire de plumbagine

L'incorporation dans les cellules U937 et Raji de la molécule fluorescente plumbagine a été effectuée par cytométrie en flux (FACSCalibur, Becton Dickinson, San José, USA). Les cellules sont traitées par la plumbagine pendant 15, 30, 45, 60, 90 et 120 minutes et puis une population d'environ 800 000 individus est prélevée, centrifugée, remise en suspension dans du milieu sans plumbagine et passée au cytomètre de flux après (Figure 34). L'analyse de cytométrie en flux est réalisée à l'aide du logiciel « Cell Quest » pour 10 000 événements/échantillon. Les données obtenues sont ensuite analysées avec l'aide du logiciel « FlowJo 8.8.7».

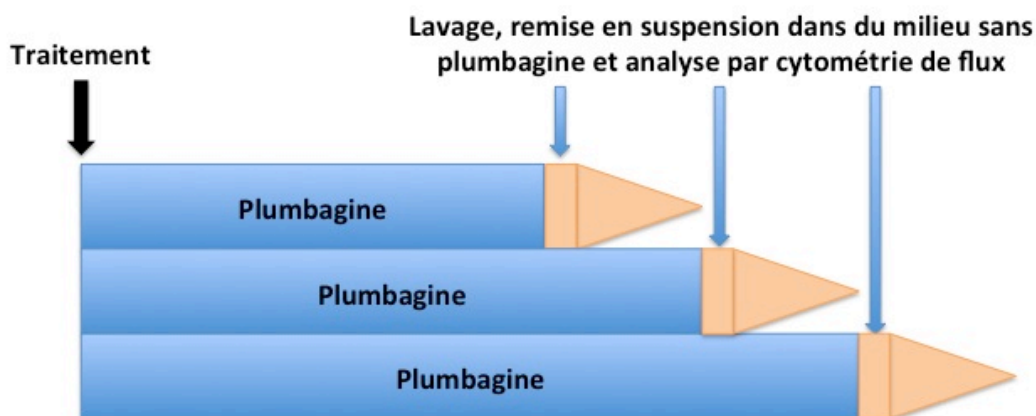


Figure 34 : Représentation schématique du principe de l'analyse de l'efflux de plumbagine.

3.10.4 Analyse de l'efflux de la plumbagine

L'analyse de l'efflux de la plumbagine dans les cellules U937 et Raji a été effectuée par cytométrie en flux (FACSCalibur, Becton Dickinson, San José, USA). Les cellules sont incubées pendant 30 minutes avec de la plumbagine, centrifugées et resuspendues dans du milieu sans plumbagine. A ce moment ($t = 0$) et après 15, 30, 60 et 90 minutes, une population d'environ 800 000 individus est prélevée et passée au cytomètre en flux. L'analyse de cytométrie de flux est réalisée à l'aide du logiciel « Cell Quest » pour 10 000 événements/échantillon. Les données obtenues sont ensuite analysées avec l'aide du logiciel « FlowJo 8.8.7 ».

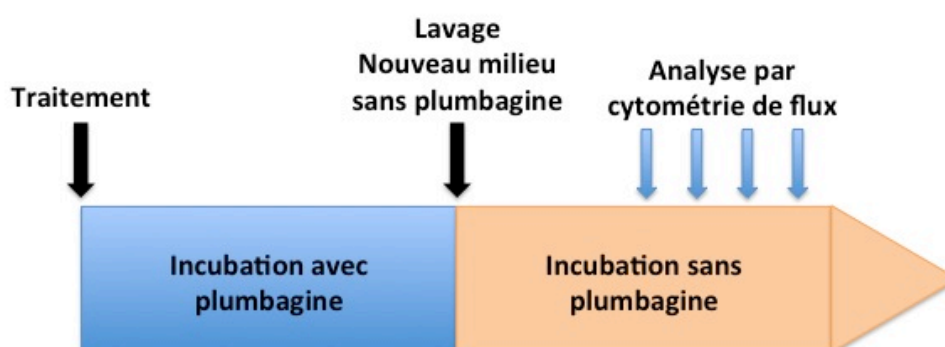


Figure 35 : Représentation schématique du principe de l'analyse de l'efflux de plumbagine.

3.10.5 Analyse de la génération d'espèces réactives de l'oxygène

L'analyse de la génération d'espèces réactives de l'oxygène a été réalisée grâce à l'utilisation d'une sonde, le diacétate de 2',7' dichlorofluorescéine (H₂DCFDA) (Rota et al., 1999). Hors de la cellule, le H₂DCFDA est non-fluorescent mais une fois qu'il a pénétré dans la cellule, il est la cible d'estérases qui le déacétylent en dichlorofluorescéine non – fluorescente (DCFH). Celle – ci est ensuite oxydée par les ERO en dichlorofluorescéine fluorescente (DCF) (Figure 36).

Les cellules U937 et Raji, pré – traitées ou non à la NAC (10 mM, 24 heures) sont traitées par la plumbagine pendant 15, 30, 45, 60 et 120 minutes. 20 minutes avant la fin du traitement, les cellules sont marquées avec 10 µM de H₂DCFDA (D-399, Life technologies Invitrogen, Gent, Belgique) pendant 20 minutes, à l'abri de la lumière et à une température de 37°C. Les différents échantillons sont ensuite analysés par cytométrie en flux (FACSCalibur, Becton Dickinson, San José, USA). L'analyse de cytométrie en flux est réalisée à l'aide du logiciel « Cell Quest » pour 10 000 événements/échantillon. Les données obtenues sont ensuite analysées avec l'aide du logiciel « FlowJo 8.8.7 ».

Des cellules Raji et U937 dans lesquelles le niveau d'ERO a été induit par un traitement de 50 µM de H₂O₂ pendant 15 ou 30 minutes ont servi de contrôle positif.

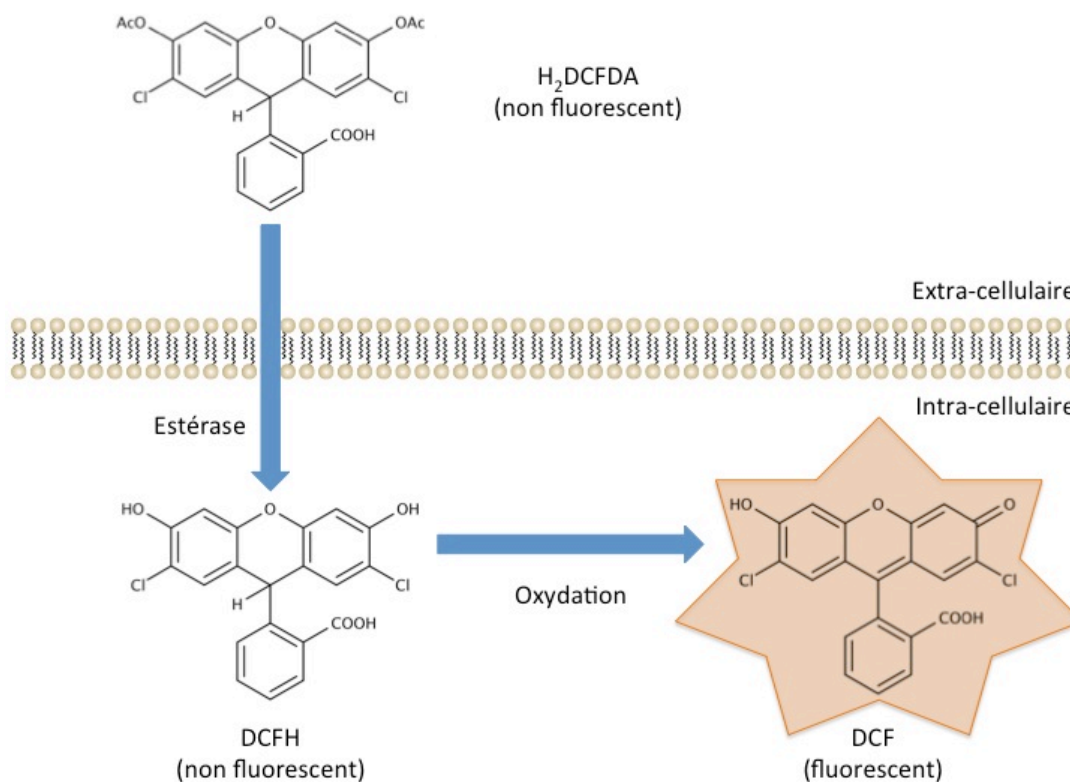


Figure 36 : Principe de fonctionnement de la sonde diacétate de dichlorofluorescéine.

La sonde non – fluorescente diacétate de dichlorofluorescéine (H₂DCFDA) pénètre dans la cellule où sous l’action d’estérases, elle est déacétylée en DCFH. Cette molécule est ensuite oxydée par les ERO en une molécule fluorescente (DCF).

3.11 Microscopie à fluorescence

- **Localisation et incorporation de composés naturellement fluorescents**

L’étude de l’incorporation et de la localisation intracellulaire des composés naturels étudiés présentant une fluorescence propre, a été réalisée à l’aide d’un microscope à fluorescence « Cell M » (Olympus).

Les cellules sont traitées pendant le temps désiré avec une concentration défini du composé étudié puis à la fin du traitement, les cellules sont marquées à l’obscurité avec 100 µM d’une solution de Hoechst 33342, un agent intercalant colorant spécifiquement le noyau pendant 20 minutes à 37°C.

A la fin de l’incubation, les cellules sont lavées et centrifugées pendant 4 minutes à 400 g, le surnageant est éliminé et le culot cellulaire est repris dans un petit volume de milieu et étalé entre lame et lamelle pour être observé au microscope à fluorescence.

- **Analyse du type de mort cellulaire induit**

L'analyse du type de mort cellulaire induit après traitement a été réalisée par l'observation morphologique et le profil d'incorporation des différents marqueurs de l'apoptose et de la nécrose, à savoir respectivement le Hoechst et l'iodure de propidium.

Les cellules sont traitées suivant les différentes conditions voulues et incubées avec 100 μM d'une solution de Hoechst 33342 pendant 20 minutes à 37°C. On ajoute ensuite 1 $\mu\text{g/mL}$ d'une solution d'iodure de propidium (Sigma – Aldrich).

Les cellules sont ensuite directement centrifugées pendant 4 minutes à 400 g, le surnageant est éliminé et le culot cellulaire est repris dans un petit volume de milieu puis étalé entre lame et lamelle pour être observé au microscope à fluorescence (Cell M Olympus).

3.12 Mesure du niveau de glutathion cellulaire

La mesure du niveau intra – cellulaire en glutathion (GSH) a été menée avec la sonde fluorescente o – phtalaldéhyde (OPA) (Life technologies Invitrogen, Gent, Belgique).

Brièvement, les cellules Raji et U937 ont été traitées par la plumbagine pendant 1 heure. Des cellules des mêmes lignées traitées par H_2O_2 (50 μM , 15 minutes) ont servi de contrôle positif pour la déplétion du GSH.

A la fin du traitement, les cellules sont lavées avec du PBS et incubées 50 μM de OPA pendant 20 minutes. La fluorescence émise par la sonde OPA est ensuite mesurée par spectrofluorimétrie (SpectraMax Geminiem, Molecular Devices, Belgique).

3.13 PCR quantitative en temps réel

La PCR quantitative en temps réel est une méthode qui permet de quantifier en temps réel l'amplification d'une séquence d'intérêt.

Cette technique s'effectue en plusieurs étapes. La première étape consiste à extraire les ARN totaux des cellules. Ensuite vient une étape de conversion des ARN messagers (ARNm) en ADN complémentaire (ADNc) grâce à une réaction de transcription inverse. Et enfin, les ADNc d'intérêt sont amplifiés et quantifiés par une méthode faisant intervenir un marqueur moléculaire fluorescent.

3.13.1 Extraction des ARN totaux

Les acides nucléiques sont extraits à partir des culots cellulaires grâce au kit « Nucleospin RNA II » (Macherey – Nagel). Après traitement, les cellules sont lysées dans un tampon contenant des agents chaotropes qui permettent la rétention des acides nucléiques sur la

matrice de silice ainsi que l'inactivation des ribonucléases. L'ADN est dégradé par l'ajout de désoxyribonucléase. Après une série de plusieurs lavages réalisés afin d'éliminer les contaminants cellulaires, les ARN totaux sont élués de la matrice avec de l'eau et dosés grâce à un spectrophotomètre (nanodrop) à 260 nm. La qualité des ARN totaux est estimée grâce au ratio des absorbances 260 nm/280 nm de Warburg – Christian.

3.13.2 Transcription inverse

La réaction de transcription inverse permet de synthétiser un ADN complémentaire double brin à partir de l'ARNm précédemment extrait. Cette méthode est réalisée à l'aide de reverse transcriptase, d'oligomères polydT et d'un mix d'oligonucléotides. Cette étape est effectuée grâce au kit « SuperScript First-strand Synthesis System for RT-PCR » (Invitrogen). La première étape consiste à hybrider des amorces polydT sur les brins d'ARN messagers à 70°C pendant 10 minutes. La synthèse proprement dite des ADNc est ensuite réalisée pendant 90 minutes à 42°C puis l'enzyme est ensuite inactivée (15 minutes à 70°C). Les ARNs sont alors dégradés par l'ajout de ribonucléase H (20 minutes à 37°C) et les ADNc sont stockés à -80°C.

3.13.3 PCR quantitative en temps réel

Les ADNc sont amplifiés par PCR à l'aide d'amorces spécifiques des séquences d'intérêt, d'un mix d'oligonucléotides et sont quantifiés par la méthode du SYBR® Green (Power SYBR Green PCR Master mix 1X, Applied Biosystems) (Figure 37). Les séquences des amorces spécifiques utilisées sont présentées dans le tableau ci – dessous (Tableau 6).

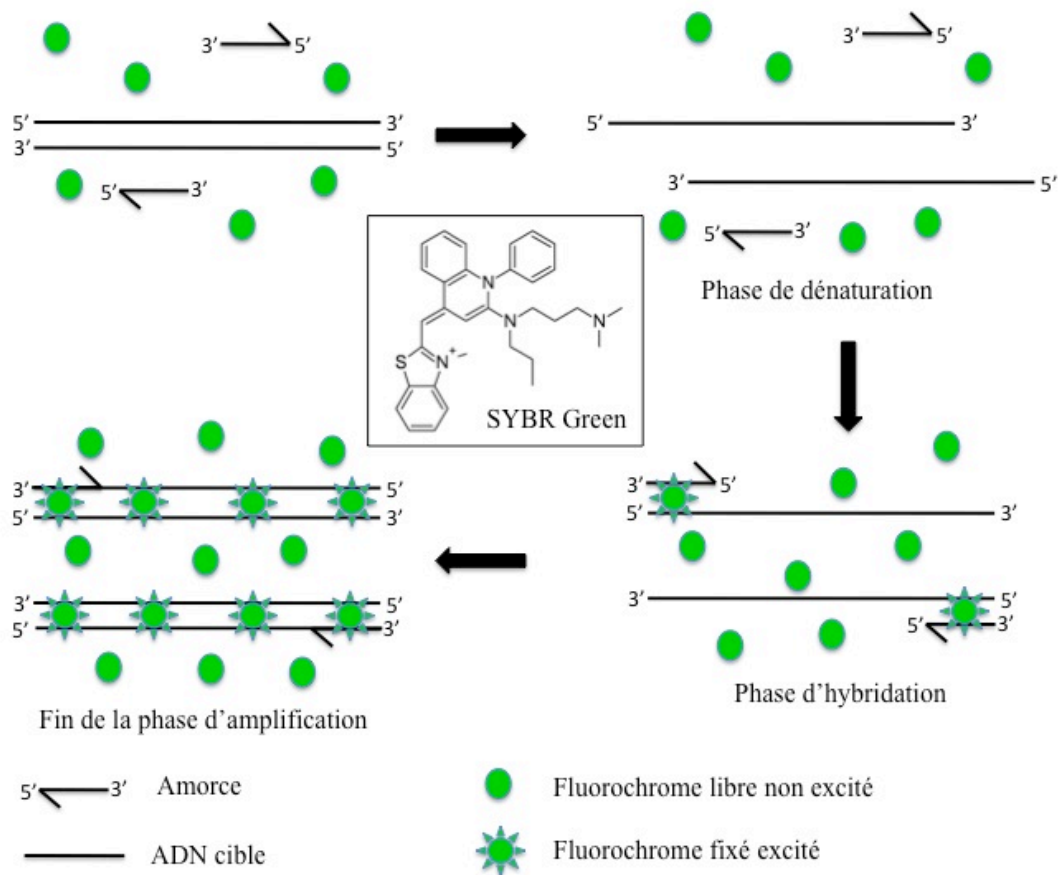


Figure 37 : Principe de fonctionnement du SYBR[®] Green.

La molécule SYBR[®] Green est une molécule dont la fluorescence augmente fortement lorsqu'elle se retrouve intercalée entre deux brins d'ADN. La fluorescence émise lue à la fin de la phase d'amplification est proportionnelle à la quantité d'ADN double brin.

Tableau 6 : Séquences des amorces oligonucléotidiques utilisées lors des expériences de PCR quantitative en temps réel. La taille des amplicons obtenus est renseignée en paire de base (pdb).

ARNm	Orientation	Séquence	Taille de l'amplicon (pdb)
Actine β	Sens	CTCTTCCAGCCTTCCTTCCT	116
	Anti – sens	AGCACTGTGTTGGCGTACAG	
c-myc	Sens	TGCTCCATGAGGAGACACC	73
	Anti – sens	TCGATTTCTTCCTCATCTTCTTG	
Cycline B1	Sens	CACTTCCTTCGGAGAGCATC	117
	Anti – sens	AGAAGGAGGAAAGTGCACCA	
Cycline D1	Sens	CGTGGCCTCTAAGATGAAGG	127
	Anti – sens	CCACTTGAGCTTGTTCACCA	
PCNA	Sens	GGCGTGAACCTCACCAGTAT	91
	Anti – sens	AGGTATCCGCGTTATCTTCG	

L'amplification et la mesure de fluorescence correspondante sont effectuées par un appareil à PCR en temps réel « 7300 Real – Time PCR System » (Applied Biosystems). Après une phase d'activation de la polymérase (10 minutes à 95°C), l'amplification est réalisée par 40 répétitions du même cycle. Un cycle complet comporte une étape initiale de dénaturation (15 secondes à 95°C) suivie des phases d'hybridation et d'élongation (60 secondes à 60°C). La quantification relative est réalisée selon la méthode des $\Delta\Delta Ct$ (Livak and Schmittgen, 2001). Le seuil est défini de façon automatique par le logiciel « 7300 System SDS Software » (Applied Biosystems), ce qui détermine les différents Ct (nombre de cycles nécessaires pour atteindre ce seuil). La normalisation est effectuée par rapport au standard interne, l'actine β . Les valeurs de ΔCt et $\Delta\Delta Ct$ sont calculées selon les équations suivantes (Figure 38):

$$\Delta Ct_{\text{contrôle}} = Ct_{\text{gène d'intérêt}} - Ct_{\text{actine}}$$
$$\Delta Ct_{\text{expérience}} = Ct_{\text{gène d'intérêt}} - Ct_{\text{actine}}$$
$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{contrôle}} - \Delta Ct_{\text{expérience}}$$
$$2^{\Delta\Delta Ct} = \text{Variation d'ADN}$$

Figure 38 : Equations utilisées pour le calcul des valeurs de ΔCt et $\Delta\Delta Ct$.

3.14 Statistiques

Les résultats représentatifs d'au moins trois expériences indépendantes ont été analysés statistiquement afin de mettre en évidence les différences significatives entre les échantillons en utilisant un test t de Student pour échantillons indépendants. Les seuils de significativité utilisés sont de $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) et, $p < 0,001$ (***)

4. Résultats

4.1 Effet de la curcumine sur la voie Wnt dans le cancer de la prostate

4.1.1 Localisation intra – cellulaire de la curcumine dans les lignées prostatiques

La curcumine est une molécule polyphénolique, naturellement fluorescente. Cette propriété nous a permis d'étudier sa localisation intracellulaire par microscopie de fluorescence. Le double marquage curcumine/Hoechst 33342 réalisé a mis en évidence que ce composé naturel est incorporé par les cellules prostatiques et qu'il se localise principalement dans le cytoplasme des différents types de lignées cancéreuses prostatiques étudiées (Figure 39).

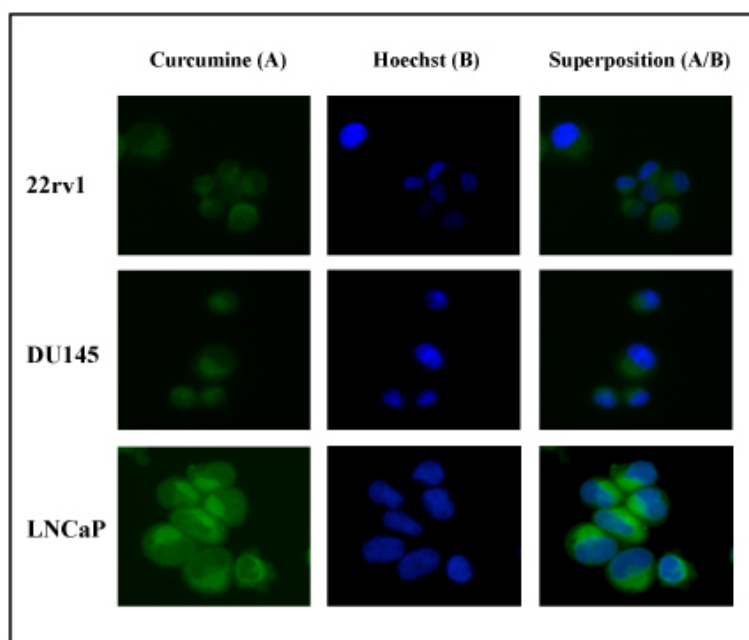


Figure 39 : Localisation intra-cellulaire de la curcumine.

Les cellules 22rv1, LNCaP et DU145 ont été incubées pendant 24 heures avec 20 μ M de curcumine (fluorescence verte), puis incubées avec une solution de Hoechst 33342, marquant les noyaux (fluorescence bleue) pendant 20 minutes à 37°C et ont ensuite été observées au microscope à fluorescence.

4.1.2 Effet de la curcumine sur la viabilité cellulaire des lignées prostatiques

L'étude du potentiel cytotoxique de la curcumine sur les lignées prostatiques, réalisée par la méthode du test d'exclusion au bleu trypan, a mis en évidence une sensibilité variable à ce traitement des différentes lignées prostatiques étudiées. Les lignées androgéno – indépendantes DU145 (Figure 40 C) et PC-3 (Figure 40 D) apparaissent moins sensibles au traitement que les lignées androgéno – sensibles 22rv1 (Figure 40 A) et LNCaP (Figure 40 B). En effet pour un traitement de 24 heures, la concentration de curcumine nécessaire pour réduire de 50% la viabilité cellulaire (IC_{50}) est d'environ 50 μ M pour les lignées 22rv1 et LNCaP, de 100 μ M pour la lignée androgéno – indépendante PC-3 alors que cette IC_{50} n'est pas atteinte pour la lignée DU145 même pour un traitement de 100 μ M de curcumine pendant 24 heures.

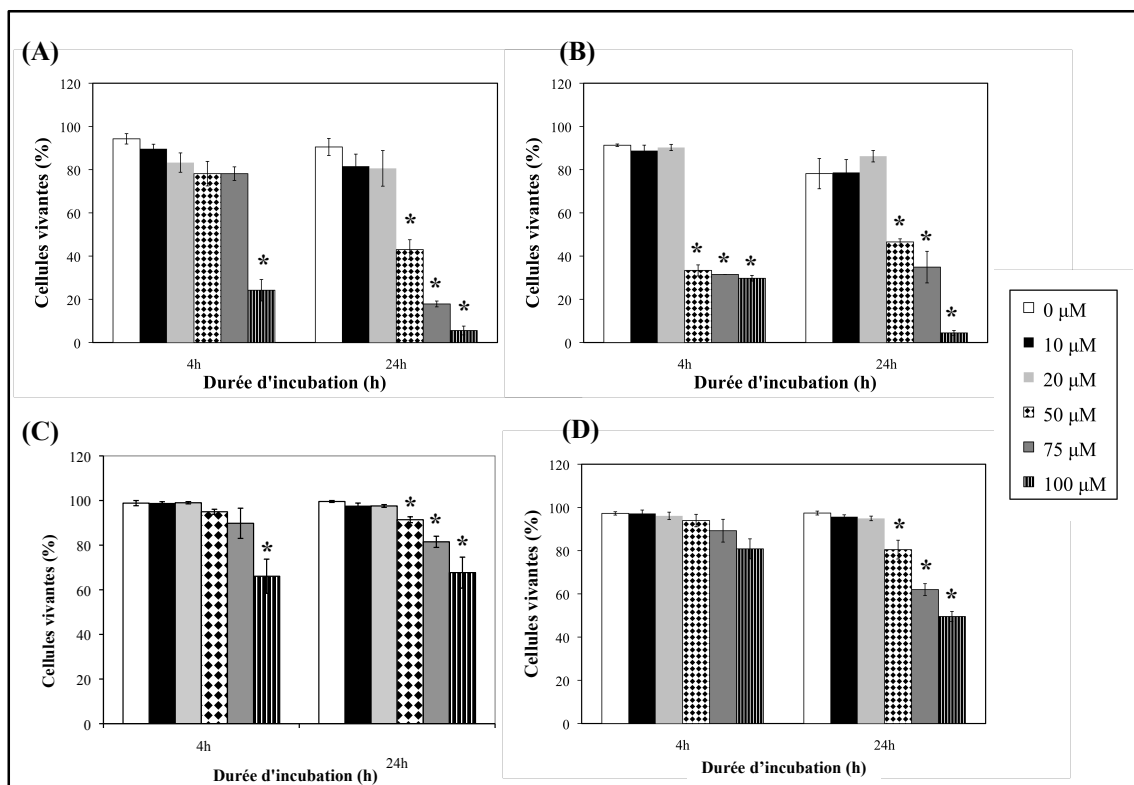


Figure 40 : Effet de la curcumine sur la viabilité cellulaire des cellules prostatiques.

La viabilité cellulaire a été déterminée par le test d'exclusion au bleu trypan après 4h ou 24h de traitement des cellules androgéno-sensibles 22rv1 (A), LNCaP (B) et androgéno-indépendantes DU145 (C), PC-3 (D) avec différentes concentrations de curcumine. Les résultats correspondent à la moyenne +/- la déviation standard d'au moins trois expériences indépendantes. * indique une différence statistiquement significative par rapport aux cellules non traitées (p-valeur < 0,05).

4.1.3 Mort des cellules cancéreuses prostatiques induite par la curcumine

Dans le but d'identifier le type de mort cellulaire mis en action après traitement par la curcumine, nous avons analysé, par Western – Blot, le profil d'expression de différents marqueurs de référence tel le clivage de caspases pour la mort par apoptose et l'expression de la protéine LC3B, marqueur spécifique du processus d'autophagie. Par comparaison avec le contrôle positif pour l'induction d'apoptose (cellules U937 traitées à l'étoposide pendant 3h30), la curcumine n'induit ni le clivage des pro-caspases -8, -9, -3, -7, ni celui de PARP mais provoque l'apparition de l'isoforme LC3B-II, une protéine présente au niveau de la membrane des autophagosomes et considérée comme un marqueur du processus d'autophagie (Mizushima and Yoshimori, 2007). L'ensemble de ces résultats suggèrent que la curcumine déclenche la mort des cellules prostatiques par un processus d'autophagie et non par apoptose (Figure 41).

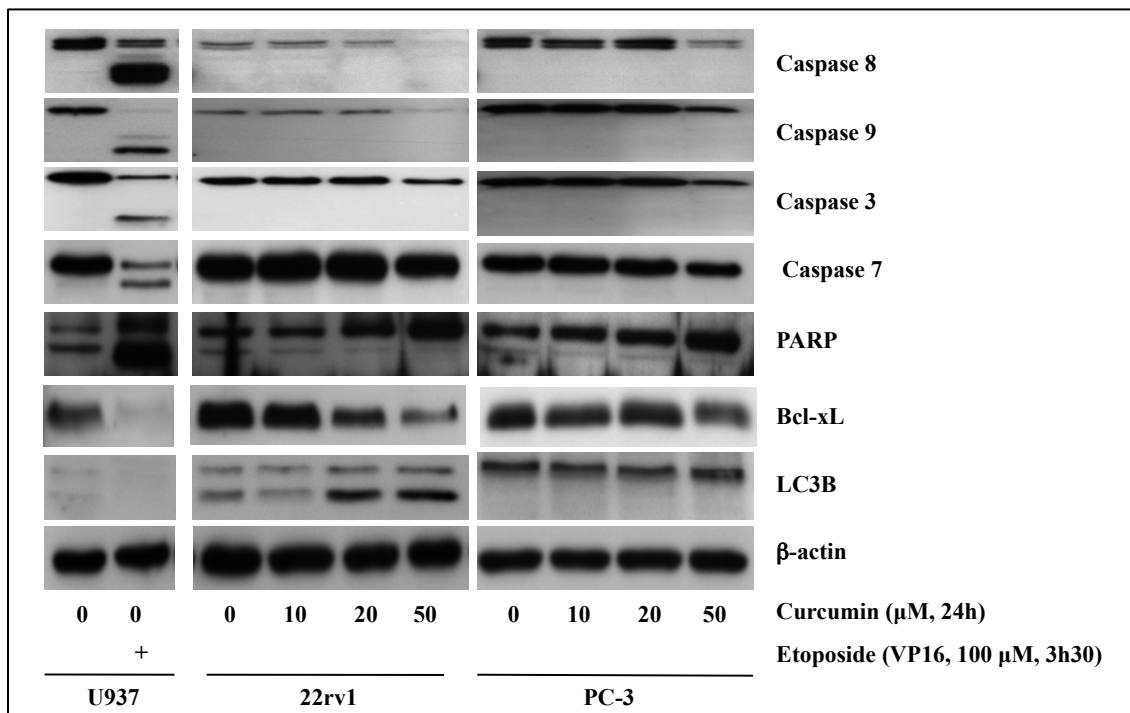


Figure 41 : Effet de la curcumine sur différents marqueurs de mort cellulaire.

Les cellules 22rv1 et PC-3 ont été traitées pendant 24h avec différentes concentrations de curcumine. Le niveau d'expression des protéines caspase 8, 9, 3, 7, PARP, Bcl-xL et LC3B est analysé par Western-Blot. Les cellules U937 traitées à l'étoposide ont été utilisées comme contrôle positif pour l'apoptose. Les résultats sont représentatifs d'au moins trois expériences réalisées de façon indépendante.

4.1.4 Effet de la curcumine sur la prolifération cellulaire

Au vu de l'effet de la curcumine sur la viabilité cellulaire des lignées prostatiques, nous avons évalué l'effet de la curcumine sur la prolifération cellulaire de ces mêmes lignées.

- **Effet de la curcumine sur le cycle cellulaire des cellules cancéreuses prostatiques**

L'étude par cytométrie en flux de l'effet de la curcumine sur le cycle cellulaire (marquage à l'iodure de propidium), révèle que la curcumine induit un arrêt du cycle cellulaire à la transition des phases G2 et M dans les cellules 22rv1 (Figure 42 A) pour toutes les concentrations testées et plus particulièrement pour la concentration de 20 μM , qui induit un blocage de 32% des cellules en G2/M par comparaison aux 15% de cellules non traitées observées dans cette même phase. Cette concentration de curcumine (20 μM) induit parallèlement une diminution de 20% de la quantité de cellules 22rv1 en phase G1.

La légère augmentation de cellules 22rv1 observées en subG1 (hausse de 5% pour 50 μM de curcumine), ne corrèle pas avec l'augmentation de mortalité observée précédemment (55% pour 50 μM de curcumine). Ceci confirme que la mort des cellules prostatiques ne se produit pas par apoptose dans nos conditions expérimentales.

Par contre cette molécule naturelle reste sans effet sur le cycle cellulaire des cellules DU145 (Figure 42 B) quelle que soient la concentration et la durée du traitement.

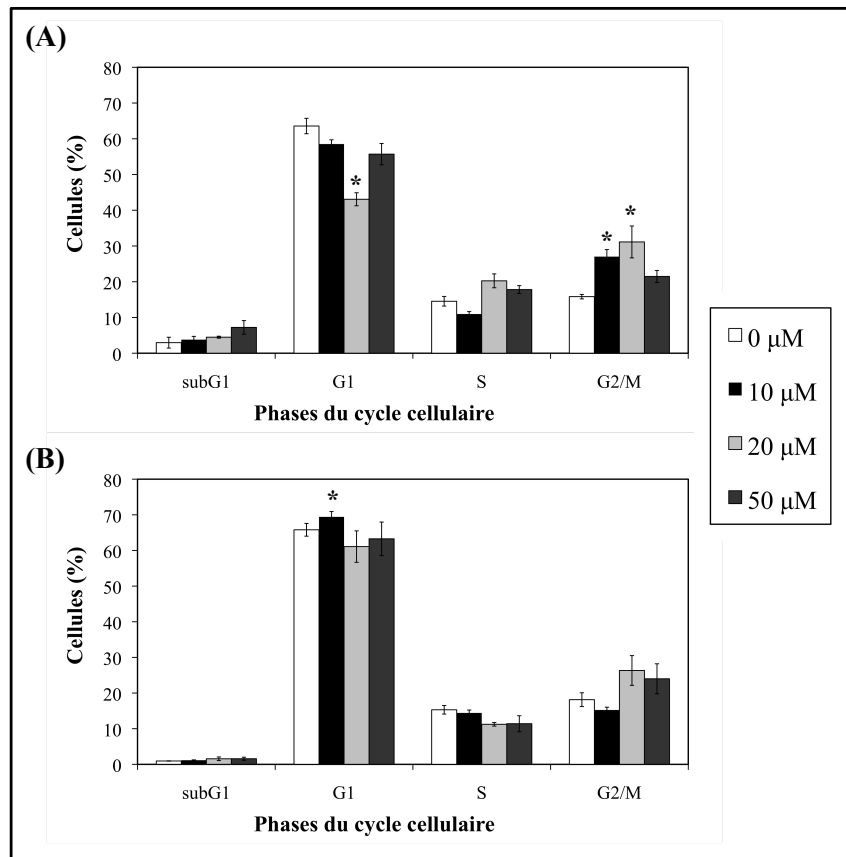


Figure 42 : Effet de la curcumine sur le cycle cellulaire des lignées prostatiques cancéreuses.

Les cellules 22rv1 (A) et DU145 (B) ont été traitées pendant 24 heures avec différentes concentrations de curcumine, puis marquées à l'iodure de propidium. L'analyse du cycle cellulaire a été réalisée par cytométrie en flux. Les résultats correspondent à la moyenne +/- la déviation standard d'au moins trois expériences indépendantes. * indique une différence statistiquement significative par rapport aux cellules non traitées (p-valeur < 0,05).

- **Effet de la curcumine sur des marqueurs de prolifération et de régulation du cycle cellulaire**

Afin de valider l'effet observé de la curcumine sur la prolifération des cellules prostatiques, nous avons évalué l'effet de cette molécule sur l'expression de marqueurs de prolifération et de régulation du cycle cellulaire, à savoir l'expression du gène PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*) impliqué dans la réplication de l'ADN et du gène de la cycline B1, qui régule le passage de la phase G2 à la phase M du cycle cellulaire (Figure 43).

Les résultats obtenus par PCR quantitative en temps réel ont mis en évidence une diminution de l'expression des marqueurs de prolifération PCNA et cycline B1 dans la lignée 22rv1 après 24 heures de traitement par la curcumine. Une concentration de 50 μ M de curcumine diminue l'expression de PCNA et une concentration de 20 μ M diminue l'expression du gène de la cycline B1 dans la lignée 22rv1 (Figure 43). Ces résultats ont été validés par l'analyse par Western-Blot de l'expression de ces marqueurs de prolifération cellulaire dans la lignée 22rv1 mais également des autres marqueurs de prolifération, à savoir phosphoHistoneH3 et survivine (Figure 44).

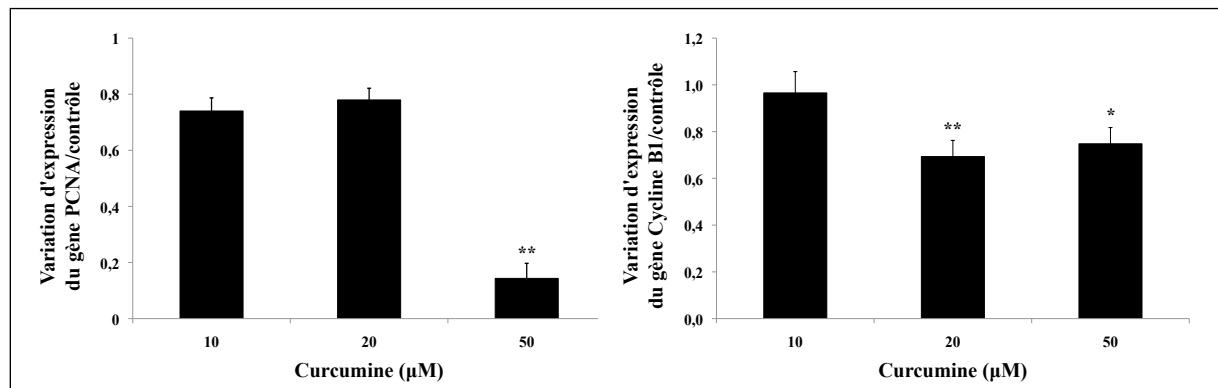


Figure 43 : Effet de la curcumine sur les marqueurs de prolifération PCNA et cycline B1 de la lignée prostatique 22rv1.

Les cellules 22rv1 et DU145 ont été traitées pendant 24 heures avec différentes concentrations de curcumine. L'expression de l'ARNm PCNA et cycline B1 a été analysée par PCR quantitative en temps réel, l'actine β est utilisée comme gène standardisant. Les résultats sont exprimés comme le rapport du gène d'intérêt comparé à l'actine β et correspondent à la moyenne +/- la déviation standard d'au moins trois expériences indépendantes. * indique une différence statistiquement significative par rapport aux cellules non traitées (* correspond à une p-valeur < 0,05, ** à une p-valeur < 0,01).

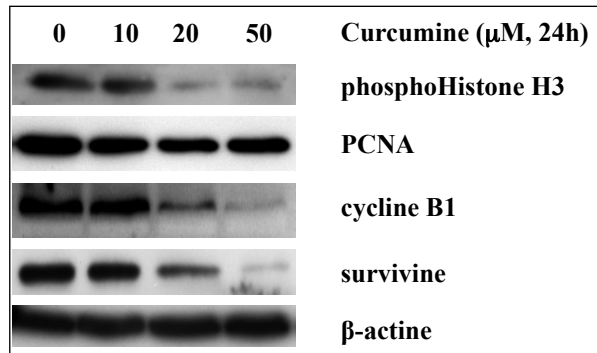


Figure 44 : Effet de la curcumine sur l'expression de protéines impliquées dans la prolifération cellulaire des cellules 22rv1.

Les cellules 22rv1 ont été traitées pendant 24h avec différentes concentrations de curcumine. Le niveau d'expression des protéines phosphoHistone H3, PCNA, survivine et cycline B1 est analysé par Western-Blot. Les résultats sont représentatifs d'au moins trois expériences réalisées de façon indépendante.

4.1.5 Effet de la curcumine sur la voie de signalisation Wnt

Comme la curcumine est capable de moduler la prolifération cellulaire des lignées de cancer de la prostate et que l'activation de la voie de signalisation Wingless (Wnt) est fortement impliquée dans l'initiation et la progression du cancer de la prostate (Yardy and Brewster, 2005), nous avons ensuite évalué l'effet de la curcumine sur la voie Wnt.

- **Effet de la curcumine sur l'activité transcriptionnelle β – caténine/Tcf – 4**

Nous avons tout d'abord évalué l'impact de la curcumine sur l'activité transcriptionnelle β -caténine/Tcf-4 de la voie Wnt. Les transfections transitoires réalisées avec les plasmides rapporteurs pTOPFlash (TOP) et pFOPFlash (FOP) ont mis en évidence que pour les concentrations supérieures à 10 μ M, la curcumine réduit l'activité TOP/FOP de manière significative (Figure 45 A). Dans le cas de la lignée androgéno-indépendante PC-3 (Figure 45 B) nous observons une augmentation significative de l'activité transcriptionnelle Wnt après traitement par la curcumine. Cette expérience montre que la curcumine agit différemment sur l'activité transcriptionnelle de la voie Wnt dans les lignées prostatiques androgéno-sensibles et androgéno-indépendantes.

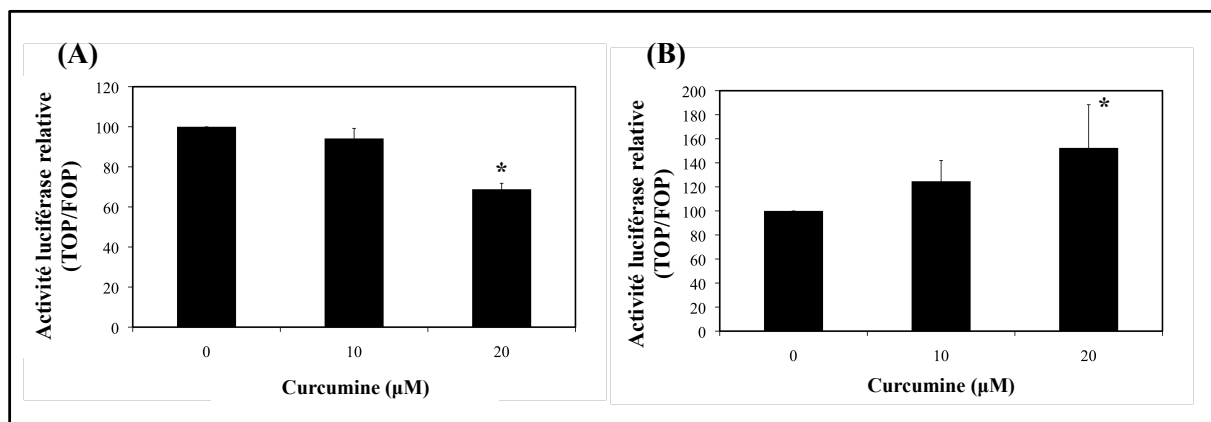


Figure 45 : Effet de la curcumine sur l'activité transcriptionnelle β -caténine/Tcf-4.

Les cellules 22rv1 (A) et PC-3 (B) sont transfectées avec les plasmides rapporteurs pTOPFlash et pFOPFlash et traitées durant 24h avec différentes concentrations de curcumine. Le vecteur Renilla pHRG-TK a été utilisé comme contrôle de l'efficacité de transfection. Les résultats correspondent à la moyenne \pm la déviation standard d'au moins trois expériences indépendantes. Ils représentent le rapport de l'activité luciférase pTOPFlash et pFOPFlash normalisée par l'activité Renilla (TOP/FOP). * indique une différence statistiquement significative par rapport aux cellules non traitées (p-valeur < 0,05).

- **Effet de la curcumine sur l'expression de protéines cibles de la voie Wnt**

Afin de vérifier l'impact de la curcumine sur l'activité transcriptionnelle β -caténine/Tcf-4 dans les cellules 22rv1, nous avons analysé après traitement, l'expression de gènes directement régulés par la voie Wnt. Les Western-Blots réalisés à partir d'extraits protéiques totaux montrent que l'expression des protéines c-myc (62 kDa, proto – oncogène) et cycline D1 (37 kDa, régulateur de la phase G1 du cycle cellulaire) diminue de manière dose-dépendante dans les cellules 22rv1 (baisse d'expression de 20% et 35% respectivement pour 20 μ M de curcumine) (Figure 46). La variation observée pour la cycline D1 dans la lignée 22rv1 conforte l'observation précédente d'une diminution du pourcentage de cellules en phase G1 après traitement avec 20 μ M de curcumine.

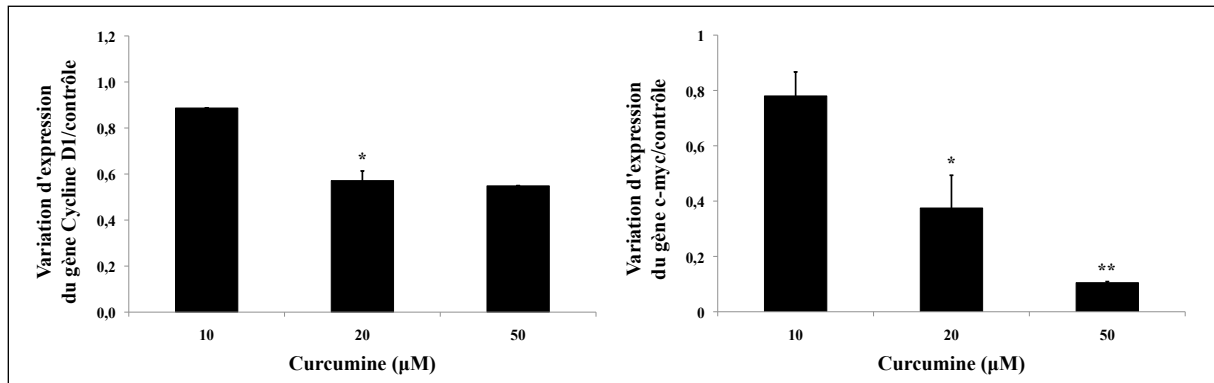


Figure 46 : Effet de la curcumine sur la transcription de gènes cibles de la voie Wnt.

Les cellules 22rv1 ont été traitées pendant 24h avec différentes concentrations de curcumine. L'expression des ARNm Cycline D1 et c-myc a été analysée par PCR quantitative en temps réel, l'actine β est utilisée comme gène standardisant. Les résultats sont exprimés comme le rapport du gène d'intérêt comparé à l'actine β et correspondent à la moyenne +/- la déviation standard d'au moins trois expériences indépendantes. . * indique une différence statistiquement significative par rapport aux cellules non traitées (* correspond à une p-valeur < 0,05, ** à une p-valeur < 0,01).

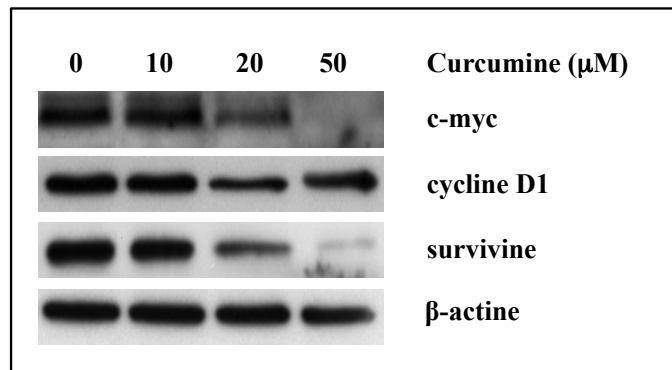


Figure 47 : Effet de la curcumine sur l'expression de protéines cibles de la voie Wnt.

Les cellules 22rv1 ont été traitées pendant 24h avec différentes concentrations de curcumine. Le niveau d'expression des protéines cycline D1, c-myc et survivine est analysé par Western-Blot. Les résultats sont représentatifs d'au moins trois expériences réalisées de façon indépendante.

L'ensemble des résultats obtenus par transfections transitoires et Western – Blots mettent en évidence que la curcumine altère la voie de signalisation Wnt dans les lignées prostatiques androgéno-sensibles mais reste sans effet dans les lignées androgéno-indépendantes.

Comme toute voie de signalisation, la voie Wnt décrit un réseau complexe de protéines interagissant entre elles. Nous avons donc poursuivi nos travaux afin de comprendre à quel niveau de la voie de signalisation Wnt agit la curcumine.

- **Effet de la curcumine sur l'activation de l'activité transcriptionnelle β -caténine/ Tcf-4 par la surexpression d'une forme β -caténine mutée**

De manière à déterminer si la curcumine agit au niveau de la machine de dégradation de la β -caténine ou sur des protéines situées en aval incluant la β -caténine elle-même, nous avons réalisé des co – transfections transitoires avec les plasmides rapporteurs pTOPFlash ou pFOPFlash et le vecteur d'expression pbCAT codant pour une forme tronquée de la β -caténine, pouvant être activée mais pas dégradée par le protéasome.

Dans le cas de la lignée DU145, la curcumine ne modifie pas l'activité TOP/FOP (Figure 48 B). *A contrario*, cette molécule naturelle augmente significativement l'activité TOP/FOP dans la lignée 22rv1 (Figure 48 A). Comme nous avons démontré précédemment que dans cette lignée, la curcumine induit une diminution de l'activité TOP/FOP, ces résultats suggèrent que la décroissance de l'activité TOP/FOP observée ne soit pas due à un effet direct de la curcumine sur la β -caténine mais à un effet sur un ou plusieurs autres éléments intervenant dans la voie de signalisation Wnt.

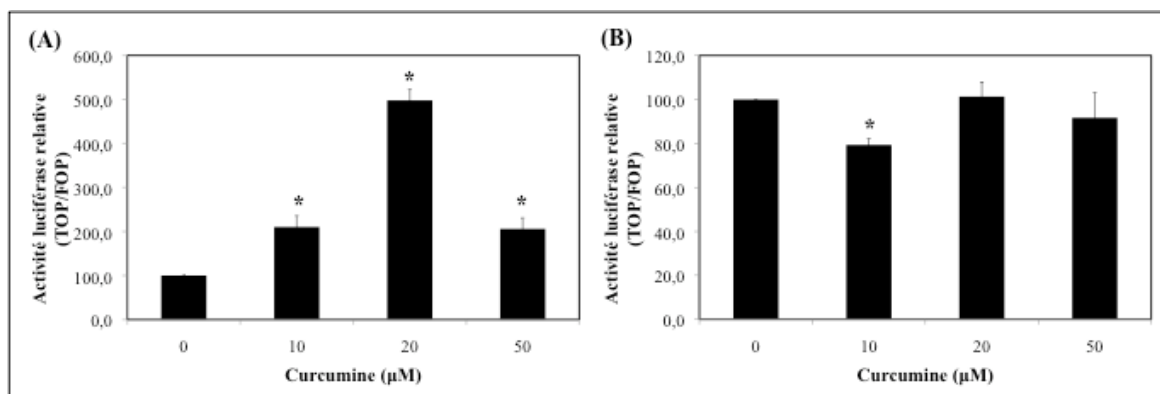


Figure 48 : Effet de la curcumine sur l'activation de l'activité transcriptionnelle β -caténine/ Tcf-4 par la surexpression d'une forme β -caténine mutée.

Les cellules 22rv1 (A) et DU145 (B) ont été co – transfectées avec le vecteur vide ou le vecteur d'expression pbCAT qui code pour la protéine β -caténine portant la mutation S33Y et les plasmides rapporteurs pTOPFlash et pFOPFlash. Les cellules transfectées ont été traitées pendant 24h avec différentes concentrations de curcumine. Les résultats correspondent à la moyenne +/- la déviation standard d'au moins trois expériences indépendantes. Ils représentent le rapport de l'activité luciférase pTopFlash et pFOPFlash normalisée par l'activité Rénilla (TOP/FOP). * indique une différence statistiquement significative par rapport aux cellules non traitées (p-valeur < 0,05).

- **Effet de la curcumine sur les protéines effectrices de la voie Wnt**

Nous avons dès lors évalué, par Western-Blot, l'effet de la curcumine sur le niveau d'expression de protéines (β -caténine, phospho- β -caténine, GSK-3 β et Tcf-4) impliquées la voie Wnt. Les résultats obtenus montrent que dans les deux lignées étudiées, de la protéine β -caténine (92 kDa) ne varie pas dans les extraits de facteurs totaux. De manière à évaluer l'effet de la curcumine sur la translocation nucléaire de la β -caténine, avons dissocié les facteurs cytoplasmiques et nucléaires. Cette analyse a permis de évidence que l'expression de la β -caténine ne varie ni au niveau cytoplasmique, ni au nucléaire quelles que soient les conditions de traitement (

Figure 49).

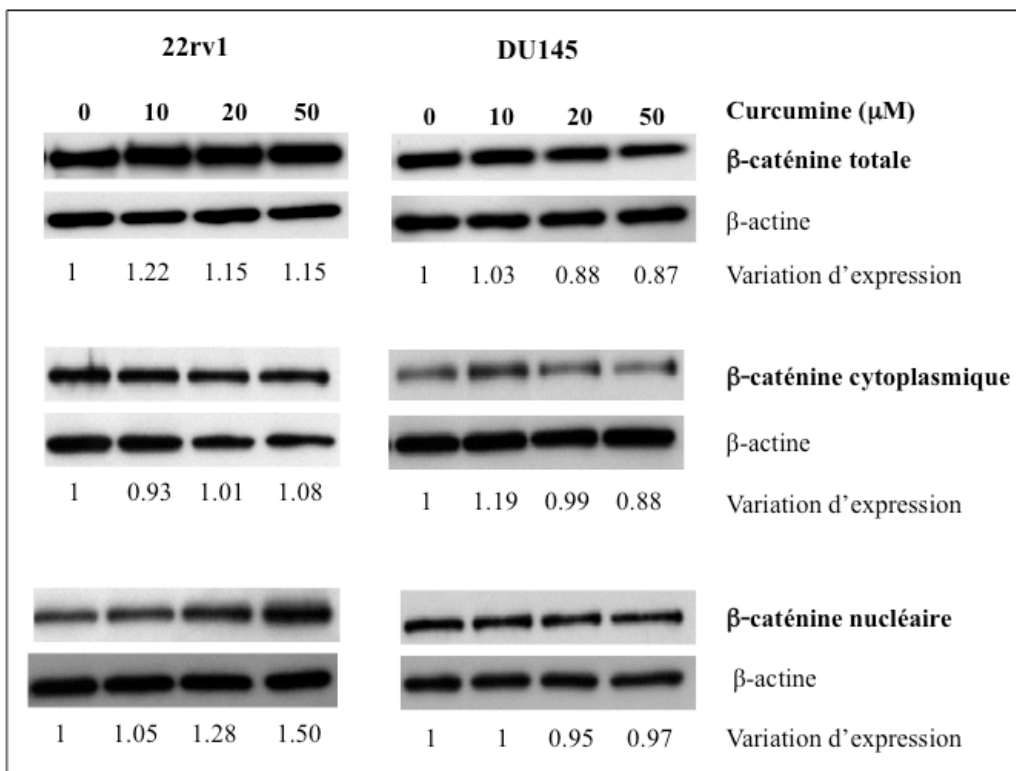


Figure 49 : Effet de la curcumine sur la localisation cellulaire de la β -caténine.

Les cellules DU145 et 22rv1 ont été traitées pendant 24h avec différentes concentrations de curcumine. Le niveau d'expression de la β -caténine totale, cytoplasmique et nucléaire est analysé par Western-Blot. Les résultats sont représentatifs d'au moins trois expériences réalisées de façon indépendante.

La diminution de l'activité transcriptionnelle de la voie Wnt observée précédemment dans les cellules 22rv1 peut s'expliquer par une incapacité de mise en place du complexe transcriptionnel de la voie Wnt. Nous avons dès lors analysé par Western – Blot l'expression des différentes protéines impliquées dans ce complexe. Les résultats obtenus révèlent que la curcumine diminue l'expression du facteur de transcription Tcf-4 et de ses co – activateurs p300 et CBP de manière dose – dépendante.

L'ensemble des résultats obtenus suggèrent que la diminution de l'activité transcriptionnelle β -caténine/ Tcf-4 observée après traitement par la curcumine est causée par la diminution de l'expression des protéines Tcf-4, p300 et CBP, et non par une diminution de la β -caténine (Figure 50).

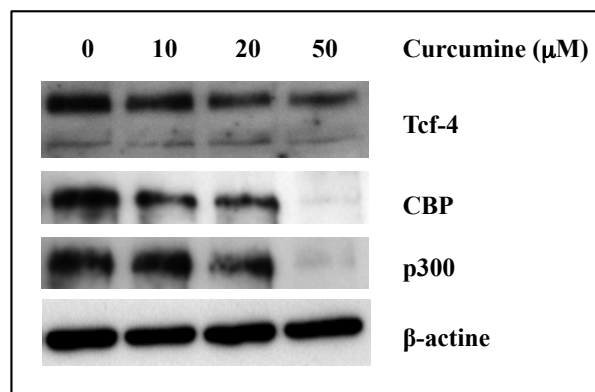


Figure 50 : Effet de la curcumine sur les protéines impliquées dans le complexe transcriptionnel de la voie Wnt dans les cellules 22rv1.

Les cellules 22rv1 ont été traitées pendant 24h avec différentes concentrations de curcumine. Le niveau d'expression de Tcf-4, CBP et p300 est analysé par Western-Blot. Les résultats sont représentatifs d'au moins trois expériences réalisées de façon indépendante.

4.2 La plumbagine, métabolite secondaire de la *Dionaea muscipula* comme agent anti – cancéreux

4.2.1 Préparation d'extraits méthanoliques *Dionaea muscipula* Solander ex Ellis

La préparation de l'extrait méthanolique de feuilles et de racines de *Dionaea muscipula* a permis d'obtenir respectivement 2,83 et 0,4 g d'extrait. Les rendements d'extraction sont présentés dans le tableau suivant (Tableau 7).

Tableau 7 : Tableau récapitulatif des rendements d'extraction obtenus lors de la préparation des différents extraits méthanoliques de *Dionaea muscipula* (voir matériel et méthodes).

Partie de la plante	Matière sèche (mg) (% de la plante)	Produit obtenu (mg)	Rendement (%)
Feuilles	6830 (78,78 %)	2830	41,43
Racines	1840 (21,22 %)	400	21,74

Contenu du fait d'un rendement d'extraction moindre pour l'extrait obtenu à partir des racines et de leur plus faible proportion en matière sèche par rapport à la masse totale de la plante (21,22 %), nous avons décidé de focaliser notre recherche de nouvelle molécule anti – cancéreuse sur l'extrait total obtenu à partir des feuilles de la *Dionaea muscipula*.

4.2.2 Effet de l'extrait méthanolique total de feuilles de *Dionaea muscipula* sur la viabilité cellulaire de plusieurs lignées cancéreuses.

L'analyse de la viabilité cellulaire des cellules en suspension HL-60, Jurkat, K562, Raji, U937 et des cellules adhérentes A549, MDA-MB-231, PC-3 et Saos-2 après traitement pendant 8, 24, 48 et 72 heures à 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175 avec 200 µg/mL d'extrait total de feuilles de *Dionaea muscipula* a mis en évidence que à l'exception de HT-29, ces différentes lignées sont sensibles à ce traitement (Annexe 1). Les valeurs des IC₅₀ des différentes lignées calculées après 24 heures de traitements sont présentées dans le tableau suivant (Tableau 8).

Tableau 8 : Tableau récapitulatif des valeurs IC₅₀ des différentes lignées cellulaires après 24 heures de traitement avec l'extrait méthanolique total de feuilles de *Dionaea muscipula*.

La valeur de l'IC₅₀ de chaque lignée a été déterminée à partir des valeurs obtenues lors de l'analyse de la viabilité cellulaire après 24 heures de traitement avec l'extrait de feuilles de dionée. Les résultats correspondent à la moyenne d'au moins trois expériences indépendantes.

	Lignée cellulaire	IC ₅₀ à 24 heures	
		µg d'extrait/mL	mg de plante sèche/mL
Cellules en suspension	HL-60	51,37	0,12
	Jurkat	82,94	0,20
	K562	182,7	0,44
	Raji	140,4	0,34
	U937	48,69	0,12
Cellules adhérentes	A549	130,2	0,31
	HT-29	> 200	0,48
	MDA-MB-231	114,63	0,28
	PC-3	156,8	0,38
	Saos-2	78,31	0,19

4.2.3 Etude de la localisation intra-cellulaire de l'extrait total de feuilles de *Dionaea muscipula* dans les cellules K562 et de son effet sur leur taille et leur morphologie

L'étude de l'incorporation et de la localisation intra – cellulaire de l'extrait total de *Dionaea muscipula* a été possible grâce à la présence de nombreuses molécules naturellement fluorescentes (chlorophylles, phycobilines, phycoérythrine) au sein de cet extrait. L'observation des cellules K562 sous microscope à fluorescence après traitement et marquage des cellules au Hoechst a mis en évidence que cet extrait pénètre dans les cellules et se localise dans l'ensemble de la cellule mais avec une localisation plus marquée au niveau du noyau (Figure 51). Pour une concentration de 50 µg/mL, les composés fluorescents localisés

au niveau du noyau s'accumulent en formant des vacuoles. L'observation en champ clair révèle la présence de nouvelles structures cellulaires au sein du cytoplasme qui sont probablement des vacuoles de pinocytose, ce qui laisse suggérer que l'incorporation de l'extrait se fait par un mécanisme actif (Figure 51). Cette analyse révèle également que un traitement par l'extrait provoque une diminution du volume du cytoplasme et une condensation du noyau des cellules K562 (Figure 52).

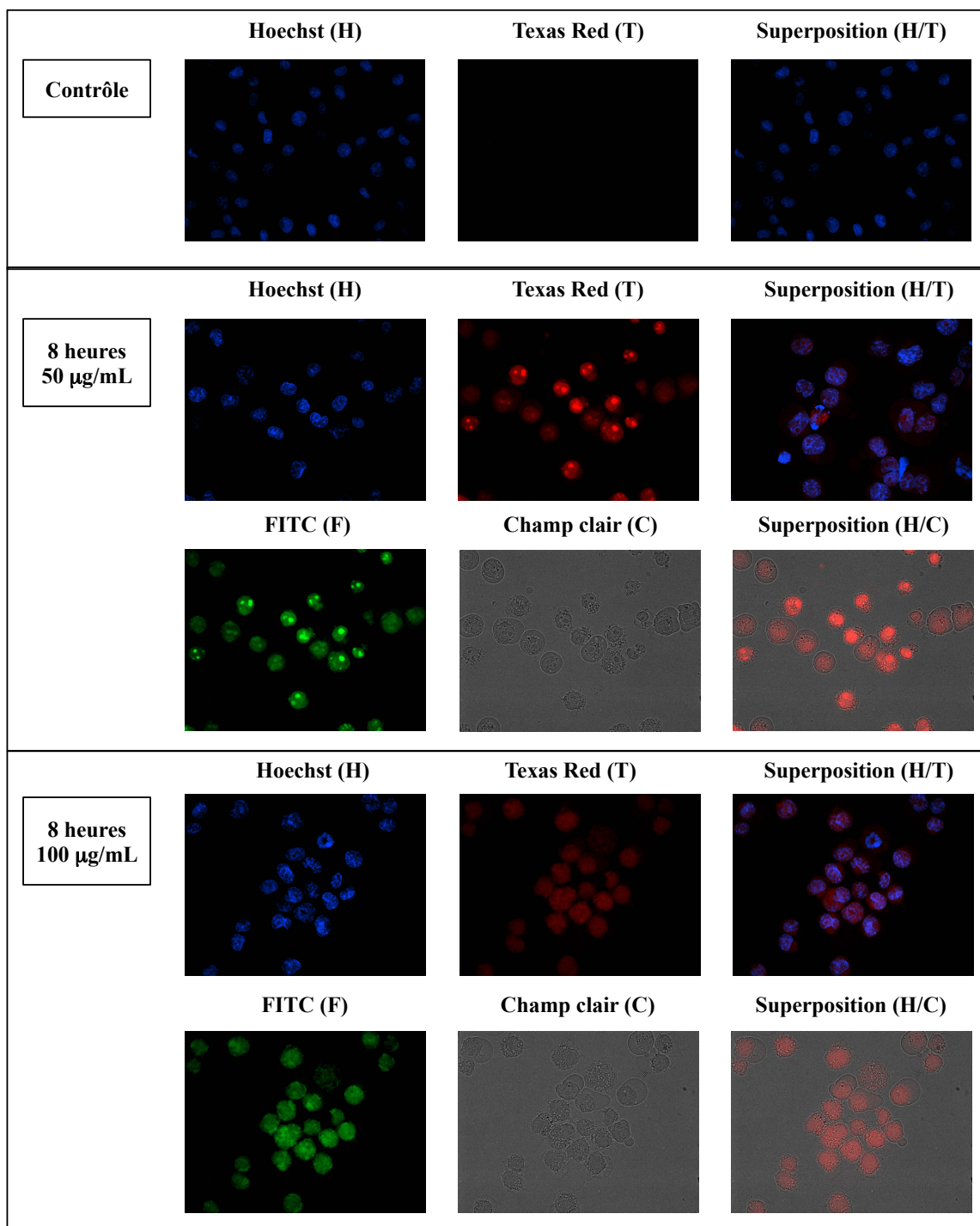


Figure 51 : Localisation intracellulaire de l'extrait total de feuilles de *Dionaea muscipula* dans les cellules K562.

Les cellules K562 ont été incubées pendant 4 et 8 heures avec 50 ou 100 µg/mL d'extrait total de feuilles de *Dionaea muscipula* puis avec une solution de Hoechst 33342.

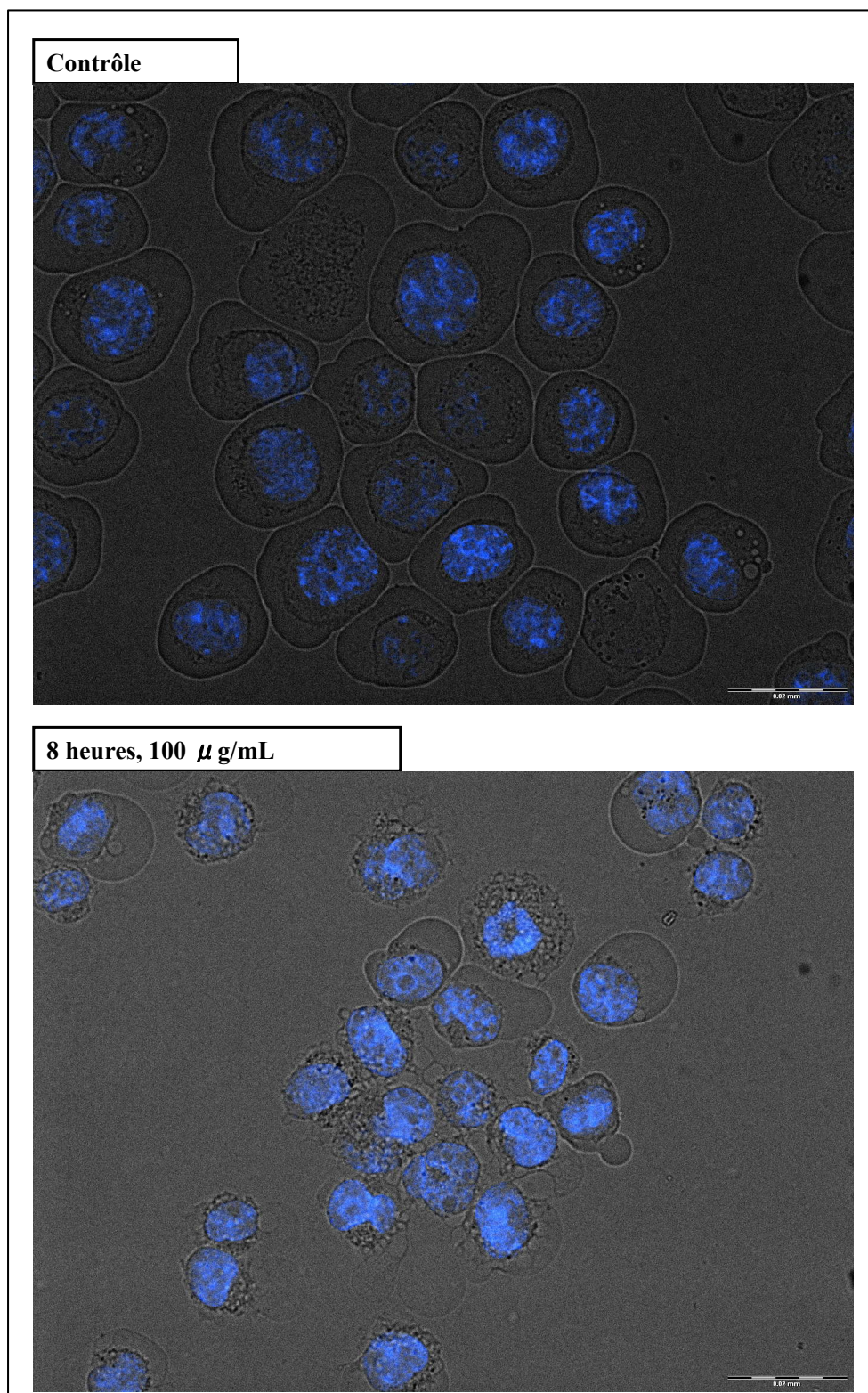


Figure 52 : Effet de l'extrait total de feuilles de *Dionaea muscipula* sur la taille et la morphologie des cellules K562.

Les cellules K562 ont été incubées pendant 8 heures avec 100 μ g/mL d'extrait total de feuilles de *Dionaea muscipula* puis avec une solution de Hoechst 33342.

4.2.4 Purification et identification des composés de l'extrait total de feuilles de *Dionaea muscipula*

- Purification de l'extrait méthanolique de feuilles de *Dionaea muscipula* par HPLC préparative

L'analyse du chromatogramme obtenu lors de la purification de l'extrait méthanolique de feuilles de *Dionaea muscipula* par HPLC préparative a révélé la présence d'au moins 7 composés majeurs qui se retrouvent dans les fractions d'intérêt F2-3, F8, F14-16, F20-21, F22-23 et F26-28 (Figure 53).

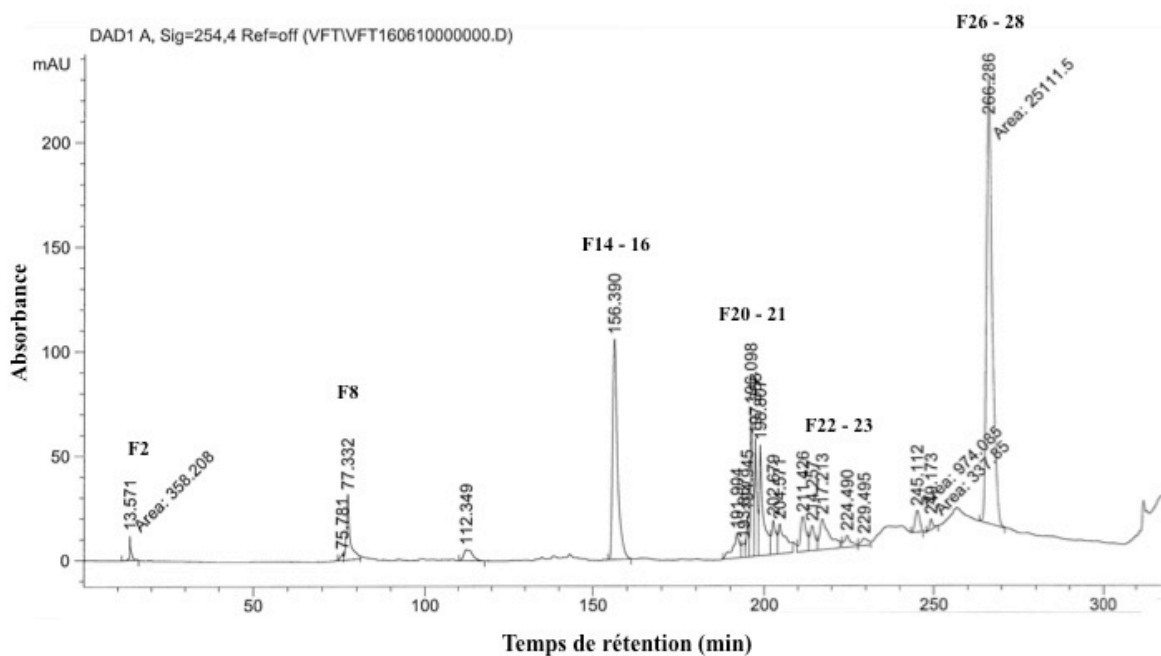
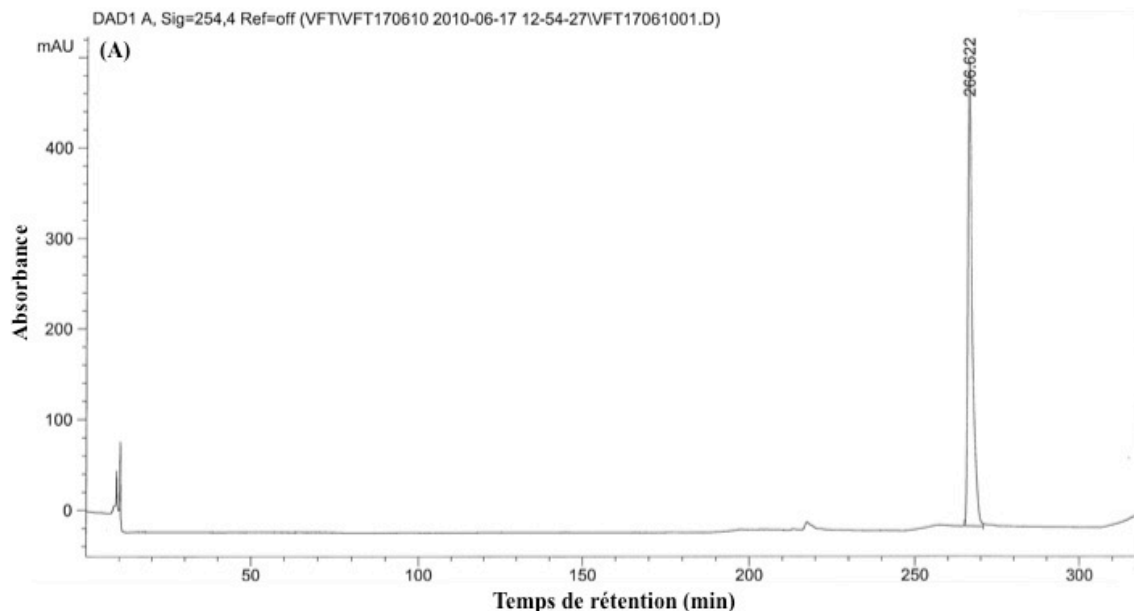
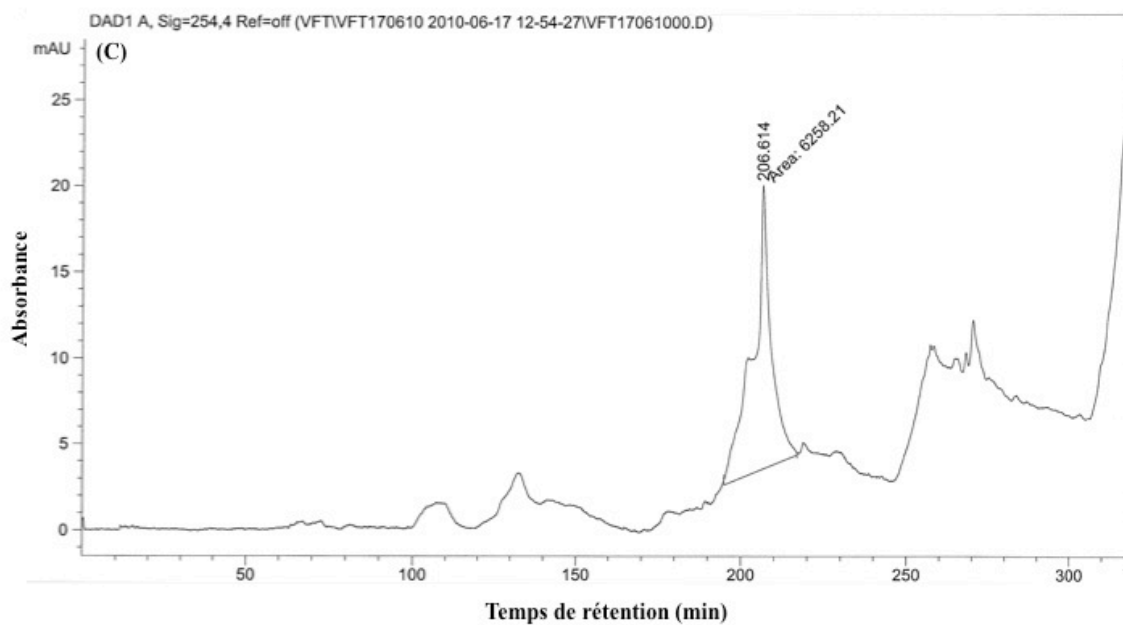
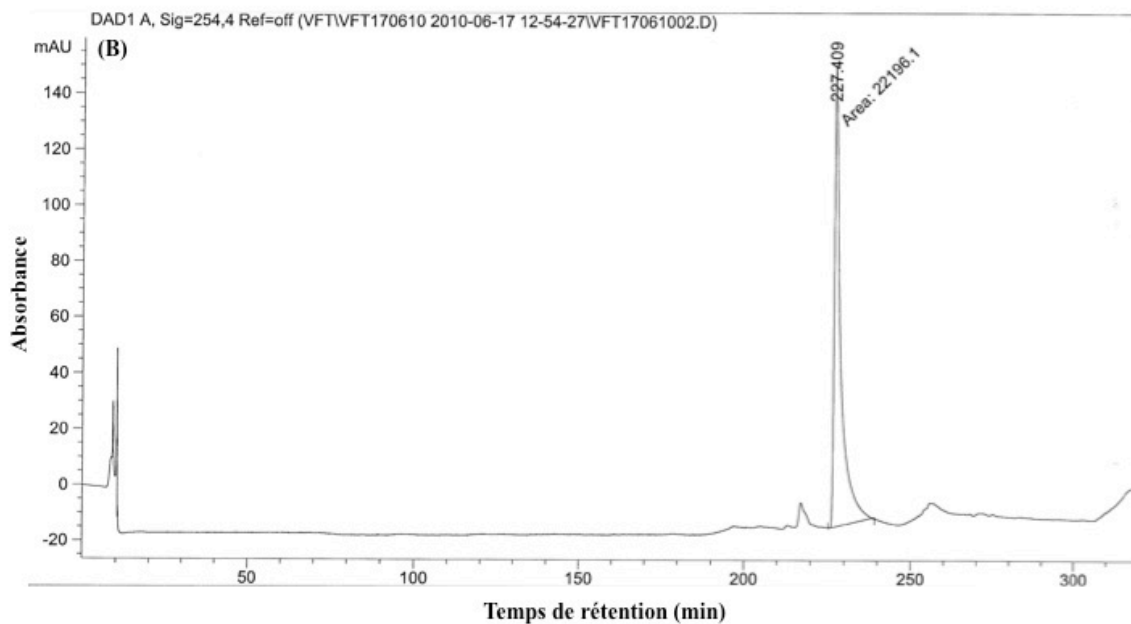


Figure 53 : Chromatogramme de l'extrait méthanolique de feuilles de *Dionaea muscipula* obtenu par HPLC à 254 nm.

- **Identification par HPLC analytique des différents pics du chromatogramme de l'extrait méthanolique de feuilles de *Dionaea muscipula* par comparaison à des substances de références**

L'identification des différents pics du chromatogramme de l'extrait méthanolique de feuilles de *Dionaea muscipula* par comparaison avec les pics des chromatogrammes obtenus par HPLC analytique des substances déjà connues chez cette plante a mis en évidence que la plumbagine (Tokunaga et al., 2004) est contenue dans les fractions F27-28, la quercétine dans les fractions F23-24 et que la myricétine (Krolicka et al., 2008) et l'acide ellagique (Pakulski and Budzianowski, 1996a) sont contenues toutes les deux dans les fractions F20-21 (Figure 54). L'identification des différentes fractions est résumée dans le tableau ci – dessous (Tableau 9).





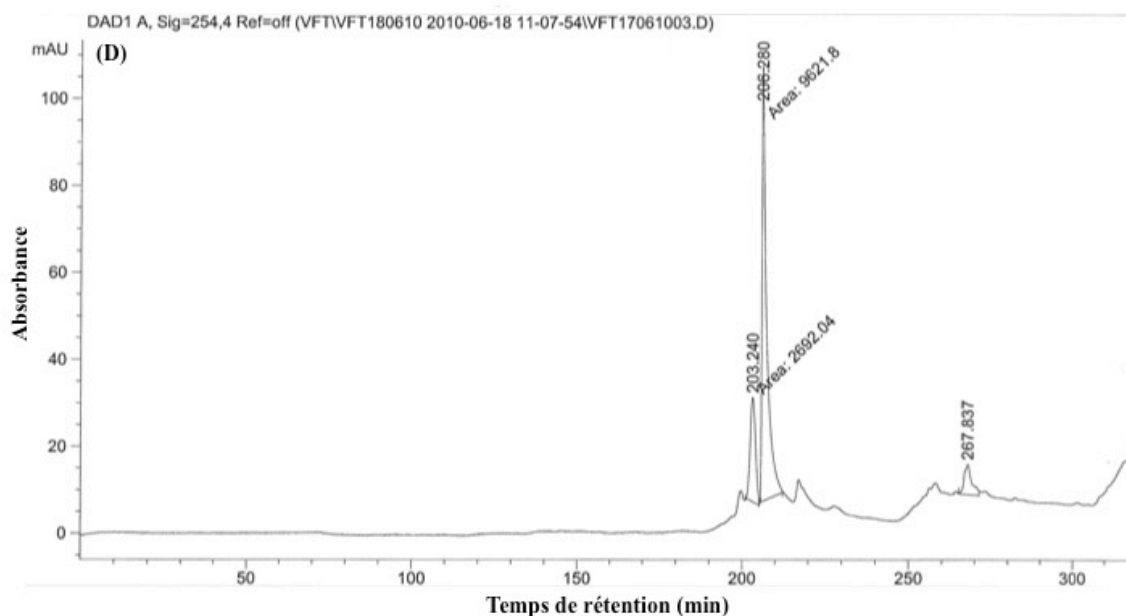


Figure 54 : Chromatogrammes des différentes substances déjà connues chez la *Dionaea muscipula* à 254 nm.

Chromatogrammes obtenus à une longueur d'onde de 254 nm après injection des différentes substances déjà connues chez la *Dionaea muscipula*. La méthode utilisée est la même que celle employée pour la purification de l'extrait de feuilles de la plante. Plumbagine (A), quercétine (B), myricétine (C), acide ellagique (D).

Tableau 9 : Tableau récapitulatif de l'identification des fractions

Fraction	Identification
2 – 3	Inconnue
8	Inconnue
14 – 16	Inconnue
20 – 21	Acide ellagique / Myricétine
22 – 23	Quercétine
26 - 28	Plumbagine

- **Effet cytotoxique des différentes fractions d'intérêt isolées par HPLC préparative à partir de l'extrait total de *Dionaea muscipula***

L'analyse de la viabilité cellulaire des différentes fractions d'intérêt isolées par HPLC à partir de l'extrait méthanolique de feuilles de *Dionaea muscipula* a mis en évidence la cytotoxicité de certaines de ces fractions (Figure 55). Les cellules K562 montrent une sensibilité vis-à-vis des fractions F8, F9 – 13, F14 – 16, F22 – 23 et F29 – 28 après 8 heures de traitement.

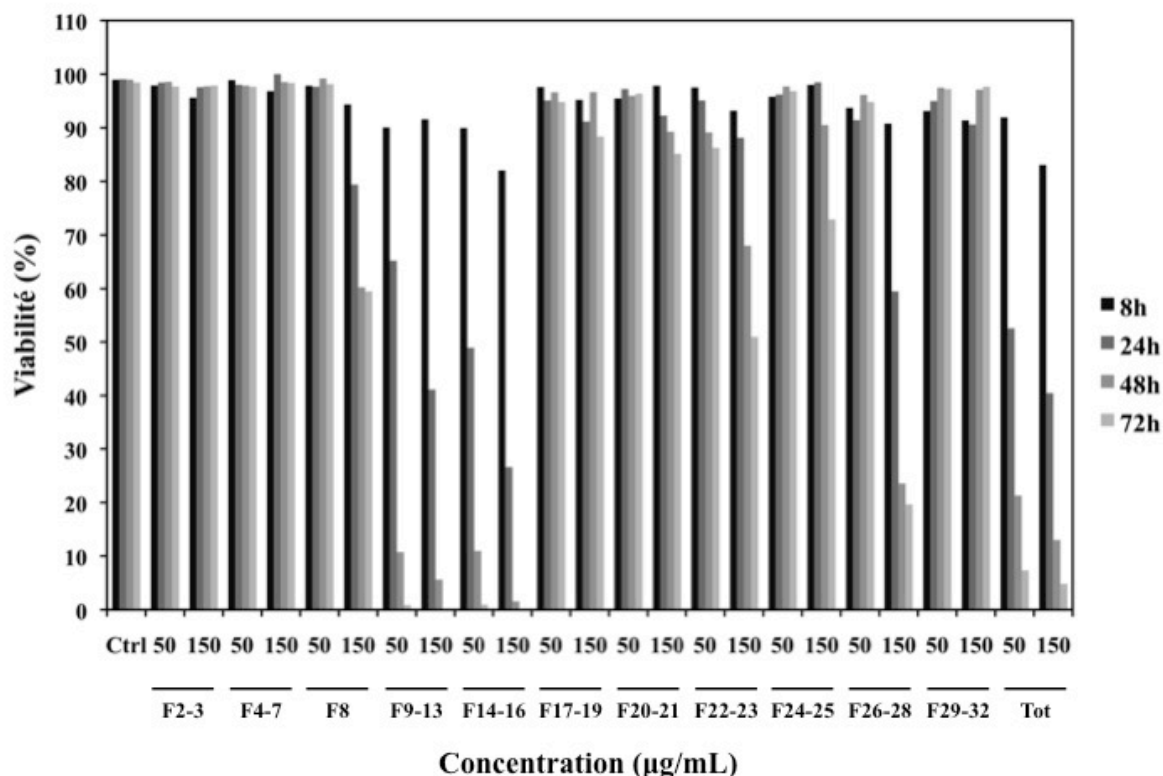


Figure 55 : Analyse du potentiel cytotoxique des différentes fractions isolées par HPLC préparative de l'extrait méthanolique total de feuilles de *Dionaea muscipula* sur des cellules K562.

La viabilité cellulaire a été déterminée par le test d'exclusion au bleu trypan après 8, 24, 48 et 72h de traitement des cellules K562 avec différentes concentrations (50 et 150 µg/mL) des différentes fractions isolées par HPLC préparative à partir de l'extrait méthanolique de feuilles de dionée ainsi que de l'extrait total lui même (Tot). Les données sont la moyenne de deux expériences menées de façon indépendante.

Comme certaines des substances présentes (la plumbagine et l'acide ellagique) chez la *Dionaea muscipula* sont connues comme étant des agents cytostatiques capable d'induire un arrêt du cycle cellulaire, nous avons analysé le potentiel cytostatique des différentes fractions de l'extrait méthanolique total de feuilles de *Dionaea muscipula* isolées par HPLC

préparative. Les résultats montrent que les fractions F8, F9-13, F14-16, F20-21, F22-23, F24-25 et F26-28 ont un effet sur la prolifération des cellules K562 (Figure 56).

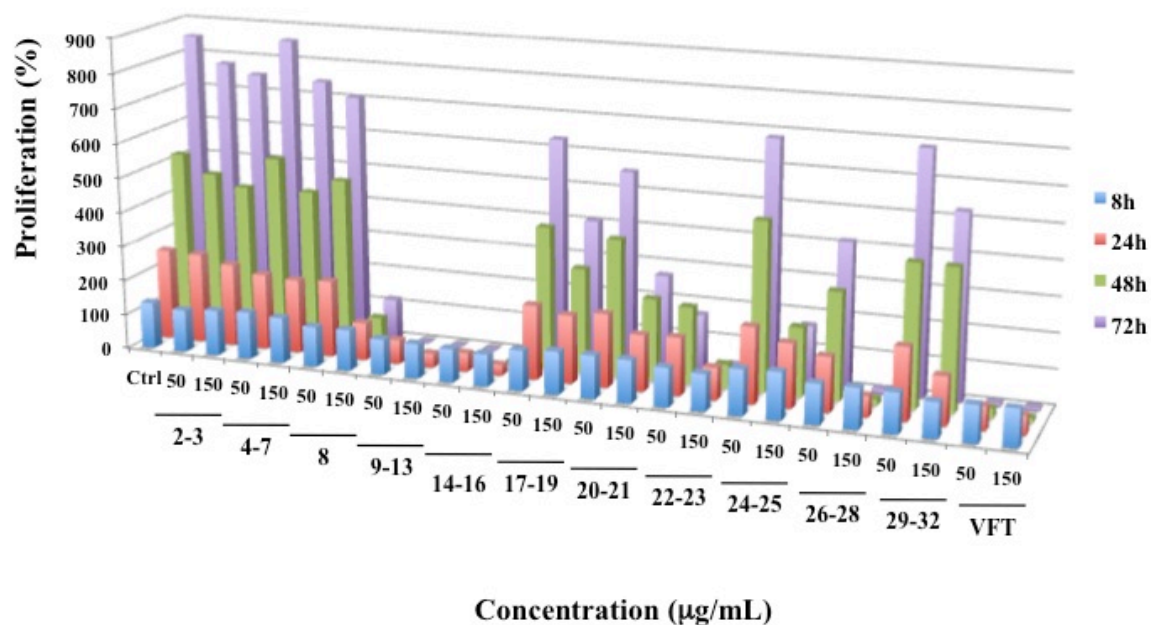


Figure 56 : Analyse du potentiel cytostatique des différentes fractions isolées par HPLC de l'extrait méthanolique total de feuilles de *Dionea muscipula* sur des cellules K562.

Le potentiel cytotoxique a été déterminé à partir des données obtenues lors de l'analyse du potentiel cytotoxique des différentes fractions isolées par HPLC préparative et de l'extrait total (VFT). Les données sont la moyenne de deux expériences menées de façon indépendante.

Après cette analyse, nous avons sélectionné les fractions non – identifiées dotées de propriétés cytotoxique et anti – proliférative dans le but de pouvoir procéder à leur identification. Nous avons écarté les fractions sans effet (F2) et les fractions identifiées (F20 – 21, F22 – 23 et F26 – 28). Nous avons également mis de coté la fraction F9-13 qui est susceptible de contenir un mélange des fractions F8 et F14 – 16.

Comme présenté dans le tableau ci – dessous (Tableau 10), nous avons focalisé notre étude sur les fractions cytotoxiques inconnues, à savoir les fractions F8 et F14 – 16

Tableau 10 : Tableau résumé de l'identification des fractions et de leur potentiel cytotoxique et anti – prolifératif.

Fraction	Identification	Effet biologique	
		Cytotoxicité	Potentiel anti - prolifératif
2 – 3	Inconnue	0	0
8	Inconnue	+	++
14 – 16	Inconnue	+++	+
20 – 21	Acide ellagique / Myricétine	+	+
22 – 23	Quercétine	++	++
26 - 28	Plumbagine	++	+++

Le symbole “0” signifie qu’aucun effet n’a été observé, le symbole “+” signifie qu’un faible effet a été observé, “++” et “+++” signifient respectivement un effet modéré et fort.

Les valeurs des IC₅₀ des fractions F8, F14 – 16 sont présentées dans le tableau suivant (Tableau 11).

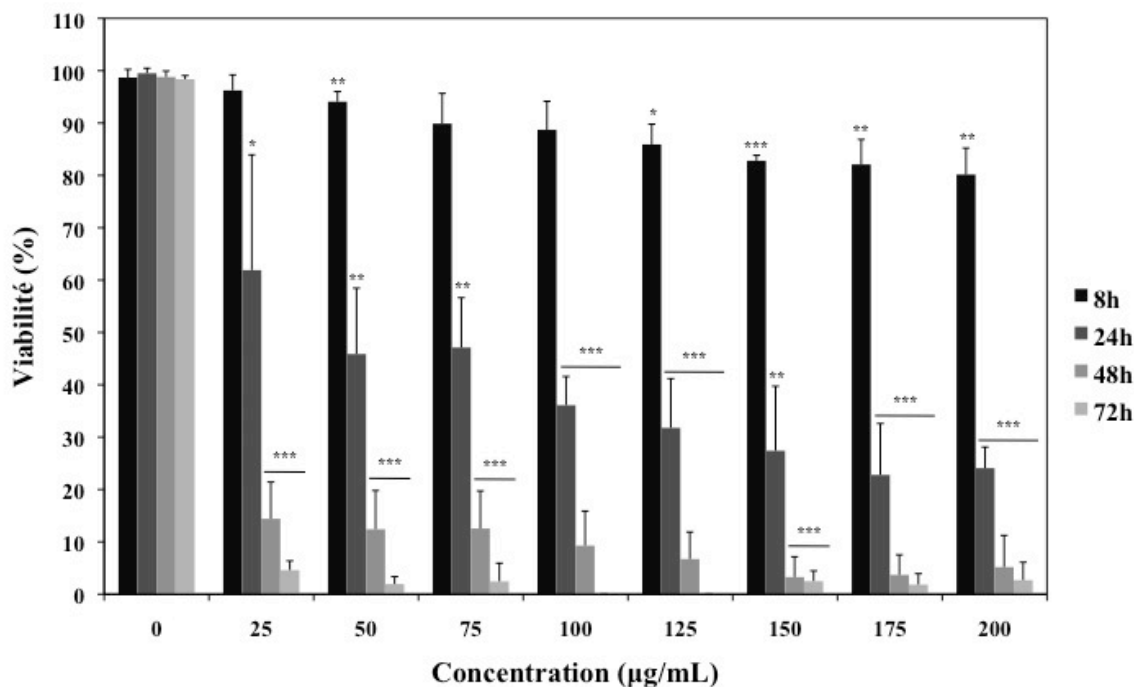


Figure 57 : Analyse de l'effet cytotoxique de la fraction F14-16 isolée par HPLC préparative à partir de l'extrait total de feuilles de *Dionaea muscipula*.

La viabilité cellulaire a été déterminée par le test d'exclusion au bleu trypan après 8, 24, 48 ou 72 heures de traitement des cellules leucémiques K562 avec différentes concentrations de la fraction F14-16 (25, 50, 75, 100, 125, 150, 175 et 200 µg/mL). Les résultats correspondent à la moyenne +/- la déviation standard d'au moins trois expériences indépendantes. * indique une différence statistiquement significative par rapport aux cellules non traitées (* correspondant à une p-valeur < 0,05, ** à une p-valeur < 0,01 et *** à une p-valeur < 0,001).

Tableau 11 : Tableau comparatif des IC₅₀ de l'extrait méthanolique total de feuilles de *Dionaea muscipula* et de la fraction F14 – 16 pour les cellules K562 après 24h de traitement.

Echantillon	IC ₅₀ à 24 heures	
	µg d'extrait/mL	mg de plante sèche/mL
Extrait total	182,7	0,44
Fraction 14 – 16	45,68	0,11

4.2.5 Fractionnement des fractions cytotoxiques d'intérêt F14-16

- **Fractionnement par HPLC préparative**

Le fractionnement de la fraction cytotoxique F14 – 16 a été effectué par HPLC. L'analyse de cette fraction par HPLC analytique révèle la présence d'au moins 12 composés dont l'un est majoritaire (Figure 58).

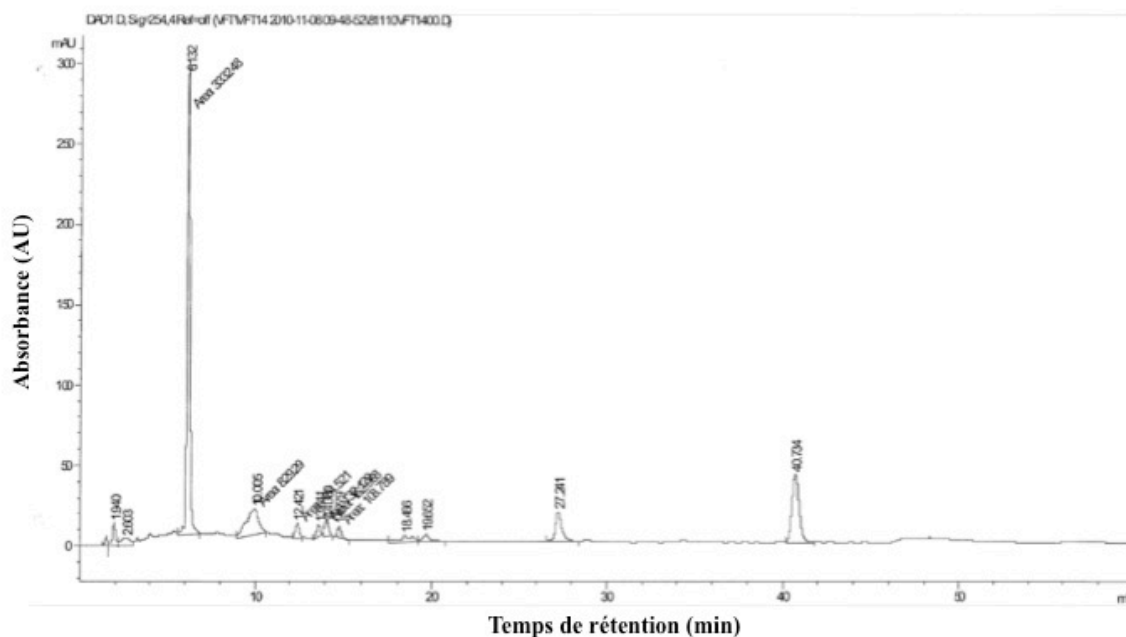


Figure 58 : Chromatogramme des fractions cytotoxiques d'intérêt obtenues par HPLC analytique à 254 nm.

- **Fractionnement par extraction liquide – liquide**

A cause d'un phénomène d'entraînement à la vapeur, il a été impossible d'éliminer par évaporation rotative le méthanol contenu dans le mélange eau – méthanol des fractions F8 et F14 – 16 issues de l'HPLC (présence de liquide coloré dans le ballon « poubelle »). Nous avons donc procédé à une extraction liquide – liquide (voir matériel et méthodes) des fractions avec un mélange dichlorométhane – eau où les fractions issues de l'HPLC préparative sont assimilées à l'eau. Ce second fractionnement a permis l'obtention de 4 sous – fractions : F8 organique, F8 aqueuse, F14 – 16 organique et F14 – 16 aqueuse.

- **Analyse de la pureté des sous – fractions**

Nous avons ensuite analysé la pureté des différentes sous – fractions obtenues, à savoir les sous – fractions organique et aqueuse F8 et F14 – 16 par HPLC (non présenté dans ce manuscrit) et par chromatographie sur couche mince (CCM). Par mesure de précaution, nous avons également procédé à l’analyse du dichlorométhane évaporé à partir des phases organiques F8 et F14 – 16 afin de vérifier qu’aucune substance n’a été entraînée avec le dichlorométhane. L’analyse par CCM révèle que aucune substance aromatique n’a été entraînée lors de l’évaporation du dichlorométhane contenu dans les fractions organiques (Figure 59A). La fraction organique F14 – F16 contient une seule substance organique (Figure 59B).

La fraction organique F8 ne nous a pas fourni assez de matériel, nous n’avons dès lors pas été en mesure de pouvoir mener procéder à son identification.

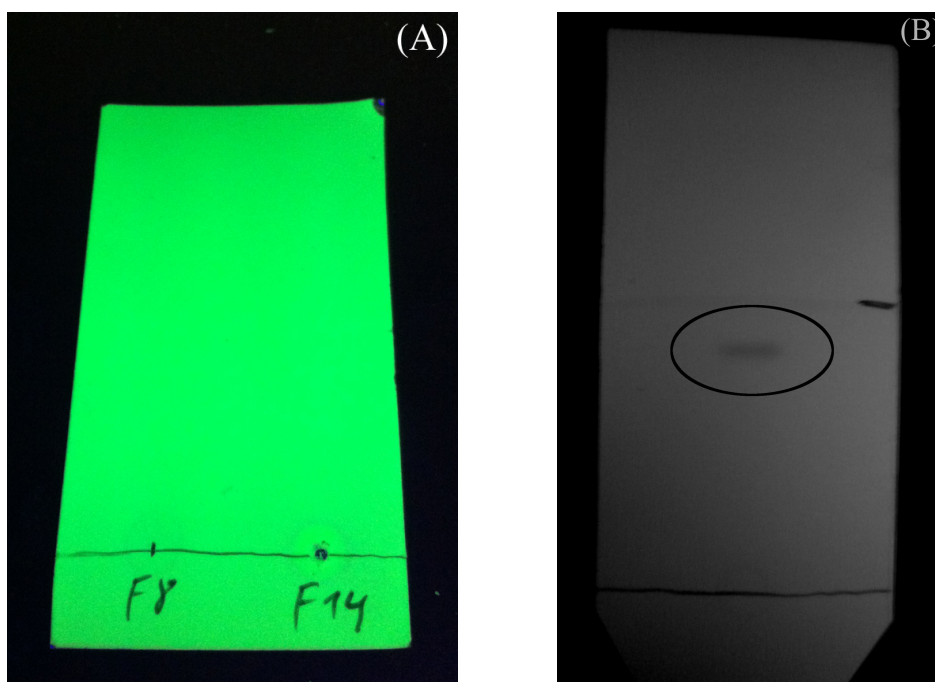


Figure 59 : Analyse de la pureté des sous – fractions par CCM.

- **Analyse du potentiel cytotoxique des sous – fractions organique et aqueuse F14 – 16**

Dans le but de déterminer dans la quelle des sous – fractions organique ou aqueuse était contenue la molécule cytotoxique inconnue, nous avons analysé le potentiel cytotoxique de chacune des fractions sur des cellules K562. L'analyse révèle que la majeure partie de la molécule inconnue se trouve dans la sous – fraction organique F14 – 16 (Figure 60).

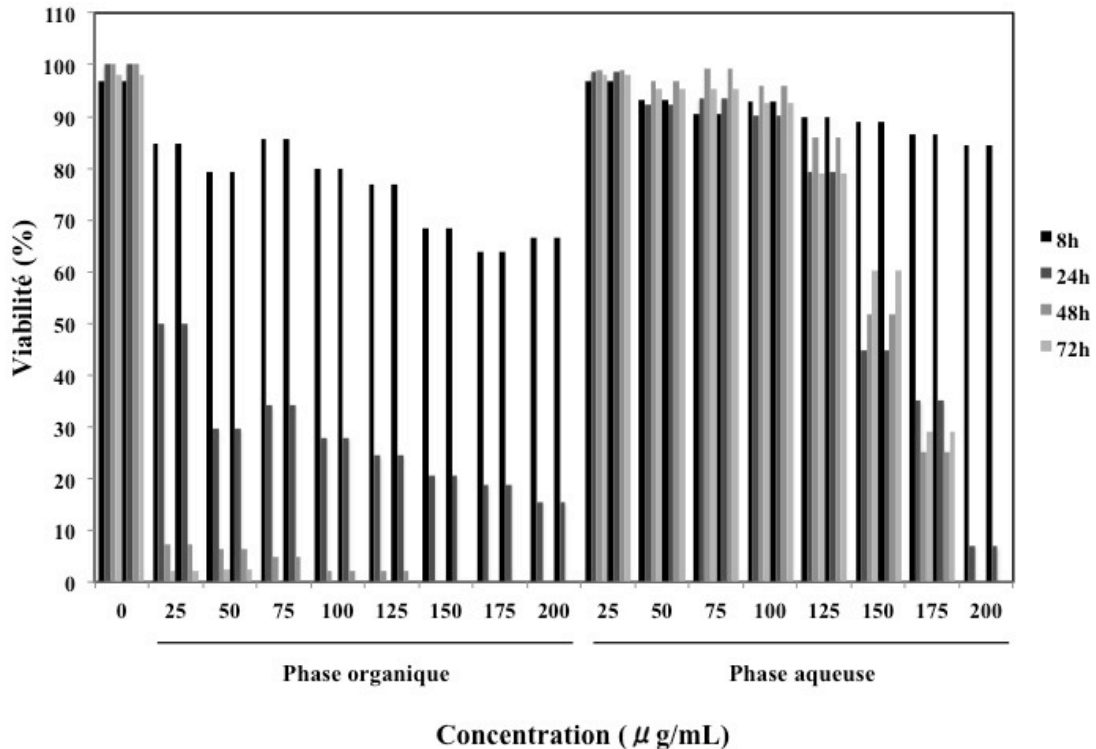
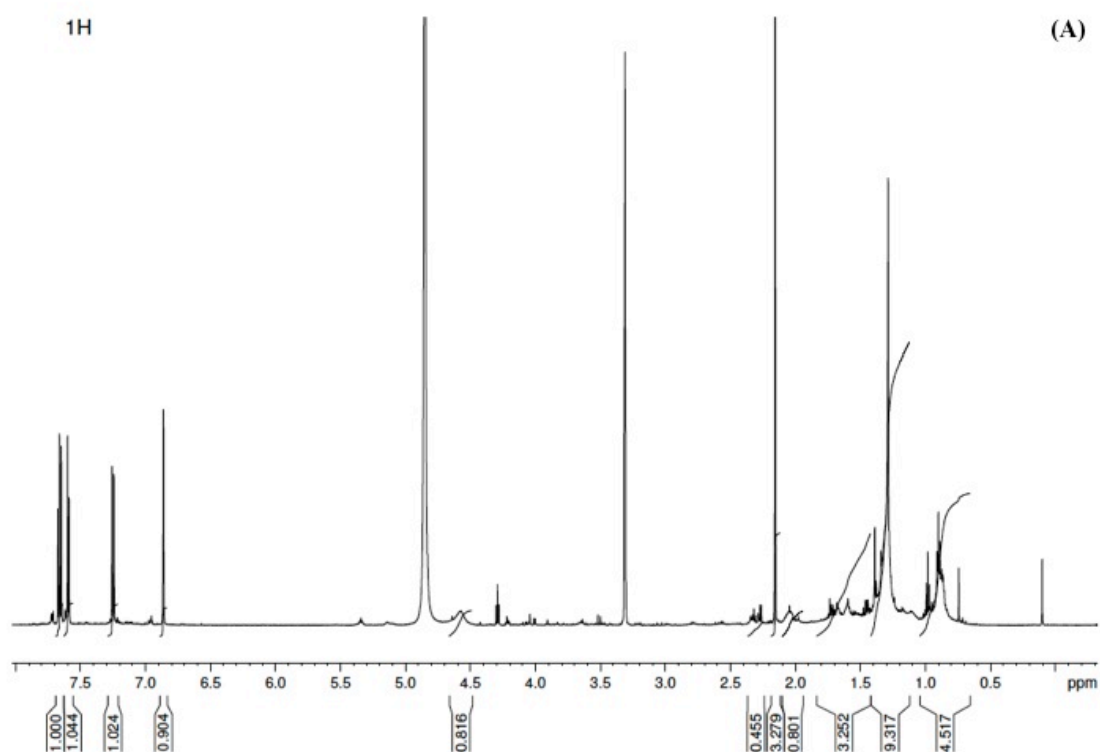


Figure 60 : Analyse du potentiel cytotoxique des sous – fractions aqueuse et organique F14 – 16

La viabilité cellulaire a été déterminée par le test d'exclusion au bleu trypan après 8, 24, 48 ou 72 heures de traitement des cellules leucémiques K562 avec différentes concentrations des sous – fractions F14 – 16 aqueuse et organique (25, 50, 75, 100, 125, 150, 175 et 200 µg/mL).

4.2.6 Identification par RMN de la plumbagine comme composant majeur de la fraction d'intérêt

L'identification du composé purifié F14 – 16 a été obtenue après analyse de l'échantillon par résonance magnétique nucléaire. L'interprétation et l'analyse des différents spectres RMN obtenus (Figure 61 à Figure 65) a conduit à l'identification de la 5 – hydroxy – 2 – méthyl – 1,4 naphthoquinone (Figure 66), également appelé plumbagine comme étant le constituant principal de la fraction organique F14 – 16.



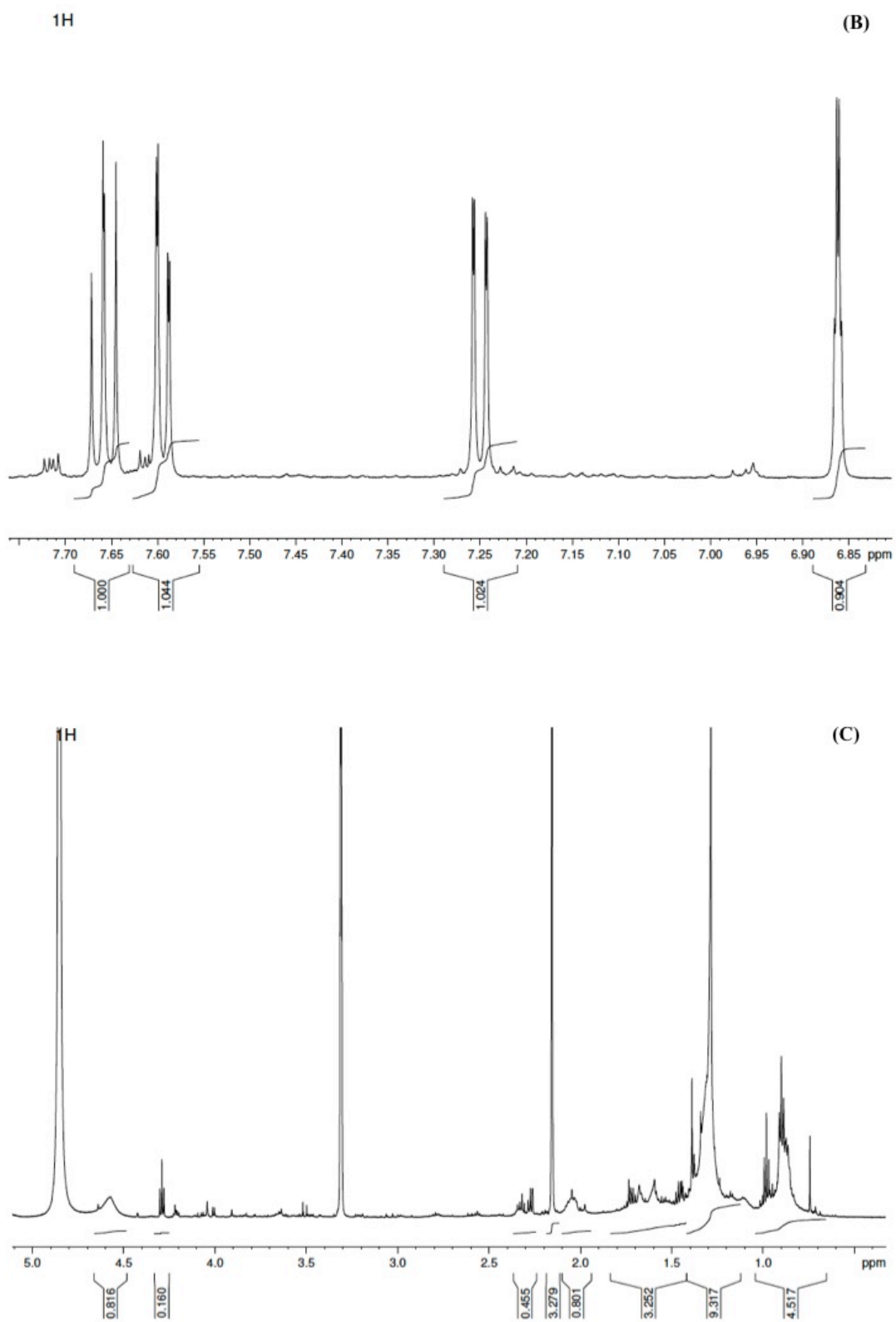


Figure 61 : Spectre de RMN 1H du composé F14-16

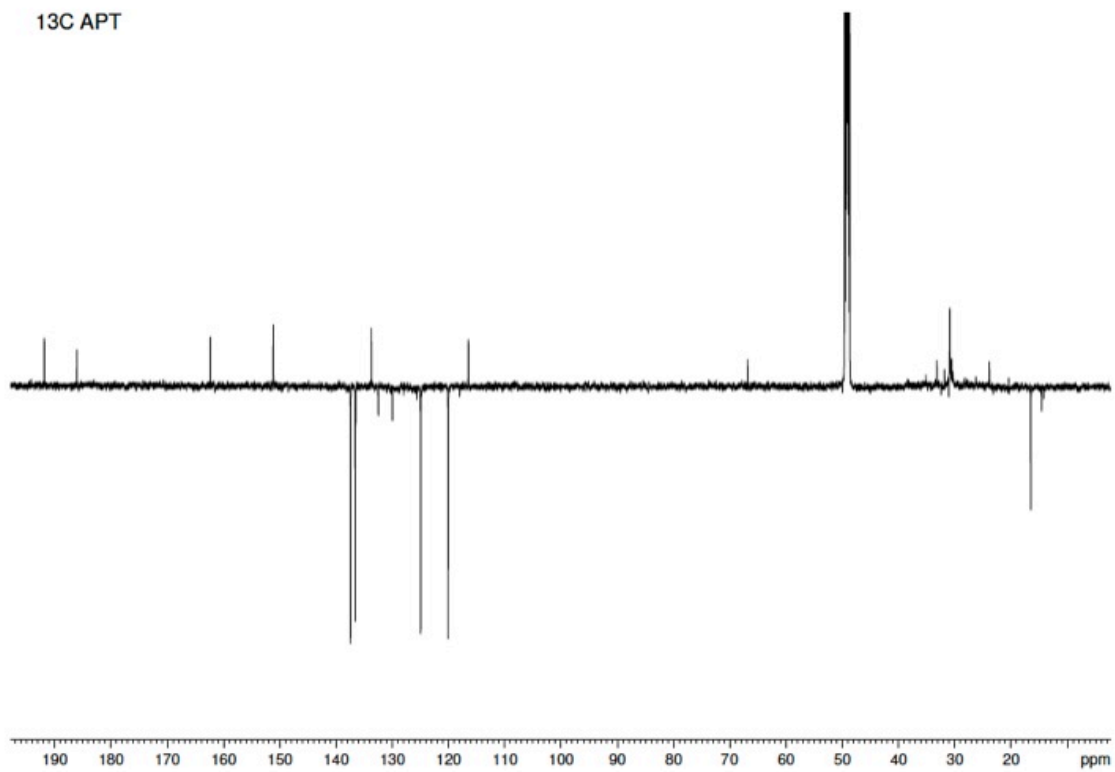
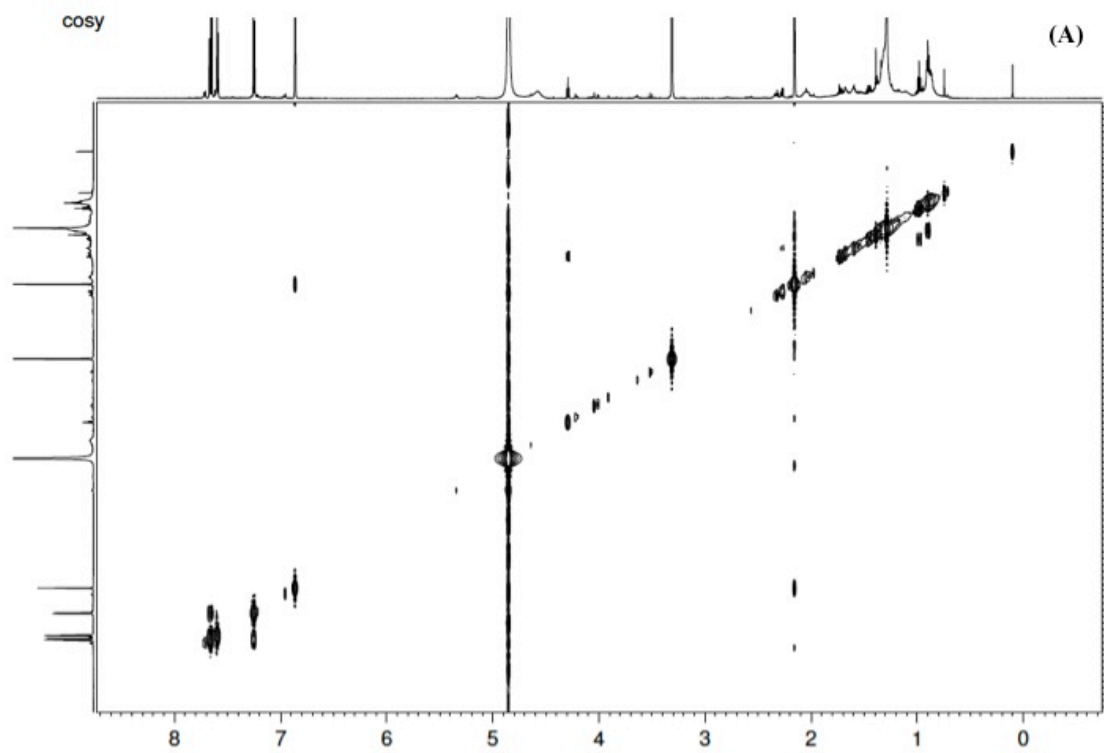


Figure 62 : Spectre de RMN ^{13}C APT du composé F14-16



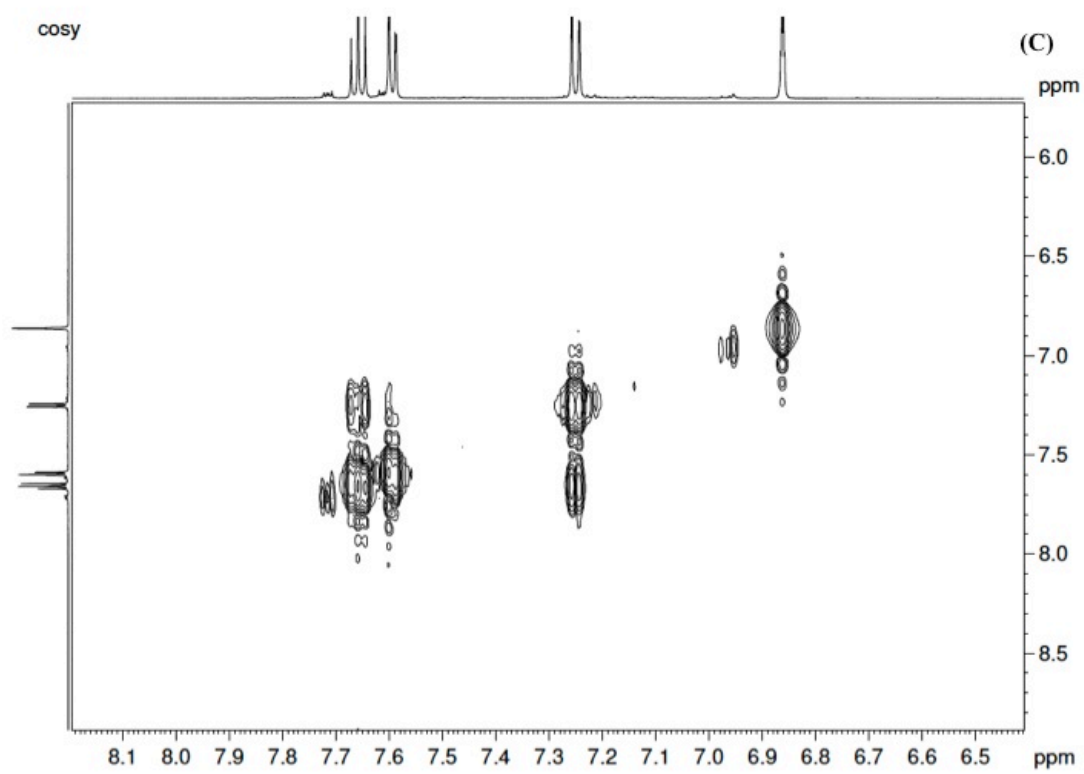
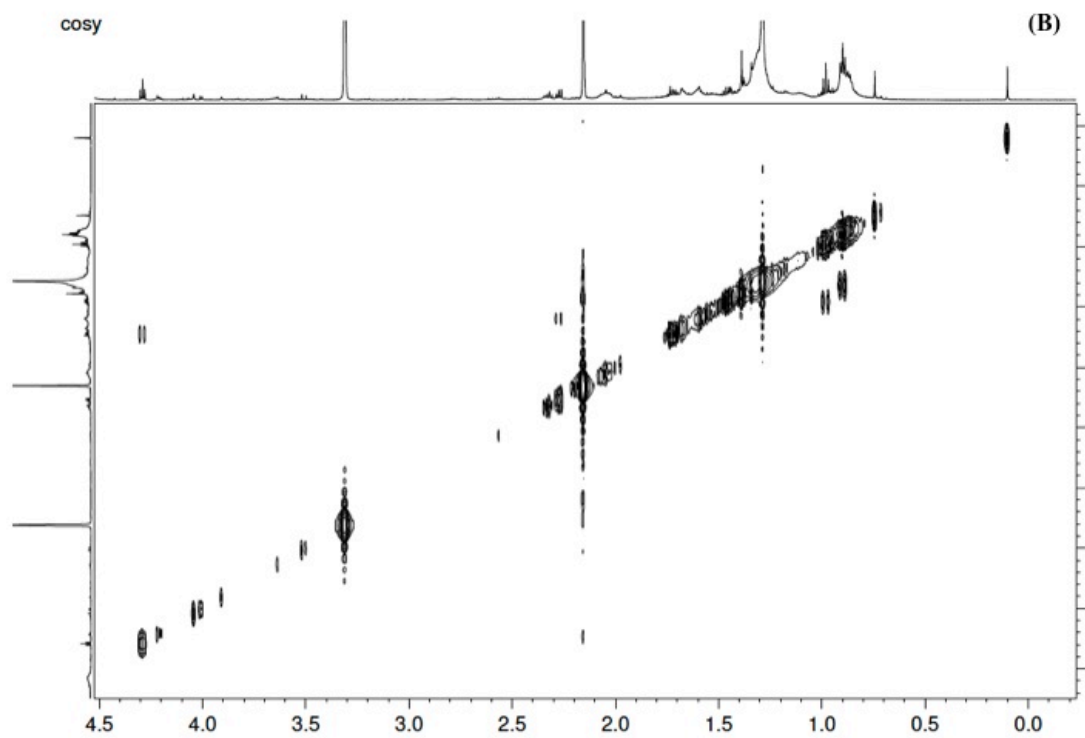
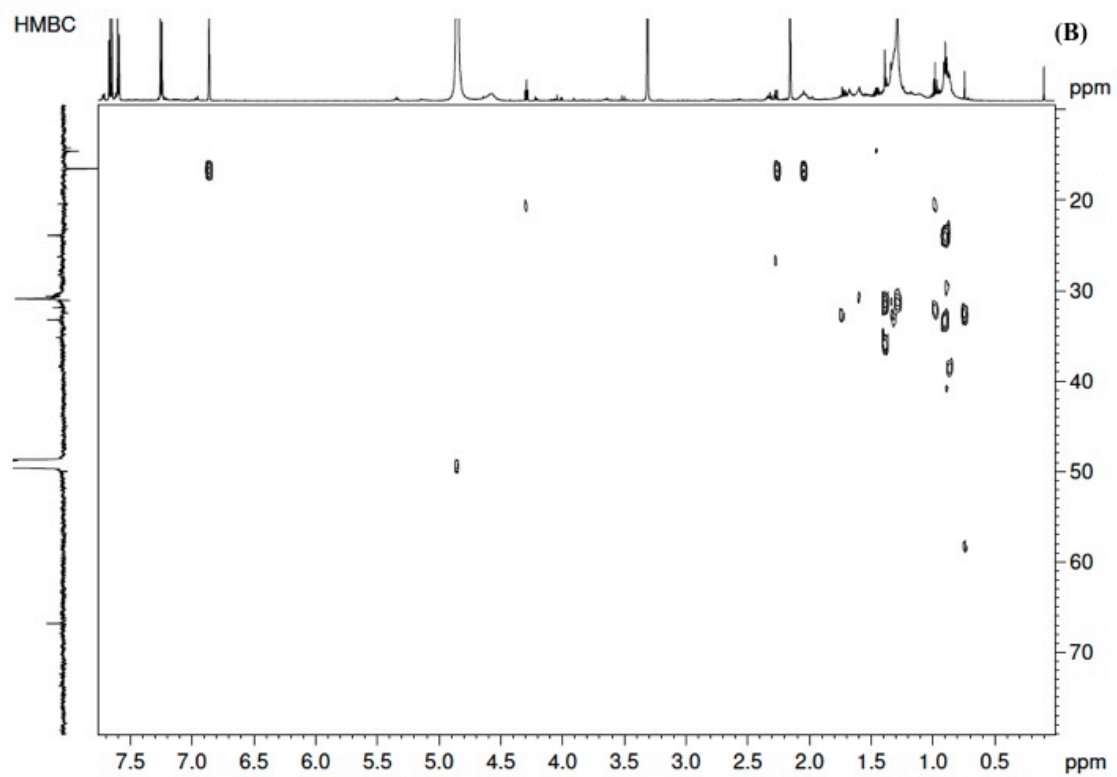
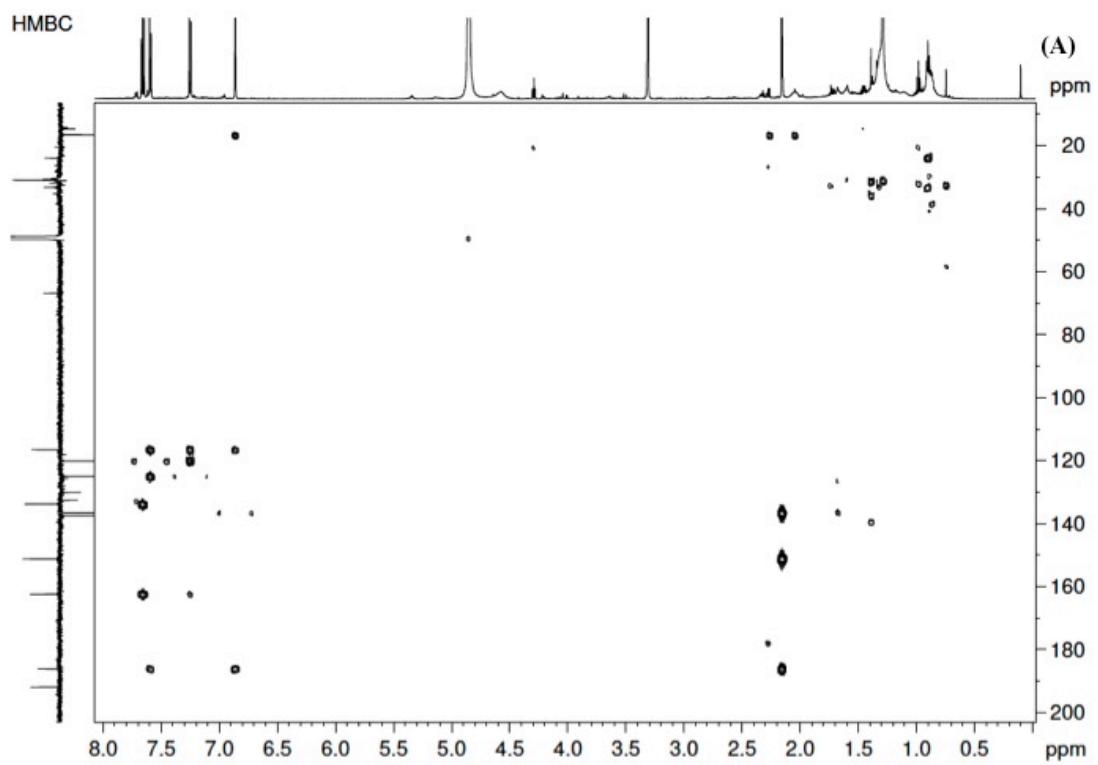


Figure 63 : Spectre RMN COSY du composé F14-16



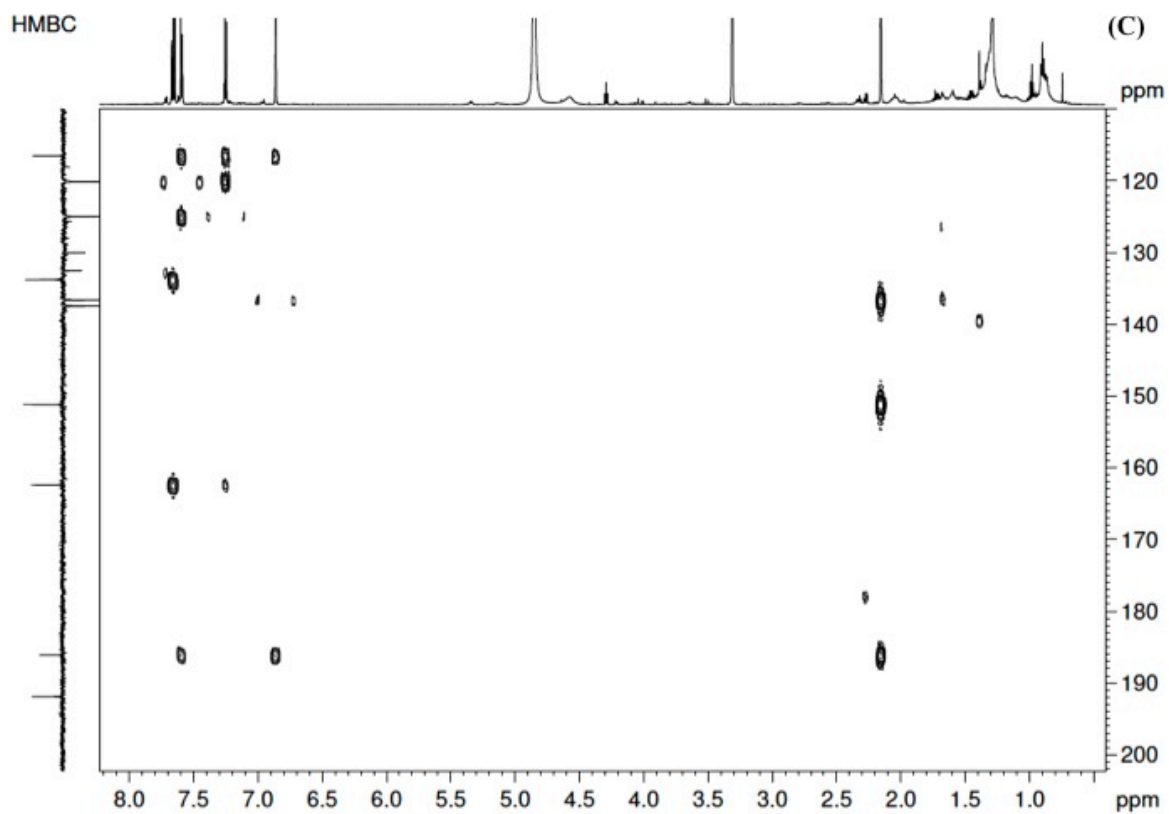
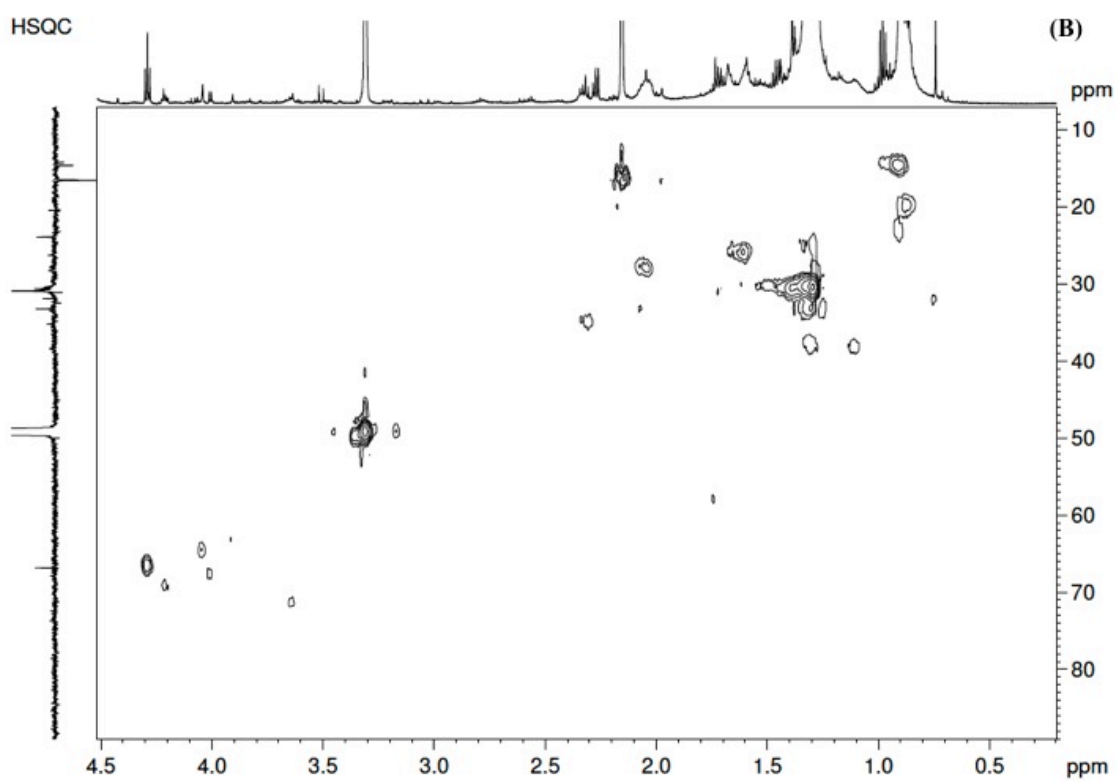
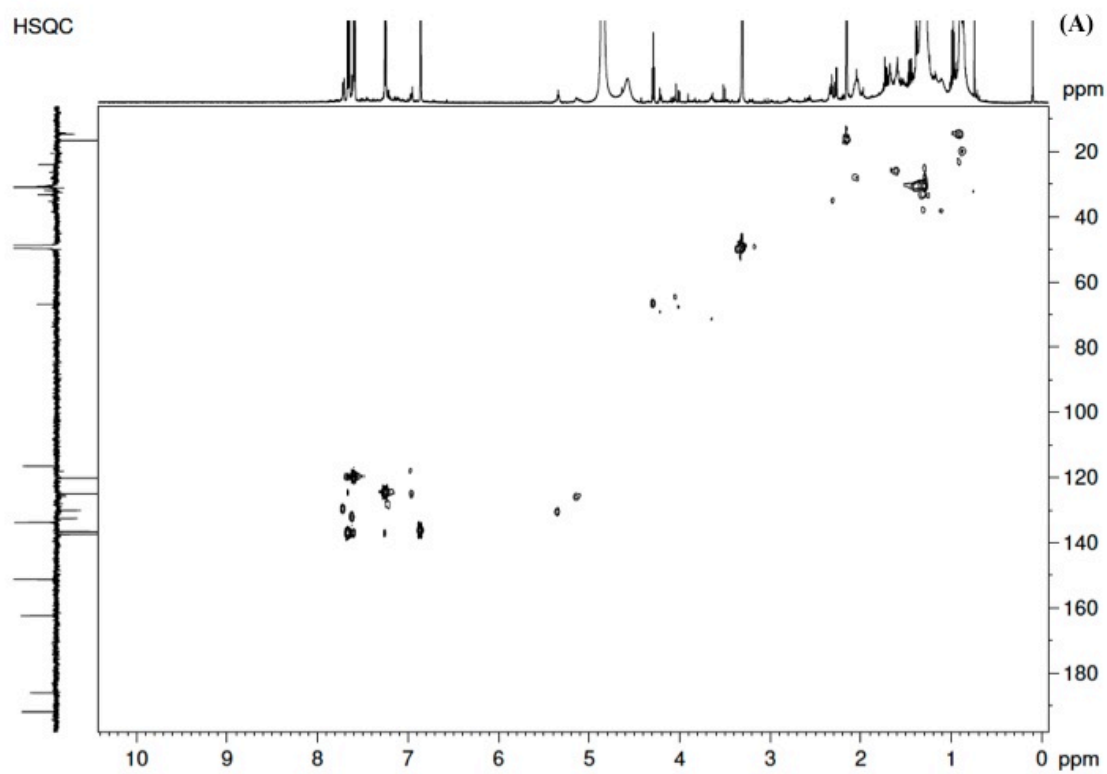


Figure 64 : Spectre RMN HMBC du composé F14 – 16.



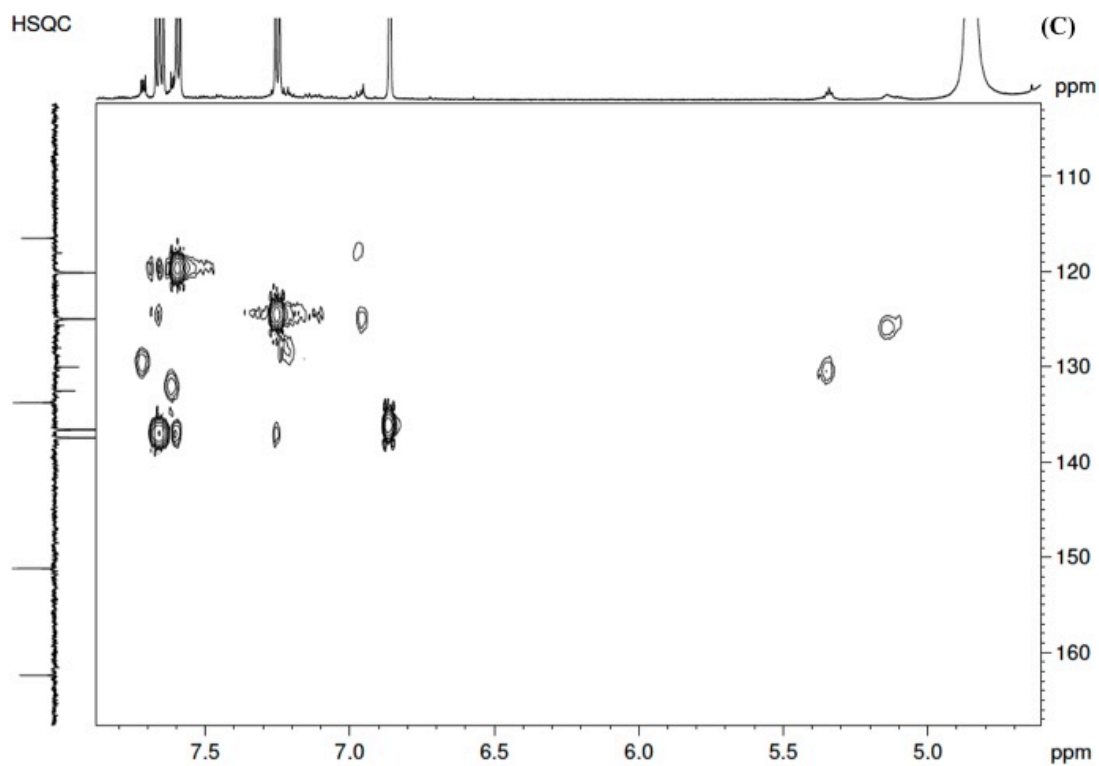


Figure 65 : Spectre RMN HSQC du composé F14 – 16.

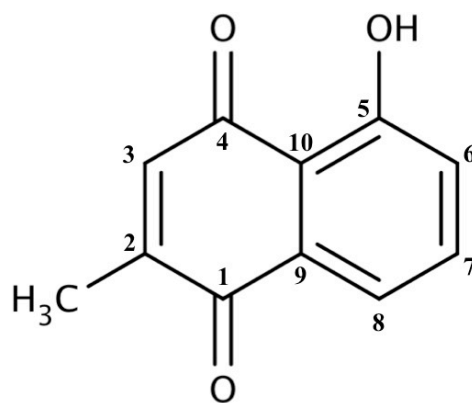


Figure 66 : Structure de la plumbagine (5 – hydroxy – 2 – méthyl – 1,4 – naphthoquinone).

4.2.7 Effet de la plumbagine pure commerciale sur une sélection de lignées leucémiques et sur des cellules saines

L'analyse de la viabilité cellulaire d'une sélection de cellules leucémiques par la méthode au bleu Trypan après traitement pendant 8, 24, 48 et 72 heures avec différentes concentrations de plumbagine commerciale a montré que toutes ces lignées présentent une sensibilité vis-à-vis de ce traitement à partir d'une concentration de 0,25 μM (données non présentées) et qu'une concentration de 5 μM de plumbagine était suffisante pour induire en 24 heures la mort d'au moins 50% des cellules dans chaque lignée (Tableau 12). Cependant certaines cellules sont apparues comme étant plus sensibles au traitement que d'autres lignées. Ainsi parmi toutes les lignées analysées, les cellules U937 sont les plus sensibles au traitement à la plumbagine avec respectivement une IC_{50} de 0,82 μM après 24 heures et bien que baissant de près de 20%, cette valeur reste dans le même ordre de grandeur (0,66 μM) après 72 heures de traitement. A l'opposé, les cellules Raji se sont montrés comme les cellules les plus sensibles de ce groupe avec une IC_{50} de 5,06 μM après 24 heures de traitement. Cette valeur diminuant d'environ 50% après 72 heures en passant de 5,06 à 2,66 μM mais restant tout de même la valeur la plus élevée parmi celles obtenues après 72 heures de traitement. Les autres lignées testées, à savoir HL-60, Jurkat et K462 ont quant à elles montré une sensibilité modérée vis-à-vis du traitement à la plumbagine avec une valeur d' IC_{50} légèrement inférieure après 72 heures de traitement. Les valeurs des IC_{50} des lignées HL-60 et K562 restent pratiquement inchangées entre 24 et 72 heures en passant respectivement de 1,38 à 0,90 μM et de 1,07 à 0,89 μM . Les cellules Jurkat se sont montrées plus résistantes après 24 heures de traitement avec une IC_{50} de 2,20 μM mais cette valeur chutant de près de 50 % après 72 heures de traitement pour passer à 0,86 μM et retomber dans un ordre de valeur des IC_{50} des cellules HL-60 et K562. Aucune cytotoxicité significative (< 80% de viabilité) ne fut observée quant à un effet de la plumbagine sur des cellules saines mononuclées du sang périphérique (PBMC) obtenues à partir de concentrés leuco-plaquettaire après 24 et 48 heures de traitement même à la plus forte concentration (10 μM).

Afin d'identifier et d'étudier les raisons derrière la différence de sensibilité à un traitement par la plumbagine nous avons sélectionné les cellules les plus résistantes et les cellules les plus sensibles à un tel traitement, à savoir les cellules Raji et les cellules U937.

Tableau 12 : Tableau des valeurs des IC₅₀ de la viabilité de cellules traitées à la plumbagine.

Tableau des valeurs des IC₅₀ de la viabilité des cellules leucémiques et des cellules de type PBMC traitées par la plumbagine commerciale obtenue par comptage au bleu trypan sur un hématimètre de type Malassez. N.C. : non cytotoxique (viabilité ≥ 80%) pour une concentration jusque 10 μM.

		IC ₅₀ (μM)		
		24h	48h	72h
Lignées leucémiques	HL – 60	1,38 ± 0,37	0,92 ± 0,16	0,90 ± 0,13
	Jurkat	2,20 ± 1,07	0,98 ± 0,15	0,86 ± 0,16
	K562	1,07 ± 0,33	0,90 ± 0,32	0,89 ± 0,30
	Raji	5,06 ± 0,22	3,49 ± 0,12	2,66 ± 0,03
	U937	0,82 ± 0,04	0,68 ± 0,01	0,66 ± 0,02
Cellules saines	PBMC	N.C.	N.C.	

4.2.8 Mort des cellules U937 et Raji induite par la plumbagine

Dans l'optique d'identifier le type de mort cellulaire déclenché après traitement par la plumbagine dans les deux lignées cellulaires sélectionnées, nous avons analysé par microscopie à fluorescence après marquage au Hoechst et à l'iodure de propidium la morphologie des cellules Raji et U937. Cette analyse confirme d'une part les résultats précédemment obtenus montrant que les cellules U937 sont plus sensibles à un traitement par la plumbagine que ne le sont les cellules Raji. D'autre part, les résultats montrent que dans les deux lignées, la mort des cellules a lieu par un mécanisme d'apoptose (Figure 67).

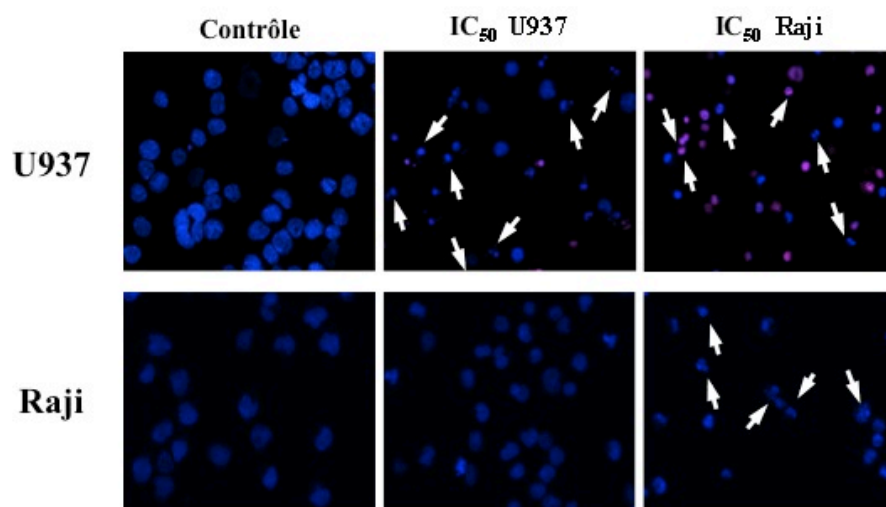


Figure 67 : Identification du type de mort induit par la plumbagine dans les cellules Raji et U937 par microscopie à fluorescence.

Les cellules Raji et U937 ont été traitées pendant 24 heures par différentes concentrations de plumbagine puis marquées avec solution de Hoechst 33342 et d'iodure de propidium. Les cellules ont ensuite été observées au microscope à fluorescence.

Ces résultats obtenus par microscopie à fluorescence ont été confirmés par analyse en cytométrie en flux de l'exposition externe de la phosphatidylsérine et de l'intégrité membranaire après marquage à l'Annexine V et à l'iodure de propidium de cellules Raji et U937 (Figure 68).

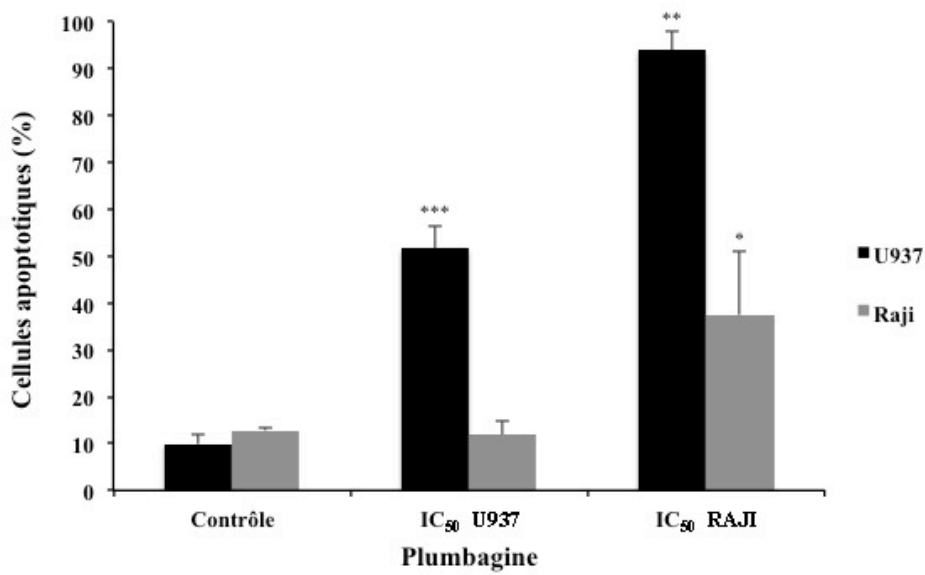
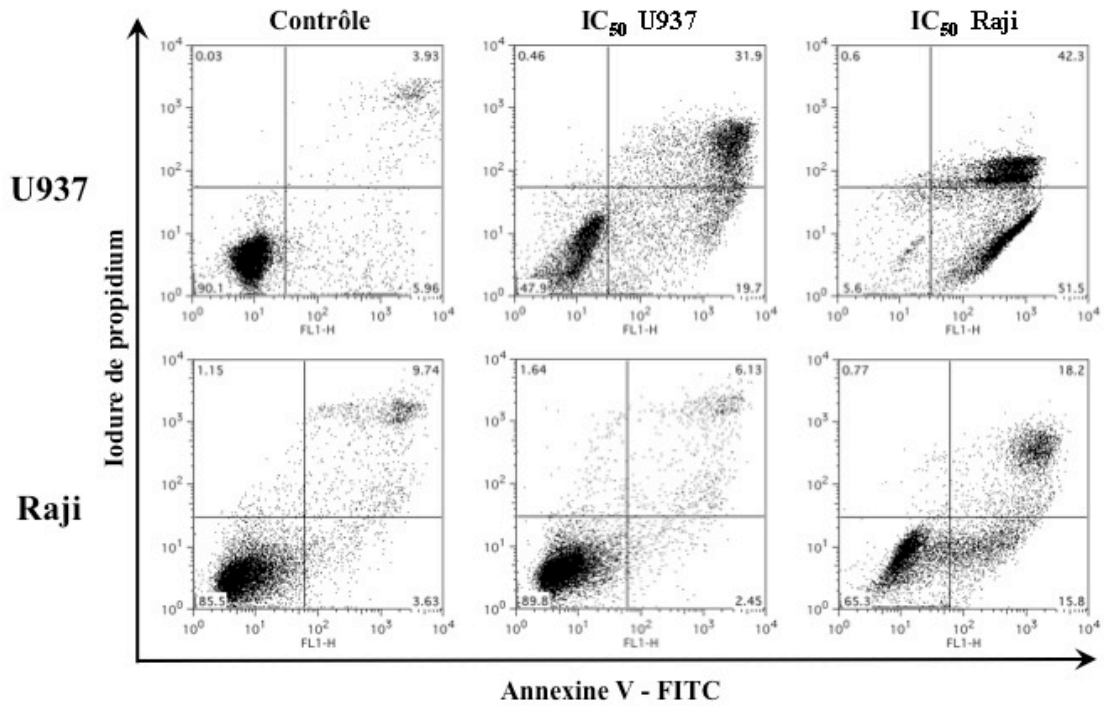


Figure 68 : Identification du type de mort induit par la plumbagine dans les cellules Raji et U937 par cytométrie en flux

Les cellules Raji et U937 ont été traitées pendant 24 heures avec différentes concentrations de plumbagine, puis marquées à l'Annexin V – FITC et à l'iodure de propidium. Les figures présentées ici sont représentatives d'au moins trois expériences indépendantes. Les résultats représentent la moyenne d'au moins trois expériences indépendantes \pm DS (déviation standard). ** : $p < 0,01$ et *** : $p < 0,001$.

Afin de confirmer les résultats obtenus par cytométrie en flux et par microscopie à fluorescence qui montrent que la mort des cellules U937 et Raji résulte d'un phénomène d'apoptose, nous avons analysé par Western – Blot, le profil d'expression de différents marqueurs apoptotiques de référence. Un traitement de 4 heures à une concentration de 1 μ M de plumbagine induit un clivage des caspases 3, 7, 8 et 9 ainsi qu'une diminution de l'expression de la protéine Mcl-1. Il est à noter également qu'aucune variation de la protéine Bcl-2 n'est observée (Figure 69). L'ensemble de ces résultats montre que la plumbagine induit la mort des cellules U937 à lieu par le mécanisme d'apoptose.

Dans le cas des cellules Raji, une concentration de 4 μ M de plumbagin pendant 4 heures laisse apparaître les premiers signes de clivages de caspases 7, 8 et 9. Après 8 heures de traitement, une diminution de la protéine Mcl-1 est également observée. Comme dans les cas des cellules U937, aucune variation de la protéine Bcl-2 n'a pu être observée (Figure 70).

L'ensemble de ces résultats montre qu'un traitement par la plumbagine induit la mort des cellules U937 et Raji par un mécanisme d'apoptose. Ces résultats confirment également la différence de sensibilité de ces deux lignées précédemment observée par le test d'exclusion au bleu trypan.

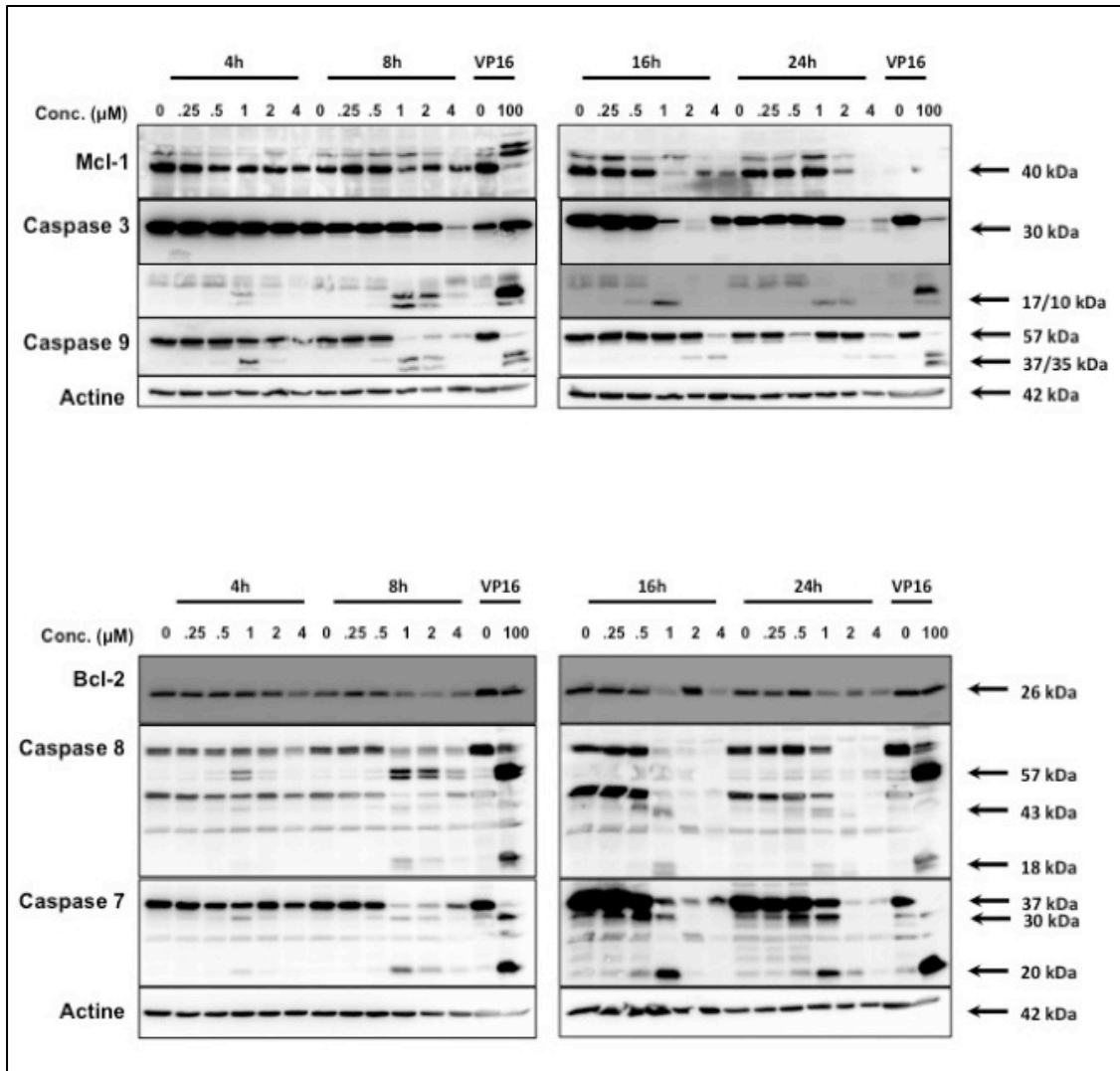


Figure 69 : Effet de la plumbagine sur différents marqueurs de mort des cellules U937 par apoptose.

Les cellules U937 ont été traitées pendant 4, 8, 16 et 24 heures par différentes concentrations de plumbagine. Le niveau d'expression des protéines caspase 3, 7, 8 et 9, Bcl-2 et Mcl-1 est analysé par Western – Blot. Des cellules U937 uniquement traitées à l'étoposide ont été utilisées comme contrôle positif (Ctrl) pour l'apoptose. Les figures présentées ici sont représentatives d'au moins trois expériences indépendantes.

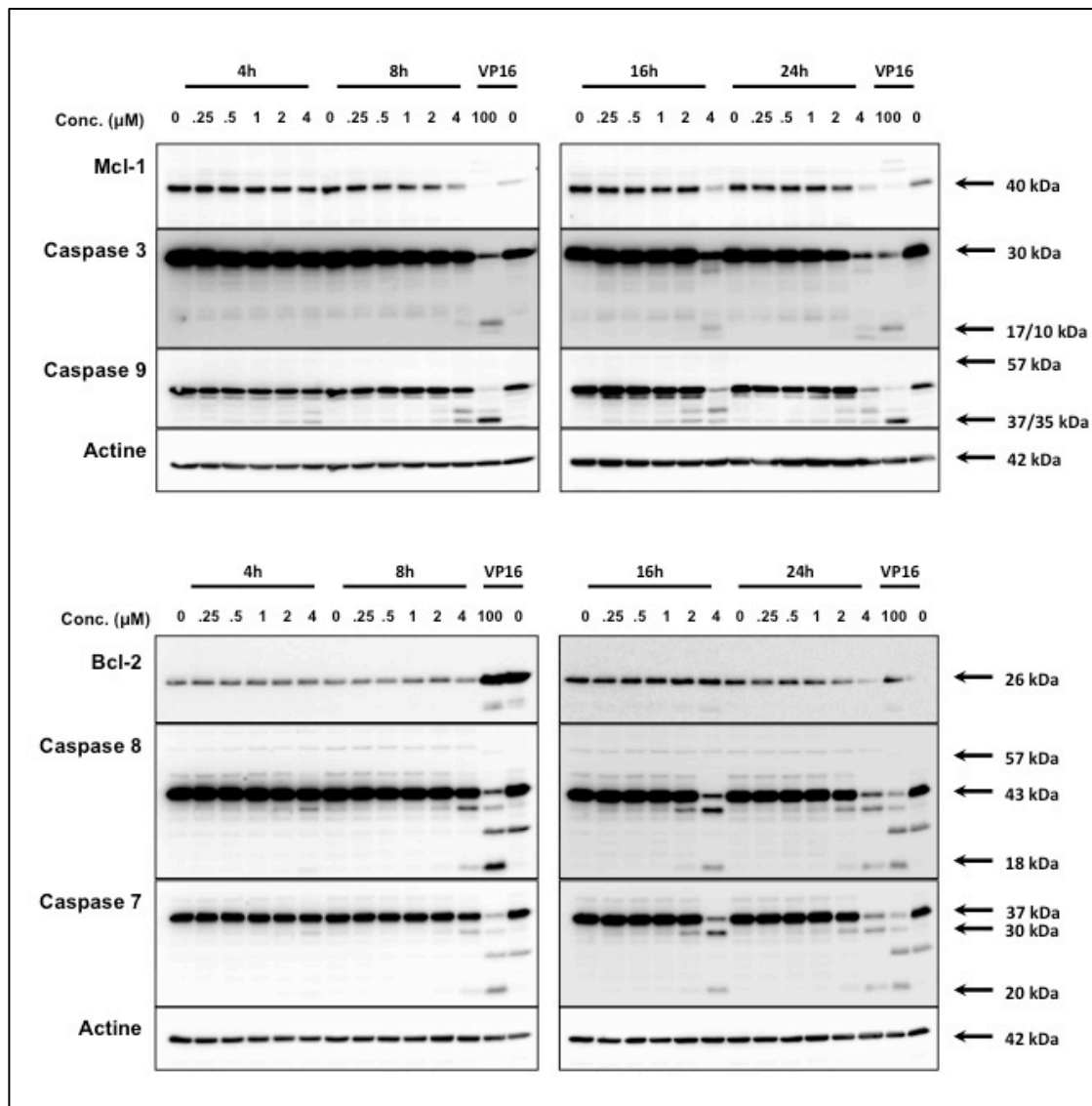


Figure 70 : Effet de la plumbagine sur différents marqueurs de mort des cellules Raji par apoptose.

Les cellules Raji ont été traitées pendant 4, 8, 16 et 24 heures par différentes concentrations de plumbagine. Le niveau d'expression des protéines caspase 3, 7, 8 et 9, Bcl-2 et Mcl-1 est analysé par Western – Blot. Des cellules U937 uniquement traitées à l'étoposide ont été utilisées comme contrôle positif (VP-16) pour l'apoptose. Les figures présentées ici sont représentatives d'au moins trois expériences indépendantes.

4.2.9 Mesure des espèces réactives de l'oxygène induites par la plumbagine dans les cellules Raji et U937

Comme la plumbagine est connue pour induire la mort de plusieurs lignées cellulaires cancéreuses par la formation d'espèces réactives de l'oxygène (Lee et al., 2012a; Powolny and Singh, 2008; Sun and McKallip, 2011; Tian et al., 2012a; Wang et al., 2008; Xu and Lu, 2010; Xu et al., 2013b), nous avons voulu vérifier si cela était également valable pour les cellules Raji et U937.

Nous avons donc souhaité savoir si la plumbagine induisait la formation d'espèces réactives de l'oxygène dans les deux lignées étudiées et si cela pouvait expliquer la différence de sensibilité vis – à – vis de ce composé. Nous avons analysé le niveau d'espèces réactives de l'oxygène induit par la plumbagine par cytométrie en flux en utilisant la sonde diacétate de dichloro – fluorescéine (H₂DCFDA). Nous observons que la plumbagine induit la formation d'espèces réactives de l'oxygène dans les deux lignées (Figure 71). Une concentration de 1 µM de plumbagine pendant 15 minutes provoque la formation d'espèces réactives de l'oxygène dans les cellules Raji tout comme dans les cellules U937. Les résultats montrent également que dans les deux lignées, la formation d'espèces réactives de l'oxygène n'est pas en corrélation directe avec la dose de plumbagine. Dans le cas des cellules résistantes Raji, la plumbagine induit une élévation du niveau d'espèces réactives de l'oxygène de 3 à 4 fois supérieure au témoin après 15 minutes de traitement et que ce niveau redescend au niveau basal après 60 à 120 minutes. Dans les cellules sensibles U937, en 15 minutes, une concentration de 1 µM de plumbagine augmente d'au moins 20 fois le niveau d'espèces réactives de l'oxygène par rapport au témoin et après 120 minutes, ce niveau reste largement supérieur par rapport au témoin.

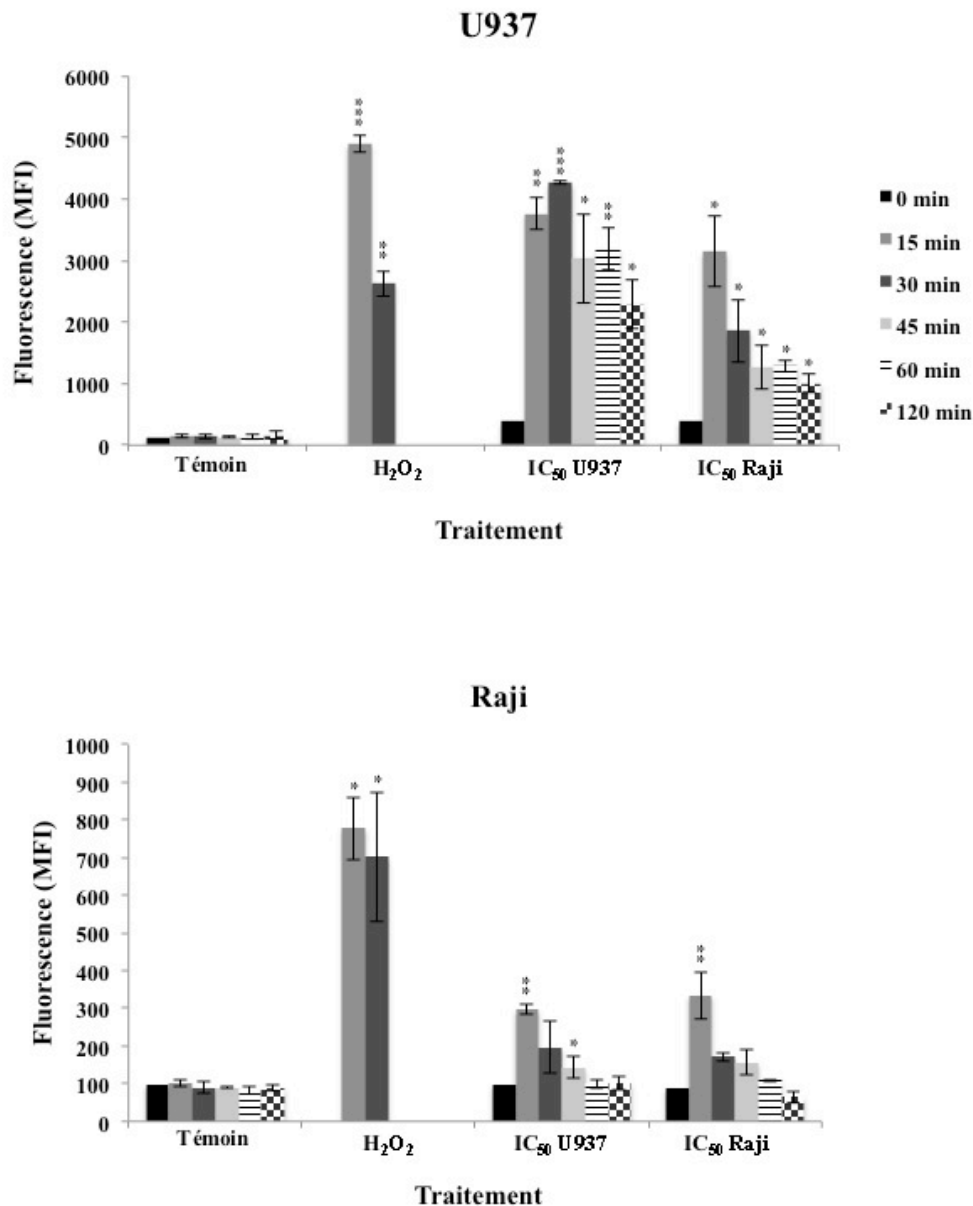


Figure 71 : Mesure du niveau d'espèces réactives de l'oxygène dans des cellules Raji et U937 traitées à la plumbagine.

Des cellules Raji et U937 ont été traitées par la plumbagine et leur niveau d'espèces réactives de l'oxygène a été mesuré par cytométrie en flux après marquage au diacétate de dichlorofluorescéine (H₂DCFDA) après 15, 30, 45, 60 et 120 minutes. Le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) a été utilisé comme contrôle positif pour la formation d'espèces réactives de l'oxygène. Les résultats correspondent à la moyenne +/- la déviation standard d'au moins trois expériences indépendantes. * indique une différence statistiquement significative par rapport aux cellules non traitées (* correspondant à une p-valeur < 0,05, ** pour p-valeur < 0,01 et *** pour p-valeur < 0,001).

Dans le but de confirmer que la plumbagine induit effectivement la formation d'espèces réactives de l'oxygène dans les cellules Raji et U937, nous avons pré – traitées des cellules par la *N* – acétyl – L – cystéine (NAC), un composé connu comme un inhibiteur de la formation d'espèces réactives de l'oxygène. Les résultats montrent qu'un pré – traitement par la NAC atténue la formation d'espèces réactives de l'oxygène induite par la plumbagine et ce, dans les deux lignées étudiées (Figure 72).

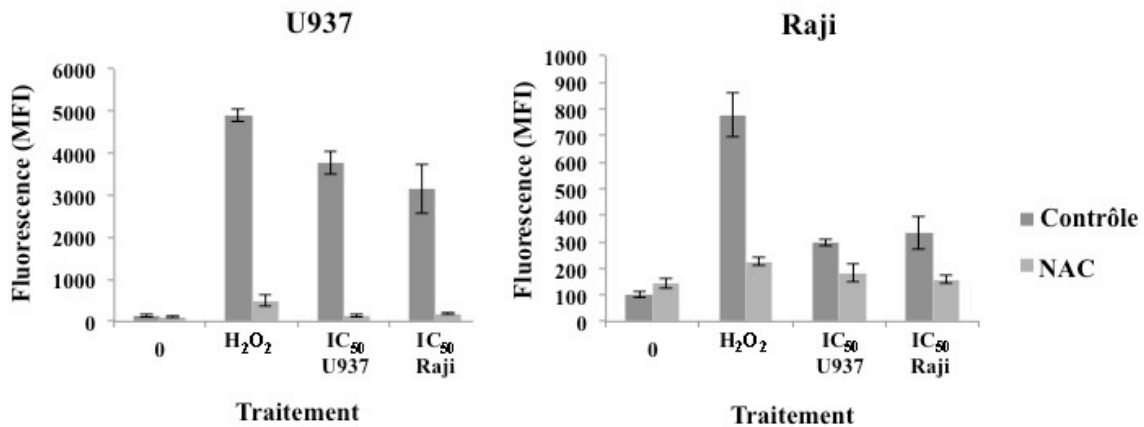


Figure 72 : Mesure du niveau d'espèces réactives de l'oxygène induit par la plumbagine dans des cellules Raji et U937 pré – traitées par la NAC.

Des cellules Raji et U937 pré – traitées par la *N* – acétyl – L – cystéine (NAC) ont été traitées par la plumbagine et leur niveau d'espèces réactives de l'oxygène a été mesuré par cytométrie en flux après marquage au diacétate de dichlorofluorescéine (H₂DCFDA) après 15 minutes. Le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) a été utilisé comme contrôle positif pour la formation d'espèces réactives de l'oxygène. Les résultats correspondent à la moyenne +/- la déviation standard d'au moins trois expériences indépendantes.

Ensuite, afin de vérifier que la formation d'espèces réactives de l'oxygène induite par la plumbagine est effectivement responsable de la mort des cellules Raji et U937 par apoptose, nous avons analysé par cytométrie en flux le potentiel mitochondrial membranaire de cellules Raji et U937 pré – traitées par la NAC après traitement par la plumbagine pendant 24 heures. Les résultats obtenus montrent que dans les deux cas, le pré – traitement par la NAC empêche la mort par apoptose des cellules exposées à la plumbagine (Figure 73).

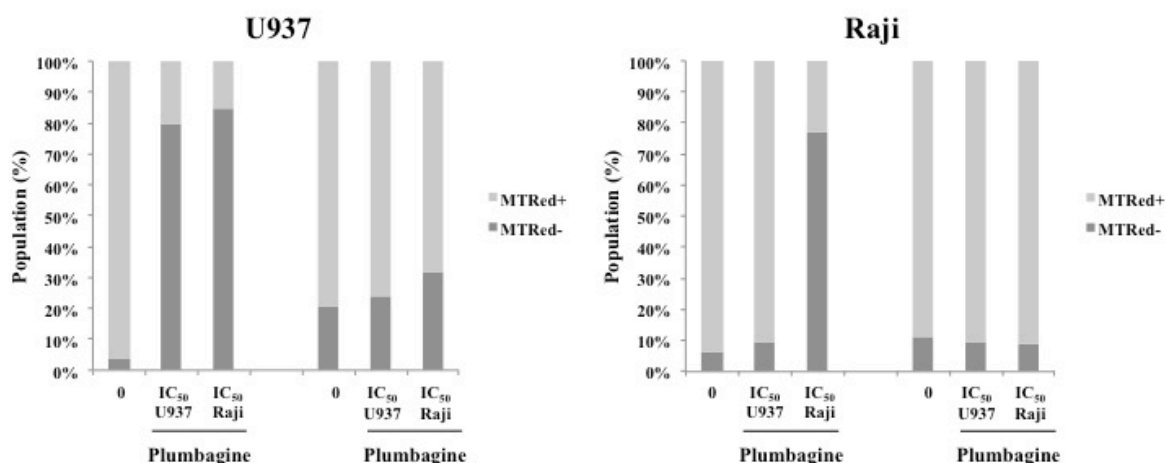


Figure 73 : Un pré – traitement par la NAC empêche la mort des cellules Raji et U937 traitées par la plumbagine.

Des cellules Raji et U937 pré – traitées par la *N* – acétyl – L – cystéine (NAC) (10mM, 24 heures) ont été traitées par la plumbagine pendant 24 heures. Le potentiel mitochondrial membranaire des cellules a ensuite été mesuré par cytométrie en flux après marquage au MitoTracker® Red (50nM). Les résultats correspondent à la moyenne +/- la déviation standard d’au moins trois expériences indépendantes.

L’ensemble des résultats obtenus montre que la plumbagine induit la formation d’espèces réactives de l’oxygène et induisent la mort par apoptose des cellules résistantes Raji et dans les cellules sensibles U937. Cependant dans le cas des cellules Raji, les résultats révèlent que la formation d’espèces réactives de l’oxygène est nécessaire mais ne suffit pas à induire la mort par apoptose. En plus de la formation d’espèces réactives de l’oxygène, il existe donc un second processus induit par la plumbagine qui permet la mort des cellules résistantes Raji par apoptose.

4.2.10 Incorporation et localisation de la plumbagine dans les cellules Raji et U937

La plumbagine étant une molécule aromatique phénolique fluorescente (van Damme and De Neve, 1979), nous avons voulu étudier son incorporation ainsi que sa localisation par cytométrie en flux et par microscopie à fluorescence afin de savoir si ces deux paramètres permettaient d’expliquer la différence de sensibilité des deux lignées sélectionnées face à un traitement par la plumbagine. L’analyse par cytométrie en flux montre une incorporation effective de la plumbagine dans les deux lignées en fonction du temps (Figure 74). Après 120

minutes de traitement, nous n'observons aucune différence significative de l'incorporation de plumbagine entre les cellules Raji et U937.

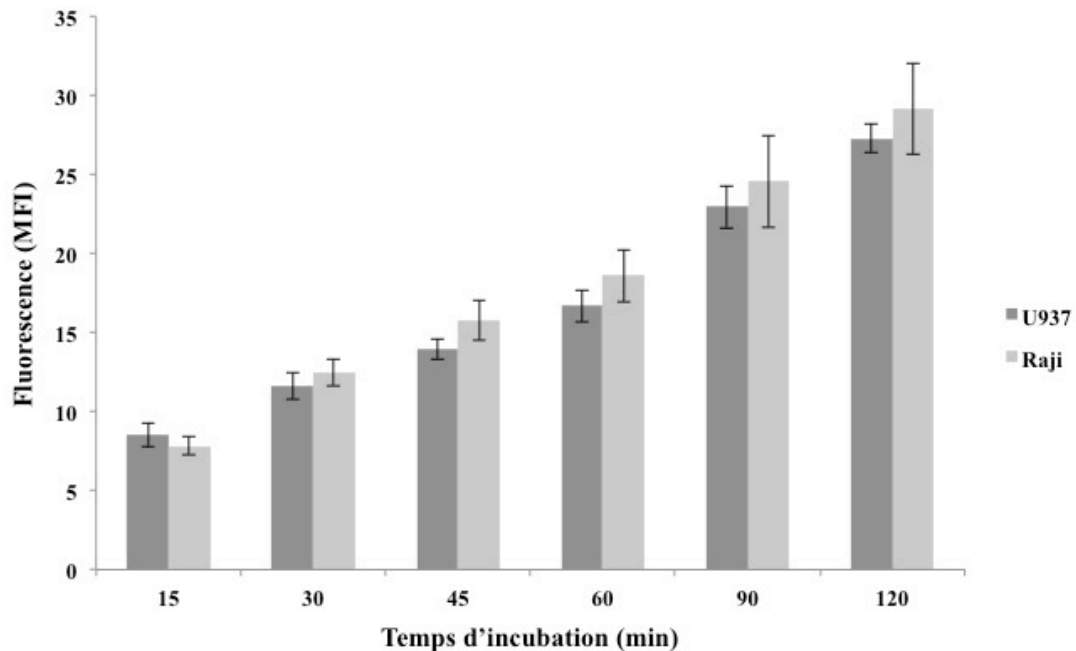


Figure 74 : Incorporation de la plumbagine dans les cellules Raji et U937.

Des cellules U937 et Raji ont été traitées par une concentration de plumbagine correspondante à la valeur de l'IC₅₀ des cellules Raji et analysées après 15, 30, 45, 60, 90 et 120 minutes par cytométrie en flux sans aucun autre marquage. Les résultats correspondent à la moyenne +/- la déviation standard d'au moins trois expériences indépendantes.

L'observation des deux lignées par microscopie à fluorescence après marquage au Hoechst montre effectivement une accumulation comparable dans les cellules Raji et U937 (Figure 75). Cette analyse révèle également que l'accumulation de plumbagine se fait de façon généralisée à tous les niveaux de la cellule bien que la plumbagine semble s'accumuler préférentiellement au niveau de certaines régions plus marquées.

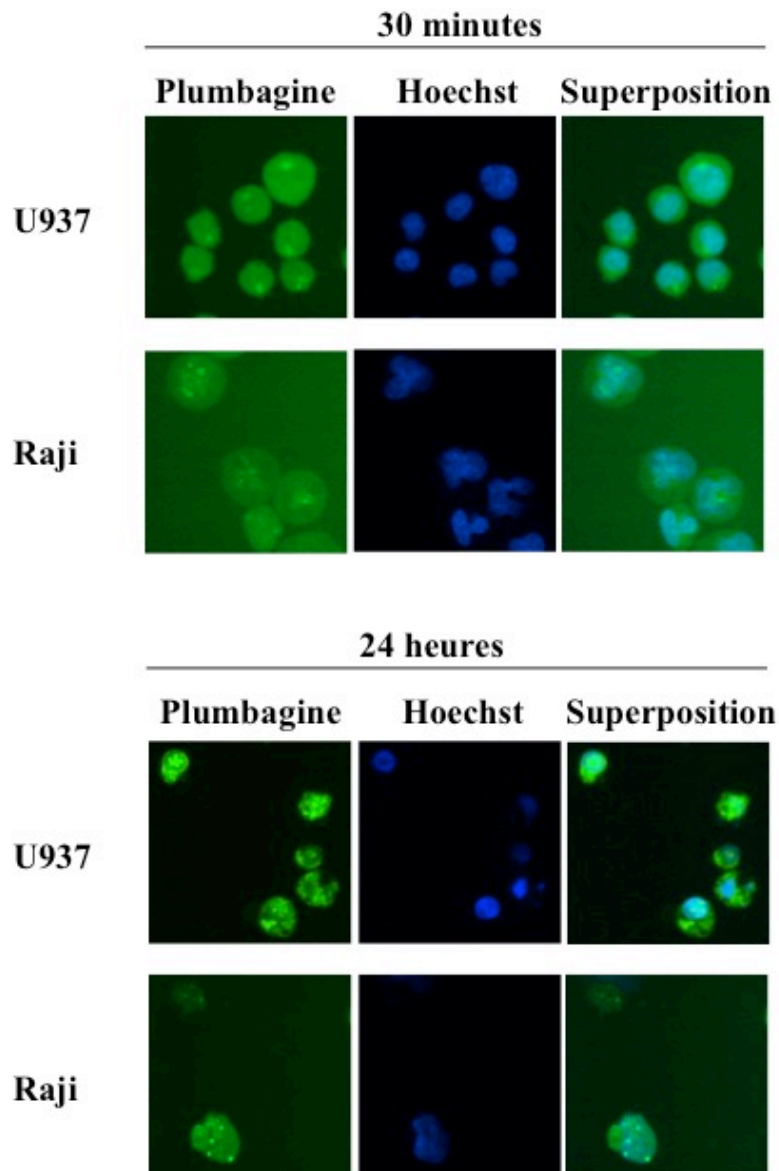


Figure 75 : Localisation intra – cellulaire de la plumbagine dans les cellules Raji et U937.

Des cellules U937 et Raji ont été traitées pendant 1 ou 24 heures par une concentration de plumbagine correspondante à la valeur de l'IC₅₀ des cellules Raji, marquées au Hoechst et observées par microscopie à fluorescence.

Nous avons ensuite voulu savoir si la sensibilité des deux lignées pouvait être expliquée par leur capacité à évacuer la plumbagine accumulée intra – cellulièrement. Pour cela, nous avons analysé par cytométrie en flux la fluorescence de cellules traitées par la plumbagine et remises en suspension dans du milieu n'en contenant pas. Nous n'avons pas observé de baisse significative de la fluorescence qui aurait montré une capacité à expulser la plumbagine hors de la cellule mais une stagnation du signal de fluorescence qui tend à légèrement augmenter après 90 minutes (Figure 76).

L'ensemble de ces résultats montrent que après son incorporation, la plumbagine n'est pas expulsée hors de la cellule mais est séquestrée de façon équivalente dans chacune des deux lignées.

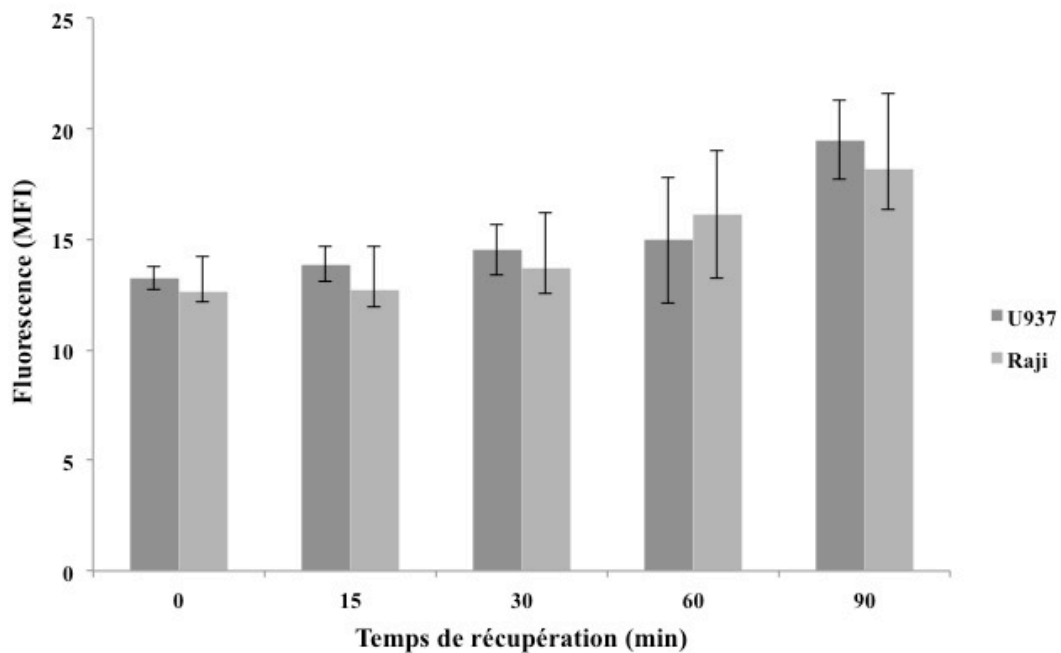


Figure 76 : Analyse de l'efflux de plumbagine hors des cellules U937 et Raji.

Des cellules Raji et U937 ont été traitées pendant 30 minutes par de la plumbagine puis centrifugées et remises en suspensions dans du milieu sans plumbagine. Les échantillons sont ensuite analysés après 15, 30, 60 et 90 minutes par cytométrie en flux sans aucun marquage. Les résultats correspondent à la moyenne +/- la déviation standard d'au moins trois expériences indépendantes.

4.2.11 Effet de la plumbagine sur le niveau intra – cellulaire de GSH des cellules Raji et U937

Le couple anti – oxydant GSH/GSSG est un système ubiquitaire souvent sur – exprimé dans de nombreux cas de cancers et qui est impliqué dans la lutte contre le stress oxydant (Circu and Aw, 2012). Comme nos résultats précédents ont montré que la plumbagine induit un stress oxydant par une augmentation de la quantité d'espèces réactives de l'oxygène, nous avons voulu savoir si cet accroissement est tamponné par une diminution du niveau de GSH.

Les résultats obtenus montrent qu'un traitement d'une heure avec de la plumbagine diminue d'une le niveau de GSH intra – cellulaire résiduel dans les deux lignées (Tableau 13) Néanmoins, le niveau de GSH des cellules sensibles U937 est bien plus affecté que ne l'est celui des cellules résistantes Raji. En effet, une concentration de 1 μ M de plumbagine diminue d'environ 32% le niveau de GSH des cellules U937 et de seulement 11% chez les cellules Raji.

Traitées avec une concentration plus élevée de plumbagine correspondant à l'IC₅₀ des cellules Raji, le niveau de GSH résiduel des cellules U937 reste à peu près équivalent à celui observé avec un traitement par 1 μ M de plumbagine (66%) alors que celui des cellules Raji diminue de 20% par rapport au témoin.

Afin de confirmer que cette diminution du niveau de GSH dans les cellules Raji et U937 est induite par les espèces réactives de l'oxygène générées par la plumbagine, nous avons mesuré le niveau de GSH de cellules pré – traitées par la NAC et traitées ensuite pendant 1 heure par la plumbagine. Les mesures révèlent une diminution moindre du niveau de GSH intra – cellulaire résiduel comparé aux cellules non – traitées par la NAC confirmant que les ERO générées par la plumbagine sont responsables de la baisse de niveau de GSH. Cependant, pour la plus forte concentration de plumbagine, le pré – traitement par la NAC n'empêche pas une diminution du GSH résiduel intra – cellulaire de l'ordre de 15% chez les U937 et 10% pour les cellules Raji.

	Lignée	Contrôle	H ₂ O ₂	IC ₅₀ U937	IC ₅₀ Raji
Témoin	U937	100,00 ± 0,00	88,38 ± 17,87	67,34 ± 9,21 *	66,20 ± 13,26 *
	Raji	100,00 ± 0,00	94,10 ± 13,88	88,49 ± 16,93	80,38 ± 5,59 *
NAC	U937	100,00 ± 0,00	89,99 ± 6,42	92,59 ± 17,54	85,71 ± 3,86 **
	Raji	100,00 ± 0,00	111,36 ± 11,02	110,76 ± 8,74	90,85 ± 14,80

Tableau 13 : Analyse du niveau de GSH intra – cellulaire résiduel de cellules Raji et U937 après traitement par la plumbagine.

Des cellules Raji et U937 pré – traitées ou non par la NAC (50mM, 24 heures) ont ensuite été traitées par la plumbagine pendant 1 heure et leur niveau de GSH a été mesuré par cytométrie en flux après marquage au o – phtaldéhyde (OPA). Le peroxyde d’hydrogène (H₂O₂) a été utilisé comme témoin positif pour la formation d’espèces réactives de l’oxygène. Les résultats correspondent à la moyenne +/- la déviation standard d’au moins trois expériences indépendantes. * indique une différence statistiquement significative par rapport aux cellules non traitées (* correspondant à une p-valeur < 0,05, ** pour p-valeur < 0,01).

5. Discussion

5.1 Effet de la curcumine sur la voie Wnt dans le cancer de la prostate

La forte incidence du cancer de la prostate observée dans les pays industrialisés montre que le style de vie, l'alimentation, les facteurs environnementaux ainsi que les facteurs génétiques (ex. dérégulations de la voie de signalisation Wnt) sont impliqués dans le développement de ce type de cancer (Rastogi et al., 2008; Whittemore et al., 1995). Par ailleurs, la lenteur du processus de développement de ce type de cancer suggère la chimioprévention comme une stratégie attractive pour prévenir l'apparition de cellules cancéreuses et leur évolution du stade androgéno-dépendant vers le stade androgéno-indépendant à tendance métastatique.

La curcumine présente un potentiel chimiopréventif intéressant contre le cancer de la prostate puisqu'elle module la prolifération cellulaire, la réponse inflammatoire ainsi que l'angiogenèse des cellules prostatiques tumorales (Teiten et al., 2010).

L'ensemble de ces données nous a donc conduit à évaluer l'effet de la curcumine sur la prolifération cellulaire du cancer de la prostate et plus spécifiquement son effet sur le cycle cellulaire et sur la voie de signalisation Wnt, connue pour être fortement impliquée dans la prolifération incontrôlée de la prostate (Verras and Sun, 2006; Yardy and Brewster, 2005).

L'étude de l'effet de la curcumine sur la viabilité cellulaire a permis de mettre en évidence que les lignées androgéno-sensibles 22rv1 et LNCaP sont plus sensibles au traitement par la curcumine que les lignées androgéno-indépendantes DU145 et PC-3 (Figure 40), ceci malgré une incorporation et une localisation intra-cytoplasmique similaire de ce composé naturel dans les différentes lignées (Figure 39). Dans de nombreuses lignées cellulaires dont les cellules prostatiques, la curcumine a principalement été signalée comme étant un inducteur de la mort cellulaire par apoptose *via* les voies intrinsèque et extrinsèque (Dorai et al., 2000; Lin et al., 2008b; Mukhopadhyay et al., 2001; Reuter et al., 2008; Song et al., 2005). Cependant, ce composé naturel est également connu comme étant capable d'induire une cytotoxicité, un arrêt en G2/M et une mort de type autophagique dans les lignées cellulaires de gliomes malins via une inhibition de la voie Akt, l'augmentation du niveau d'expression de la beclin 1 et de l'apparition de l'isoforme LC3II (Aoki et al., 2007; Jia et al., 2009; Shinojima et al., 2007). Dans notre approche expérimentale, nous avons révélé que la curcumine n'induit pas la mort des cellules 22rv1 par apoptose (pas de clivages des caspases ni de PARP et moins de 8% des cellules en phase subG1) (Figure 41, Figure 42) mais provoque une mort cellulaire par

autophagie comme le montre l'apparition de l'isoforme LC3IIB et la diminution de l'expression de Bcl-xL (Figure 41).

En effet, un lien a été établi entre la mort cellulaire par autophagie et le niveau d'expression de la protéine anti – apoptotique Bcl-2 et il a été rapporté que Bcl-xL peut se lier et inhiber Beclin-1, un médiateur essentiel de l'autophagie (Maiuri et al., 2007; Pattingre et al., 2005). Une induction semblable de mort cellulaire par autophagie a également été observée dans des cellules de cancer de l'œsophage après traitement par la curcumine (O'Sullivan-Coyne et al., 2009). L'autophagie a été rapportée comme étant un mécanisme alternatif à la mort cellulaire quand les autres mécanismes de mort cellulaire échouent et est à présent considérée comme une cible pour de nouvelles approches dans la thérapie contre le cancer (Moretti et al., 2007). En plus de son effet cytotoxique, la curcumine module également la prolifération des cellules tumorales prostatiques qui se traduit par un arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M des cellules androgéno – sensibles 22rv1 alors que cette molécule naturelle reste sans effet sur le cycle cellulaire des cellules DU145 androgéno-indépendantes après 24 heures de traitement (Figure 42). Dans la littérature, en fonction des lignées cellulaires testées, la curcumine est citée comme étant capable d'induire un arrêt du cycle cellulaire en phase G1 dans les gliomes (Choi et al., 2008) et dans les cellules prostatiques (Aggarwal et al., 2007a; Hour et al., 2002) ou en phase G2/M dans les cellules de cancer de colon (Hanif et al., 1997; Jaiswal et al., 2002; Lin et al., 2008b) et du sein (Prasad et al., 2009). Dans notre approche expérimentale, l'analyse par cytométrie en flux a révélé que la curcumine est capable d'induire un arrêt du cycle cellulaire à la transition G2/M. La diminution de l'expression de la cycline B1 et de la protéine phosphoHistone H3 un marqueur spécifique de la mitose confirme que ce composé naturel induit de façon efficace un arrêt du cycle cellulaire en phase G2 dans les cellules 22rv1 (Figure 42). Un tel arrêt à la transition G2/M du cycle cellulaire ainsi que la diminution concomitante de l'expression de la cycline B1 et de PCNA ont également été observés dans les cellules HCT-116 de cancer du colon (Jaiswal et al., 2002), dans les cellules BxPC3 de cancer humain de pancréas (Sahu et al., 2009), dans les cellules de cancer humain de sein (Prasad et al., 2009; Ramachandran and You, 1999), et dans les cellules T24 de cancer humain de la vessie (Park et al., 2006) après traitement par la curcumine. Jaiswal et al., ont dès lors suggéré que l'arrêt en G2/M des cellules HCT-116 peut résulter d'une modulation de la voie Wnt et de la voie de l'adhésion cellule-cellule. Cette diminution de la prolifération cellulaire dans la lignée 22rv1 suggère un effet de la curcumine sur la voie de signalisation Wnt, puisque des travaux récents ont montré que la suppression de cette voie inhibe la prolifération cellulaire du cancer de la prostate (Lu et al., 2009). Nous avons donc réalisé des

transfections transitoires de plasmides rapporteurs spécifiques (pTOPFlash/pFOPFlash) de la voie Wnt. Le traitement par la curcumine des cellules ainsi transfectées augmente l'activité transcriptionnelle β -caténine/Tcf-4 des cellules androgéno-indépendantes PC-3, ne modifie pas celle des DU145 mais elle diminue celle des cellules androgéno-dépendantes 22rv1 et LNCaP (Figure 45). La diminution de l'activité transcriptionnelle β -caténine/Tcf-4 résulte en une diminution de l'expression de gènes cibles de la β -caténine (He et al., 1998; Tetsu and McCormick, 1999) tels c-myc, cycline D1 et survivine (Figure 47). La survivine, un membre du groupe des inhibiteurs de l'apoptose (*the inhibitor of apoptosis*, IAP), est une cible intéressante pour la curcumine car elle est exprimée de façon différentielle dans les tumeurs et dans les tissus sains (elle n'est pas exprimée dans l'épithélium sécrétoire de la prostate mais elle est fortement exprimée dans les cellules cancéreuses prostatiques). Elle est normalement requise pour conserver le potentiel de survie et d'invasion dans les cellules cancéreuses (Altieri, 2003). La survivine est notamment décrite comme un médiateur potentiel des métastases dans le cas du cancer de la prostate (Zhang et al., 2010). La cycline D1, est un proto-oncogène capable de former un complexe avec CDKs dont l'activité est requise pour la transition de la phase G1 à S du cycle cellulaire (Sherr, 1996). La suppression de la prolifération cellulaire induite par la curcumine est également liée à une diminution de l'expression de la cycline D1 dans les cellules de cancer, de la prostate et de carcinome des cellules squameuses (Mukhopadhyay et al., 2002; Prasad et al., 2009). De plus, la diminution de la cycline D1 observée après traitement par la curcumine (Figure 47) est en accord avec les résultats précédemment publiés réalisés sur des cellules androgéno – dépendantes LNCaP (Mukhopadhyay et al., 2002) mais aussi avec la diminution de la population cellulaire observée en phase G1 (Figure 42). La curcumine est capable de diminuer l'expression du gène codant pour c-myc, gène cible de la β -caténine (He et al., 1998) dans les cellules HCT116 de cancer du colon (Park et al., 2005b), ceci en corrélation avec une diminution de l'activité transcriptionnelle β -caténine/Tcf-4 et de l'expression nucléaire de la β -caténine et de Tcf-4. Un tel effet inhibiteur de la curcumine sur l'activité transcriptionnelle de la voie Wnt a également été observé dans les cellules d'ostéosarcome humain (Leow et al., 2009) de cancer du colon (Jaiswal et al., 2002; Park et al., 2005b) et de cellules de cancer du sein (Prasad et al., 2009) mais jusqu'à présent rien encore n'a été rapporté dans la littérature concernant un quelconque effet de la curcumine sur la voie Wnt dans le cancer de la prostate. Dans le cas du cancer du sein, la faible dose cytostatique de 20 mM de curcumine a également été rapportée comme étant capable d'induire un arrêt du cycle cellulaire à la transition G2/M. Ceci semble être lié à une diminution de l'expression des protéines effectrices de la voie Wnt telles les

protéines Dsh (Dishevelled) et β -caténine mais également à une diminution des cibles régulées de façon positive par la β -caténine comme la cycline D1 et la protéine slug (Prasad et al., 2009). De manière à déterminer à quel niveau de la voie de signalisation Wnt agit la curcumine, nous avons ensuite co-transfecté les cellules avec un vecteur d'expression qui code pour une forme tronquée de la β -caténine pouvant être activée par le complexe GSK3-Axine-APC mais ne pouvant être dégradée par le protéasome. Une telle transfection est connue pour induire une augmentation de l'activité transcriptionnelle β -caténine/Tcf-4 de 2 fois dans les cellules DU145 et de 10 fois dans les cellules 22rv1 en absence de traitement avec la curcumine (Cronauer et al., 2005). En présence d'un traitement par la curcumine, cette activité transcriptionnelle induite n'est pas modifiée dans la lignée DU145, mais elle est significativement augmentée dans la lignée 22rv1 (Figure 45). Ces résultats suggèrent que la diminution de l'activité transcriptionnelle β -caténine/Tcf-4 observée précédemment dans la lignée 22rv1 n'est pas liée à un effet direct de la curcumine sur la β -caténine mais plutôt à un effet sur la voie de dégradation de la β -caténine ou sur des éléments en aval de la β -caténine. Pour vérifier cette hypothèse nous avons alors évalué l'effet de la curcumine sur des protéines impliquées dans la voie Wnt. Les résultats obtenus par Western – Blot (Figure 50) confirment que la curcumine reste sans effet sur l'expression de la β -caténine mais qu'elle diminue l'expression du facteur de transcription Tcf-4 et de ses deux co-activateurs CBP et p300 dans la lignée 22rv1. Des travaux menés par Park *et al.*, ont, quant à eux, montré que dans le cancer du colon, la curcumine agissait plutôt au niveau de l'interaction β -caténine/Tcf-4 nécessaire à la fixation du facteur de transcription Tcf-4 sur les sites spécifiques au niveau du promoteur de gènes cibles de la voie Wnt et que de ce fait la fonctionnalité de la β -caténine comme activateur de transcription via sa liaison à Tcf-4 est rendue inopérante par un traitement par la curcumine (Park et al., 2005b).

5.2 La plumbagine, agent métabolite secondaire de la *Dionaea muscipula* comme agent anti-cancéreux

Dans la première partie de cette étude, nous avons tenté d'isoler de nouvelles molécules dotées de propriété anti – cancéreuses à partir de la *Dionaea muscipula*. Plusieurs molécules thérapeutiques ont précédemment été isolées à partir de cette plante mais quasiment la totalité de ces molécules ont été également identifiées dans d'autres plantes, à l'exception de la diomuscipulone (Gaascht et al., 2013). Afin d'optimiser nos recherches, nous avons focalisé nos investigations sur la partie aérienne de la plante d'une part car la diomuscipulone n'est présente qu'au niveau des racines et d'autre part, la partie aérienne de la plante fournit plus de matière sèche (Tableau 7).

La méthode d'extraction (Soxhlet, ultrasons, sonication,...) ainsi que le ou les solvants que cette méthode peut utiliser, influence la quantité, la nature et la composition de l'extrait obtenu (Lee et al., 2010a; Stashenko et al., 2004). Le contenu en métabolites secondaires d'une même plante peut varier en fonction du moment de sa période de végétation, du climat et de son environnement en général (Gershenson, 1984; Szakiel et al., 2011). Il aurait été dès lors intéressant de préparer différents extraits à partir de différentes plantes (localisation, pathogènes, période de récolte,...) en variant leur méthode d'obtention et de procéder à différentes analyses comparatives tout au cours de ce projet.

L'analyse de l'incorporation de l'extrait méthanolique total de feuilles de *Dionaea muscipula* a révélé que celui – ci pénètre dans les cellules K562 mais s'accumule de façon plus marquée au niveau de certaines régions du noyau (Figure 51). L'observation révèle également une diminution du volume du cytoplasme et du noyau des cellules (Figure 52). Un extrait de plante est un mélange complexe de plusieurs molécules, parfois plusieurs dizaines, à différentes concentrations (Gonzalez et al., 2012; Vardar-Unlu et al., 2003). Ces différentes substances peuvent agir de façon synergique mais également de façon antagoniste sur des mécanismes biologiques (Savelev et al., 2003; Williamson, 2001). Du fait de la complexité de ces interactions, et l'identification de nouvelles molécules étant la première priorité de ce projet, nous n'avons pas cherché à analyser les raisons de ce phénomène ou de tout autre effet biologique observé durant cette partie du projet.

Comme l'on pouvait s'y attendre, l'étude de la viabilité cellulaire des différentes lignées cellulaires cancéreuses (HL-60, Jurkat, K562, Raji, U937, A549, HT-29, MDA-MB-231, PC-3, Saos-2) après traitement par l'extrait méthanolique de feuilles de *Dionaea muscipula* a révélé que cette solution contient au moins un composé cytotoxique (Tableau 8). De manière

à identifier le ou les substances capables d'induire la mort des cellules, nous avons procédé à la purification de l'extrait de feuilles de *Dionaea muscipula* par HPLC. Les différentes fractions collectées ont été testées pour leur potentiel cytotoxique vis – à – vis des cellules K562 (Figure 55).

Dans le but d'identifier le contenu des diverses fractions cytotoxiques obtenues, nous avons procédé à l'identification des différents pics du chromatogramme de l'extrait de feuilles en comparant son profil avec les chromatogrammes de différentes substances déjà identifiées chez la *Dionaea muscipula*. Les résultats obtenus montrent que les fractions cytotoxiques F8 et F14 – 16 ne correspondent ni à la quercétine, ni à la myricétine, ni à la plumbagine et ni à l'acide ellagique (Figure 54). Après une seconde purification des différents produits, nous n'avons pas été en mesure d'obtenir une quantité suffisante de produit F8 permettant son identification. Après analyse de la pureté du produit F14 – 16 (Figure 59) par CCM, nous avons procédé à son identification par RMN. L'analyse des différents spectres RMN obtenus (Figure 61 à Figure 65) a conclu à l'identification de la plumbagine comme constituant majeur de la fraction F14 – 16 (Figure 66).

Bien que par notre stratégie de recherche, nous pensions dès le départ avoir écarté l'hypothèse de l'identification de la plumbagine déjà connue chez la *Dionaea muscipula* (Pakulski and Budzianowski, 1996a), cela n'a pas été le cas. L'isolement de molécules à partir de substances naturelles est une pratique qui consiste à identifier une structures chimiques, parfois très complexe tout en conservant son intégralité au cours des différents processus d'extraction, d'isolation et de purification. Certaines de ces étapes peuvent cependant conduire à une modification voire à une dégradation de la molécule native. Ainsi, la chaleur, la lumière, les radiations les solvants ou pathogènes (bactéries, champignons) sont connus pour modifier et altérer une structure chimique (Aman et al., 2005; Houghton and Raman, 1998; Kimbaris et al., 2006; Krishnaswamy, 2003). Dans la nature, il existe de nombreuses molécules structurellement proches de la plumbagine (Padhye et al., 2012; Pakulski and Budzianowski, 1996a). Bien que nous ayons pris le maximum de précautions, nous ne pouvons dès lors écarter l'hypothèse d'une modification de la molécule d'intérêt isolée de départ en plumbagine au cours de ce processus d'isolement.

Dans la seconde partie de cette étude, nous avons analysé le mécanisme contribuant au potentiel anti – cancéreux de la plumbagine dans des modèles de cellules leucémiques. Parmi un panel de cinq lignées cancéreuses hématopoïétiques, nous avons découvert que les cellules Raji sont les plus résistantes à un traitement par la plumbagine (IC_{50} de $5,06 \pm 0,22 \mu M$ à 24

heures); et que les cellules de la lignée U937 sont les plus sensibles (IC_{50} de $0,82 \pm 0,04 \mu M$ à 24 heures) (Tableau 12). L'étude de la cytotoxicité de la plumbagine poussée jusqu'à 72 heures révèle que les valeurs des IC_{50} chutent d'environ 50%, en diminuant jusqu'à $2,66 \pm 0,03 \mu M$ chez les cellules Raji, qui restent cependant les cellules les plus résistantes du lot. Chez les cellules U937, après 72 heures de traitement, l' IC_{50} diminue d'environ 20% mais reste dans la même gamme ($0,66 \pm 0,02 \mu M$).

Nos résultats sont en accord à d'autres études qui ont montré qu'une concentration de plumbagine inférieure à $4 \mu M$ est suffisante pour induire la mort de cellules cancéreuses leucémiques (K562 et HL-60) en 24 heures (Kawiak et al., 2007; Sun and McKallip, 2011) et que cette molécule n'a pas d'effet cytotoxique significatif vis – à – vis des cellules saines de type PBMC (Subramaniya et al., 2011).

Nous avons sélectionné les lignées Raji et U937 pour des études mécanistiques supplémentaires et procédé à des analyses comparatives des effets de la plumbagine sur ces lignées dans le but d'identifier et à analyser les mécanismes en amont pouvant expliquer cette différence de sensibilité entre ces deux lignées.

En premier lieu, nous avons montré que l'effet cytotoxique de la plumbagine sur ces deux modèles était dû à une mort par le mécanisme d'apoptose (Figure 67 à Figure 70).

La plumbagine est un composé naturel très largement étudié pour ses propriétés anti – cancéreuses (Hsu et al., 2006 ; Sandur et al., 2006; Subramaniya et al., 2011). De nombreuses études ont révélé que ses effets cytostatique et cytotoxique étaient imputables à sa capacité à influencer l'état rédox des cellules traitées. Au fil du temps, un nombre d'études toujours plus croissant a mis en évidence la capacité de la plumbagine à susciter la production d'ERO. Cette accumulation de la quantité d'ERO, a été à son tour, identifié comme étant responsable des dommages aux cellules cancéreuses et de leur mort (Kawiak et al., 2007; Powolny and Singh, 2008; Sun and McKallip, 2011; Xu and Lu, 2010). Comme on pouvait s'y attendre, nous avons observé une augmentation rapide (15 minutes) du niveau d'ERO après traitement par la plumbagine dans les cellules Raji et U937 (Figure 71).

L'utilisation de l'agent anti – oxydant *N* – acétyl – cystéine a abrogé l'accumulation d'ERO et l'induction de mort par apoptose dans les deux modèles cellulaires (Figure 72) confirmant ainsi la responsabilité d'un stress oxydant mortel induit par la plumbagine dans ces deux lignées.

Cependant, l'analyse comparative de la production d'ERO entre les deux modèles cellulaires révèle une différence frappante : en comparaison avec leurs cellules témoin respectives, la plumbagine augmente le niveau d'ERO de plus de 20 fois après 15 minutes dans les cellules

U937 alors que ce niveau n'augmente que de 3 à 4 fois dans des cellules Raji traitées par des concentrations de plumbagine correspondantes à leurs IC_{50} respectives (Figure 71).

Il est également à noter que l'augmentation du niveau d'ERO induit par le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) utilisé comme témoin positif est comparable au niveau d'ERO généré par la plumbagine chez les cellules U937 alors que cet effet reste bien plus modeste chez les cellules Raji. De plus, il a été observé que la production de ROS atteint son maximum (effet plateau) avec $1 \mu M$ correspondant à la valeur de l' IC_{50} des cellules U937 alors que cette concentration est inférieure à la quantité effectrice de plumbagine chez cette lignée. Ce résultat peut être la conséquence d'une internalisation différentielle du composé ; en plus il peut être l'expression de mécanismes différentiels impliqués dans un stress oxydant induit par la plumbagine dans ces deux lignées cellulaires et peut supposer un rôle non – déterminant des ERO dans la mort cellulaire, au moins pour les cellules Raji. Nous avons procédé à des analyses d'incorporation et d'efflux en exploitant la fluorescence naturelle de la plumbagine. Nous n'avons pas été en mesure de détecter de différences significatives dans le comportement des deux lignées sélectionnées (Figure 74 et Figure 76). Dans le cas de la mesure d'efflux, le niveau de fluorescence a été maintenu à un haut niveau pendant une certaine durée (jusqu'à 4 heures, données non – présentées dans ce manuscrit). L'analyse de la localisation de la plumbagine n'a pour sa part révélé aucune différence de localisation entre les deux lignées, qui reste (Figure 75). Ces observations peuvent dévoiler certains aspects liés au métabolisme intra – cellulaire de la plumbagine qui est notamment connue comme un inhibiteur des pompes à efflux de type transporteur ABC (Shukla et al., 2007) dont la fluorescence pourrait être augmenté après liaison aux protéines comme cela a été observé pour certains flavonoïdes (Baran et al., 2011). Il va de soit que ces observations mériteraient à l'avenir des études complémentaires, qui sont de toute façon dans la continuité des objectifs de cette étude.

Dans notre cas présent, nous pouvons totalement exclure une internalisation différentielle du composé en tant qu'événement responsable de la faible augmentation du niveau d'ERO dans les cellules Raji.

Dans la littérature, l'élévation du niveau d'ERO intra – cellulaire après traitement par la plumbagine est fréquemment observée. Cependant, les cibles cellulaires de la plumbagine dans le contrôle du stress oxydant reste encore très controversé. Plus récemment, plusieurs études ont souligné la capacité de la plumbagine à moduler les groupements thiols intra – cellulaires (Checker et al., 2010; Kawiak et al., 2007). Ce mécanisme impliquerait la modulation du thiolstat intra – cellulaire pour déclencher les effets anti – cancéreux de la

plumbagine, en lieu et place de la génération d'ERO, qui apparaîtrait plutôt comme un effet secondaire additionnel.

Il a par ailleurs été montré que la plumbagine diminue le niveau de GSH (Inbaraj and Chignell, 2004) et il est prouvé que cette baisse peut être la conséquence directe d'une liaison de la plumbagine au GSH, probablement par addition nucléophile mais également d'une oxydation du GSH en GSSG sous l'impulsion de la naphtoquinone (Checker et al., 2010; Inbaraj and Chignell, 2004; Powolny and Singh, 2008).

L'analyse de l'effet de la plumbagine sur le niveau de GSH intra – cellulaire résiduel effectuée par l'utilisation de la sonde fluorescente OPA révèle une diminution du GSH dans les deux lignées (Tableau 13). Cependant, une diminution maximale de l'ordre de 30% est observée dans les cellules sensibles U937 alors que dans les cellules Raji, cette diminution n'atteint que 20% pour la plus haute concentration de plumbagine. Les valeurs supérieures à 100 % obtenues dans le cas des cellules Raji pré – traitées par la NAC, un précurseur du GSH, peut être expliqué par le fait que la sonde OPA quantifie par inadvertance ce composé exogène. La liaison de la plumbagine au GSH intra – cellulaire peut pour sa part expliquer pourquoi un pré – traitement par la NAC ne permet pas de rétablir le niveau de GSH intra – cellulaire dans sa totalité dans le cas des cellules traitées par la plus forte concentration de plumbagine.

La petite molécule GSH avec son groupement thiol est paradigmatique du réservoir intra – cellulaire de groupements thiols pouvant être des cibles potentielles de la plumbagine, qui incluent notamment de nombreuses protéines et enzymes. Parmi celles – ci, la tubuline est un exemple de cible de fixation connue pour la plumbagine (Acharya et al., 2008).

Le groupe de Sainis (Checker et al., 2010) a révélé la capacité de la plumbagine à diminuer les groupements thiols libres des protéines et à favoriser des réaction de glutathionylation. Ces deux modulations ont pu être réversée par l'utilisation d'agents anti – oxydants contenant des groupements thiols (GSH, *N* – acétyl – cystéine ou dithiothréitol) mais pas par des agents anti – oxydants n'en contenant pas (par exemple, le Trolox). Pris dans leur intégralité, ces résultats indiquent que la plumbagine est capable de réguler des fonctions intra – cellulaires importants et en particulier celles régulées par les groupements thiols, qui comprennent entre autres le contrôle d'enzymes et/ou la modulation du potentiel redox cellulaire.

6. Conclusion & Perspectives

Le cancer est aujourd'hui un problème majeur de santé publique qui touche toutes les couches de la population mondiale. Les facteurs génétiques mais surtout l'environnement dans lequel nous vivons sont responsables de l'apparition et du développement du cancer. Ainsi en ayant une hygiène de vie saine, il serait possible de réduire de 30% le nombre de cas de cancer. Le développement du cancer est un processus qui s'étale sur plusieurs années et qui si il est diagnostiqué à temps, peut être soigné avec de meilleurs résultats. Néanmoins, des lacunes au niveau de la détection et du diagnostic du cancer mais aussi le manque de traitements efficaces font que cette maladie est une des premières causes de décès dans le Monde. Utilisés partout autour du globe par les médecines traditionnelles, les produits d'origine naturel ont montré qu'ils étaient capables de soigner de nombreuses maladies touchant notre société actuelle. De plus, des études ont montré qu'une consommation régulière et équilibrée de fruits et de légumes aidait à prévenir l'apparition et le développement de certaines maladies dont les cancers.

6.1 Effet de la curcumine sur la voie Wnt dans le cancer de la prostate

L'ensemble de ces travaux réalisés au cours de ce projet de recherche ont permis de mettre en évidence l'efficacité de la curcumine pour éradiquer le cancer de la prostate en stade précoce (représenté ici par la lignée androgéno – sensible 22rv1) mais que cette molécule naturelle reste sans effet sur les stades plus tardifs à tendance métastatique (représenté ici par la lignée androgéno – indépendante DU145). Nos résultats soulignent ainsi le potentiel chimiopréventif de la curcumine dans le cancer de la prostate et que cette molécule naturelle peut être considérée comme une modalité alternative, non – toxique pour prévenir la progression du cancer de la prostate vers le stade androgéno – indépendant.

L'initiation de la transformation tumorale de la prostate implique généralement les hormones androgènes qui jouent déjà un rôle essentiel dans la croissance et la fonctionnalité de la prostate saine. L'action de ces androgènes est médiée par les récepteurs aux androgènes (RA) qui régulent au niveau transcriptionnel l'expression de gènes androgéno-dépendants. La voie de signalisation des androgènes est influencée par d'autres voies de signalisation et notamment par la voie Wnt (Terry et al., 2006). En effet, la β -caténine est connue pour sa capacité à promouvoir la voie des RA, puisqu'elle peut se lier aux RA dans le noyau et

induire l'activation de la transcription des gènes régulés par les RA (Truica et al., 2000). La protéine GSK-3 β fonctionne, quant à elle, comme un répresseur de l'activité transcriptionnelle des RA (Wang et al., 2004).

Dans la continuité de ce travail concernant l'effet de la curcumine sur la voie Wnt dans le cancer de la prostate, nous envisageons :

Dans un premier temps, nous validerons nos résultats en réalisant le même type de travaux sur :

- d'autres lignées androgéno – dépendantes (LNCaP) et androgéno – indépendantes (PC-3).
- des cultures primaires issues de biopsies de cancer de la prostate
- des lignées prostatiques saines (BPH-1) afin de vérifier la non – toxicité de la curcumine.

Dans un deuxième temps, nous étudierons l'effet de la curcumine sur les RA :

- par l'étude de l'expression des protéines RA natives et phosphorylées.
- par l'évaluation de la translocation nucléaire des RA par microscopie après transfection de plasmides pAR-t1EosFP (Rinnab et al., 2008).
- par l'étude de l'activité transcriptionnelle dépendante des RA, par transfection transitoire de plasmides rapporteurs dépendants des RA (Cronauer et al., 2004).

Dans un troisième temps, nous étudierons l'effet de la curcumine sur les interactions pouvant exister entre la voie des RA et la voie Wnt :

- nous évaluerons l'effet de la curcumine sur l'activité de la GSK-3 β , connue pour moduler la réponse de la prostate aux androgènes.
- nous déterminerons l'effet de la curcumine sur le lien existant entre les RA et la β -caténine par immuno – précipitation et par co – transfection.

6.2 La plumbagine, métabolite secondaire de la *Dionaea muscipula* comme agent anti-cancéreux

L'ensemble des résultats obtenus montre que la plumbagine est un agent cancéreux – ciblant spécifiquement les cellules cancéreuses. Cependant, bien que se comportant de la même façon dans chacune des lignées et induisant les mêmes effets, nos résultats révèlent que les cellules leucémiques possèdent une sensibilité différentielles vis – à – vis de cette molécule naturelle dont les raisons moléculaires restent à l'heure actuelle encore à élucider

Dans les perspectives de ce projet visant à comprendre le mécanisme différentiel tournant autour du potentiel anti – cancéreux de la plumbagine dans les lignées leucémiques, nous envisageons :

Dans un premier temps, nous nous intéresserons au devenir intra – cellulaire de la plumbagine et à la formation des ERO :

- Nous procéderons à des analyses quantitative et analytique de la plumbagine intra – cellulaire par HPLC dans le but de connaître sous quelles formes et sous quelle quantité la plumbagine est assimilée.
- Nous étudierons les raisons de la séquestration intra – cellulaire de la plumbagine notamment son effet sur les enzymes de détoxification comme les transporteurs ABC.
- Nous quantifierons le niveau de GSSG intra – cellulaire pour le comparer au niveau de GSH intra – cellulaire résiduel afin de savoir si cette corrélation est respectée ou si effectivement la plumbagine se lie au GSH libre.
- Nous analyserons l'activité et l'expression des enzymes comme les cytochromes P450 réductases impliquées dans la formation des ERO.

Dans un deuxième temps, nous analyserons l'effet de la plumbagine sur les autres molécules impliquées dans la lutte contre le stress oxydant par :

- L'analyse par Western – Blot des voies NRF2 et FOXO3 connue pour être des cibles des ERO et qui contrôlent l'expression des molécules impliquées dans la régulation du stress oxydant.
- La mesure de l'expression et de l'activité des enzymes anti – oxydantes (GSTP1, catalase, SOD, thiorédoxine et glutarédoxine).

6.3 Conclusion générale

En conclusion, l'exemple de la curcumine en tant qu'agent chimiopréventif dans le développement du cancer de la prostate et de la plumbagine dans le traitement des leucémies nous ont montré que les molécules d'origine naturelle sont d'excellents candidats pour servir de base au développement des futurs médicaments anti – cancéreux.

7. Bibliographie

Acharya, B.R., Bhattacharyya, B., and Chakrabarti, G. (2008). The natural naphthoquinone plumbagin exhibits antiproliferative activity and disrupts the microtubule network through tubulin binding. *Biochemistry* 47, 7838-7845.

Afify Ael, M., El-Beltagi, H.S., El-Salam, S.M., and Omran, A.A. (2012). Biochemical changes in phenols, flavonoids, tannins, vitamin E, beta-carotene and antioxidant activity during soaking of three white sorghum varieties. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine* 2, 203-209.

Aggarwal, B.B. (2008). Prostate cancer and curcumin: Add spice to your life. *Cancer Biol Ther* 7.

Aggarwal, B.B., Banerjee, S., Bharadwaj, U., Sung, B., Shishodia, S., and Sethi, G. (2007a). Curcumin induces the degradation of cyclin E expression through ubiquitin-dependent pathway and up-regulates cyclin-dependent kinase inhibitors p21 and p27 in multiple human tumor cell lines. *Biochem Pharmacol* 73, 1024-1032.

Aggarwal, B.B., Bhatt, I.D., Ichikawa, H., Ahn, K.S., Sethi, G., Sandur, S.K., Sundaram, C., Seeram, N., and Shishodia, S. (2007b). Curcumin : Biological and Medicinal properties, In *Turmeric: The genus Curcuma Vol 45* (New york: CRC Press).

Aguilera-Carbo, A., Augur, C., Prado-Barragan, L., Aguilar, C., and Favela-Torres, E. (2008). Extraction and analysis of ellagic acid from novel complex sources. *Chemical Papers* 62, 440-444.

Akiyama, T. (2000). Wnt/beta-catenin signaling. *Cytokine Growth Factor Rev* 11, 273-282.

Alexander, D.D., Mink, P.J., Cushing, C.A., and Scurman, B. (2010). A review and meta-analysis of prospective studies of red and processed meat intake and prostate cancer. *Nutrition journal* 9, 50.

Alfredsson, C.F., Ding, M., Liang, Q.L., Sundstrom, B.E., and Nanberg, E. (2013). Ellagic acid induces a dose- and time-dependent depolarization of mitochondria and activation of caspase-9 and -3 in human neuroblastoma cells. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*.

Alias, L.M., Manoharan, S., Vellaichamy, L., Balakrishnan, S., and Ramachandran, C.R. (2009). Protective effect of ferulic acid on 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced skin carcinogenesis in Swiss albino mice. *Experimental and toxicologic pathology : official journal of the Gesellschaft fur Toxikologische Pathologie* 61, 205-214.

Altieri, D.C. (2003). Validating survivin as a cancer therapeutic target. *Nat Rev Cancer* 3, 46-54.

Aman, R., Schieber, A., and Carle, R. (2005). Effects of heating and illumination on trans-cis isomerization and degradation of beta-carotene and lutein in isolated spinach chloroplasts. *Journal of agricultural and food chemistry* 53, 9512-9518.

An, C., and Mou, Z. (2011). Salicylic acid and its function in plant immunity. *Journal of integrative plant biology* 53, 412-428.

Anderson, H.J., Coleman, J.E., Andersen, R.J., and Roberge, M. (1997). Cytotoxic peptides hemiasterlin, hemiasterlin A and hemiasterlin B induce mitotic arrest and abnormal spindle formation. *Cancer Chemother Pharmacol* 39, 223-226.

- Andersson, D.I., and Hughes, D. (2010). Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance? *Nature reviews Microbiology* 8, 260-271.
- Anitha, P., Priyadarsini, R.V., Kavitha, K., Thiyagarajan, P., and Nagini, S. (2013). Ellagic acid coordinately attenuates Wnt/beta-catenin and NF-kappaB signaling pathways to induce intrinsic apoptosis in an animal model of oral oncogenesis. *European journal of nutrition* 52, 75-84.
- Anter, J., Romero-Jimenez, M., Fernandez-Bedmar, Z., Villatoro-Pulido, M., Analla, M., Alonso-Moraga, A., and Munoz-Serrano, A. (2011). Antigenotoxicity, cytotoxicity, and apoptosis induction by apigenin, bisabolol, and protocatechuic acid. *Journal of medicinal food* 14, 276-283.
- Anto, R.J., Mukhopadhyay, A., Denning, K., and Aggarwal, B.B. (2002). Curcumin (diferuloylmethane) induces apoptosis through activation of caspase-8, BID cleavage and cytochrome c release: its suppression by ectopic expression of Bcl-2 and Bcl-xl. *Carcinogenesis* 23, 143-150.
- Ao, C., Li, A., Elzaawely, A.A., Xuan, T.D., and Tawata, S. (2008). Evaluation of antioxidant and antibacterial activities of *Ficus microcarpa* L. fil. extract. *Food Control* 19, 940-948.
- Aoki, H., Takada, Y., Kondo, S., Sawaya, R., Aggarwal, B.B., and Kondo, Y. (2007). Evidence that curcumin suppresses the growth of malignant gliomas in vitro and in vivo through induction of autophagy: role of Akt and extracellular signal-regulated kinase signaling pathways. *Mol Pharmacol* 72, 29-39.
- Arbiser, J.L., Klauber, N., Rohan, R., van Leeuwen, R., Huang, M.T., Fisher, C., Flynn, E., and Byers, H.R. (1998). Curcumin is an in vivo inhibitor of angiogenesis. *Mol Med* 4, 376-383.
- Arner, E.S., and Holmgren, A. (2000). Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *Eur J Biochem* 267, 6102-6109.
- Arner, E.S., and Holmgren, A. (2006). The thioredoxin system in cancer. *Seminars in cancer biology* 16, 420-426.
- Atri, N., Sharma, S.K., Joshi, R., Gulati, A., and Gulati, A. (2013). Nutritional and nutraceutical composition of five wild culinary-medicinal species of genus *pleurotus* (higher basidiomycetes) from northwest India. *International journal of medicinal mushrooms* 15, 49-56.
- Aung, H.H., Chia, L.S., Goh, N.K., Chia, T.F., Ahmed, A.A., Pare, P.W., and Mabry, T.J. (2002). Phenolic constituents from the leaves of the carnivorous plant *Nepenthes gracilis*. *Fitoterapia* 73, 445-447.
- Awad, H.M., Boersma, M.G., Boeren, S., van Bladeren, P.J., Vervoort, J., and Rietjens, I.M. (2002). The regioselectivity of glutathione adduct formation with flavonoid quinone/quinone methides is pH-dependent. *Chemical research in toxicology* 15, 343-351.
- Awad, H.M., Boersma, M.G., Vervoort, J., and Rietjens, I.M. (2000). Peroxidase-catalyzed formation of quercetin quinone methide-glutathione adducts. *Archives of biochemistry and biophysics* 378, 224-233.
- Aykin-Burns, N., Ahmad, I.M., Zhu, Y., Oberley, L.W., and Spitz, D.R. (2009). Increased levels of superoxide and H₂O₂ mediate the differential susceptibility of cancer cells versus normal cells to glucose deprivation. *The Biochemical journal* 418, 29-37.

- Azad, M.B., Chen, Y., and Gibson, S.B. (2009). Regulation of autophagy by reactive oxygen species (ROS): implications for cancer progression and treatment. *Antioxidants & redox signaling* *11*, 777-790.
- Azaizeh, H., Saad, B., Cooper, E., and Said, O. (2010). Traditional Arabic and Islamic Medicine, a Re-emerging Health Aid. Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM *7*, 419-424.
- Aziz, N.H., Farag, S.E., Mousa, L.A., and Abo-Zaid, M.A. (1998). Comparative antibacterial and antifungal effects of some phenolic compounds. *Microbios* *93*, 43-54.
- Azuma, K., Ippoushi, K., Nakayama, M., Ito, H., Higashio, H., and Terao, J. (2000). Absorption of chlorogenic acid and caffeic acid in rats after oral administration. *Journal of agricultural and food chemistry* *48*, 5496-5500.
- Babula, P., Adam, V., Kizek, R., Sladký, Z., and Havel, L. (2009). Naphthoquinones as allelochemical triggers of programmed cell death. *Environmental and Experimental Botany* *65*, 330-337.
- Babula, P., Mikelova, R., Adam, V., Kizek, R., Havel, L., and Sladky, Z. (2006). Using of liquid chromatography coupled with diode array detector for determination of naphthoquinones in plants and for investigation of influence of pH of cultivation medium on content of plumbagin in *Dionaea muscipula*. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* *842*, 28-35.
- Baguley, B.C. (2010). Multiple drug resistance mechanisms in cancer. *Mol Biotechnol* *46*, 308-316.
- Baldwin, A.S., Jr. (1996). The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol* *14*, 649-683.
- Balk, S.P., Ko, Y.J., and Bubley, G.J. (2003). Biology of prostate-specific antigen. *J Clin Oncol* *21*, 383-391.
- Balkwill, F., and Mantovani, A. (2001). Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* *357*, 539-545.
- Bandyopadhyay, G., Biswas, T., Roy, K.C., Mandal, S., Mandal, C., Pal, B.C., Bhattacharya, S., Rakshit, S., Bhattacharya, D.K., Chaudhuri, U., *et al.* (2004). Chlorogenic acid inhibits Bcr-Abl tyrosine kinase and triggers p38 mitogen-activated protein kinase-dependent apoptosis in chronic myelogenous leukemic cells. *Blood* *104*, 2514-2522.
- Baran, I., Ganea, C., Ursu, I., Baran, V., Calinescu, O., Iftime, A., Ungureanu, R., and Tofolean, I. (2011). Fluorescence properties of quercetin in human leukemia Jurkat T-cells. *Rom J Phys* *56*, 388-398.
- Barker, N., and Clevers, H. (2006). Mining the Wnt pathway for cancer therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* *5*, 997-1014.
- Barve, A., Chen, C., Hebbar, V., Desiderio, J., Saw, C.L., and Kong, A.N. (2009). Metabolism, oral bioavailability and pharmacokinetics of chemopreventive kaempferol in rats. *Biopharmaceutics & drug disposition* *30*, 356-365.
- Bashir, A., Abdalla, A., Wasfi, I., Hassan, E., Amiri, M., and Crabb, T. (1994). Flavonoids of *Limonium axillare*. *Pharmaceutical Biology* *32*, 366-372.
- Baskaran, N., Manoharan, S., Balakrishnan, S., and Pugalandhi, P. (2010). Chemopreventive potential of ferulic acid in 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced mammary carcinogenesis in Sprague-Dawley rats. *Eur J Pharmacol* *637*, 22-29.

- Basu, A., Betts, N.M., Mulugeta, A., Tong, C., Newman, E., and Lyons, T.J. (2013). Green tea supplementation increases glutathione and plasma antioxidant capacity in adults with the metabolic syndrome. *Nutrition research* 33, 180-187.
- Beaudry, F., Ross, A., Lema, P.P., and Vachon, P. (2010). Pharmacokinetics of vanillin and its effects on mechanical hypersensitivity in a rat model of neuropathic pain. *Phytotherapy research : PTR* 24, 525-530.
- Beevers, C.S., Li, F., Liu, L., and Huang, S. (2006). Curcumin inhibits the mammalian target of rapamycin-mediated signaling pathways in cancer cells. *Int J Cancer* 119, 757-764.
- Behera, K.K., Sahoo, S., and Mohapatra, P.C. (2007). Medicinal Plant Resources for Bioprospecting and Drug Development in Tribal Rich District of Orissa, India. *Ethnobotanical Leaflets* 11, 106-112.
- Bharti, A.C., Donato, N., Singh, S., and Aggarwal, B.B. (2003). Curcumin (diferuloylmethane) down-regulates the constitutive activation of nuclear factor-kappa B and I κ B kinase in human multiple myeloma cells, leading to suppression of proliferation and induction of apoptosis. *Blood* 101, 1053-1062.
- Bhuvanewari, V., Velmurugan, B., Balasenthil, S., Ramachandran, C.R., and Nagini, S. (2001). Chemopreventive efficacy of lycopene on 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced hamster buccal pouch carcinogenesis. *Fitoterapia* 72, 865-874.
- Binder, R.G., Benson, M.E., and Flath, R.A. (1989). Eight 1, 4-naphthoquinones from *Juglans*. *Phytochemistry* 28, 2799-2801.
- Bishayee, A., Politis, T., and Darvesh, A.S. (2009). Resveratrol in the chemoprevention and treatment of hepatocellular carcinoma. *Cancer Treat Rev*.
- Bishayee, K., Ghosh, S., Mukherjee, A., Sadhukhan, R., Mondal, J., and Khuda-Bukhsh, A.R. (2013). Quercetin induces cytochrome-c release and ROS accumulation to promote apoptosis and arrest the cell cycle in G2/M, in cervical carcinoma: signal cascade and drug-DNA interaction. *Cell proliferation* 46, 153-163.
- Blasius, R., Duvoix, A., Morceau, F., Schnekenburger, M., Delhalle, S., Henry, E., Dicato, M., and Diederich, M. (2004). Curcumin stability and its effect on glutathione S-transferase P1-1 mRNA expression in K562 cells. *Ann N Y Acad Sci* 1030, 442-448.
- Blasius, R., Reuter, S., Henry, E., Dicato, M., and Diederich, M. (2006). Curcumin regulates signal transducer and activator of transcription (STAT) expression in K562 cells. *Biochem Pharmacol* 72, 1547-1554.
- Bock, R., and Warzecha, H. (2010). Solar-powered factories for new vaccines and antibiotics. *Trends in biotechnology* 28, 246-252.
- Bolton, J.L., Trush, M.A., Penning, T.M., Dryhurst, G., and Monks, T.J. (2000). Role of quinones in toxicology. *Chemical research in toxicology* 13, 135-160.
- Boly, R., Gras, T., Lamkami, T., Guissou, P., Serteyn, D., Kiss, R., and Dubois, J. (2011). Quercetin inhibits a large panel of kinases implicated in cancer cell biology. *Int J Oncol* 38, 833-842.
- Boonchird, C., and Flegel, T.W. (1982). In vitro antifungal activity of eugenol and vanillin against *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans*. *Canadian journal of microbiology* 28, 1235-1241.
- Borek, C. (2001). Antioxidant health effects of aged garlic extract. *J Nutr* 131, 1010S-1015S.

- Bostwick, D.G. (1996). Progression of prostatic intraepithelial neoplasia to early invasive adenocarcinoma. *Eur Urol* *30*, 145-152.
- Bouayed, J., Rammal, H., Dicko, A., Younos, C., and Soulimani, R. (2007). Chlorogenic acid, a polyphenol from *Prunus domestica* (Mirabelle), with coupled anxiolytic and antioxidant effects. *Journal of the neurological sciences* *262*, 77-84.
- Bourgau, F., Gravot, A., Milesi, S., and Gontier, E. (2001). Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science* *161*, 839-851.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* *72*, 248-254.
- Brewer, M.S. (2011). Natural Antioxidants: Sources, Compounds, Mechanisms of Action, and Potential Applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* *10*, 221-247.
- Brown, J.M., and Giaccia, A.J. (1998). The unique physiology of solid tumors: opportunities (and problems) for cancer therapy. *Cancer Res* *58*, 1408-1416.
- Budzianowski, J., Budzianowska, A., and Kromer, K. (2002). Naphthalene glucoside and other phenolics from the shoot and callus cultures of *Drosophyllum lusitanicum*. *Phytochemistry* *61*, 421-425.
- Burgos-Moron, E., Calderon-Montano, J.M., Orta, M.L., Pastor, N., Perez-Guerrero, C., Austin, C., Mateos, S., and Lopez-Lazaro, M. (2012). The Coffee Constituent Chlorogenic Acid Induces Cellular DNA Damage and Formation of Topoisomerase I- and II-DNA Complexes in Cells. *Journal of agricultural and food chemistry* *60*, 7384-7391.
- Burlacu, A. (2003). Regulation of apoptosis by Bcl-2 family proteins. *Journal of cellular and molecular medicine* *7*, 249-257.
- Burnette, W.N. (1981). "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem* *112*, 195-203.
- Bush, J.A., Cheung, K.J., Jr., and Li, G. (2001). Curcumin induces apoptosis in human melanoma cells through a Fas receptor/caspase-8 pathway independent of p53. *Exp Cell Res* *271*, 305-314.
- Bussemakers, M.J., van Bokhoven, A., Verhaegh, G.W., Smit, F.P., Karthaus, H.F., Schalken, J.A., Debruyne, F.M., Ru, N., and Isaacs, W.B. (1999). DD3: a new prostate-specific gene, highly overexpressed in prostate cancer. *Cancer Res* *59*, 5975-5979.
- Cailleau, R., Young, R., Olive, M., and Reeves, W.J., Jr. (1974). Breast tumor cell lines from pleural effusions. *Journal of the National Cancer Institute* *53*, 661-674.
- Calderon-Montano, J.M., Burgos-Moron, E., Perez-Guerrero, C., and Lopez-Lazaro, M. (2011). A review on the dietary flavonoid kaempferol. *Mini reviews in medicinal chemistry* *11*, 298-344.
- Cao, J., Liu, Y., Jia, L., Zhou, H.M., Kong, Y., Yang, G., Jiang, L.P., Li, Q.J., and Zhong, L.F. (2007). Curcumin induces apoptosis through mitochondrial hyperpolarization and mtDNA damage in human hepatoma G2 cells. *Free Radic Biol Med* *43*, 968-975.
- Cardona, J.A., Lee, J.H., and Talcott, S.T. (2009). Color and polyphenolic stability in extracts produced from muscadine grape (*Vitis rotundifolia*) pomace. *Journal of agricultural and food chemistry* *57*, 8421-8425.

- Casagrande, S., Bonetto, V., Fratelli, M., Gianazza, E., Eberini, I., Massignan, T., Salmona, M., Chang, G., Holmgren, A., and Ghezzi, P. (2002). Glutathionylation of human thioredoxin: a possible crosstalk between the glutathione and thioredoxin systems. *Proc Natl Acad Sci U S A* *99*, 9745-9749.
- Castedo, M., Perfettini, J.L., Roumier, T., Andreau, K., Medema, R., and Kroemer, G. (2004). Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. *Oncogene* *23*, 2825-2837.
- Chae, H.Z., Kim, H.J., Kang, S.W., and Rhee, S.G. (1999). Characterization of three isoforms of mammalian peroxiredoxin that reduce peroxides in the presence of thioredoxin. *Diabetes research and clinical practice* *45*, 101-112.
- Chandramohan Reddy, T., Bharat Reddy, D., Aparna, A., Arunasree, K.M., Gupta, G., Achari, C., Reddy, G.V., Lakshmipathi, V., Subramanyam, A., and Reddanna, P. (2012). Anti-leukemic effects of gallic acid on human leukemia K562 cells: downregulation of COX-2, inhibition of BCR/ABL kinase and NF-kappaB inactivation. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* *26*, 396-405.
- Chang, Y.F., Chi, C.W., and Wang, J.J. (2006). Reactive oxygen species production is involved in quercetin-induced apoptosis in human hepatoma cells. *Nutr Cancer* *55*, 201-209.
- Chanwitheesuk, A., Teerawutgulrag, A., Kilburn, J.D., and Rakariyatham, N. (2007). Antimicrobial gallic acid from *Caesalpinia mimosoides* Lamk. *Food chemistry* *100*, 1044-1048.
- Checker, R., Sharma, D., Sandur, S.K., Subrahmanyam, G., Krishnan, S., Poduval, T.B., and Sainis, K.B. (2010). Plumbagin inhibits proliferative and inflammatory responses of T cells independent of ROS generation but by modulating intracellular thiols. *J Cell Biochem* *110*, 1082-1093.
- Chen, A.Y., and Chen, Y.C. (2013). A review of the dietary flavonoid, kaempferol on human health and cancer chemoprevention. *Food chemistry* *138*, 2099-2107.
- Chen, F.F., Wang, G.Y., and Shi, Y.P. (2011a). Molecularly imprinted polymer microspheres for solid-phase extraction of protocatechuic acid in *Rhizoma homalomenae*. *Journal of separation science* *34*, 2602-2610.
- Chen, G., Chen, Z., Hu, Y., and Huang, P. (2011b). Inhibition of mitochondrial respiration and rapid depletion of mitochondrial glutathione by beta-phenethyl isothiocyanate: mechanisms for anti-leukemia activity. *Antioxidants & redox signaling* *15*, 2911-2921.
- Chen, G., Wang, F., Trachootham, D., and Huang, P. (2010). Preferential killing of cancer cells with mitochondrial dysfunction by natural compounds. *Mitochondrion* *10*, 614-625.
- Chen, N.D., Chen, N.F., Chen, C.W., and Zhang, L. (2013). Separation and structure elucidation of a new homoflavanol derivative from *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn. *Natural product research*.
- Cheng, E.H., Wei, M.C., Weiler, S., Flavell, R.A., Mak, T.W., Lindsten, T., and Korsmeyer, S.J. (2001). BCL-2, BCL-X(L) sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis. *Molecular cell* *8*, 705-711.
- Cheng, W.Y., Hsiang, C.Y., Bau, D.T., Chen, J.C., Shen, W.S., Li, C.C., Lo, H.Y., Wu, S.L., Chiang, S.Y., and Ho, T.Y. (2007). Microarray analysis of vanillin-regulated gene expression profile in human hepatocarcinoma cells. *Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society* *56*, 474-482.

- Cheshire, D.R., and Isaacs, W.B. (2003). Beta-catenin signaling in prostate cancer: an early perspective. *Endocr Relat Cancer* *10*, 537-560.
- Cheung, K.L., and Kong, A.N. (2010). Molecular targets of dietary phenethyl isothiocyanate and sulforaphane for cancer chemoprevention. *AAPS J* *12*, 87-97.
- Chiorazzi, N., Rai, K.R., and Ferrarini, M. (2005). Chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* *352*, 804-815.
- Cho, J.W., Lee, K.S., and Kim, C.W. (2007). Curcumin attenuates the expression of IL-1beta, IL-6, and TNF-alpha as well as cyclin E in TNF-alpha-treated HaCaT cells; NF-kappaB and MAPKs as potential upstream targets. *Int J Mol Med* *19*, 469-474.
- Cho, S.Y., Park, S.J., Kwon, M.J., Jeong, T.S., Bok, S.H., Choi, W.Y., Jeong, W.I., Ryu, S.Y., Do, S.H., Lee, C.S., *et al.* (2003). Quercetin suppresses proinflammatory cytokines production through MAP kinases and NF-kappaB pathway in lipopolysaccharide-stimulated macrophage. *Molecular and cellular biochemistry* *243*, 153-160.
- Choi, B.H., Kim, C.G., Bae, Y.S., Lim, Y., Lee, Y.H., and Shin, S.Y. (2008). p21 Waf1/Cip1 expression by curcumin in U-87MG human glioma cells: role of early growth response-1 expression. *Cancer Res* *68*, 1369-1377.
- Choi, K.C., Lee, Y.H., Jung, M.G., Kwon, S.H., Kim, M.J., Jun, W.J., Lee, J., Lee, J.M., and Yoon, H.G. (2009). Gallic acid suppresses lipopolysaccharide-induced nuclear factor-kappaB signaling by preventing RelA acetylation in A549 lung cancer cells. *Molecular cancer research : MCR* *7*, 2011-2021.
- Choi, S.J., Shin, S.C., and Choi, J.S. (2011). Effects of myricetin on the bioavailability of doxorubicin for oral drug delivery in rats: possible role of CYP3A4 and P-glycoprotein inhibition by myricetin. *Archives of pharmacal research* *34*, 309-315.
- Chuang-Xin, L., Wen-Yu, W., Yao, C., Xiao-Yan, L., and Yun, Z. (2012). Quercetin enhances the effects of 5-fluorouracil-mediated growth inhibition and apoptosis of esophageal cancer cells by inhibiting NF-kappaB. *Oncology letters* *4*, 775-778.
- Chung, T.W., Moon, S.K., Chang, Y.C., Ko, J.H., Lee, Y.C., Cho, G., Kim, S.H., Kim, J.G., and Kim, C.H. (2004). Novel and therapeutic effect of caffeic acid and caffeic acid phenyl ester on hepatocarcinoma cells: complete regression of hepatoma growth and metastasis by dual mechanism. *FASEB J* *18*, 1670-1681.
- Circu, M.L., and Aw, T.Y. (2010). Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radic Biol Med* *48*, 749-762.
- Circu, M.L., and Aw, T.Y. (2012). Glutathione and modulation of cell apoptosis. *Biochim Biophys Acta* *1823*, 1767-1777.
- Collins, S.J., Gallo, R.C., and Gallagher, R.E. (1977). Continuous growth and differentiation of human myeloid leukaemic cells in suspension culture. *Nature* *270*, 347-349.
- Cottle, W., and Kolattukudy, P.E. (1982). Biosynthesis, deposition, and partial characterization of potato suberin phenolics. *Plant Physiol* *69*, 393-399.
- Courtois, G., and Gilmore, T.D. (2006). Mutations in the NF-kappaB signaling pathway: implications for human disease. *Oncogene* *25*, 6831-6843.
- Cronauer, M.V., Schulz, W.A., Ackermann, R., and Burchardt, M. (2005). Effects of WNT/beta-catenin pathway activation on signaling through T-cell factor and androgen receptor in prostate cancer cell lines. *Int J Oncol* *26*, 1033-1040.

- Cronauer, M.V., Schulz, W.A., Burchardt, T., Ackermann, R., and Burchardt, M. (2004). Inhibition of p53 function diminishes androgen receptor-mediated signaling in prostate cancer cell lines. *Oncogene* 23, 3541-3549.
- Dalle-Donne, I., Rossi, R., Colombo, G., Giustarini, D., and Milzani, A. (2009). Protein S-glutathionylation: a regulatory device from bacteria to humans. *Trends Biochem Sci* 34, 85-96.
- de Bruin, E.C., and Medema, J.P. (2008). Apoptosis and non-apoptotic deaths in cancer development and treatment response. *Cancer Treat Rev* 34, 737-749.
- De Marzo, A.M., Platz, E.A., Sutcliffe, S., Xu, J., Gronberg, H., Drake, C.G., Nakai, Y., Isaacs, W.B., and Nelson, W.G. (2007). Inflammation in prostate carcinogenesis. *Nat Rev Cancer* 7, 256-269.
- Del Mar Blanquer-Rossello, M., Oliver, J., Valle, A., and Roca, P. (2013). Effect of xanthohumol and 8-prenylnaringenin on MCF-7 breast cancer cells oxidative stress and mitochondrial complexes expression. *J Cell Biochem*.
- Deschler, B., and Lubbert, M. (2006). Acute myeloid leukemia: epidemiology and etiology. *Cancer* 107, 2099-2107.
- Dhar, S.K., Tangpong, J., Chaiswing, L., Oberley, T.D., and St Clair, D.K. (2011). Manganese superoxide dismutase is a p53-regulated gene that switches cancers between early and advanced stages. *Cancer Res* 71, 6684-6695.
- Di Pietro, G., Magno, L.A., and Rios-Santos, F. (2010). Glutathione S-transferases: an overview in cancer research. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology* 6, 153-170.
- Dimitropoulou, P., Lophatananon, A., Easton, D., Pocock, R., Dearnaley, D.P., Guy, M., Edwards, S., O'Brien, L., Hall, A., Wilkinson, R., *et al.* (2009). Sexual activity and prostate cancer risk in men diagnosed at a younger age. *BJU Int* 103, 178-185.
- Dorai, T., Cao, Y.C., Dorai, B., Buttyan, R., and Katz, A.E. (2001). Therapeutic potential of curcumin in human prostate cancer. III. Curcumin inhibits proliferation, induces apoptosis, and inhibits angiogenesis of LNCaP prostate cancer cells in vivo. *Prostate* 47, 293-303.
- Dorai, T., Gehani, N., and Katz, A. (2000). Therapeutic potential of curcumin in human prostate cancer-I. curcumin induces apoptosis in both androgen-dependent and androgen-independent prostate cancer cells. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 3, 84-93.
- Downie, D., McFadyen, M.C., Rooney, P.H., Cruickshank, M.E., Parkin, D.E., Miller, I.D., Telfer, C., Melvin, W.T., and Murray, G.I. (2005). Profiling cytochrome P450 expression in ovarian cancer: identification of prognostic markers. *Clin Cancer Res* 11, 7369-7375.
- Durner, J., Shah, J., and Klessig, D.F. (1997). Salicylic acid and disease resistance in plants. *Trends in plant science* 2, 266-274.
- Duthie, S.J., Collins, A.R., Duthie, G.G., and Dobson, V.L. (1997). Quercetin and myricetin protect against hydrogen peroxide-induced DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) in human lymphocytes. *Mutat Res* 393, 223-231.
- Duvoix, A., Blasius, R., Delhalle, S., Schnekenburger, M., Morceau, F., Henry, E., Dicato, M., and Diederich, M. (2005). Chemopreventive and therapeutic effects of curcumin. *Cancer Lett* 223, 181-190.
- Duvoix, A., Morceau, F., Delhalle, S., Schmitz, M., Schnekenburger, M., Galteau, M.M., Dicato, M., and Diederich, M. (2003a). Induction of apoptosis by curcumin: mediation by glutathione S-transferase P1-1 inhibition. *Biochem Pharmacol* 66, 1475-1483.

- Duvoix, A., Morceau, F., Schnekenburger, M., Delhalle, S., Galteau, M.M., Dicato, M., and Diederich, M. (2003b). Curcumin-induced cell death in two leukemia cell lines: K562 and Jurkat. *Ann N Y Acad Sci* *1010*, 389-392.
- Edderkaoui, M., Odnokova, I., Ohno, I., Gukovsky, I., Go, V.L., Pandol, S.J., and Gukovskaya, A.S. (2008). Ellagic acid induces apoptosis through inhibition of nuclear factor kappa B in pancreatic cancer cells. *World J Gastroenterol* *14*, 3672-3680.
- Eilenberg, H., Pnini-Cohen, S., Rahamim, Y., Sionov, E., Segal, E., Carmeli, S., and Zilberstein, A. (2010). Induced production of antifungal naphthoquinones in the pitchers of the carnivorous plant *Nepenthes khasiana*. *Journal of experimental botany* *61*, 911-922.
- Eisenberg-Lerner, A., Bialik, S., Simon, H.U., and Kimchi, A. (2009). Life and death partners: apoptosis, autophagy and the cross-talk between them. *Cell Death Differ* *16*, 966-975.
- Ekstrom, A.M., Serafini, M., Nyren, O., Wolk, A., Bosetti, C., and Bellocco, R. (2011). Dietary quercetin intake and risk of gastric cancer: results from a population-based study in Sweden. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* *22*, 438-443.
- el-Shirbiny, A.M. (1994). Prostatic specific antigen. *Adv Clin Chem* *31*, 99-133.
- Ellingwood, F., and Lloyd, J.U. (1919). *American Materia Medica, Therapeutics and Pharmacognosy: Developing the Latest Acquired Knowledge of Drugs, and Especially of the Direct Action of Single Drugs Upon Exact Conditions of Disease, with Especial Reference to the Therapeutics of the Plant Drugs of the Americas* (Chicago, Illinois, USA: Ellingwoods' therapist).
- Feng, R., Lu, Y., Bowman, L.L., Qian, Y., Castranova, V., and Ding, M. (2005). Inhibition of activator protein-1, NF-kappaB, and MAPKs and induction of phase 2 detoxifying enzyme activity by chlorogenic acid. *J Biol Chem* *280*, 27888-27895.
- Fernandes, A.P., and Holmgren, A. (2004). Glutaredoxins: glutathione-dependent redox enzymes with functions far beyond a simple thioredoxin backup system. *Antioxidants & redox signaling* *6*, 63-74.
- Ferraro, D., Corso, S., Fasano, E., Panieri, E., Santangelo, R., Borrello, S., Giordano, S., Pani, G., and Galeotti, T. (2006). Pro-metastatic signaling by c-Met through RAC-1 and reactive oxygen species (ROS). *Oncogene* *25*, 3689-3698.
- Ferry, D.R., Smith, A., Malkhandi, J., Fyfe, D.W., deTakats, P.G., Anderson, D., Baker, J., and Kerr, D.J. (1996). Phase I clinical trial of the flavonoid quercetin: pharmacokinetics and evidence for in vivo tyrosine kinase inhibition. *Clin Cancer Res* *2*, 659-668.
- Festa, M., Capasso, A., D'Acunto, C.W., Masullo, M., Rossi, A.G., Pizza, C., and Piacente, S. (2011). Xanthohumol induces apoptosis in human malignant glioblastoma cells by increasing reactive oxygen species and activating MAPK pathways. *J Nat Prod* *74*, 2505-2513.
- Fimia, G.M., and Piacentini, M. (2010). Regulation of autophagy in mammals and its interplay with apoptosis. *Cell Mol Life Sci* *67*, 1581-1588.
- Fogh, J., and Trempe, G. (1975). New human tumor cell lines. In *Human Tumor Cells in vitro*, 115-141.
- Folmer, F., Harrison, W.T., Tabudravu, J.N., Jaspars, M., Aalbersberg, W., Feussner, K., Wright, A.D., Dicato, M., and Diederich, M. (2008a). NF-kappaB-inhibiting naphthopyrones from the Fijian echinoderm *Comanthus parvicirrus*. *J Nat Prod* *71*, 106-111.

- Folmer, F., Jaspars, M., Dicato, M., and Diederich, M. (2008b). Marine natural products as targeted modulators of the transcription factor NF-kappaB. *Biochem Pharmacol* 75, 603-617.
- Forester, S.C., and Lambert, J.D. (2011). The role of antioxidant versus pro-oxidant effects of green tea polyphenols in cancer prevention. *Molecular nutrition & food research* 55, 844-854.
- Friend, J., Reynolds, S., and Aveyard, M.A. (1973). Phenylalanine ammonia lyase, chlorogenic acid and lignin in potato tuber tissue inoculated with *Phytophthora infestans*. *Physiological Plant Pathology* 3, 495-507.
- Friesen, T.L., Stukenbrock, E.H., Liu, Z., Meinhardt, S., Ling, H., Faris, J.D., Rasmussen, J.B., Solomon, P.S., McDonald, B.A., and Oliver, R.P. (2006). Emergence of a new disease as a result of interspecific virulence gene transfer. *Nature genetics* 38, 953-956.
- Fujino, G., Noguchi, T., Takeda, K., and Ichijo, H. (2006). Thioredoxin and protein kinases in redox signaling. *Seminars in cancer biology* 16, 427-435.
- Fulda, S. (2013). Alternative cell death pathways and cell metabolism. *International journal of cell biology* 2013, 463637.
- Fulda, S., and Debatin, K.M. (2006). Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene* 25, 4798-4811.
- Furlanetto, V., Zagotto, G., Pasquale, R., Moro, S., and Gatto, B. (2012). Ellagic acid and polyhydroxylated urolithins are potent catalytic inhibitors of human topoisomerase II: an in vitro study. *Journal of agricultural and food chemistry* 60, 9162-9170.
- Fuster, V., and Sweeny, J.M. (2011). Aspirin: a historical and contemporary therapeutic overview. *Circulation* 123, 768-778.
- Gaascht, F., Dicato, M., and Diederich, M. (2013). Venus flytrap (*Dionaea muscipula* Solander ex Ellis) contains powerful compounds that prevent and cure cancer. *Frontiers in Oncology* 3.
- Gaascht, F., Teiten, M.H., Schumacher, M., Dicato, M., and Diederich, M. (2010). Approche végétale dans le traitement des leucémies. *Correspondances en Onco-hématologie* V, 102-108.
- Galati, G., Moridani, M.Y., Chan, T.S., and O'Brien, P.J. (2001). Peroxidative metabolism of apigenin and naringenin versus luteolin and quercetin: glutathione oxidation and conjugation. *Free Radic Biol Med* 30, 370-382.
- Gallagher, R., Collins, S., Trujillo, J., McCredie, K., Ahearn, M., Tsai, S., Metzgar, R., Aulakh, G., Ting, R., Ruscetti, F., *et al.* (1979). Characterization of the continuous, differentiating myeloid cell line (HL-60) from a patient with acute promyelocytic leukemia. *Blood* 54, 713-733.
- Gallogly, M.M., and Mieyal, J.J. (2007). Mechanisms of reversible protein glutathionylation in redox signaling and oxidative stress. *Current opinion in pharmacology* 7, 381-391.
- Gartner, C., Stahl, W., and Sies, H. (1997). Lycopene is more bioavailable from tomato paste than from fresh tomatoes. *Am J Clin Nutr* 66, 116-122.
- Gershenson, J. (1984). Changes in the Levels of Plant Secondary Metabolites Under Water and Nutrient Stress. In *Phytochemical Adaptations to Stress*, B. Timmermann, C. Steelink, and F. Loewus, eds. (Springer US), pp. 273-320.
- Gerstein, A.V., Almeida, T.A., Zhao, G., Chess, E., Shih Ie, M., Buhler, K., Pienta, K., Rubin, M.A., Vessella, R., and Papadopoulos, N. (2002). APC/CTNNB1 (beta-catenin) pathway alterations in human prostate cancers. *Genes Chromosomes Cancer* 34, 9-16.

- Gheldof, N., and Engeseth, N.J. (2002). Antioxidant capacity of honeys from various floral sources based on the determination of oxygen radical absorbance capacity and inhibition of in vitro lipoprotein oxidation in human serum samples. *Journal of agricultural and food chemistry* *50*, 3050-3055.
- Giard, D.J., Aaronson, S.A., Todaro, G.J., Arnstein, P., Kersey, J.H., Dosik, H., and Parks, W.P. (1973). In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Natl Cancer Inst* *51*, 1417-1423.
- Giddings, G., Allison, G., Brooks, D., and Carter, A. (2000). Transgenic plants as factories for biopharmaceuticals. *Nature biotechnology* *18*, 1151-1155.
- Goel, A., Kunnumakkara, A.B., and Aggarwal, B.B. (2008). Curcumin as "Curecumin": from kitchen to clinic. *Biochem Pharmacol* *75*, 787-809.
- Golstein, P., and Kroemer, G. (2007). Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends Biochem Sci* *32*, 37-43.
- Gomathinayagam, R., Sowmyalakshmi, S., Mardhatillah, F., Kumar, R., Akbarsha, M.A., and Damodaran, C. (2008). Anticancer mechanism of plumbagin, a natural compound, on non-small cell lung cancer cells. *Anticancer research* *28*, 785-792.
- Gonthier, M.P., Verny, M.A., Besson, C., Remesy, C., and Scalbert, A. (2003). Chlorogenic acid bioavailability largely depends on its metabolism by the gut microflora in rats. *J Nutr* *133*, 1853-1859.
- Gonzalez, A.M., Tracanna, M.I., Amani, S.M., Schuff, C., Poch, M.J., Bach, H., and Catalan, C.A. (2012). Chemical composition, antimicrobial and antioxidant properties of the volatile oil and methanol extract of *Xenophyllum poposum*. *Natural product communications* *7*, 1663-1666.
- Graf, E. (1992). Antioxidant potential of ferulic acid. *Free Radic Biol Med* *13*, 435-448.
- Granado-Serrano, A.B., Martin, M.A., Bravo, L., Goya, L., and Ramos, S. (2006). Quercetin induces apoptosis via caspase activation, regulation of Bcl-2, and inhibition of PI-3-kinase/Akt and ERK pathways in a human hepatoma cell line (HepG2). *J Nutr* *136*, 2715-2721.
- Granado-Serrano, A.B., Martin, M.A., Izquierdo-Pulido, M., Goya, L., Bravo, L., and Ramos, S. (2007). Molecular mechanisms of (-)-epicatechin and chlorogenic acid on the regulation of the apoptotic and survival/proliferation pathways in a human hepatoma cell line. *Journal of agricultural and food chemistry* *55*, 2020-2027.
- Gray, J.W., and Coffino, P. (1979). Cell cycle analysis by flow cytometry. *Methods Enzymol* *58*, 233-248.
- Gross, A., Jockel, J., Wei, M.C., and Korsmeyer, S.J. (1998). Enforced dimerization of BAX results in its translocation, mitochondrial dysfunction and apoptosis. *EMBO J* *17*, 3878-3885.
- Gutter, M.G. (2000). Caspases: key players in programmed cell death. *Current opinion in structural biology* *10*, 649-655.
- Gu, J.Q., Graf, T.N., Lee, D., Chai, H.B., Mi, Q., Kardono, L.B., Setyowati, F.M., Ismail, R., Riswan, S., Farnsworth, N.R., *et al.* (2004). Cytotoxic and antimicrobial constituents of the bark of *Diospyros maritima* collected in two geographical locations in Indonesia. *J Nat Prod* *67*, 1156-1161.

- Gupta, S.C., Sundaram, C., Reuter, S., and Aggarwal, B.B. (2010). Inhibiting NF-kappaB activation by small molecules as a therapeutic strategy. *Biochimica et biophysica acta* 1799, 775-787.
- Gururaj, A.E., Belakavadi, M., Venkatesh, D.A., Marme, D., and Salimath, B.P. (2002). Molecular mechanisms of anti-angiogenic effect of curcumin. *Biochem Biophys Res Commun* 297, 934-942.
- Hafeez, B.B., Zhong, W., Fischer, J.W., Mustafa, A., Shi, X., Meske, L., Hong, H., Cai, W., Havighurst, T., Kim, K., *et al.* (2013). Plumbagin, a medicinal plant (*Plumbago zeylanica*)-derived 1,4-naphthoquinone, inhibits growth and metastasis of human prostate cancer PC-3M-luciferase cells in an orthotopic xenograft mouse model. *Molecular oncology* 7, 428-439.
- Hagiwara, Y., Kasukabe, T., Kaneko, Y., Niitsu, N., and Okabe-Kado, J. (2010). Ellagic acid, a natural polyphenolic compound, induces apoptosis and potentiates retinoic acid-induced differentiation of human leukemia HL-60 cells. *International journal of hematology* 92, 136-143.
- Hakkinen, S.H., Karenlampi, S.O., Heinonen, I.M., Mykkanen, H.M., and Torronen, A.R. (1999). Content of the flavonols quercetin, myricetin, and kaempferol in 25 edible berries. *Journal of agricultural and food chemistry* 47, 2274-2279.
- Hamedeyazdan, S., Fathiazad, F., Sharifi, S., and Nazemiyeh, H. (2012). Antiproliferative activity of *Marrubium persicum* extract in the MCF-7 human breast cancer cell line. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP* 13, 5843-5848.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646-674.
- Hancock, V., Dahl, M., Vejborg, R.M., and Klemm, P. (2010). Dietary plant components ellagic acid and tannic acid inhibit *Escherichia coli* biofilm formation. *Journal of medical microbiology* 59, 496-498.
- Hanif, R., Qiao, L., Shiff, S.J., and Rigas, B. (1997). Curcumin, a natural plant phenolic food additive, inhibits cell proliferation and induces cell cycle changes in colon adenocarcinoma cell lines by a prostaglandin-independent pathway. *J Lab Clin Med* 130, 576-584.
- Harikumar, K.B., Kunnumakkara, A.B., Ahn, K.S., Anand, P., Krishnan, S., Guha, S., and Aggarwal, B.B. (2009). Modification of the cysteine residues in I-kappaB kinase and NF-kappaB (p65) by xanthohumol leads to suppression of NF-kappaB-regulated gene products and potentiation of apoptosis in leukemia cells. *Blood* 113, 2003-2013.
- Hart, M.J., de los Santos, R., Albert, I.N., Rubinfeld, B., and Polakis, P. (1998). Downregulation of beta-catenin by human Axin and its association with the APC tumor suppressor, beta-catenin and GSK3 beta. *Curr Biol* 8, 573-581.
- Hartmann, J.T., Haap, M., Kopp, H.G., and Lipp, H.P. (2009). Tyrosine kinase inhibitors - a review on pharmacology, metabolism and side effects. *Current drug metabolism* 10, 470-481.
- Hartmann, T. (2007). From waste products to ecochemicals: fifty years research of plant secondary metabolism. *Phytochemistry* 68, 2831-2846.
- Hayat, S., Ali, B., and Ahmad, A. (2007). Salicylic acid: biosynthesis, metabolism and physiological role in plants. In *Salicylic Acid: A Plant Hormone*, S. Hayat, and A. Ahmad, eds. (Dordrecht, The Netherlands: Springer), pp. 1-14.

- Hayes, J.D., Flanagan, J.U., and Jowsey, I.R. (2005). Glutathione transferases. *Annual review of pharmacology and toxicology* 45, 51-88.
- He, T.C., Sparks, A.B., Rago, C., Hermeking, H., Zawel, L., da Costa, L.T., Morin, P.J., Vogelstein, B., and Kinzler, K.W. (1998). Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science* 281, 1509-1512.
- Hedin, P.A., Collum, D.H., Langhans, V.E., and Graves, C.H. (1980). Distribution of juglone and related compounds in pecan and their effect on *Fusicladium effusum*. *Journal of agricultural and food chemistry* 28, 340-342.
- Hehlmann, R., Hochhaus, A., and Baccarani, M. (2007). Chronic myeloid leukaemia. *Lancet* 370, 342-350.
- Heinen, T.E., and da Veiga, A.B. (2011). Arthropod venoms and cancer. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology* 57, 497-511.
- Heng, H.H., Stevens, J.B., Bremer, S.W., Liu, G., Abdallah, B.Y., and Ye, C.J. (2011). Evolutionary mechanisms and diversity in cancer. *Advances in cancer research* 112, 217-253.
- Henning, S.M., Wang, P., Said, J., Magyar, C., Castor, B., Doan, N., Tosity, C., Moro, A., Gao, K., Li, L., *et al.* (2012). Polyphenols in brewed green tea inhibit prostate tumor xenograft growth by localizing to the tumor and decreasing oxidative stress and angiogenesis. *The Journal of nutritional biochemistry* 23, 1537-1542.
- Henshall, D.C., Bonislowski, D.P., Skradski, S.L., Araki, T., Lan, J.Q., Schindler, C.K., Meller, R., and Simon, R.P. (2001a). Formation of the Apaf-1/cytochrome c complex precedes activation of caspase-9 during seizure-induced neuronal death. *Cell Death Differ* 8, 1169-1181.
- Henshall, D.C., Bonislowski, D.P., Skradski, S.L., Lan, J.Q., Meller, R., and Simon, R.P. (2001b). Cleavage of bid may amplify caspase-8-induced neuronal death following focally evoked limbic seizures. *Neurobiology of disease* 8, 568-580.
- Hernandez, I., Alegre, L., Van Breusegem, F., and Munne-Bosch, S. (2009). How relevant are flavonoids as antioxidants in plants? *Trends in plant science* 14, 125-132.
- Higa, M., Ogihara, K., and Yogi, S. (1998). Bioactive naphthoquinone derivatives from *Diospyros maritima* Blume. *Chemical and pharmaceutical bulletin* 46, 1189-1193.
- Ho, C.C., Huang, A.C., Yu, C.S., Lien, J.C., Wu, S.H., Huang, Y.P., Huang, H.Y., Kuo, J.H., Liao, W.Y., Yang, J.S., *et al.* (2013a). Ellagic acid induces apoptosis in tsg8301 human bladder cancer cells through the endoplasmic reticulum stress- and mitochondria-dependent signaling pathways. *Environmental toxicology*.
- Ho, H.H., Chang, C.S., Ho, W.C., Liao, S.Y., Lin, W.L., and Wang, C.J. (2013b). Gallic acid inhibits gastric cancer cells metastasis and invasive growth via increased expression of RhoB, downregulation of AKT/small GTPase signals and inhibition of NF-kappaB activity. *Toxicol Appl Pharmacol* 266, 76-85.
- Ho, H.H., Chang, C.S., Ho, W.C., Liao, S.Y., Wu, C.H., and Wang, C.J. (2010). Anti-metastasis effects of gallic acid on gastric cancer cells involves inhibition of NF-kappaB activity and downregulation of PI3K/AKT/small GTPase signals. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* 48, 2508-2516.

- Ho, K., Yazan, L.S., Ismail, N., and Ismail, M. (2009). Apoptosis and cell cycle arrest of human colorectal cancer cell line HT-29 induced by vanillin. *Cancer epidemiology* 33, 155-160.
- Hodgson, J.M., Morton, L.W., Puddey, I.B., Beilin, L.J., and Croft, K.D. (2000). Gallic acid metabolites are markers of black tea intake in humans. *Journal of agricultural and food chemistry* 48, 2276-2280.
- Holy, J.M. (2002). Curcumin disrupts mitotic spindle structure and induces micronucleation in MCF-7 breast cancer cells. *Mutat Res* 518, 71-84.
- Hong, R.L., Spohn, W.H., and Hung, M.C. (1999). Curcumin inhibits tyrosine kinase activity of p185neu and also depletes p185neu. *Clin Cancer Res* 5, 1884-1891.
- Hoover, K., Alaniz, S.A., Yee, J.L., Rocke, D.M., Hammock, B.D., and Duffey, S.S. (1998). Dietary protein and chlorogenic acid effect on baculoviral disease of noctuid (Lepidoptera: Noctuidae) larvae. *Environmental entomology* 27, 1264-1272.
- Hornero-Méndez, D.m., and Minguez-Mosquera, M.I. (2007). Bioaccessibility of carotenes from carrots: Effect of cooking and addition of oil. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 8, 407-412.
- Horoszewicz, J.S., Leong, S.S., Kawinski, E., Karr, J.P., Rosenthal, H., Chu, T.M., Mirand, E.A., and Murphy, G.P. (1983). LNCaP model of human prostatic carcinoma. *Cancer Res* 43, 1809-1818.
- Hou, X., Song, J., Li, X.N., Zhang, L., Wang, X., Chen, L., and Shen, Y.H. (2010). Metformin reduces intracellular reactive oxygen species levels by upregulating expression of the antioxidant thioredoxin via the AMPK-FOXO3 pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 396, 199-205.
- Houghton, P.J., and Raman, A. (1998). *Laboratory Handbook for the Fractionation of Natural Extracts* (Chapman & Hall).
- Hour, T.C., Chen, J., Huang, C.Y., Guan, J.Y., Lu, S.H., and Pu, Y.S. (2002). Curcumin enhances cytotoxicity of chemotherapeutic agents in prostate cancer cells by inducing p21(WAF1/CIP1) and C/EBPbeta expressions and suppressing NF-kappaB activation. *Prostate* 51, 211-218.
- Hsieh, Y.-J., Lin, L.-C., and Tsai, T.-H. (2005). Determination and identification of plumbagin from the roots of *Plumbago zeylanica* L. by liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1083, 141-145.
- Hsieh, Y.J., Lin, L.C., and Tsai, T.H. (2006). Measurement and pharmacokinetic study of plumbagin in a conscious freely moving rat using liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 844, 1-5.
- Hsu, Y.L., Cho, C.Y., Kuo, P.L., Huang, Y.T., and Lin, C.C. (2006). Plumbagin (5-hydroxy-2-methyl-1,4-naphthoquinone) induces apoptosis and cell cycle arrest in A549 cells through p53 accumulation via c-Jun NH2-terminal kinase-mediated phosphorylation at serine 15 in vitro and in vivo. *J Pharmacol Exp Ther* 318, 484-494.
- Hu, Y., Rosen, D.G., Zhou, Y., Feng, L., Yang, G., Liu, J., and Huang, P. (2005). Mitochondrial manganese-superoxide dismutase expression in ovarian cancer: role in cell proliferation and response to oxidative stress. *J Biol Chem* 280, 39485-39492.

- Hu, Y., Urig, S., Koncarevic, S., Wu, X., Fischer, M., Rahlfs, S., Mersch-Sundermann, V., and Becker, K. (2007). Glutathione- and thioredoxin-related enzymes are modulated by sulfur-containing chemopreventive agents. *Biological chemistry* 388, 1069-1081.
- Huang, M.T., Wood, A.W., Newmark, H.L., Sayer, J.M., Yagi, H., Jerina, D.M., and Conney, A.H. (1983). Inhibition of the mutagenicity of bay-region diol-epoxides of polycyclic aromatic hydrocarbons by phenolic plant flavonoids. *Carcinogenesis* 4, 1631-1637.
- Huang, W.W., Chiu, Y.J., Fan, M.J., Lu, H.F., Yeh, H.F., Li, K.H., Chen, P.Y., Chung, J.G., and Yang, J.S. (2010). Kaempferol induced apoptosis via endoplasmic reticulum stress and mitochondria-dependent pathway in human osteosarcoma U-2 OS cells. *Molecular nutrition & food research* 54, 1585-1595.
- Huang, W.Y., Zhang, H.C., Liu, W.X., and Li, C.Y. (2012). Survey of antioxidant capacity and phenolic composition of blueberry, blackberry, and strawberry in Nanjing. *Journal of Zhejiang University Science B* 13, 94-102.
- Huang, Z., Pinto, J.T., Deng, H., and Richie, J.P., Jr. (2008). Inhibition of caspase-3 activity and activation by protein glutathionylation. *Biochem Pharmacol* 75, 2234-2244.
- Huang, Z.Z., Chen, C., Zeng, Z., Yang, H., Oh, J., Chen, L., and Lu, S.C. (2001). Mechanism and significance of increased glutathione level in human hepatocellular carcinoma and liver regeneration. *FASEB J* 15, 19-21.
- Hudson, E.A., Dinh, P.A., Kokubun, T., Simmonds, M.S., and Gescher, A. (2000). Characterization of potentially chemopreventive phenols in extracts of brown rice that inhibit the growth of human breast and colon cancer cells. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 9, 1163-1170.
- Hulme, A.C. (1953). The isolation of chlorogenic acid from the apple fruit. *The Biochemical journal* 53, 337-340.
- Huo, Y., Qiu, W.Y., Pan, Q., Yao, Y.F., Xing, K., and Lou, M.F. (2009). Reactive oxygen species (ROS) are essential mediators in epidermal growth factor (EGF)-stimulated corneal epithelial cell proliferation, adhesion, migration, and wound healing. *Experimental eye research* 89, 876-886.
- Huynh, H., Nguyen, T.T., Chan, E., and Tran, E. (2003). Inhibition of ErbB-2 and ErbB-3 expression by quercetin prevents transforming growth factor alpha (TGF-alpha)- and epidermal growth factor (EGF)-induced human PC-3 prostate cancer cell proliferation. *Int J Oncol* 23, 821-829.
- Igura, K., Ohta, T., Kuroda, Y., and Kaji, K. (2001). Resveratrol and quercetin inhibit angiogenesis in vitro. *Cancer Lett* 171, 11-16.
- Ikonen, A., Tahvanainen, J., and Roininen, H. (2001). Chlorogenic acid as an antiherbivore defence of willows against leaf beetles. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 99, 47-54.
- Imai, J., Ide, N., Nagae, S., Moriguchi, T., Matsuura, H., and Itakura, Y. (1994). Antioxidant and radical scavenging effects of aged garlic extract and its constituents. *Planta Med* 60, 417-420.
- Inbaraj, J.J., and Chignell, C.F. (2004). Cytotoxic action of juglone and plumbagin: a mechanistic study using HaCaT keratinocytes. *Chemical research in toxicology* 17, 55-62.
- Indo, H.P., Davidson, M., Yen, H.C., Suenaga, S., Tomita, K., Nishii, T., Higuchi, M., Koga, Y., Ozawa, T., and Majima, H.J. (2007). Evidence of ROS generation by mitochondria in

cells with impaired electron transport chain and mitochondrial DNA damage. *Mitochondrion* 7, 106-118.

Ishikawa, K., Takenaga, K., Akimoto, M., Koshikawa, N., Yamaguchi, A., Imanishi, H., Nakada, K., Honma, Y., and Hayashi, J. (2008). ROS-generating mitochondrial DNA mutations can regulate tumor cell metastasis. *Science* 320, 661-664.

Ishikawa, Y., and Kitamura, M. (2000). Anti-apoptotic effect of quercetin: intervention in the JNK- and ERK-mediated apoptotic pathways. *Kidney international* 58, 1078-1087.

Itagaki, S., Kurokawa, T., Nakata, C., Saito, Y., Oikawa, S., Kobayashi, M., Hirano, T., and Iseki, K. (2009). In vitro and in vivo antioxidant properties of ferulic acid: A comparative study with other natural oxidation inhibitors. *Food chemistry* 114, 466-471.

Jacob, C., Jamier, V., and Ba, L.A. (2011). Redox active secondary metabolites. *Current opinion in chemical biology* 15, 149-155.

Jaganathan, S.K. (2012). Growth inhibition by caffeic acid, one of the phenolic constituents of honey, in HCT 15 colon cancer cells. *ScientificWorldJournal* 2012, 372345.

Jain, D., and Kumar, S. (2012). Snake venom: a potent anticancer agent. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP* 13, 4855-4860.

Jaiswal, A.S., Marlow, B.P., Gupta, N., and Narayan, S. (2002). Beta-catenin-mediated transactivation and cell-cell adhesion pathways are important in curcumin (diferuylmethane)-induced growth arrest and apoptosis in colon cancer cells. *Oncogene* 21, 8414-8427.

Janicke, B., Hegardt, C., Krogh, M., Onning, G., Akesson, B., Cirenajwis, H.M., and Oredsson, S.M. (2011). The antiproliferative effect of dietary fiber phenolic compounds ferulic acid and p-coumaric acid on the cell cycle of Caco-2 cells. *Nutr Cancer* 63, 611-622.

Jankun, J., Selman, S.H., Swiercz, R., and Skrzypczak-Jankun, E. (1997). Why drinking green tea could prevent cancer. *Nature* 387, 561.

Jemal, A., Bray, F., Center, M.M., Ferlay, J., Ward, E., and Forman, D. (2011). Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 61, 69-90.

Jeong, J.C., Kim, M.S., Kim, T.H., and Kim, Y.K. (2009a). Kaempferol induces cell death through ERK and Akt-dependent down-regulation of XIAP and survivin in human glioma cells. *Neurochemical research* 34, 991-1001.

Jeong, J.H., An, J.Y., Kwon, Y.T., Rhee, J.G., and Lee, Y.J. (2009b). Effects of low dose quercetin: cancer cell-specific inhibition of cell cycle progression. *J Cell Biochem* 106, 73-82.

Jia, Y.L., Li, J., Qin, Z.H., and Liang, Z.Q. (2009). Autophagic and apoptotic mechanisms of curcumin-induced death in K562 cells. *J Asian Nat Prod Res* 11, 918-928.

Jin, S., and White, E. (2007). Role of autophagy in cancer: management of metabolic stress. *Autophagy* 3, 28-31.

Jin, U.H., Lee, J.Y., Kang, S.K., Kim, J.K., Park, W.H., Kim, J.G., Moon, S.K., and Kim, C.H. (2005). A phenolic compound, 5-caffeoylquinic acid (chlorogenic acid), is a new type and strong matrix metalloproteinase-9 inhibitor: isolation and identification from methanol extract of *Euonymus alatus*. *Life sciences* 77, 2760-2769.

Johnson, V.A., Calvez, V., Gunthard, H.F., Paredes, R., Pillay, D., Shafer, R., Wensing, A.M., and Richman, D.D. (2011). 2011 update of the drug resistance mutations in HIV-1. *Topics in antiviral medicine* 19, 156-164.

- Juncker, T., Schumacher, M., Dicato, M., and Diederich, M. (2009). UNBS1450 from *Calotropis procera* as a regulator of signaling pathways involved in proliferation and cell death. *Biochem Pharmacol* 78, 1-10.
- Jung, J.E., Kim, H.S., Lee, C.S., Park, D.H., Kim, Y.N., Lee, M.J., Lee, J.W., Park, J.W., Kim, M.S., Ye, S.K., *et al.* (2007a). Caffeic acid and its synthetic derivative CADPE suppress tumor angiogenesis by blocking STAT3-mediated VEGF expression in human renal carcinoma cells. *Carcinogenesis* 28, 1780-1787.
- Jung, Y., Xu, W., Kim, H., Ha, N., and Neckers, L. (2007b). Curcumin-induced degradation of ErbB2: A role for the E3 ubiquitin ligase CHIP and the Michael reaction acceptor activity of curcumin. *Biochim Biophys Acta* 1773, 383-390.
- Jürgens, A., El-Sayed, A.M., and Suckling, D.M. (2009). Do carnivorous plants use volatiles for attracting prey insects? *Functional Ecology* 23, 875-887.
- K.A, T., T, R., G, R., K.C, S., Nair, R.S., G, S., Banerji, A., Somasundaram, V., and Srinivas, P. (2013). Structure activity relationship of plumbagin in BRCA1 related cancer cells. *Molecular Carcinogenesis* 52, 392-403.
- Kaighn, M.E., Narayan, K.S., Ohnuki, Y., Lechner, J.F., and Jones, L.W. (1979). Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3). *Invest Urol* 17, 16-23.
- Kampa, M., Alexaki, V.I., Notas, G., Nifli, A.P., Nistikaki, A., Hatzoglou, A., Bakogeorgou, E., Kouimtzoglou, E., Blekas, G., Boskou, D., *et al.* (2004). Antiproliferative and apoptotic effects of selective phenolic acids on T47D human breast cancer cells: potential mechanisms of action. *Breast cancer research : BCR* 6, R63-74.
- Kang, J.W., Kim, J.H., Song, K., Kim, S.H., Yoon, J.H., and Kim, K.S. (2010a). Kaempferol and quercetin, components of Ginkgo biloba extract (EGb 761), induce caspase-3-dependent apoptosis in oral cavity cancer cells. *Phytotherapy research : PTR* 24 Suppl 1, S77-82.
- Kang, K.A., Wang, Z.H., Zhang, R., Piao, M.J., Kim, K.C., Kang, S.S., Kim, Y.W., Lee, J., Park, D., and Hyun, J.W. (2010b). Myricetin Protects Cells against Oxidative Stress-Induced Apoptosis via Regulation of PI3K/Akt and MAPK Signaling Pathways. *International journal of molecular sciences* 11, 4348-4360.
- Karimi, E., Oskoueian, E., Hendra, R., Oskoueian, A., and Jaafar, H.Z. (2012). Phenolic Compounds Characterization and Biological Activities of Citrus aurantium Bloom. *Molecules* 17, 1203-1218.
- Karin, M. (2006). Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression. *Nature* 441, 431-436.
- Karmakar, S., Banik, N.L., Patel, S.J., and Ray, S.K. (2006). Curcumin activated both receptor-mediated and mitochondria-mediated proteolytic pathways for apoptosis in human glioblastoma T98G cells. *Neurosci Lett* 407, 53-58.
- Kaur, B., and Chakraborty, D. (2013). Biotechnological and molecular approaches for vanillin production: a review. *Applied biochemistry and biotechnology* 169, 1353-1372.
- Kawiak, A., Piosik, J., Stasiłojc, G., Gwizdek-Wisniewska, A., Marczak, L., Stobiecki, M., Bigda, J., and Lojkowska, E. (2007). Induction of apoptosis by plumbagin through reactive oxygen species-mediated inhibition of topoisomerase II. *Toxicol Appl Pharmacol* 223, 267-276.

Kawiak, A., Zawacka-Pankau, J., and Lojkowska, E. (2012). Plumbagin induces apoptosis in Her2-overexpressing breast cancer cells through the mitochondrial-mediated pathway. *J Nat Prod* 75, 747-751.

Kayang, H., Kharbuli, B., Myrboh, B., and Syiem, D. (2003). Medicinal plants of Khasi hills of Meghalaya, India. In III WOCMAP Congress on Medicinal and Aromatic Plants-Volume 1: Bioprospecting and Ethnopharmacology, E.N. J. Bernáth, L.E. Craker, Z.E. Gardner, ed. (Chiang Mai, Thailand: Acta Horticulturae), pp. 75-80.

Keats, J.J., Fonseca, R., Chesi, M., Schop, R., Baker, A., Chng, W.J., Van Wier, S., Tiedemann, R., Shi, C.X., Sebag, M., *et al.* (2007). Promiscuous mutations activate the noncanonical NF-kappaB pathway in multiple myeloma. *Cancer Cell* 12, 131-144.

Kelkel, M., Schumacher, M., Dicato, M., and Diederich, M. (2011). Antioxidant and anti-proliferative properties of lycopene. *Free radical research* 45, 925-940.

Kelly, G.S. (1998). Clinical applications of N-acetylcysteine. *Alternative medicine review : a journal of clinical therapeutic* 3, 114-127.

Khanduja, K.L., Avti, P.K., Kumar, S., Mittal, N., Sohi, K.K., and Pathak, C.M. (2006). Anti-apoptotic activity of caffeic acid, ellagic acid and ferulic acid in normal human peripheral blood mononuclear cells: a Bcl-2 independent mechanism. *Biochim Biophys Acta* 1760, 283-289.

Kim, B.W., Lee, E.R., Min, H.M., Jeong, H.S., Ahn, J.Y., Kim, J.H., Choi, H.Y., Choi, H., Kim, E.Y., Park, S.P., *et al.* (2008). Sustained ERK activation is involved in the kaempferol-induced apoptosis of breast cancer cells and is more evident under 3-D culture condition. *Cancer Biol Ther* 7, 1080-1089.

Kim, Y.A., Xiao, D., Xiao, H., Powolny, A.A., Lew, K.L., Reilly, M.L., Zeng, Y., Wang, Z., and Singh, S.V. (2007). Mitochondria-mediated apoptosis by diallyl trisulfide in human prostate cancer cells is associated with generation of reactive oxygen species and regulated by Bax/Bak. *Mol Cancer Ther* 6, 1599-1609.

Kimbaris, A.C., Siatis, N.G., Daferera, D.J., Tarantilis, P.A., Pappas, C.S., and Polissiou, M.G. (2006). Comparison of distillation and ultrasound-assisted extraction methods for the isolation of sensitive aroma compounds from garlic (*Allium sativum*). *Ultrasonics sonochemistry* 13, 54-60.

Kirsh, V.A., Peters, U., Mayne, S.T., Subar, A.F., Chatterjee, N., Johnson, C.C., and Hayes, R.B. (2007). Prospective study of fruit and vegetable intake and risk of prostate cancer. *J Natl Cancer Inst* 99, 1200-1209.

Ko, C.H., Shen, S.C., Lee, T.J., and Chen, Y.C. (2005). Myricetin inhibits matrix metalloproteinase 2 protein expression and enzyme activity in colorectal carcinoma cells. *Mol Cancer Ther* 4, 281-290.

Kops, G.J., Dansen, T.B., Polderman, P.E., Saarloos, I., Wirtz, K.W., Coffey, P.J., Huang, T.T., Bos, J.L., Medema, R.H., and Burgering, B.M. (2002). Forkhead transcription factor FOXO3a protects quiescent cells from oxidative stress. *Nature* 419, 316-321.

Korsmeyer, S.J., Wei, M.C., Saito, M., Weiler, S., Oh, K.J., and Schlesinger, P.H. (2000). Pro-apoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome c. *Cell Death Differ* 7, 1166-1173.

Kosinova, P., Berka, K., Wykes, M., Otyepka, M., and Trouillas, P. (2012). Positioning of antioxidant quercetin and its metabolites in lipid bilayer membranes: implication for their lipid-peroxidation inhibition. *The journal of physical chemistry B* 116, 1309-1318.

- Kote-Jarai, Z., Easton, D.F., Stanford, J.L., Ostrander, E.A., Schleutker, J., Ingles, S.A., Schaid, D., Thibodeau, S., Dork, T., Neal, D., *et al.* (2008). Multiple novel prostate cancer predisposition loci confirmed by an international study: the PRACTICAL Consortium. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 17, 2052-2061.
- Kovacik, J., Klejdus, B., and Repcakova, K. (2012). Phenolic metabolites in carnivorous plants: Inter-specific comparison and physiological studies. *Plant physiology and biochemistry : PPB / Societe francaise de physiologie vegetale* 52, 21-27.
- Kreher, B., Neszmélyi, A., and Wagner, H. (1990). Naphthoquinones from *Dionaea muscipula*. *Phytochemistry* 29, 605-606.
- Krishnaswamy, N.R. (2003). *Chemistry of Natural Products: A Laboratory Handbook* (Sangam Books).
- Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E.S., Baehrecke, E.H., Blagosklonny, M.V., El-Deiry, W.S., Golstein, P., Green, D.R., *et al.* (2009). Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ* 16, 3-11.
- Krol, E., Plachno, B.J., Adamec, L., Stolarz, M., Dziubinska, H., and Trebacz, K. (2012). Quite a few reasons for calling carnivores 'the most wonderful plants in the world'. *Annals of botany* 109, 47-64.
- Krolicka, A., Szpitter, A., Gilgenast, E., Romanik, G., Kaminski, M., and Lojkowska, E. (2008). Stimulation of antibacterial naphthoquinones and flavonoids accumulation in carnivorous plants grown in vitro by addition of elicitors. *Enzyme and Microbial Technology* 42, 216-221.
- Krolicka, A., Szpitter, A., Gilgenast, E., Romanik, G., Kamiński, M., and Lojkowska, E. (2006). Induction of naphthoquinone and flavonoid production in *Dionaea muscipula* and *Drosera capensis*. *Planta Medica* 72, P_137.
- Kumar, S. (2002). *The medicinal plants of North-East India* (Jodhpur, India: Scientific Publishers (India)).
- Kumar, S., Gautam, S., and Sharma, A. (2013). Antimutagenic and antioxidant properties of plumbagin and other naphthoquinones. *Mutat Res* 755, 30-41.
- Kunnumakkara, A.B., Anand, P., and Aggarwal, B.B. (2008). Curcumin inhibits proliferation, invasion, angiogenesis and metastasis of different cancers through interaction with multiple cell signaling proteins. *Cancer Lett* 269, 199-225.
- Kuo, P.L., Hsu, Y.L., and Cho, C.Y. (2006). Plumbagin induces G2-M arrest and autophagy by inhibiting the AKT/mammalian target of rapamycin pathway in breast cancer cells. *Molecular cancer therapeutics* 5, 3209-3221.
- Kuppers, R., and Hansmann, M.L. (2005). The Hodgkin and Reed/Sternberg cell. *The international journal of biochemistry & cell biology* 37, 511-517.
- Kurup, R., Johnson, A.J., Sankar, S., Hussain, A.A., Sathish Kumar, C., and Sabulal, B. (2013). Fluorescent prey traps in carnivorous plants. *Plant biology* 15, 611-615.
- Labbe, D., Provencal, M., Lamy, S., Boivin, D., Gingras, D., and Beliveau, R. (2009). The flavonols quercetin, kaempferol, and myricetin inhibit hepatocyte growth factor-induced medulloblastoma cell migration. *J Nutr* 139, 646-652.

- Lai, T.N., Herent, M.F., Quetin-Leclercq, J., Nguyen, T.B., Rogez, H., Larondelle, Y., and Andre, C.M. (2013). Piceatannol, a potent bioactive stilbene, as major phenolic component in *Rhodomyrtus tomentosa*. *Food chemistry* 138, 1421-1430.
- Lambert, J.D., and Elias, R.J. (2010). The antioxidant and pro-oxidant activities of green tea polyphenols: a role in cancer prevention. *Archives of biochemistry and biophysics* 501, 65-72.
- Lansky, E.P., Harrison, G., Froom, P., and Jiang, W.G. (2005). Pomegranate (*Punica granatum*) pure chemicals show possible synergistic inhibition of human PC-3 prostate cancer cell invasion across Matrigel. *Invest New Drugs* 23, 121-122.
- Lattanzio, V., Lattanzio, V.M., and Cardinali, A. (2006). Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects. *Phytochemistry: Advances in research* 661, 23-67.
- Lee, J.H., Yeon, J.H., Kim, H., Roh, W., Chae, J., Park, H.O., and Kim, D.M. (2012a). The natural anticancer agent plumbagin induces potent cytotoxicity in MCF-7 human breast cancer cells by inhibiting a PI-5 kinase for ROS generation. *PloS one* 7, e45023.
- Lee, J.M., and Johnson, J.A. (2004). An important role of Nrf2-ARE pathway in the cellular defense mechanism. *Journal of biochemistry and molecular biology* 37, 139-143.
- Lee, J.Y., Yoo, C., Jun, S.Y., Ahn, C.Y., and Oh, H.M. (2010a). Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae. *Bioresource technology* 101 Suppl 1, S75-77.
- Lee, K., Lee, J.S., Jang, H.J., Kim, S.M., Chang, M.S., Park, S.H., Kim, K.S., Bae, J., Park, J.W., Lee, B., *et al.* (2012b). Chlorogenic acid ameliorates brain damage and edema by inhibiting matrix metalloproteinase-2 and 9 in a rat model of focal cerebral ischemia. *Eur J Pharmacol* 689, 89-95.
- Lee, M.F., Chan, C.Y., Hung, H.C., Chou, I.T., Yee, A.S., and Huang, C.Y. (2013). N-acetylcysteine (NAC) inhibits cell growth by mediating the EGFR/Akt/HMG box-containing protein 1 (HBP1) signaling pathway in invasive oral cancer. *Oral oncology* 49, 129-135.
- Lee, W.J., and Zhu, B.T. (2006). Inhibition of DNA methylation by caffeic acid and chlorogenic acid, two common catechol-containing coffee polyphenols. *Carcinogenesis* 27, 269-277.
- Lee, Y.K., Hwang, J.T., Kwon, D.Y., Surh, Y.J., and Park, O.J. (2010b). Induction of apoptosis by quercetin is mediated through AMPK α 1/ASK1/p38 pathway. *Cancer Lett* 292, 228-236.
- Lee, Y.S. (2005). Role of NADPH oxidase-mediated generation of reactive oxygen species in the mechanism of apoptosis induced by phenolic acids in HepG2 human hepatoma cells. *Archives of pharmacal research* 28, 1183-1189.
- Lei, Y., Huang, K., Gao, C., Lau, Q.C., Pan, H., Xie, K., Li, J., Liu, R., Zhang, T., Xie, N., *et al.* (2011). Proteomics identification of ITGB3 as a key regulator in reactive oxygen species-induced migration and invasion of colorectal cancer cells. *Molecular & cellular proteomics* : MCP 10, M110 005397.
- Leiss, K.A., Maltese, F., Choi, Y.H., Verpoorte, R., and Klinkhamer, P.G. (2009). Identification of chlorogenic acid as a resistance factor for thrips in *chrysanthemum*. *Plant Physiol* 150, 1567-1575.

Leow, P., Tian, Q., Ong, Z., Yang, Z., and Ee, P. (2009). Antitumor activity of natural compounds, curcumin and PKF118-310, as Wnt/beta-catenin antagonists against human osteosarcoma cells. *Invest New Drugs*.

Lesage-Meessen, L., Lomascolo, A., Bonnin, E., Thibault, J.F., Buleon, A., Roller, M., Asther, M., Record, E., Ceccaldi, B.C., and Asther, M. (2002). A biotechnological process involving filamentous fungi to produce natural crystalline vanillin from maize bran. *Applied biochemistry and biotechnology* 102-103, 141-153.

Li, C., Li, X., and Choi, J.S. (2009a). Enhanced bioavailability of etoposide after oral or intravenous administration of etoposide with kaempferol in rats. *Archives of pharmacological research* 32, 133-138.

Li, C., Lim, S.C., Kim, J., and Choi, J.S. (2011). Effects of myricetin, an anticancer compound, on the bioavailability and pharmacokinetics of tamoxifen and its main metabolite, 4-hydroxytamoxifen, in rats. *European journal of drug metabolism and pharmacokinetics* 36, 175-182.

Li, G., Zeng, X., Xie, Y., Cai, Z., Moore, J.C., Yuan, X., Cheng, Z., and Ji, G. (2012a). Pharmacokinetic properties of isorhamnetin, kaempferol and quercetin after oral gavage of total flavones of *Hippophae rhamnoides* L. in rats using a UPLC-MS method. *Fitoterapia* 83, 182-191.

Li, G.X., Chen, Y.K., Hou, Z., Xiao, H., Jin, H., Lu, G., Lee, M.J., Liu, B., Guan, F., Yang, Z., *et al.* (2010). Pro-oxidative activities and dose-response relationship of (-)-epigallocatechin-3-gallate in the inhibition of lung cancer cell growth: a comparative study in vivo and in vitro. *Carcinogenesis* 31, 902-910.

Li, H., Chen, B., and Yao, S. (2005). Application of ultrasonic technique for extracting chlorogenic acid from *Eucommia ulmoides* Oliv. (*E. ulmoides*). *Ultrasonics sonochemistry* 12, 295-300.

Li, W., Guo, J., Tang, Y., Wang, H., Huang, M., Qian, D., and Duan, J.A. (2012b). Pharmacokinetic Comparison of Ferulic Acid in Normal and Blood Deficiency Rats after Oral Administration of *Angelica sinensis*, *Ligusticum chuanxiong* and Their Combination. *International journal of molecular sciences* 13, 3583-3597.

Li, X.N., Song, J., Zhang, L., LeMaire, S.A., Hou, X., Zhang, C., Coselli, J.S., Chen, L., Wang, X.L., Zhang, Y., *et al.* (2009b). Activation of the AMPK-FOXO3 pathway reduces fatty acid-induced increase in intracellular reactive oxygen species by upregulating thioredoxin. *Diabetes* 58, 2246-2257.

Liang, C.Z., Zhang, X., Li, H., Tao, Y.Q., Tao, L.J., Yang, Z.R., Zhou, X.P., Shi, Z.L., and Tao, H.M. (2012). Gallic acid induces the apoptosis of human osteosarcoma cells in vitro and in vivo via the regulation of mitogen-activated protein kinase pathways. *Cancer biotherapy & radiopharmaceuticals* 27, 701-710.

Liang, J.A., Wu, S.L., Lo, H.Y., Hsiang, C.Y., and Ho, T.Y. (2009). Vanillin inhibits matrix metalloproteinase-9 expression through down-regulation of nuclear factor-kappaB signaling pathway in human hepatocellular carcinoma cells. *Mol Pharmacol* 75, 151-157.

Liao, C.L., Lai, K.C., Huang, A.C., Yang, J.S., Lin, J.J., Wu, S.H., Gibson Wood, W., Lin, J.G., and Chung, J.G. (2012). Gallic acid inhibits migration and invasion in human osteosarcoma U-2 OS cells through suppressing the matrix metalloproteinase-2/-9, protein kinase B (PKB) and PKC signaling pathways. *Food and chemical toxicology* : an

international journal published for the British Industrial Biological Research Association 50, 1734-1740.

Likhitwitayawuid, K., Kaewamatawong, R., Ruangrunsi, N., and Krungkrai, J. (1998). Antimalarial naphthoquinones from *Nepenthes thorelii*. *Planta Med* 64, 237-241.

Lillig, C.H., Berndt, C., and Holmgren, A. (2008). Glutaredoxin systems. *Biochim Biophys Acta* 1780, 1304-1317.

Lim, S.D., Sun, C., Lambeth, J.D., Marshall, F., Amin, M., Chung, L., Petros, J.A., and Arnold, R.S. (2005). Increased Nox1 and hydrogen peroxide in prostate cancer. *Prostate* 62, 200-207.

Lin, C.W., Hou, W.C., Shen, S.C., Juan, S.H., Ko, C.H., Wang, L.M., and Chen, Y.C. (2008a). Quercetin inhibition of tumor invasion via suppressing PKC delta/ERK/AP-1-dependent matrix metalloproteinase-9 activation in breast carcinoma cells. *Carcinogenesis* 29, 1807-1815.

Lin, H.H., Chen, J.H., Chou, F.P., and Wang, C.J. (2011a). Protocatechuic acid inhibits cancer cell metastasis involving the down-regulation of Ras/Akt/NF-kappaB pathway and MMP-2 production by targeting RhoB activation. *British journal of pharmacology* 162, 237-254.

Lin, H.H., Chen, J.H., and Wang, C.J. (2011b). Chemopreventive properties and molecular mechanisms of the bioactive compounds in *Hibiscus sabdariffa* Linne. *Current medicinal chemistry* 18, 1245-1254.

Lin, L.C., Yang, L.L., and Chou, C.J. (2003). Cytotoxic naphthoquinones and plumbagic acid glucosides from *Plumbago zeylanica*. *Phytochemistry* 62, 619-622.

Lin, R.K., Zhou, N., Lyu, Y.L., Tsai, Y.C., Lu, C.H., Kerrigan, J., Chen, Y.T., Guan, Z., Hsieh, T.S., and Liu, L.F. (2011c). Dietary isothiocyanate-induced apoptosis via thiol modification of DNA topoisomerase IIalpha. *J Biol Chem* 286, 33591-33600.

Lin, S.S., Huang, H.P., Yang, J.S., Wu, J.Y., Hsia, T.C., Lin, C.C., Lin, C.W., Kuo, C.L., Gibson Wood, W., and Chung, J.G. (2008b). DNA damage and endoplasmic reticulum stress mediated curcumin-induced cell cycle arrest and apoptosis in human lung carcinoma A-549 cells through the activation caspases cascade- and mitochondrial-dependent pathway. *Cancer Lett* 272, 77-90.

Lincoln, D.T., Ali Emadi, E.M., Tonissen, K.F., and Clarke, F.M. (2003). The thioredoxin-thioredoxin reductase system: over-expression in human cancer. *Anticancer Res* 23, 2425-2433.

Lirdprapamongkol, K., Kramb, J.P., Suthiphongchai, T., Surarit, R., Srisomsap, C., Dannhardt, G., and Svasti, J. (2009). Vanillin suppresses metastatic potential of human cancer cells through PI3K inhibition and decreases angiogenesis in vivo. *Journal of agricultural and food chemistry* 57, 3055-3063.

Lirdprapamongkol, K., Sakurai, H., Kawasaki, N., Choo, M.K., Saitoh, Y., Aozuka, Y., Singhirunnusorn, P., Ruchirawat, S., Svasti, J., and Saiki, I. (2005). Vanillin suppresses in vitro invasion and in vivo metastasis of mouse breast cancer cells. *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences* 25, 57-65.

Lirdprapamongkol, K., Sakurai, H., Suzuki, S., Koizumi, K., Prangsaengtong, O., Viriyaroj, A., Ruchirawat, S., Svasti, J., and Saiki, I. (2010). Vanillin enhances TRAIL-induced apoptosis in cancer cells through inhibition of NF-kappaB activation. *In vivo* 24, 501-506.

- Liu, K.C., Ho, H.C., Huang, A.C., Ji, B.C., Lin, H.Y., Chueh, F.S., Yang, J.S., Lu, C.C., Chiang, J.H., Meng, M., *et al.* (2013a). Gallic acid provokes DNA damage and suppresses DNA repair gene expression in human prostate cancer PC-3 cells. *Environmental toxicology* 28, 579-587.
- Liu, K.C., Huang, A.C., Wu, P.P., Lin, H.Y., Chueh, F.S., Yang, J.S., Lu, C.C., Chiang, J.H., Meng, M., and Chung, J.G. (2011). Gallic acid suppresses the migration and invasion of PC-3 human prostate cancer cells via inhibition of matrix metalloproteinase-2 and -9 signaling pathways. *Oncol Rep* 26, 177-184.
- Liu, Y.J., Zhou, C.Y., Qiu, C.H., Lu, X.M., and Wang, Y.T. (2013b). Chlorogenic acid induced apoptosis and inhibition of proliferation in human acute promyelocytic leukemia HL60 cells. *Molecular medicine reports* 8, 1106-1110.
- Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods* 25, 402-408.
- Lloyd, J., and Felter, H. (1898). *King's American Dispensatory* 18th ed. Sandy, OR (Eclectic Medical Publications).
- Lo, C., Lai, T.Y., Yang, J.H., Yang, J.S., Ma, Y.S., Weng, S.W., Chen, Y.Y., Lin, J.G., and Chung, J.G. (2010). Gallic acid induces apoptosis in A375.S2 human melanoma cells through caspase-dependent and -independent pathways. *Int J Oncol* 37, 377-385.
- Lowry, J.B., Cook, N., and Wilson, R.D. (1984). Flavonol glycoside distribution in cultivars and hybrids of *Leucaena leucocephala*. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 35, 401-407.
- Lozzio, C.B., and Lozzio, B.B. (1975). Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. *Blood* 45, 321-334.
- Lu, J., and Holmgren, A. (2013). The thioredoxin antioxidant system. *Free Radic Biol Med*.
- Lu, N., Chen, P., Yang, Q., and Peng, Y.Y. (2011). Anti- and pro-oxidant effects of (+)-catechin on hemoglobin-induced protein oxidative damage. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* 25, 833-838.
- Lu, S.C. (2009). Regulation of glutathione synthesis. *Molecular aspects of medicine* 30, 42-59.
- Lu, S.C. (2013). Glutathione synthesis. *Biochim Biophys Acta* 1830, 3143-3153.
- Lu, W., Tinsley, H.N., Keeton, A., Qu, Z., Piazza, G.A., and Li, Y. (2009). Suppression of Wnt/beta-catenin signaling inhibits prostate cancer cell proliferation. *Eur J Pharmacol* 602, 8-14.
- Lu, Y., Jiang, F., Jiang, H., Wu, K., Zheng, X., Cai, Y., Katakowski, M., Chopp, M., and To, S.S. (2010). Gallic acid suppresses cell viability, proliferation, invasion and angiogenesis in human glioma cells. *Eur J Pharmacol* 641, 102-107.
- Luo, H., Daddysman, M.K., Rankin, G.O., Jiang, B.H., and Chen, Y.C. (2010). Kaempferol enhances cisplatin's effect on ovarian cancer cells through promoting apoptosis caused by down regulation of cMyc. *Cancer cell international* 10, 16.
- Luo, H., Jiang, B., Li, B., Li, Z., Jiang, B.H., and Chen, Y.C. (2012a). Kaempferol nanoparticles achieve strong and selective inhibition of ovarian cancer cell viability. *International journal of nanomedicine* 7, 3951-3959.

- Luo, H., Rankin, G.O., Juliano, N., Jiang, B.H., and Chen, Y.C. (2012b). Kaempferol inhibits VEGF expression and in vitro angiogenesis through a novel ERK-NFkappaB-cMyc-p21 pathway. *Food chemistry* *130*, 321-328.
- Luo, H., Rankin, G.O., Li, Z., Depriest, L., and Chen, Y.C. (2011). Kaempferol induces apoptosis in ovarian cancer cells through activating p53 in the intrinsic pathway. *Food chemistry* *128*, 513-519.
- Lupea, A.X., Pop, M., and Cacig, S. (2008). Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids from *Ziziphus* and *Hydrangea* extracts. *Rev Chim* *59*, 309-313.
- Lv, J., Yu, L., Lu, Y., Niu, Y., Liu, L., Costa, J., and Yu, L.L. (2012). Phytochemical compositions, and antioxidant properties, and antiproliferative activities of wheat flour. *Food chemistry* *135*, 325-331.
- Ma, Z.S., Huynh, T.H., Ng, C.P., Do, P.T., Nguyen, T.H., and Huynh, H. (2004). Reduction of CWR22 prostate tumor xenograft growth by combined tamoxifen-quercetin treatment is associated with inhibition of angiogenesis and cellular proliferation. *Int J Oncol* *24*, 1297-1304.
- MacDonald, B.T., Tamai, K., and He, X. (2009). Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev Cell* *17*, 9-26.
- Maher, P. (1999). A review of 'traditional' aboriginal health beliefs. *The Australian journal of rural health* *7*, 229-236.
- Maiuri, M.C., Le Toumelin, G., Criollo, A., Rain, J.C., Gautier, F., Juin, P., Tasdemir, E., Pierron, G., Troulinaki, K., Tavernarakis, N., *et al.* (2007). Functional and physical interaction between Bcl-X(L) and a BH3-like domain in Beclin-1. *EMBO J* *26*, 2527-2539.
- Malik, A., Afaq, S., Shahid, M., Akhtar, K., and Assiri, A. (2011). Influence of ellagic acid on prostate cancer cell proliferation: a caspase-dependent pathway. *Asian Pacific journal of tropical medicine* *4*, 550-555.
- Malvezzi, M., Bertuccio, P., Levi, F., La Vecchia, C., and Negri, E. (2013). European cancer mortality predictions for the year 2013. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* *24*, 792-800.
- Manach, C., Morand, C., Crespy, V., Demigne, C., Texier, O., Regerat, F., and Remesy, C. (1998). Quercetin is recovered in human plasma as conjugated derivatives which retain antioxidant properties. *FEBS Lett* *426*, 331-336.
- Manach, C., Morand, C., Texier, O., Favier, M.L., Agullo, G., Demigne, C., Regerat, F., and Remesy, C. (1995). Quercetin metabolites in plasma of rats fed diets containing rutin or quercetin. *J Nutr* *125*, 1911-1922.
- Marczak, L., Kawiak, A., Lojkowska, E., and Stobiecki, M. (2005). Secondary metabolites in in vitro cultured plants of the genus *Drosera*. *Phytochemical analysis : PCA* *16*, 143-149.
- Martin-Cordero, C., Leon-Gonzalez, A.J., Calderon-Montano, J.M., Burgos-Moron, E., and Lopez-Lazaro, M. (2012). Pro-oxidant natural products as anticancer agents. *Current drug targets* *13*, 1006-1028.
- Maskarinec, G. (2009). Cancer protective properties of cocoa: a review of the epidemiologic evidence. *Nutr Cancer* *61*, 573-579.
- Mates, J.M., and Sanchez-Jimenez, F.M. (2000). Role of reactive oxygen species in apoptosis: implications for cancer therapy. *The international journal of biochemistry & cell biology* *32*, 157-170.

- Mathew, R., Karantza-Wadsworth, V., and White, E. (2007). Role of autophagy in cancer. *Nat Rev Cancer* 7, 961-967.
- Matos, H.R., Di Mascio, P., and Medeiros, M.H. (2000). Protective effect of lycopene on lipid peroxidation and oxidative DNA damage in cell culture. *Archives of biochemistry and biophysics* 383, 56-59.
- Matthews, J.R., Wakasugi, N., Virelizier, J.L., Yodoi, J., and Hay, R.T. (1992). Thioredoxin regulates the DNA binding activity of NF-kappa B by reduction of a disulphide bond involving cysteine 62. *Nucleic Acids Res* 20, 3821-3830.
- Maurya, D.K., and Devasagayam, T.P. (2013). Ferulic acid inhibits gamma radiation-induced DNA strand breaks and enhances the survival of mice. *Cancer biotherapy & radiopharmaceuticals* 28, 51-57.
- Mayer, A.M., and Gustafson, K.R. (2008). Marine pharmacology in 2005-2006: antitumour and cytotoxic compounds. *Eur J Cancer* 44, 2357-2387.
- McCall, K. (2010). Genetic control of necrosis - another type of programmed cell death. *Curr Opin Cell Biol* 22, 882-888.
- McDonald, T.A., Holland, N.T., Skibola, C., Duramad, P., and Smith, M.T. (2001). Hypothesis: phenol and hydroquinone derived mainly from diet and gastrointestinal flora activity are causal factors in leukemia. *Leukemia* 15, 10-20.
- Meckelmann, S.W., Riegel, D.W., van Zonneveld, M.J., Rios, L., Pena, K., Ugas, R., Quinonez, L., Mueller-Seitz, E., and Petz, M. (2013). Compositional Characterization of Native Peruvian Chili Peppers (*Capsicum* spp.). *Journal of agricultural and food chemistry* 61, 2530-2537.
- Mehta, R.G., Murillo, G., Naithani, R., and Peng, X. (2010). Cancer chemoprevention by natural products: how far have we come? *Pharmaceutical research* 27, 950-961.
- Meister, A., and Tate, S.S. (1976). Glutathione and related gamma-glutamyl compounds: biosynthesis and utilization. *Annual review of biochemistry* 45, 559-604.
- Metodiewa, D., Jaiswal, A.K., Cenas, N., Dickancaite, E., and Segura-Aguilar, J. (1999). Quercetin may act as a cytotoxic prooxidant after its metabolic activation to semiquinone and quinoidal product. *Free Radic Biol Med* 26, 107-116.
- Min, Y.D., Choi, C.H., Bark, H., Son, H.Y., Park, H.H., Lee, S., Park, J.W., Park, E.K., Shin, H.I., and Kim, S.H. (2007). Quercetin inhibits expression of inflammatory cytokines through attenuation of NF-kappaB and p38 MAPK in HMC-1 human mast cell line. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society* [et al] 56, 210-215.
- Miyoshi, E., Shizuri, Y., and Yamamura, S. (1984). Isolation and structures of diomuscipulone and diomuscipulone from *Dionaea muscipula*. *Phytochemistry* 23, 2385-2387.
- Mizushima, N., and Yoshimori, T. (2007). How to interpret LC3 immunoblotting. *Autophagy* 3, 542-545.
- Moerman, D.E. (1998). *Native American Ethnobotany Database* (Portland, Oregon, USA: Timber Press, Inc.).
- Molinski, T.F., Dalisay, D.S., Lievens, S.L., and Saludes, J.P. (2009). Drug development from marine natural products. *Nat Rev Drug Discov* 8, 69-85.
- Molyneux, E.M., Rochford, R., Griffin, B., Newton, R., Jackson, G., Menon, G., Harrison, C.J., Israels, T., and Bailey, S. (2012). Burkitt's lymphoma. *Lancet* 379, 1234-1244.

- Monsuez, J.J., Charniot, J.C., Vignat, N., and Artigou, J.Y. (2010). Cardiac side-effects of cancer chemotherapy. *International journal of cardiology* *144*, 3-15.
- Monteghirfo, S., Tosetti, F., Ambrosini, C., Stigliani, S., Pozzi, S., Frassoni, F., Fassina, G., Soverini, S., Albini, A., and Ferrari, N. (2008). Antileukemia effects of xanthohumol in Bcr/Abl-transformed cells involve nuclear factor-kappaB and p53 modulation. *Mol Cancer Ther* *7*, 2692-2702.
- Moon, M.K., Lee, Y.J., Kim, J.S., Kang, D.G., and Lee, H.S. (2009). Effect of caffeic acid on tumor necrosis factor-alpha-induced vascular inflammation in human umbilical vein endothelial cells. *Biological & pharmaceutical bulletin* *32*, 1371-1377.
- Moon, R.T., Bowerman, B., Boutros, M., and Perrimon, N. (2002). The promise and perils of Wnt signaling through beta-catenin. *Science* *296*, 1644-1646.
- Moore, R., McDermott, D.L., and Wood, T. (1948). Determination of chlorogenic acid in coffee. *Analytical Chemistry* *20*, 620-624.
- Moragoda, L., Jaszewski, R., and Majumdar, A.P. (2001). Curcumin induced modulation of cell cycle and apoptosis in gastric and colon cancer cells. *Anticancer Res* *21*, 873-878.
- Morales, P., and Haza, A.I. (2012). Selective apoptotic effects of piceatannol and myricetin in human cancer cells. *Journal of applied toxicology : JAT* *32*, 986-993.
- Morens, D.M., and Fauci, A.S. (2012). Emerging infectious diseases in 2012: 20 years after the institute of medicine report. *mBio* *3*.
- Moretti, L., Yang, E.S., Kim, K.W., and Lu, B. (2007). Autophagy signaling in cancer and its potential as novel target to improve anticancer therapy. *Drug Resist Updat* *10*, 135-143.
- Morin, P.J. (1999). beta-catenin signaling and cancer. *Bioessays* *21*, 1021-1030.
- Morin, P.J., Vogelstein, B., and Kinzler, K.W. (1996). Apoptosis and APC in colorectal tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* *93*, 7950-7954.
- Morse, S.S. (1995). Factors in the emergence of infectious diseases. *Emerging infectious diseases* *1*, 7-15.
- Motta, M., Wierda, W.G., and Ferrajoli, A. (2009). Chronic lymphocytic leukemia: treatment options for patients with refractory disease. *Cancer* *115*, 3830-3841.
- Muhammad, A., Guerrero-Analco, J.A., Martineau, L.C., Musallam, L., Madiraju, P., Nachar, A., Saleem, A., Haddad, P.S., and Arnason, J.T. (2012). Antidiabetic compounds from *Sarracenia purpurea* used traditionally by the Eeyou Istchee Cree First Nation. *J Nat Prod* *75*, 1284-1288.
- Muhammad, A., Haddad, P.S., Durst, T., and Arnason, J.T. (2013). Phytochemical constituents of *Sarracenia purpurea* L. (pitcher plant). *Phytochemistry*.
- Mukhopadhyay, A., Banerjee, S., Stafford, L.J., Xia, C., Liu, M., and Aggarwal, B.B. (2002). Curcumin-induced suppression of cell proliferation correlates with down-regulation of cyclin D1 expression and CDK4-mediated retinoblastoma protein phosphorylation. *Oncogene* *21*, 8852-8861.
- Mukhopadhyay, A., Bueso-Ramos, C., Chatterjee, D., Pantazis, P., and Aggarwal, B.B. (2001). Curcumin downregulates cell survival mechanisms in human prostate cancer cell lines. *Oncogene* *20*, 7597-7609.
- Muller-Scharer, H., Schaffner, U., and Steinger, T. (2004). Evolution in invasive plants: implications for biological control. *Trends in ecology & evolution* *19*, 417-422.

- Munday, R., Munday, J.S., and Munday, C.M. (2003). Comparative effects of mono-, di-, tri-, and tetrasulfides derived from plants of the *Allium* family: redox cycling in vitro and hemolytic activity and Phase 2 enzyme induction in vivo. *Free Radic Biol Med* *34*, 1200-1211.
- Murakami, A., Ashida, H., and Terao, J. (2008). Multitargeted cancer prevention by quercetin. *Cancer Lett* *269*, 315-325.
- Musonda, C.A., and Chipman, J.K. (1998). Quercetin inhibits hydrogen peroxide (H₂O₂)-induced NF-kappaB DNA binding activity and DNA damage in HepG2 cells. *Carcinogenesis* *19*, 1583-1589.
- Nagata, T., and Ebizuka, Y. (2002). *Medicinal and Aromatic Plants XII* (Dordrecht, The Netherlands: Springer).
- Namdeo, A. (2007). Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: A review. *Pharmacognosy Reviews* *1*, 69-79.
- Nardini, M., Leonardi, F., Scaccini, C., and Virgili, F. (2001). Modulation of ceramide-induced NF-kappaB binding activity and apoptotic response by caffeic acid in U937 cells: comparison with other antioxidants. *Free Radic Biol Med* *30*, 722-733.
- Nguyen, D.M., Seo, D.J., Lee, H.B., Kim, I.S., Kim, K.Y., Park, R.D., and Jung, W.J. (2013). Antifungal activity of gallic acid purified from *Terminalia nigrovenulosa* bark against *Fusarium solani*. *Microbial pathogenesis* *56*, 8-15.
- Nguyen, T.T., Tran, E., Nguyen, T.H., Do, P.T., Huynh, T.H., and Huynh, H. (2004). The role of activated MEK-ERK pathway in quercetin-induced growth inhibition and apoptosis in A549 lung cancer cells. *Carcinogenesis* *25*, 647-659.
- Nguyen, T.T., Tran, E., Ong, C.K., Lee, S.K., Do, P.T., Huynh, T.T., Nguyen, T.H., Lee, J.J., Tan, Y., Ong, C.S., *et al.* (2003). Kaempferol-induced growth inhibition and apoptosis in A549 lung cancer cells is mediated by activation of MEK-MAPK. *Journal of cellular physiology* *197*, 110-121.
- Nordberg, J., and Arner, E.S. (2001). Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol Med* *31*, 1287-1312.
- Nowell, P.C. (2007). Discovery of the Philadelphia chromosome: a personal perspective. *J Clin Invest* *117*, 2033-2035.
- Nusse, R., and Varmus, H.E. (1982). Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome. *Cell* *31*, 99-109.
- Nusslein-Volhard, C., and Wieschaus, E. (1980). Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* *287*, 795-801.
- O'Sullivan-Coyne, G., O'Sullivan, G.C., O'Donovan, T.R., Piwocka, K., and McKenna, S.L. (2009). Curcumin induces apoptosis-independent death in oesophageal cancer cells. *Br J Cancer* *101*, 1585-1595.
- Oksman-Caldentey, K.M., and Inze, D. (2004). Plant cell factories in the post-genomic era: new ways to produce designer secondary metabolites. *Trends in plant science* *9*, 433-440.
- Olthof, M.R., Hollman, P.C., and Katan, M.B. (2001). Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans. *J Nutr* *131*, 66-71.
- Orlikova, B., and Diederich, M. (2012). Power from the garden: plant compounds as inhibitors of the hallmarks of cancer. *Current medicinal chemistry* *19*, 2061-2087.

- Oskoueian, E., Abdullah, N., Ahmad, S., Saad, W.Z., Omar, A.R., and Ho, Y.W. (2011). Bioactive Compounds and Biological Activities of *Jatropha curcas* L. Kernel Meal Extract. *International journal of molecular sciences* *12*, 5955-5970.
- Ozawa, M., Baribault, H., and Kemler, R. (1989). The cytoplasmic domain of the cell adhesion molecule uvomorulin associates with three independent proteins structurally related in different species. *EMBO J* *8*, 1711-1717.
- Padhye, S., Dandawate, P., Yusufi, M., Ahmad, A., and Sarkar, F.H. (2012). Perspectives on medicinal properties of plumbagin and its analogs. *Medicinal research reviews* *32*, 1131-1158.
- Pahl, H.L. (1999). Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* *18*, 6853-6866.
- Pakulski, G., and Budzianowski, J. (1996a). Ellagic acid derivatives and naphthoquinones of *Dionaea muscipula* from in vitro cultures. *Phytochemistry* *41*, 775-778.
- Pakulski, G., and Budzianowski, J. (1996b). Quercetin and kaempferol glycosides of *Dionaea muscipula* from in vitro cultures. *Planta Med* *62*, 95-96.
- Palacio, L., Cantero, J.J., Cusido, R.M., and Goleniowski, M.E. (2012). Phenolic compound production in relation to differentiation in cell and tissue cultures of *Larrea divaricata* (Cav.). *Plant science : an international journal of experimental plant biology* *193-194*, 1-7.
- Panzella, L., Napolitano, A., and d'Ischia, M. (2003). Oxidative conjugation of chlorogenic acid with glutathione. Structural characterization of addition products and a new nitrite-Promoted pathway. *Bioorganic & medicinal chemistry* *11*, 4797-4805.
- Paranjpe, A., Cacalano, N.A., Hume, W.R., and Jewett, A. (2007). N-acetylcysteine protects dental pulp stromal cells from HEMA-induced apoptosis by inducing differentiation of the cells. *Free Radic Biol Med* *43*, 1394-1408.
- Parasassi, T., Brunelli, R., Costa, G., De Spirito, M., Krasnowska, E., Lundeberg, T., Pittaluga, E., and Ursini, F. (2010). Thiol redox transitions in cell signaling: a lesson from N-acetylcysteine. *ScientificWorldJournal* *10*, 1192-1202.
- Park, C., Kim, G.Y., Kim, G.D., Choi, B.T., Park, Y.M., and Choi, Y.H. (2006). Induction of G2/M arrest and inhibition of cyclooxygenase-2 activity by curcumin in human bladder cancer T24 cells. *Oncol Rep* *15*, 1225-1231.
- Park, C.H., Chang, J.Y., Hahm, E.R., Park, S., Kim, H.K., and Yang, C.H. (2005a). Quercetin, a potent inhibitor against beta-catenin/Tcf signaling in SW480 colon cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* *328*, 227-234.
- Park, C.H., Hahm, E.R., Park, S., Kim, H.K., and Yang, C.H. (2005b). The inhibitory mechanism of curcumin and its derivative against beta-catenin/Tcf signaling. *FEBS Lett* *579*, 2965-2971.
- Parkin, D.M., Bray, F., Ferlay, J., and Pisani, P. (2005). Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* *55*, 74-108.
- Pastore, A., and Piemonte, F. (2012). S-Glutathionylation signaling in cell biology: progress and prospects. *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences* *46*, 279-292.
- Pattingre, S., Tassa, A., Qu, X., Garuti, R., Liang, X.H., Mizushima, N., Packer, M., Schneider, M.D., and Levine, B. (2005). Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell* *122*, 927-939.

- Pellicano, H., Carney, D., and Huang, P. (2004). ROS stress in cancer cells and therapeutic implications. *Drug Resist Updat* 7, 97-110.
- Pellati, F., Bruni, R., Righi, D., Grandini, A., Tognolini, M., Pio Prencipe, F., Poli, F., Benvenuti, S., Del Rio, D., and Rossi, D. (2013). Metabolite profiling of polyphenols in a *Terminalia chebula* Retzius ayurvedic decoction and evaluation of its chemopreventive activity. *Journal of ethnopharmacology* 147, 277-285.
- Peppercorn, M.A., and Goldman, P. (1971). Caffeic acid metabolism by bacteria of the human gastrointestinal tract. *Journal of bacteriology* 108, 996-1000.
- Perchellet, J.P., Perchellet, E.M., Abney, N.L., Zirnstein, J.A., and Belman, S. (1986). Effects of garlic and onion oils on glutathione peroxidase activity, the ratio of reduced/oxidized glutathione and ornithine decarboxylase induction in isolated mouse epidermal cells treated with tumor promoters. *Cancer biochemistry biophysics* 8, 299-312.
- Perry, R.R., Mazetta, J.A., Levin, M., and Barranco, S.C. (1993). Glutathione levels and variability in breast tumors and normal tissue. *Cancer* 72, 783-787.
- Pfaller, M.A. (2012). Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. *The American journal of medicine* 125, S3-13.
- Phillips, P.A., Sangwan, V., Borja-Cacho, D., Dudeja, V., Vickers, S.M., and Saluja, A.K. (2011). Myricetin induces pancreatic cancer cell death via the induction of apoptosis and inhibition of the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) signaling pathway. *Cancer Lett* 308, 181-188.
- Pineda-Molina, E., Klatt, P., Vazquez, J., Marina, A., Garcia de Lacoba, M., Perez-Sala, D., and Lamas, S. (2001). Glutathionylation of the p50 subunit of NF-kappaB: a mechanism for redox-induced inhibition of DNA binding. *Biochemistry* 40, 14134-14142.
- Pollyea, D.A., Kohrt, H.E., and Medeiros, B.C. (2011). Acute myeloid leukaemia in the elderly: a review. *Br J Haematol* 152, 524-542.
- Pompella, A., Visvikis, A., Paolicchi, A., De Tata, V., and Casini, A.F. (2003). The changing faces of glutathione, a cellular protagonist. *Biochem Pharmacol* 66, 1499-1503.
- Poppinga, S., Hartmeyer, S.R., Masselter, T., Hartmeyer, I., and Speck, T. (2013). Trap diversity and evolution in the family Droseraceae. *Plant signaling & behavior* 8.
- Porrini, M., and Riso, P. (2000). Lymphocyte lycopene concentration and DNA protection from oxidative damage is increased in women after a short period of tomato consumption. *J Nutr* 130, 189-192.
- Powolny, A.A., and Singh, S.V. (2008). Plumbagin-induced apoptosis in human prostate cancer cells is associated with modulation of cellular redox status and generation of reactive oxygen species. *Pharmaceutical research* 25, 2171-2180.
- Prasad, C.P., Rath, G., Mathur, S., Bhatnagar, D., and Ralhan, R. (2009). Potent growth suppressive activity of curcumin in human breast cancer cells: Modulation of Wnt/beta-catenin signaling. *Chem Biol Interact* 181, 263-271.
- Prasad, M.N.V., and Jeeva, S. (2009). Coal mining and its leachate are potential threats to *Nepenthes khasiana* Hook. f.(Nepenthaceae) that preys on insects-an endemic plant in North Eastern India. *Biological Diversity and Conservation* 2, 29-33.
- Pratheeshkumar, P., Budhraj, A., Son, Y.O., Wang, X., Zhang, Z., Ding, S., Wang, L., Hitron, A., Lee, J.C., Xu, M., *et al.* (2012). Quercetin inhibits angiogenesis mediated human

prostate tumor growth by targeting VEGFR- 2 regulated AKT/mTOR/P70S6K signaling pathways. *PloS one* 7, e47516.

Priyadarsini, R.V., and Nagini, S. (2012). Quercetin suppresses cytochrome P450 mediated ROS generation and NFkappaB activation to inhibit the development of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) induced hamster buccal pouch carcinomas. *Free radical research* 46, 41-49.

Proskuryakov, S.Y., Konoplyannikov, A.G., and Gabai, V.L. (2003). Necrosis: a specific form of programmed cell death? *Exp Cell Res* 283, 1-16.

Pui, C.H., Robison, L.L., and Look, A.T. (2008). Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* 371, 1030-1043.

Pulvertaft, J.V. (1964). Cytology of Burkitt's Tumour (African Lymphoma). *Lancet* 1, 238-240.

Qing, Z.J., Yong, W., Hui, L.Y., Yong, L.W., Long, L.H., Ao, D.J., and Xia, P.L. (2012). Two new natural products from the fruits of *Alpinia oxyphylla* with inhibitory effects on nitric oxide production in lipopolysaccharide-activated RAW264.7 macrophage cells. *Archives of pharmacal research* 35, 2143-2146.

Quave, C.L., Estevez-Carmona, M., Compadre, C.M., Hobby, G., Hendrickson, H., Beenken, K.E., and Smeltzer, M.S. (2012). Ellagic acid derivatives from *Rubus ulmifolius* inhibit *Staphylococcus aureus* biofilm formation and improve response to antibiotics. *PloS one* 7, e28737.

Raina, K., Rajamanickam, S., Deep, G., Singh, M., Agarwal, R., and Agarwal, C. (2008). Chemopreventive effects of oral gallic acid feeding on tumor growth and progression in TRAMP mice. *Mol Cancer Ther* 7, 1258-1267.

Raj, G., Kurup, R., Hussain, A.A., and Baby, S. (2011). Distribution of naphthoquinones, plumbagin, droserone, and 5-O-methyl droserone in chitin-induced and uninduced *Nepenthes khasiana*: molecular events in prey capture. *Journal of experimental botany* 62, 5429-5436.

Rajendra Prasad, N., Karthikeyan, A., Karthikeyan, S., and Reddy, B.V. (2011). Inhibitory effect of caffeic acid on cancer cell proliferation by oxidative mechanism in human HT-1080 fibrosarcoma cell line. *Molecular and cellular biochemistry* 349, 11-19.

Rakshit, S., Mandal, L., Pal, B.C., Bagchi, J., Biswas, N., Chaudhuri, J., Chowdhury, A.A., Manna, A., Chaudhuri, U., Konar, A., *et al.* (2010). Involvement of ROS in chlorogenic acid-induced apoptosis of Bcr-Abl+ CML cells. *Biochem Pharmacol* 80, 1662-1675.

Ramachandran, C., and You, W. (1999). Differential sensitivity of human mammary epithelial and breast carcinoma cell lines to curcumin. *Breast Cancer Res Treat* 54, 269-278.

Ramis, R., Diggle, P., Cambra, K., and Lopez-Abente, G. (2011). Prostate cancer and industrial pollution Risk around putative focus in a multi-source scenario. *Environment international* 37, 577-585.

Ramos, S., Alia, M., Bravo, L., and Goya, L. (2005). Comparative effects of food-derived polyphenols on the viability and apoptosis of a human hepatoma cell line (HepG2). *Journal of agricultural and food chemistry* 53, 1271-1280.

Rao, S.R., and Ravishankar, G.A. (2002). Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology advances* 20, 101-153.

Raskin, I. (1992). Role of salicylic acid in plants. *Annual review of plant biology* 43, 439-463.

- Rasmussen, J.A., and Einhellig, F.A. (1977). Synergistic inhibitory effects of p-coumaric and ferulic acids on germination and growth of grain sorghum. *Journal of Chemical Ecology* 3, 197-205.
- Rastogi, T., Devesa, S., Mangtani, P., Mathew, A., Cooper, N., Kao, R., and Sinha, R. (2008). Cancer incidence rates among South Asians in four geographic regions: India, Singapore, UK and US. *Int J Epidemiol* 37, 147-160.
- Rathod, M.A., Patel, D., Das, A., Tipparaju, S.R., Shinde, S.S., and Anderson, R.F. (2013). Inhibition of radical-induced DNA strand breaks by water-soluble constituents of coffee: phenolics and caffeine metabolites. *Free radical research* 47, 480-487.
- Remington, J.P., and Wood, H.C. (1918). *The Dispensatory of the United States of America* (Philadelphia, Pennsylvania, USA: J.B. Lippincott Company).
- Ren, R. (2005). Mechanisms of BCR-ABL in the pathogenesis of chronic myelogenous leukaemia. *Nat Rev Cancer* 5, 172-183.
- Renart, J., Reiser, J., and Stark, G.R. (1979). Transfer of proteins from gels to diazobenzoyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 3116-3120.
- Reuter, S., Eifes, S., Dicato, M., Aggarwal, B.B., and Diederich, M. (2008). Modulation of anti-apoptotic and survival pathways by curcumin as a strategy to induce apoptosis in cancer cells. *Biochem Pharmacol* 76, 1340-1351.
- Reuter, S., Schnekenburger, M., Cristofanon, S., Buck, I., Teiten, M.H., Daubeuf, S., Eifes, S., Dicato, M., Aggarwal, B.B., Visvikis, A., *et al.* (2009). Tumor necrosis factor alpha induces gamma-glutamyltransferase expression via nuclear factor-kappaB in cooperation with Sp1. *Biochem Pharmacol* 77, 397-411.
- Richman, E.L., Kenfield, S.A., Stampfer, M.J., Giovannucci, E.L., and Chan, J.M. (2011). Egg, red meat, and poultry intake and risk of lethal prostate cancer in the prostate-specific antigen-era: incidence and survival. *Cancer prevention research* 4, 2110-2121.
- Rijsewijk, F., Schuermann, M., Wagenaar, E., Parren, P., Weigel, D., and Nusse, R. (1987). The *Drosophila* homolog of the mouse mammary oncogene *int-1* is identical to the segment polarity gene *wingless*. *Cell* 50, 649-657.
- Rinnab, L., Schutz, S.V., Diesch, J., Schmid, E., Kufer, R., Hautmann, R.E., Spindler, K.D., and Cronauer, M.V. (2008). Inhibition of glycogen synthase kinase-3 in androgen-responsive prostate cancer cell lines: are GSK inhibitors therapeutically useful? *Neoplasia* 10, 624-634.
- Rota, C., Chignell, C.F., and Mason, R.P. (1999). Evidence for free radical formation during the oxidation of 2'-7'-dichlorofluorescein to the fluorescent dye 2'-7'-dichlorofluorescein by horseradish peroxidase: possible implications for oxidative stress measurements. *Free Radic Biol Med* 27, 873-881.
- Rothwell, P.M., Wilson, M., Elwin, C.E., Norrving, B., Algra, A., Warlow, C.P., and Meade, T.W. (2010). Long-term effect of aspirin on colorectal cancer incidence and mortality: 20-year follow-up of five randomised trials. *Lancet* 376, 1741-1750.
- Ruiz-Irastorza, G., Ramos-Casals, M., Brito-Zeron, P., and Khamashta, M.A. (2010). Clinical efficacy and side effects of antimalarials in systemic lupus erythematosus: a systematic review. *Annals of the rheumatic diseases* 69, 20-28.

- Russo, A., DeGraff, W., Friedman, N., and Mitchell, J.B. (1986). Selective modulation of glutathione levels in human normal versus tumor cells and subsequent differential response to chemotherapy drugs. *Cancer Res* 46, 2845-2848.
- Sahu, R.P., Batra, S., and Srivastava, S.K. (2009). Activation of ATM/Chk1 by curcumin causes cell cycle arrest and apoptosis in human pancreatic cancer cells. *Br J Cancer* 100, 1425-1433.
- Sahu, S.C., and Washington, M.C. (1991). Effects of antioxidants on quercetin-induced nuclear DNA damage and lipid peroxidation. *Cancer Lett* 60, 259-264.
- Salae, A.-W., Karalai, C., Ponglimanont, C., Kanjana-Opas, A., and Yuenyongsawad, S. (2010). Naphthalene derivatives from *Diospyros wallichii*. *Canadian Journal of Chemistry* 88, 922-927.
- Sandur, S.K., Ichikawa, H., Sethi, G., Ahn, K.S., and Aggarwal, B.B. (2006). Plumbagin (5-hydroxy-2-methyl-1,4-naphthoquinone) suppresses NF-kappaB activation and NF-kappaB-regulated gene products through modulation of p65 and IkappaBalpha kinase activation, leading to potentiation of apoptosis induced by cytokine and chemotherapeutic agents. *J Biol Chem* 281, 17023-17033.
- Sato, N., Ueno, T., Kubo, K., Suzuki, T., Tsukimura, N., Att, W., Yamada, M., Hori, N., Maeda, H., and Ogawa, T. (2009). N-Acetyl cysteine (NAC) inhibits proliferation, collagen gene transcription, and redox stress in rat palatal mucosal cells. *Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials* 25, 1532-1540.
- Sato, Y., Itagaki, S., Kurokawa, T., Ogura, J., Kobayashi, M., Hirano, T., Sugawara, M., and Iseki, K. (2011). *In vitro* and *in vivo* antioxidant properties of chlorogenic acid and caffeic acid. *International journal of pharmaceutics* 403, 136-138.
- Sauer, H., Wartenberg, M., and Hescheler, J. (2001). Reactive oxygen species as intracellular messengers during cell growth and differentiation. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* 11, 173-186.
- Saunders, J.A., Rogers, L.C., Klomsiri, C., Poole, L.B., and Daniel, L.W. (2010). Reactive oxygen species mediate lysophosphatidic acid induced signaling in ovarian cancer cells. *Free Radic Biol Med* 49, 2058-2067.
- Savelev, S., Okello, E., Perry, N., Wilkins, R., and Perry, E. (2003). Synergistic and antagonistic interactions of anticholinesterase terpenoids in *Salvia lavandulaefolia* essential oil. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 75, 661-668.
- Sawadogo, W.R., Schumacher, M., Teiten, M.H., Dicato, M., and Diederich, M. (2012). Traditional West African pharmacopeia, plants and derived compounds for cancer therapy. *Biochem Pharmacol* 84, 1225-1240.
- Sawahata, T., and Neal, R.A. (1983). Biotransformation of phenol to hydroquinone and catechol by rat liver microsomes. *Mol Pharmacol* 23, 453-460.
- Sawyers, C.L. (1999). Chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 340, 1330-1340.
- Scala, J., Iott, K., Schwab, D.W., and Semersky, F.E. (1969). Digestive Secretion of *Dionaea muscipula* (Venus's Flytrap). *Plant Physiol* 44, 367-371.
- Schenk, H., Klein, M., Erdbrugger, W., Droge, W., and Schulze-Osthoff, K. (1994). Distinct effects of thioredoxin and antioxidants on the activation of transcription factors NF-kappa B and AP-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 1672-1676.

- Scherz-Shouval, R., and Elazar, Z. (2011). Regulation of autophagy by ROS: physiology and pathology. *Trends Biochem Sci* 36, 30-38.
- Scherz-Shouval, R., Shvets, E., Fass, E., Shorer, H., Gil, L., and Elazar, Z. (2007). Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4. *EMBO J* 26, 1749-1760.
- Schneider, U., Schwenk, H.U., and Bornkamm, G. (1977). Characterization of EBV-genome negative "null" and "T" cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma. *Int J Cancer* 19, 621-626.
- Schreiber, E., Matthias, P., Muller, M.M., and Schaffner, W. (1989). Rapid detection of octamer binding proteins with 'mini-extracts', prepared from a small number of cells. *Nucleic Acids Res* 17, 6419.
- Schulz, W.A., Burchardt, M., and Cronauer, M.V. (2003). Molecular biology of prostate cancer. *Mol Hum Reprod* 9, 437-448.
- Schumacher, M., Cerella, C., Eifes, S., Chateauvieux, S., Morceau, F., Jaspars, M., Dicato, M., and Diederich, M. (2009). Heteronemin, a spongian sesterterpene, inhibits TNF α -induced NF-kappaB activation through proteasome inhibition and induces apoptotic cell death. *Biochem Pharmacol*.
- Schumacher, M., Cerella, C., Reuter, S., Dicato, M., and Diederich, M. (2010). Anti-inflammatory, pro-apoptotic, and anti-proliferative effects of a methanolic neem (*Azadirachta indica*) leaf extract are mediated via modulation of the nuclear factor- κ B pathway. *Genes & Nutrition*.
- Scognamiglio, M., Esposito, A., D'Abrosca, B., Pacifico, S., Fiumano, V., Tsafantakis, N., Monaco, P., and Fiorentino, A. (2012). Isolation, distribution and allelopathic effect of caffeic acid derivatives from *Bellis perennis* L. *Biochemical Systematics and Ecology* 43, 108-113.
- Seelig, G.F., Simonsen, R.P., and Meister, A. (1984). Reversible dissociation of gamma-glutamylcysteine synthetase into two subunits. *J Biol Chem* 259, 9345-9347.
- Sen, R., and Baltimore, D. (1986). Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell* 46, 705-716.
- Senthilkumar, K., Arunkumar, R., Elumalai, P., Sharmila, G., Gunadharini, D.N., Banudevi, S., Krishnamoorthy, G., Benson, C.S., and Arunakaran, J. (2011). Quercetin inhibits invasion, migration and signalling molecules involved in cell survival and proliferation of prostate cancer cell line (PC-3). *Cell biochemistry and function* 29, 87-95.
- Senthilkumar, K., Elumalai, P., Arunkumar, R., Banudevi, S., Gunadharini, N.D., Sharmila, G., Selvakumar, K., and Arunakaran, J. (2010). Quercetin regulates insulin like growth factor signaling and induces intrinsic and extrinsic pathway mediated apoptosis in androgen independent prostate cancer cells (PC-3). *Molecular and cellular biochemistry* 344, 173-184.
- Seshadri, P., Rajaram, A., and Rajaram, R. (2011). Plumbagin and juglone induce caspase-3-dependent apoptosis involving the mitochondria through ROS generation in human peripheral blood lymphocytes. *Free Radic Biol Med* 51, 2090-2107.
- Sesink, A.L., Arts, I.C., de Boer, V.C., Breedveld, P., Schellens, J.H., Hollman, P.C., and Russel, F.G. (2005). Breast cancer resistance protein (Bcrp1/Abcg2) limits net intestinal uptake of quercetin in rats by facilitating apical efflux of glucuronides. *Mol Pharmacol* 67, 1999-2006.

Sethi, G., and Tergaonkar, V. (2009). Potential pharmacological control of the NF-kappaB pathway. *Trends Pharmacol Sci* 30, 313-321.

Shahidi, F., and Perera, N. (2013). Oil and Phytochemicals from Small Fruit Seeds. In *Nutrition, Functional and Sensory Properties of Foods*, C.M. Chi-Tang Ho, Fereidoon Shahidi, Ellene Tratras Contis, ed. (Cambridge, UK: RSC Publishing), pp. 224-230.

Shahrzad, S., Aoyagi, K., Winter, A., Koyama, A., and Bitsch, I. (2001). Pharmacokinetics of gallic acid and its relative bioavailability from tea in healthy humans. *J Nutr* 131, 1207-1210.

Shan, B.E., Wang, M.X., and Li, R.Q. (2009). Quercetin inhibit human SW480 colon cancer growth in association with inhibition of cyclin D1 and survivin expression through Wnt/beta-catenin signaling pathway. *Cancer investigation* 27, 604-612.

Shankar, S., and Srivastava, R.K. (2007). Involvement of Bcl-2 family members, phosphatidylinositol 3'-kinase/AKT and mitochondrial p53 in curcumin (diferulolylmethane)-induced apoptosis in prostate cancer. *Int J Oncol* 30, 905-918.

Sharma, V., Joseph, C., Ghosh, S., Agarwal, A., Mishra, M.K., and Sen, E. (2007). Kaempferol induces apoptosis in glioblastoma cells through oxidative stress. *Mol Cancer Ther* 6, 2544-2553.

Shelton, M.D., Chock, P.B., and Mieyal, J.J. (2005). Glutaredoxin: role in reversible protein s-glutathionylation and regulation of redox signal transduction and protein translocation. *Antioxidants & redox signaling* 7, 348-366.

Sherr, C.J. (1996). Cancer cell cycles. *Science* 274, 1672-1677.

Shi, Y. (2002). Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Molecular cell* 9, 459-470.

Shih, Y.W., Wu, P.F., Lee, Y.C., Shi, M.D., and Chiang, T.A. (2009). Myricetin suppresses invasion and migration of human lung adenocarcinoma A549 cells: possible mediation by blocking the ERK signaling pathway. *Journal of agricultural and food chemistry* 57, 3490-3499.

Shin, K.S., Lee, S., and Cha, B.J. (2007). Suppression of phytopathogenic fungi by hexane extract of *Nepenthes ventricosa* x *maxima* leaf. *Fitoterapia* 78, 585-586.

Shinojima, N., Yokoyama, T., Kondo, Y., and Kondo, S. (2007). Roles of the Akt/mTOR/p70S6K and ERK1/2 signaling pathways in curcumin-induced autophagy. *Autophagy* 3, 635-637.

Shiomi, K., Kuriyama, I., Yoshida, H., and Mizushima, Y. (2013). Inhibitory effects of myricetin on mammalian DNA polymerase, topoisomerase and human cancer cell proliferation. *Food chemistry* 139, 910-918.

Shirai, T., Sano, M., Tamano, S., Takahashi, S., Hirose, M., Futakuchi, M., Hasegawa, R., Imaida, K., Matsumoto, K., Wakabayashi, K., *et al.* (1997). The prostate: a target for carcinogenicity of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) derived from cooked foods. *Cancer Res* 57, 195-198.

Shukla, S., Wu, C.P., Nandigama, K., and Ambudkar, S.V. (2007). The naphthoquinones, vitamin K3 and its structural analogue plumbagin, are substrates of the multidrug resistance linked ATP binding cassette drug transporter ABCG2. *Mol Cancer Ther* 6, 3279-3286.

Siegel, R., Naishadham, D., and Jemal, A. (2012). Cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 62, 10-29.

- Silva, I.D., Rodrigues, A.S., Gaspar, J., Maia, R., Laires, A., and Rueff, J. (1997). Involvement of rat cytochrome 1A1 in the biotransformation of kaempferol to quercetin: relevance to the genotoxicity of kaempferol. *Mutagenesis* *12*, 383-390.
- Simon, H.U., Haj-Yehia, A., and Levi-Schaffer, F. (2000). Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* *5*, 415-418.
- Simos, Y.V., Verginadis, II, Toliopoulos, I.K., Velalopoulou, A.P., Karagounis, I.V., Karkabounas, S.C., and Evangelou, A.M. (2012). Effects of catechin and epicatechin on superoxide dismutase and glutathione peroxidase activity, in vivo. *Redox Rep* *17*, 181-186.
- Singh, R.P., and Agarwal, R. (2006). Mechanisms of action of novel agents for prostate cancer chemoprevention. *Endocr Relat Cancer* *13*, 751-778.
- Singh, S.V., Srivastava, S.K., Choi, S., Lew, K.L., Antosiewicz, J., Xiao, D., Zeng, Y., Watkins, S.C., Johnson, C.S., Trump, D.L., *et al.* (2005). Sulforaphane-induced cell death in human prostate cancer cells is initiated by reactive oxygen species. *J Biol Chem* *280*, 19911-19924.
- Sinha, S., Pal, K., Elkhanany, A., Dutta, S., Cao, Y., Mondal, G., Iyer, S., Somasundaram, V., Couch, F.J., Shridhar, V., *et al.* (2013). Plumbagin inhibits tumorigenesis and angiogenesis of ovarian cancer cells in vivo. *Int J Cancer* *132*, 1201-1212.
- Skrzycki, M., Majewska, M., Podsiad, M., and Czczot, H. (2009). Expression and activity of superoxide dismutase isoenzymes in colorectal cancer. *Acta biochimica Polonica* *56*, 663-670.
- Smith, B.G., and Harris, P.J. (2001). Ferulic acid is esterified to glucuronoarabinoxylans in pineapple cell walls. *Phytochemistry* *56*, 513-519.
- Song, G., Mao, Y.B., Cai, Q.F., Yao, L.M., Ouyang, G.L., and Bao, S.D. (2005). Curcumin induces human HT-29 colon adenocarcinoma cell apoptosis by activating p53 and regulating apoptosis-related protein expression. *Braz J Med Biol Res* *38*, 1791-1798.
- Sourrouille, C., Marshall, B., Lienard, D., and Faye, L. (2009). From Neanderthal to nanobiotech: from plant potions to pharming with plant factories. *Methods in molecular biology* *483*, 1-23.
- Spagnuolo, C., Cerella, C., Russo, M., Chateauvieux, S., Diederich, M., and Russo, G.L. (2011). Quercetin downregulates Mcl-1 by acting on mRNA stability and protein degradation. *British journal of cancer* *105*, 221-230.
- Spitz, G.A., Furtado, C.M., Sola-Penna, M., and Zancan, P. (2009). Acetylsalicylic acid and salicylic acid decrease tumor cell viability and glucose metabolism modulating 6-phosphofructo-1-kinase structure and activity. *Biochem Pharmacol* *77*, 46-53.
- Sramkoski, R.M., Pretlow, T.G., 2nd, Giaconia, J.M., Pretlow, T.P., Schwartz, S., Sy, M.S., Marengo, S.R., Rhim, J.S., Zhang, D., and Jacobberger, J.W. (1999). A new human prostate carcinoma cell line, 22Rv1. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* *35*, 403-409.
- Srinivasan, M., Sudheer, A.R., Pillai, K.R., Kumar, P.R., Sudhakaran, P.R., and Menon, V.P. (2006). Influence of ferulic acid on gamma-radiation induced DNA damage, lipid peroxidation and antioxidant status in primary culture of isolated rat hepatocytes. *Toxicology* *228*, 249-258.

- Stacewicz-Sapuntzakis, M., Bowen, P.E., Hussain, E.A., Damayanti-Wood, B.I., and Farnsworth, N.R. (2001). Chemical composition and potential health effects of prunes: a functional food? *Critical reviews in food science and nutrition* 41, 251-286.
- Staniforth, V., Huang, W.C., Aravindaram, K., and Yang, N.S. (2012). Ferulic acid, a phenolic phytochemical, inhibits UVB-induced matrix metalloproteinases in mouse skin via posttranslational mechanisms. *The Journal of nutritional biochemistry* 23, 443-451.
- Stashenko, E.E., Jaramillo, B.E., and Martinez, J.R. (2004). Comparison of different extraction methods for the analysis of volatile secondary metabolites of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown, grown in Colombia, and evaluation of its in vitro antioxidant activity. *Journal of chromatography A* 1025, 93-103.
- Steinmetz, K.A., and Potter, J.D. (1996). Vegetables, fruit, and cancer prevention: a review. *J Am Diet Assoc* 96, 1027-1039.
- Stevenson, M.A., Zhao, M.J., Asea, A., Coleman, C.N., and Calderwood, S.K. (1999). Salicylic acid and aspirin inhibit the activity of RSK2 kinase and repress RSK2-dependent transcription of cyclic AMP response element binding protein- and NF-kappa B-responsive genes. *J Immunol* 163, 5608-5616.
- Stolarczyk, M., Piwowarski, J.P., Granica, S., Stefanska, J., Naruszewicz, M., and Kiss, A.K. (2013). Extracts from *Epilobium* sp. Herbs, Their Components and Gut Microbiota Metabolites of *Epilobium* Ellagitannins, Urolithins, Inhibit Hormone-Dependent Prostate Cancer Cells-(LNCaP) Proliferation and PSA Secretion. *Phytotherapy Research*.
- Stone, K.R., Mickey, D.D., Wunderli, H., Mickey, G.H., and Paulson, D.F. (1978). Isolation of a human prostate carcinoma cell line (DU 145). *Int J Cancer* 21, 274-281.
- Strand, L.P., and Scheline, R.R. (1975). The metabolism of vanillin and isovanillin in the rat. *Xenobiotica; the fate of foreign compounds in biological systems* 5, 49-63.
- Strathmann, J., Klimo, K., Sauer, S.W., Okun, J.G., Prehn, J.H., and Gerhauser, C. (2010). Xanthohumol-induced transient superoxide anion radical formation triggers cancer cells into apoptosis via a mitochondria-mediated mechanism. *FASEB J* 24, 2938-2950.
- Subramaniya, B.R., Srinivasan, G., Sadullah, S.S., Davis, N., Subhadara, L.B., Halagowder, D., and Sivasitambaram, N.D. (2011). Apoptosis inducing effect of plumbagin on colonic cancer cells depends on expression of COX-2. *PloS one* 6, e18695.
- Sultana, N., Akhter, M., and Khatoon, Z. (2010). Nematicidal natural products from the aerial parts of *Rubus niveus*. *Natural product research* 24, 407-415.
- Sun, F., Zheng, X.Y., Ye, J., Wu, T.T., Wang, J., and Chen, W. (2012). Potential anticancer activity of myricetin in human T24 bladder cancer cells both in vitro and in vivo. *Nutr Cancer* 64, 599-606.
- Sun, J., and McKallip, R.J. (2011). Plumbagin treatment leads to apoptosis in human K562 leukemia cells through increased ROS and elevated TRAIL receptor expression. *Leukemia research* 35, 1402-1408.
- Sun, S.C. (2011). Non-canonical NF-kappaB signaling pathway. *Cell Res* 21, 71-85.
- Sundstrom, C., and Nilsson, K. (1976). Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). *Int J Cancer* 17, 565-577.
- Sung, B., Pandey, M.K., Ahn, K.S., Yi, T., Chaturvedi, M.M., Liu, M., and Aggarwal, B.B. (2008). Anacardic acid (6-nonadecyl salicylic acid), an inhibitor of histone acetyltransferase, suppresses expression of nuclear factor-kappaB-regulated gene products involved in cell

survival, proliferation, invasion, and inflammation through inhibition of the inhibitory subunit of nuclear factor-kappaB/alpha kinase, leading to potentiation of apoptosis. *Blood* *111*, 4880-4891.

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

Sutcliffe, S., Giovannucci, E., Leitzmann, M.F., Rimm, E.B., Stampfer, M.J., Willett, W.C., and Platz, E.A. (2007). A prospective cohort study of red wine consumption and risk of prostate cancer. *Int J Cancer* *120*, 1529-1535.

Syed Alwi, S.S., Cavell, B.E., Donlevy, A., and Packham, G. (2012). Differential induction of apoptosis in human breast cancer cell lines by phenethyl isothiocyanate, a glutathione depleting agent. *Cell stress & chaperones* *17*, 529-538.

Szakiel, A., Pączkowski, C., and Henry, M. (2011). Influence of environmental abiotic factors on the content of saponins in plants. *Phytochem Rev* *10*, 471-491.

Tai, A., Sawano, T., Yazama, F., and Ito, H. (2011). Evaluation of antioxidant activity of vanillin by using multiple antioxidant assays. *Biochim Biophys Acta* *1810*, 170-177.

Tan, C., Wang, Q., Luo, C., Chen, S., Li, Q., and Li, P. (2013). Yeast β -Glucosidase Inhibitory Phenolic Compounds Isolated from *Gynura medica* Leaf. *International journal of molecular sciences* *14*, 2551-2558.

Tanaka, T., Tanaka, T., and Tanaka, M. (2011). Potential cancer chemopreventive activity of protocatechuic acid. *Journal of Experimental & Clinical Medicine* *3*, 27-33.

Tang, R.N., Qu, X.B., Guan, S.H., Xu, P.P., Shi, Y.Y., and Guo, D.A. (2012). Chemical constituents of *Spatholobus suberectus*. *Chinese journal of natural medicines* *10*, 32-35.

Teiten, M.-H., Gaascht, F., Dicato, M., and Diederich, M. (2013a). Anticancer bioactivity of compounds from medicinal plants used in European Medieval traditions. *Biochemical Pharmacology*.

Teiten, M.H., Dicato, M., and Diederich, M. (2013b). Curcumin as a regulator of epigenetic events. *Molecular nutrition & food research* *57*, 1619-1629.

Teiten, M.H., Gaascht, F., Eifes, S., Dicato, M., and Diederich, M. (2010). Chemopreventive potential of curcumin in prostate cancer. *Genes Nutr* *5*, 61-74.

Terry, S., Yang, X., Chen, M.W., Vacherot, F., and Buttyan, R. (2006). Multifaceted interaction between the androgen and Wnt signaling pathways and the implication for prostate cancer. *J Cell Biochem* *99*, 402-410.

Tetsu, O., and McCormick, F. (1999). Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature* *398*, 422-426.

Thangapazham, R.L., Sharma, A., and Maheshwari, R.K. (2006). Multiple molecular targets in cancer chemoprevention by curcumin. *Aaps J* *8*, E443-449.

Thurrow, T., and Lee, S.-O. (2012). Effect of Chlorogenic Acid and Neochlorogenic Acid on Human Colon Cancer Cells. *Discovery journal* *13*, 86-93.

Tian, B., Wang, Z., Zhao, Y., Wang, D., Li, Y., Ma, L., Li, X., Li, J., Xiao, N., Tian, J., *et al.* (2008). Effects of curcumin on bladder cancer cells and development of urothelial tumors in a rat bladder carcinogenesis model. *Cancer Lett* *264*, 299-308.

- Tian, L., Yin, D., Ren, Y., Gong, C., Chen, A., and Guo, F.J. (2012a). Plumbagin induces apoptosis via the p53 pathway and generation of reactive oxygen species in human osteosarcoma cells. *Molecular medicine reports* 5, 126-132.
- Tian, M., Bi, W., and Row, K.H. (2012b). Simultaneous extraction and separation of flavonols and flavones from *Chamaecyparis obtusa* by multi-phase extraction using an ionic liquid-modified microsphere polymer. *Phytochemical analysis : PCA* 23, 576-581.
- Tilak, J.C., Adhikari, S., and Devasagayam, T.P. (2004). Antioxidant properties of *Plumbago zeylanica*, an Indian medicinal plant and its active ingredient, plumbagin. *Redox Rep* 9, 219-227.
- Tlili, N., Elfalleh, W., Saadaoui, E., Khaldi, A., Triki, S., and Nasri, N. (2011). The caper (*Capparis L.*): ethnopharmacology, phytochemical and pharmacological properties. *Fitoterapia* 82, 93-101.
- Tokunaga, T., Takada, N., and Ueda, M. (2004). Mechanism of antifeedant activity of plumbagin, a compound concerning the chemical defense in carnivorous plant. *Tetrahedron Letters* 45, 7115-7119.
- Townsend, D.M., and Tew, K.D. (2003). The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance. *Oncogene* 22, 7369-7375.
- Trachootham, D., Alexandre, J., and Huang, P. (2009). Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? *Nat Rev Drug Discov* 8, 579-591.
- Tredan, O., Galmarini, C.M., Patel, K., and Tannock, I.F. (2007). Drug resistance and the solid tumor microenvironment. *J Natl Cancer Inst* 99, 1441-1454.
- Treutter, D. (2006). Significance of flavonoids in plant resistance: a review. *Environmental Chemistry Letters* 4, 147-157.
- Truica, C.I., Byers, S., and Gelmann, E.P. (2000). Beta-catenin affects androgen receptor transcriptional activity and ligand specificity. *Cancer Res* 60, 4709-4713.
- Tu, T., Giblin, D., and Gross, M.L. (2011). Structural determinant of chemical reactivity and potential health effects of quinones from natural products. *Chemical research in toxicology* 24, 1527-1539.
- Umesalma, S., and Sudhandiran, G. (2010). Differential inhibitory effects of the polyphenol ellagic acid on inflammatory mediators NF-kappaB, iNOS, COX-2, TNF-alpha, and IL-6 in 1,2-dimethylhydrazine-induced rat colon carcinogenesis. *Basic & clinical pharmacology & toxicology* 107, 650-655.
- Umesalma, S., and Sudhandiran, G. (2011). Ellagic acid prevents rat colon carcinogenesis induced by 1, 2 dimethyl hydrazine through inhibition of AKT-phosphoinositide-3 kinase pathway. *Eur J Pharmacol* 660, 249-258.
- Vakifahmetoglu, H., Olsson, M., and Zhivotovsky, B. (2008). Death through a tragedy: mitotic catastrophe. *Cell Death Differ* 15, 1153-1162.
- Valgimigli, L., and Iori, R. (2009). Antioxidant and pro-oxidant capacities of ITCs. *Environmental and molecular mutagenesis* 50, 222-237.
- van Damme, J.G., and De Neve, R.E. (1979). Fluorescence assay of hydroxynaphthoquinones. *Journal of pharmaceutical sciences* 68, 16-19.
- Vardar-Unlu, G., Candan, F., Sokmen, A., Daferera, D., Polissiou, M., Sokmen, M., Donmez, E., and Tepe, B. (2003). Antimicrobial and antioxidant activity of the essential oil and

methanol extracts of *Thymus pectinatus* Fisch. et Mey. Var. *pectinatus* (Lamiaceae). *Journal of agricultural and food chemistry* 51, 63-67.

Vardiman, J.W. (2010). The World Health Organization (WHO) classification of tumors of the hematopoietic and lymphoid tissues: an overview with emphasis on the myeloid neoplasms. *Chem Biol Interact* 184, 16-20.

Vari, R., D'Archivio, M., Filesi, C., Carotenuto, S., Scazzocchio, B., Santangelo, C., Giovannini, C., and Masella, R. (2011). Protocatechuic acid induces antioxidant/detoxifying enzyme expression through JNK-mediated Nrf2 activation in murine macrophages. *The Journal of nutritional biochemistry* 22, 409-417.

Verma, S., Singh, A., and Mishra, A. (2013). Gallic acid: Molecular rival of cancer. *Environmental toxicology and pharmacology* 35, 473-485.

Vermeulen, K., Van Bockstaele, D.R., and Berneman, Z.N. (2005). Apoptosis: mechanisms and relevance in cancer. *Annals of hematology* 84, 627-639.

Verras, M., and Sun, Z. (2006). Roles and regulation of Wnt signaling and beta-catenin in prostate cancer. *Cancer Lett* 237, 22-32.

Vicinanza, R., Zhang, Y., Henning, S.M., and Heber, D. (2013). Pomegranate Juice Metabolites, Ellagic Acid and Urolithin A, Synergistically Inhibit Androgen-Independent Prostate Cancer Cell Growth via Distinct Effects on Cell Cycle Control and Apoptosis. *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM* 2013, 247504.

Vidya Priyadarsini, R., Senthil Murugan, R., Maitreyi, S., Ramalingam, K., Karunakaran, D., and Nagini, S. (2010). The flavonoid quercetin induces cell cycle arrest and mitochondria-mediated apoptosis in human cervical cancer (HeLa) cells through p53 induction and NF-kappaB inhibition. *Eur J Pharmacol* 649, 84-91.

Vijayababu, M.R., Arunkumar, A., Kanagaraj, P., Venkataraman, P., Krishnamoorthy, G., and Arunakaran, J. (2006). Quercetin downregulates matrix metalloproteinases 2 and 9 proteins expression in prostate cancer cells (PC-3). *Molecular and cellular biochemistry* 287, 109-116.

Viljoen, T.C., van Aswegen, C.H., and du Plessis, D.J. (1995). Influence of acetylsalicylic acid and metabolites on DU-145 prostatic cancer cell proliferation. *Oncology* 52, 465-469.

Vlot, A.C., Dempsey, D.A., and Klessig, D.F. (2009). Salicylic Acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annual review of phytopathology* 47, 177-206.

Volkov, A.G., Adesina, T., Markin, V.S., and Jovanov, E. (2008). Kinetics and mechanism of *Dionaea muscipula* trap closing. *Plant Physiol* 146, 694-702.

Volkov, A.G., Harris, S.L., 2nd, Vilfranc, C.L., Murphy, V.A., Wooten, J.D., Paulicin, H., Volkova, M.I., and Markin, V.S. (2013). Venus flytrap biomechanics: forces in the *Dionaea muscipula* trap. *Journal of plant physiology* 170, 25-32.

Volkov, A.G., Murphy, V.A., Clemmons, J.I., Curley, M.J., and Markin, V.S. (2012). Energetics and forces of the *Dionaea muscipula* trap closing. *Journal of plant physiology* 169, 55-64.

Walton, N.J., Mayer, M.J., and Narbad, A. (2003). Vanillin. *Phytochemistry* 63, 505-515.

Walton, N.J., Narbad, A., Faulds, C., and Williamson, G. (2000). Novel approaches to the biosynthesis of vanillin. *Current opinion in biotechnology* 11, 490-496.

- Wang, C.C., Chiang, Y.M., Sung, S.C., Hsu, Y.L., Chang, J.K., and Kuo, P.L. (2008). Plumbagin induces cell cycle arrest and apoptosis through reactive oxygen species/c-Jun N-terminal kinase pathways in human melanoma A375.S2 cells. *Cancer letters* 259, 82-98.
- Wang, L., Lin, H.K., Hu, Y.C., Xie, S., Yang, L., and Chang, C. (2004). Suppression of androgen receptor-mediated transactivation and cell growth by the glycogen synthase kinase 3 beta in prostate cells. *J Biol Chem* 279, 32444-32452.
- Wang, N., Wang, Z.Y., Mo, S.L., Loo, T.Y., Wang, D.M., Luo, H.B., Yang, D.P., Chen, Y.L., Shen, J.G., and Chen, J.P. (2012a). Ellagic acid, a phenolic compound, exerts anti-angiogenesis effects via VEGFR-2 signaling pathway in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 134, 943-955.
- Wang, Y., Siemann, E., Wheeler, G.S., Zhu, L., Gu, X., and Ding, J. (2012b). Genetic variation in anti-herbivore chemical defences in an invasive plant. *Journal of Ecology* 100, 894-904.
- Weidner, S., Rybarczyk, A., Karamac, M., Krol, A., Mostek, A., Grebosz, J., and Amarowicz, R. (2013). Differences in the phenolic composition and antioxidant properties between *Vitis coignetiae* and *Vitis vinifera* seeds extracts. *Molecules* 18, 3410-3426.
- Weston, L.A., and Mathesius, U. (2013). Flavonoids: their structure, biosynthesis and role in the rhizosphere, including allelopathy. *J Chem Ecol* 39, 283-297.
- Whitson, E.L., Sun, H., Thomas, C.L., Henrich, C.J., Sayers, T.J., McMahon, J.B., Griesinger, C., and McKee, T.C. (2012). Synergistic TRAIL sensitizers from *Barleria alluaudii* and *Diospyros maritima*. *J Nat Prod* 75, 394-399.
- Whittemore, A.S., Kolonel, L.N., Wu, A.H., John, E.M., Gallagher, R.P., Howe, G.R., Burch, J.D., Hankin, J., Dreon, D.M., West, D.W., *et al.* (1995). Prostate cancer in relation to diet, physical activity, and body size in blacks, whites, and Asians in the United States and Canada. *J Natl Cancer Inst* 87, 652-661.
- Williamson, E. (2001). Synergy and other interactions in phytomedicines. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology* 8, 401-409.
- Xia, C., Meng, Q., Liu, L.Z., Rojanasakul, Y., Wang, X.R., and Jiang, B.H. (2007). Reactive oxygen species regulate angiogenesis and tumor growth through vascular endothelial growth factor. *Cancer Res* 67, 10823-10830.
- Xiao, D., Powolny, A.A., Moura, M.B., Kelley, E.E., Bommareddy, A., Kim, S.H., Hahm, E.R., Normolle, D., Van Houten, B., and Singh, S.V. (2010). Phenethyl isothiocyanate inhibits oxidative phosphorylation to trigger reactive oxygen species-mediated death of human prostate cancer cells. *J Biol Chem* 285, 26558-26569.
- Xiao, S., Zhang, L.F., Zhang, X., Li, S.M., and Xue, F.Q. (2013). Tracing antibacterial compounds from *Acalypha australis* Linn. by spectrum-effect relationships and semi-preparative HPLC. *Journal of separation science* 36, 1667-1676.
- Xiao, X., Shi, D., Liu, L., Wang, J., Xie, X., Kang, T., and Deng, W. (2011). Quercetin suppresses cyclooxygenase-2 expression and angiogenesis through inactivation of P300 signaling. *PloS one* 6, e22934.
- Xu, J., Dolan, M.C., Medrano, G., Cramer, C.L., and Weathers, P.J. (2012). Green factory: plants as bioproduction platforms for recombinant proteins. *Biotechnology advances* 30, 1171-1184.

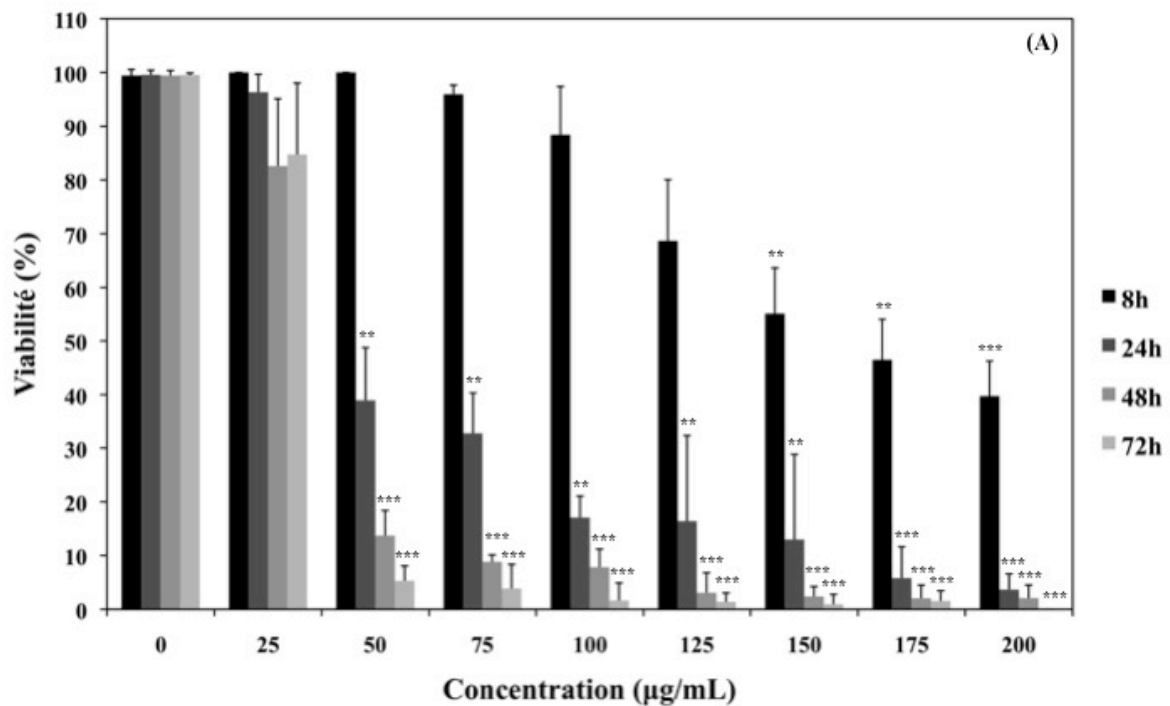
- Xu, K.H., and Lu, D.P. (2010). Plumbagin induces ROS-mediated apoptosis in human promyelocytic leukemia cells in vivo. *Leukemia research* 34, 658-665.
- Xu, R., Kang, Q., Ren, J., Li, Z., and Xu, X. (2013a). Antitumor Molecular Mechanism of Chlorogenic Acid on Inducing Genes GSK-3 beta and APC and Inhibiting Gene beta - Catenin. *Journal of analytical methods in chemistry* 2013, 951319.
- Xu, T.P., Shen, H., Liu, L.X., and Shu, Y.Q. (2013b). Plumbagin from *Plumbago Zeylanica* L induces apoptosis in human non-small cell lung cancer cell lines through NF- kappaB inactivation. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP* 14, 2325-2331.
- Yagasaki, K., Miura, Y., Okauchi, R., and Furuse, T. (2000). Inhibitory effects of chlorogenic acid and its related compounds on the invasion of hepatoma cells in culture. *Cytotechnology* 33, 229-235.
- YANG, J.-S., LIU, C.-W., MA, Y.-S., WENG, S.-W., TANG, N.-Y., WU, S.-H., JI, B.-C., MA, C.-Y., KO, Y.-C., and FUNAYAMA, S. (2012). Chlorogenic Acid Induces Apoptotic Cell Death in U937 Leukemia Cells through Caspase-and Mitochondria-dependent Pathways. *In vivo* 26, 971-978.
- Yang, S.J., Chang, S.C., Wen, H.C., Chen, C.Y., Liao, J.F., and Chang, C.H. (2010). Plumbagin activates ERK1/2 and Akt via superoxide, Src and PI3-kinase in 3T3-L1 cells. *European journal of pharmacology* 638, 21-28.
- Yang, Y., Li, Y., Wang, K., Wang, Y., Yin, W., and Li, L. (2013). P38/NF-kappaB/snail pathway is involved in caffeic acid-induced inhibition of cancer stem cells-like properties and migratory capacity in malignant human keratinocyte. *PloS one* 8, e58915.
- Yardy, G.W., and Brewster, S.F. (2005). Wnt signalling and prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 8, 119-126.
- Yeh, C.C., Hou, M.F., Tsai, S.M., Lin, S.K., Hsiao, J.K., Huang, J.C., Wang, L.H., Wu, S.H., Hou, L.A., Ma, H., *et al.* (2005a). Superoxide anion radical, lipid peroxides and antioxidant status in the blood of patients with breast cancer. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 361, 104-111.
- Yeh, S.L., Huang, C.S., and Hu, M.L. (2005b). Lycopene enhances UVA-induced DNA damage and expression of heme oxygenase-1 in cultured mouse embryo fibroblasts. *European journal of nutrition* 44, 365-370.
- Yemis, G.P., Pagotto, F., Bach, S., and Delaquis, P. (2011). Effect of vanillin, ethyl vanillin, and vanillic acid on the growth and heat resistance of *Cronobacter* species. *Journal of food protection* 74, 2062-2069.
- Yi, L., Ji, X.X., Lin, M., Tan, H., Tang, Y., Wen, L., Ma, Y.H., and Su, Q. (2010). Diallyl disulfide induces apoptosis in human leukemia HL-60 cells through activation of JNK mediated by reactive oxygen. *Die Pharmazie* 65, 693-698.
- Yin, M.C., Lin, C.C., Wu, H.C., Tsao, S.M., and Hsu, C.K. (2009). Apoptotic effects of protocatechuic acid in human breast, lung, liver, cervix, and prostate cancer cells: potential mechanisms of action. *Journal of agricultural and food chemistry* 57, 6468-6473.
- Ying, B., Yang, T., Song, X., Hu, X., Fan, H., Lu, X., Chen, L., Cheng, D., Wang, T., Liu, D., *et al.* (2009). Quercetin inhibits IL-1 beta-induced ICAM-1 expression in pulmonary epithelial cell line A549 through the MAPK pathways. *Molecular biology reports* 36, 1825-1832.

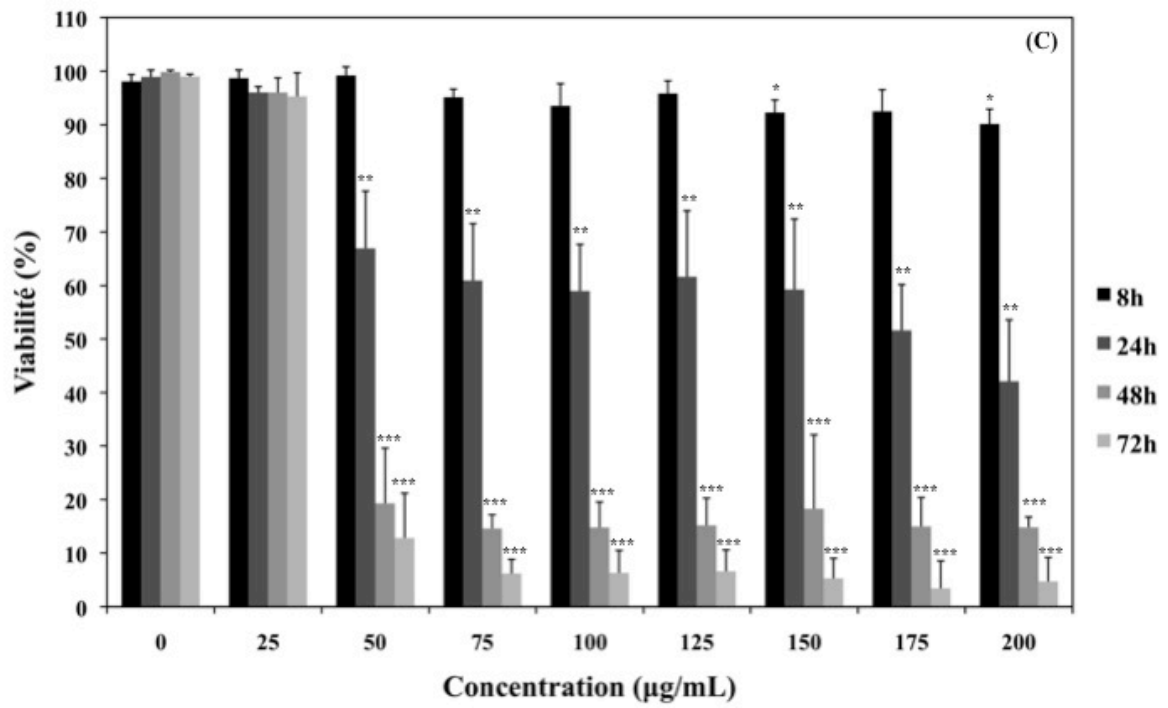
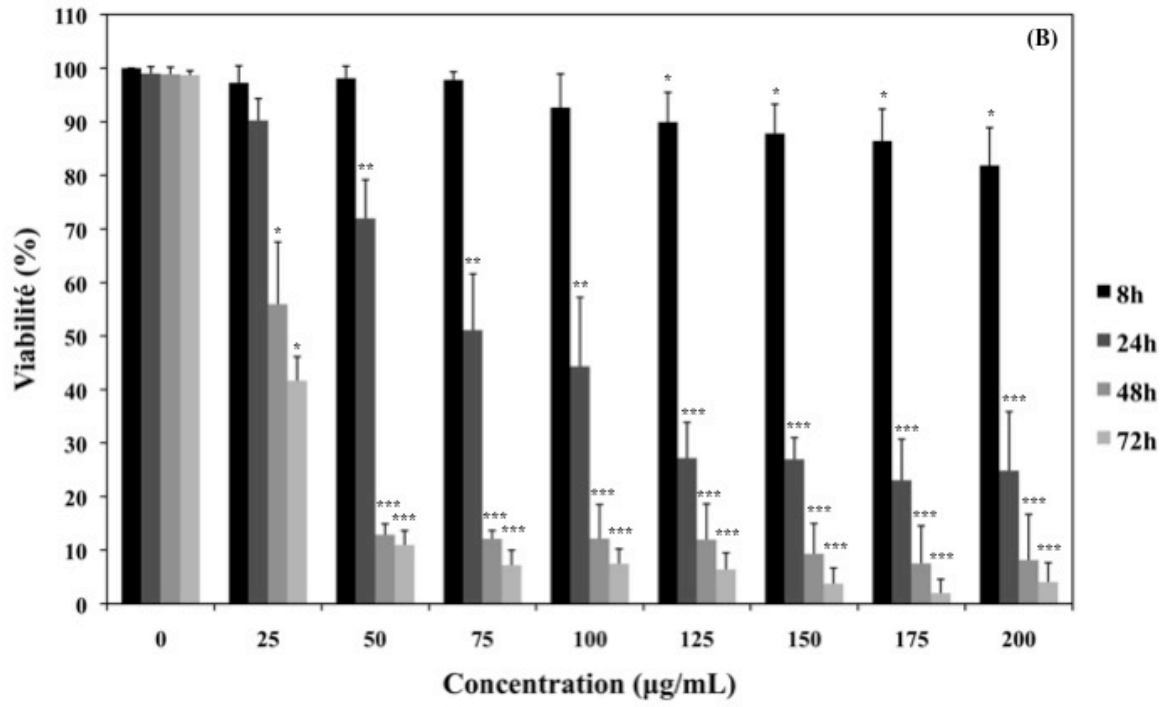
- Yip, E.C., Chan, A.S., Pang, H., Tam, Y.K., and Wong, Y.H. (2006). Protocatechuic acid induces cell death in HepG2 hepatocellular carcinoma cells through a c-Jun N-terminal kinase-dependent mechanism. *Cell biology and toxicology* 22, 293-302.
- Yu, S., Shen, G., Khor, T.O., Kim, J.H., and Kong, A.N. (2008). Curcumin inhibits Akt/mammalian target of rapamycin signaling through protein phosphatase-dependent mechanism. *Mol Cancer Ther* 7, 2609-2620.
- Zhang, B., Yang, R., and Liu, C.-Z. (2008). Microwave-assisted extraction of chlorogenic acid from flower buds of *Lonicera japonica* Thunb. *Separation and Purification Technology* 62, 480-483.
- Zhang, H.N., Yu, C.X., Zhang, P.J., Chen, W.W., Jiang, A.L., Kong, F., Deng, J.T., Zhang, J.Y., and Young, C.Y. (2007). Curcumin downregulates homeobox gene NKX3.1 in prostate cancer cell LNCaP. *Acta Pharmacol Sin* 28, 423-430.
- Zhang, M., Coen, J.J., Suzuki, Y., Siedow, M.R., Niemierko, A., Khor, L.Y., Pollack, A., Zhang, Y., Zietman, A.L., Shipley, W.U., *et al.* (2010). Survivin Is a Potential Mediator of Prostate Cancer Metastasis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*.
- Zhang, M., Swarts, S.G., Yin, L., Liu, C., Tian, Y., Cao, Y., Swarts, M., Yang, S., Zhang, S.B., Zhang, K., *et al.* (2011). Antioxidant properties of quercetin. *Advances in experimental medicine and biology* 701, 283-289.
- Zhang, Y. (2000). Role of glutathione in the accumulation of anticarcinogenic isothiocyanates and their glutathione conjugates by murine hepatoma cells. *Carcinogenesis* 21, 1175-1182.
- Zhao, Z., and Moghadasian, M.H. (2008). Chemistry, natural sources, dietary intake and pharmacokinetic properties of ferulic acid: a review. *Food chemistry* 109, 691-702.
- Zhong, L., Arner, E.S., Ljung, J., Aslund, F., and Holmgren, A. (1998). Rat and calf thioredoxin reductase are homologous to glutathione reductase with a carboxyl-terminal elongation containing a conserved catalytically active penultimate selenocysteine residue. *J Biol Chem* 273, 8581-8591.
- Zhou, H., Beevers, C.S., and Huang, S. (2011). The targets of curcumin. *Current drug targets* 12, 332-347.
- Zhou, J., and Du, Y. (2012). Acquisition of resistance of pancreatic cancer cells to 2-methoxyestradiol is associated with the upregulation of manganese superoxide dismutase. *Molecular cancer research : MCR* 10, 768-777.
- Ziech, D., Anastopoulos, I., Hanafi, R., Voulgaridou, G.P., Franco, R., Georgakilas, A.G., Pappa, A., and Panayiotidis, M.I. (2012). Pleiotropic effects of natural products in ROS-induced carcinogenesis: the role of plant-derived natural products in oral cancer chemoprevention. *Cancer Lett* 327, 16-25.
- Zitta, K., Meybohm, P., Bein, B., Huang, Y., Heinrich, C., Scholz, J., Steinfath, M., and Albrecht, M. (2012). Salicylic acid induces apoptosis in colon carcinoma cells grown in-vitro: influence of oxygen and salicylic acid concentration. *Exp Cell Res* 318, 828-834.
- Zwolak, P., Borja-Cacho, D., Phillips, P., Dudeja, V., Dawra, R.K., Talukdar, R., Chugh, R.K., Dudek, A.Z., Vickers, S.M., and Saluja, A.K. (2008). 55. Myricetin a Novel Natural Antineoplastic Agent Decreases Progression of Human Pancreatic Cancer Via Inhibition of Akt Kinase and Erk Pathways. *Journal of Surgical Research* 144, 200-200.

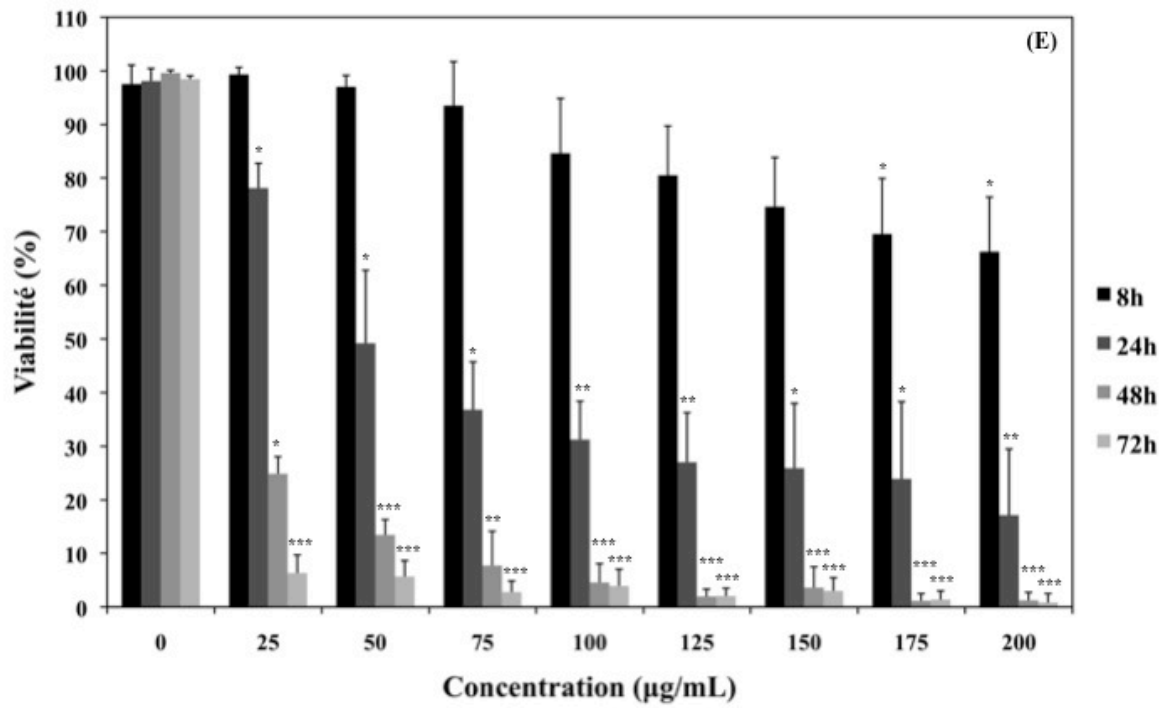
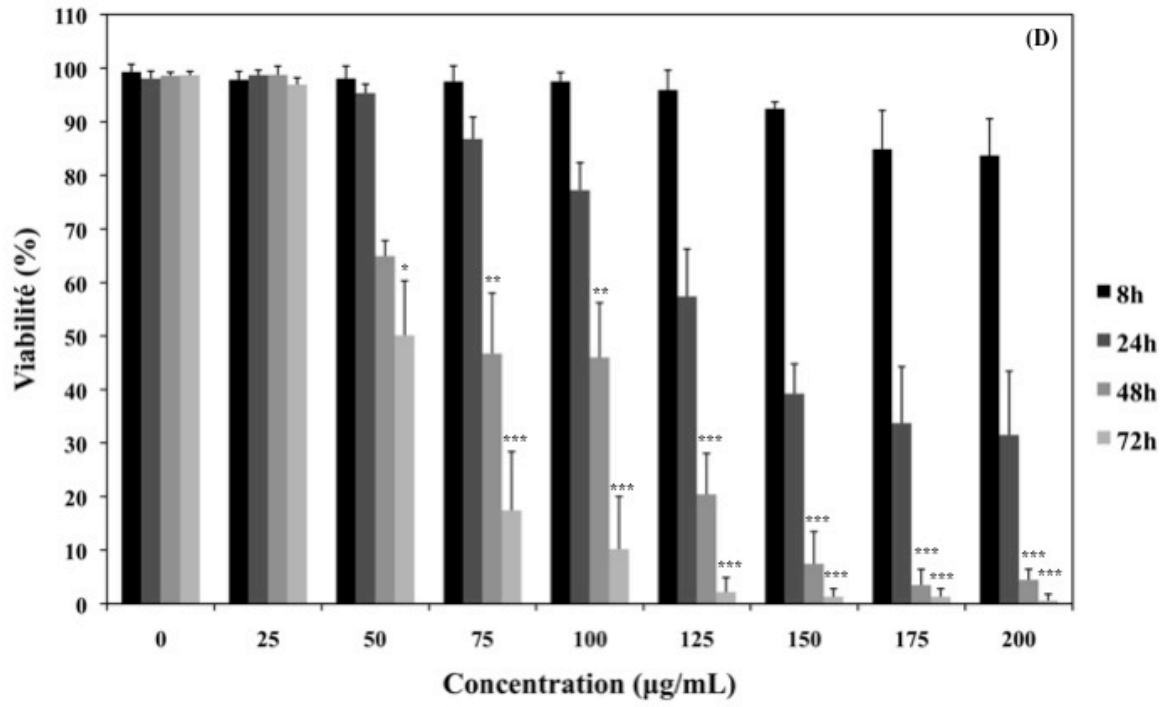
8. Annexes

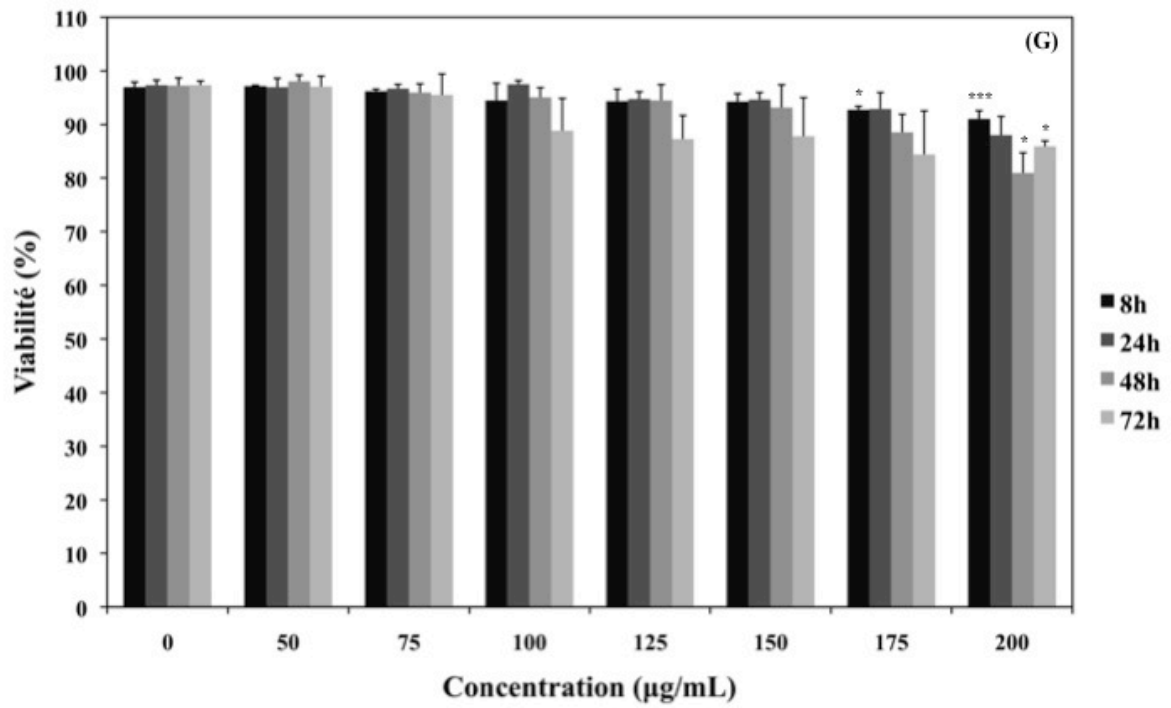
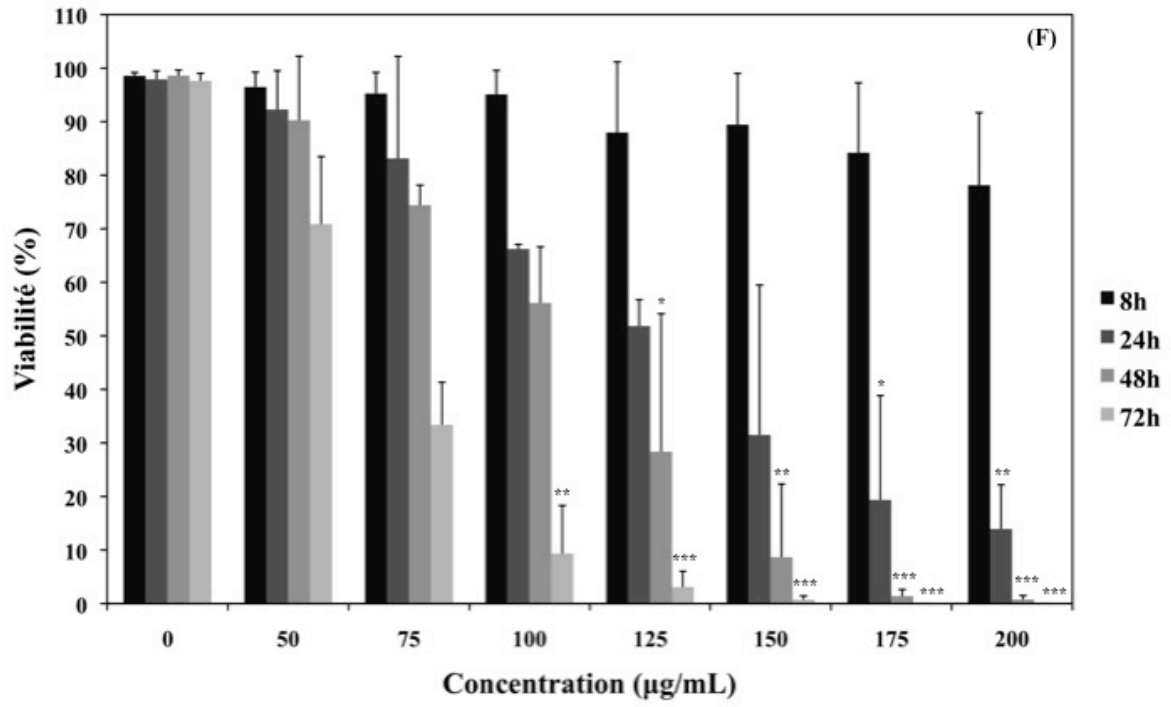
Annexe 1 : Effet de l'extrait total de feuilles de *Dionaea muscipula* sur la viabilité de différentes lignées cellulaires.

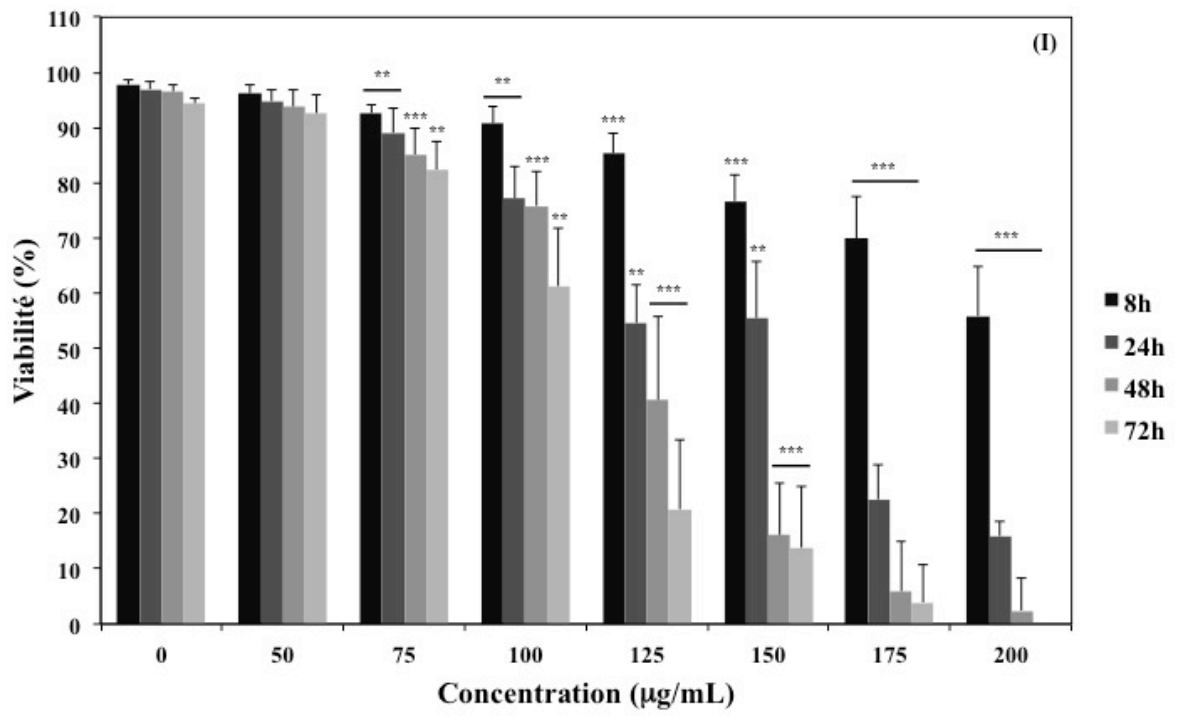
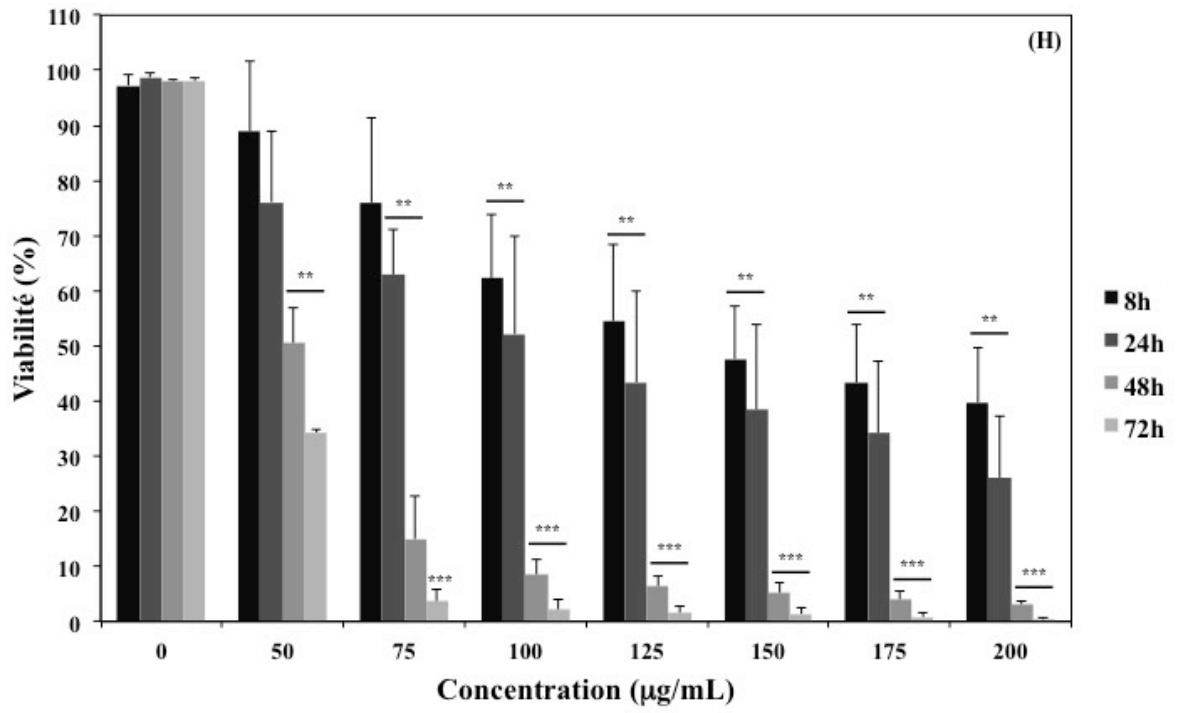
La viabilité cellulaire a été déterminée par le test d'exclusion au bleu trypan après 8, 24, 48 ou 72 heures de traitement des cellules leucémiques HL-60 (A), Jurkat (B), K562 (C), Raji (D) et U937 (E) et des cellules adhérentes A549 (F), HT-29 (G), MDA-MB-231 (H), PC-3 (I), Saos-2 (J) avec différentes concentrations de l'extrait de feuilles de dionée (25, 50, 75, 100, 125, 150, 175 et 200 µg/mL). Les résultats correspondent à la moyenne +/- la déviation standard d'au moins trois expériences indépendantes. * indique une différence statistiquement significative par rapport aux cellules non traitées (* correspondant à une p-valeur < 0,05, ** p-valeur < 0,01 et *** p-valeur < 0,001).

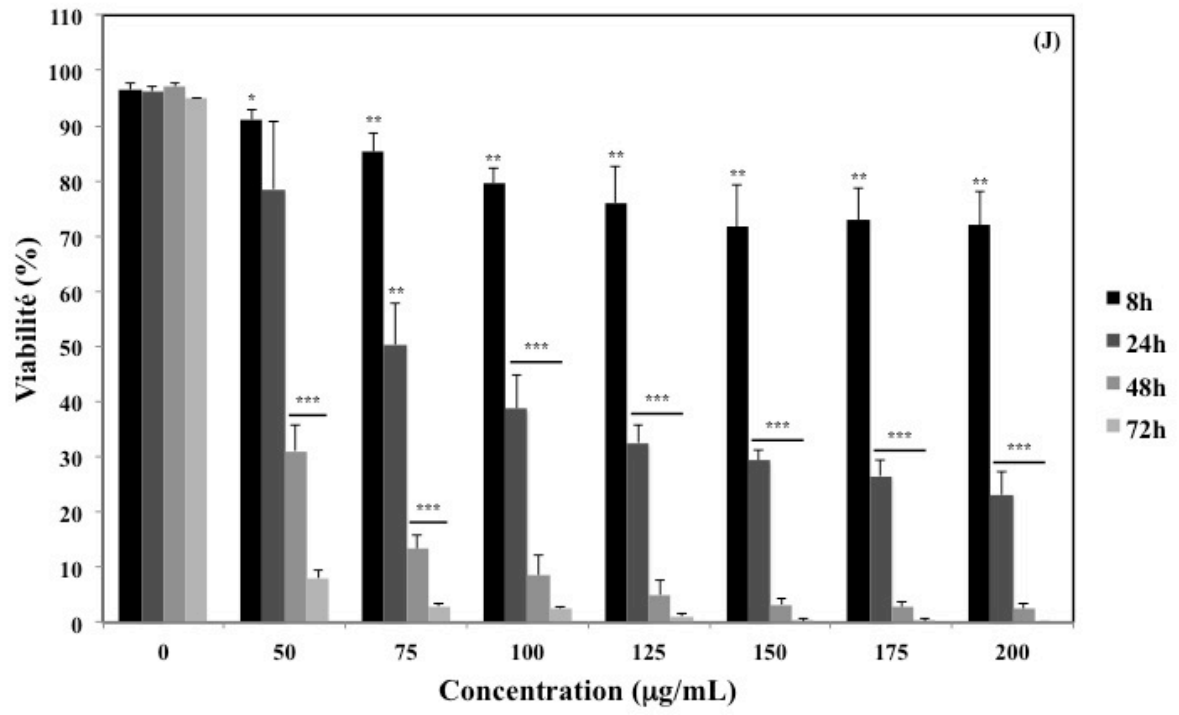














Approche végétale dans le traitement des leucémies

Vegetal approach in leukemia treatment

■ F. Gaascht*, M.H. Teiten*, M. Schumacher*, M. Dicato*, M. Diederich*

RÉSUMÉ

◆ Le cancer est la première cause de décès en France. De nombreuses études menées au cours des dernières décennies ont mis en évidence la possibilité de prévenir l'apparition et/ou le développement du cancer en vivant dans un environnement sain et en ayant une alimentation équilibrée. En effet, de nombreuses substances issues de produits naturels d'origines diverses se sont révélées être de puissantes molécules anticancéreuses pouvant agir sur toutes les étapes essentielles de la cancérogenèse.

Mots-clés : Cancer – Leucémie – Produits naturels – Chimio-prévention.

Summary. Cancer is the first cause of death in France. During the last decades, numerous studies have pointed out that it is possible to prevent the appearance and/or the development of cancer by living in a healthy environment and with a healthful diet. Many substances, isolated from natural products, appear to possess a powerful anticancer potential, which can act on all stages of carcinogenesis.

Keywords: Cancer – Leukemia – Natural products – Chemoprevention.

cas de cancer sont diagnostiqués chaque année (source : Institut de veille sanitaire). Les causes de développement d'un cancer sont nombreuses et très variées. Il peut s'agir de causes d'ordre génétique (mutation autosomique dominante, prédispositions génétiques) ou d'effets secondaires liés à l'exposition à des facteurs externes (polluants, éléments radioactifs, rayons ultraviolets, champs électromagnétiques, etc.), mais également à des agents infectieux (virus, bactéries, etc.). Les inflammations chroniques contribuent également au développement de nombreux cancers. Par ailleurs, le mode de vie des pays industrialisés (mauvais régime alimentaire, tabac, alcool, obésité, faible activité physique) est sans nul doute une des principales causes de développement du cancer (1, 2).

Ainsi, un mode de vie sain dans un environnement moins pollué accompagné d'une alimentation composée majoritairement de produits naturels riches en substances anticancéreuses permettrait de prévenir l'apparition et le développement du cancer.

ALIMENTATION ET CHIMIOPRÉVENTION

Bon nombre de ces substances naturelles ont été décrites comme étant capables d'interagir sur la modulation des signaux mitogènes, de survie cellulaire, d'apoptose, de régulation du cycle cellulaire, d'angiogenèse, ou encore sur les processus intervenant dans le développement de métastases (figure 1). Ces substances se retrouvent naturellement au sein même de notre alimentation, notamment dans les fruits, les légumes, les céréales et les épices, mais également dans certains végétaux ou produits d'origine marine. Ces substances sont considérées comme étant chimiopréventives.

Ainsi, la chimioprévention est une méthode de prophylaxie qui consiste à utiliser des molécules

Avec 30% de décès en 2006 (155 000 morts), le cancer apparaît comme la première cause de décès en France (source : CépiDc, Inserm). On estime qu'environ 320 000 nouveaux

* Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire du Cancer, hôpital Kirchberg, Luxembourg.

d'origine synthétique ou naturelle ne présentant pas d'effet toxique, mais qui permettent d'empêcher, voire de bloquer, l'apparition et le développement de certaines maladies, dont le cancer.

✓ **Les composés naturels anticancéreux issus de l'alimentation**

Parmi cette multitude d'agents naturels chimiopréventifs issus de l'alimentation, on peut notamment citer les flavonoïdes (carottes), les isothiocyanates (choux), les lycopènes (tomates), les indoles, les organo-sulfures (ail, oignons, champignons shiitaké) et les polyphénols (curcuma) [3-6].

Les isothiocyanates, trouvés dans les légumes de la famille des Brassicacées (choux, brocolis, navets...), peuvent stimuler l'activité d'enzymes impliquées dans la détoxification des produits carcinogènes.

La vitamine C, présente en grande quantité dans les agrumes (oranges, citrons et pamplemousses), est capable de protéger la membrane et l'ADN des cellules contre les dommages oxydatifs, mais également de stimuler l'activité d'enzymes de détoxification. Le β -carotène des carottes, papayes et potirons a la capacité de protéger les cellules contre les dommages provoqués par les radicaux libres.

Les composés organo-sulfurés tels que l'ajoène, que l'on retrouve dans les plantes du genre *Allium* (oignons et ail), se sont révélés être des inhibiteurs du protéasome et des inducteurs d'arrêt du cycle cellulaire à la transition des phases G2 et M des cellules de la lignée leucémique HL-60 (7). Le diallyl tétrasulfide (Al_2S_4) [figure 2, p. 106], quant à lui, provoque un arrêt du cycle cellulaire à la transition G2/M, l'inactivation des protéines antiapoptotiques et l'activation des protéines

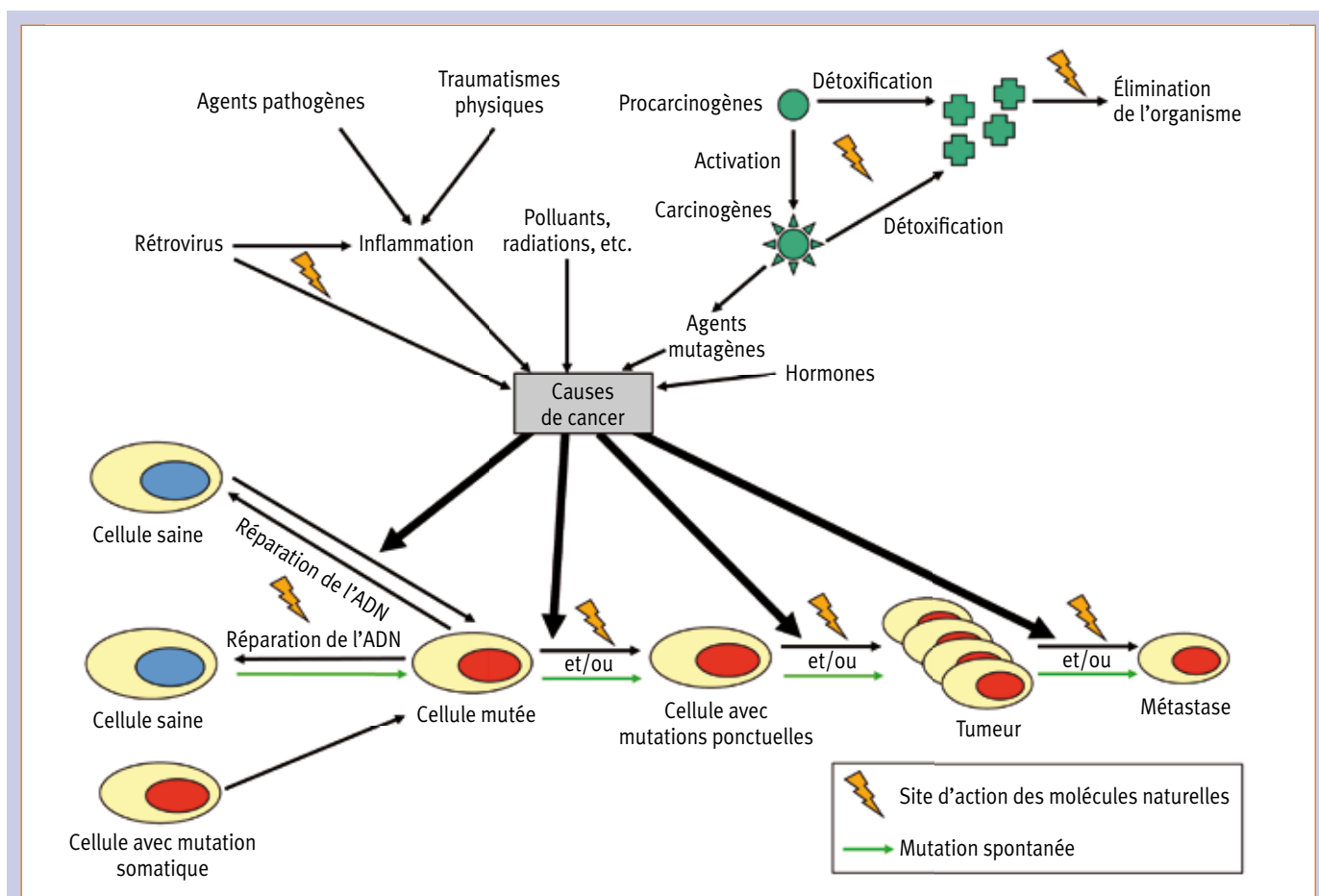


Figure 1. Représentation schématique des sites d'action potentiels des agents chimiopréventifs au cours du développement du cancer.

proapoptotiques, ainsi qu'un relargage du cytochrome *c* conduisant à une mort cellulaire dépendante des caspases (8, 9).

La curcumine (figure 2, p. 106), une molécule extraite de la racine de *Curcuma longa*, une plante originaire d'Asie, est utilisée depuis des siècles dans les cuisines et les médecines traditionnelles hindoues et chinoises. Cette molécule, tout d'abord reconnue pour ses propriétés anti-inflammatoires, principalement via l'inhibition de la voie NF- κ B (Nuclear Factor Kappa B) [10], est également capable d'induire la mort des cellules cancéreuses, principalement par apoptose (11-13). L'épigallocatechine-3-gallate (EGCG), une molécule contenue dans le thé vert, est une des molécules nutritionnelles les plus puissantes, capable de contrecarrer l'angiogenèse, un processus nécessaire à l'invasion des tissus sains par les cellules cancéreuses. L'EGCG est capable de désactiver les récepteurs VEGF-R1 et R2 du VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), et de

provoquer une activation de la caspase-3 et une diminution de l'expression des protéines anti-apoptotiques Bcl-2 (*B-cell leukemia/lymphoma 2*) et XIAP (*X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein*) dans des cellules primaires issues d'une leucémie lymphoïde chronique (14).

D'autres études ont révélé que les phytoalexines, des molécules issues des plantes de la famille des Brassicacées, sont dotées de propriétés antiprolifératives et proapoptotiques vis-à-vis des cellules leucémiques Jurkat (15).

Des recherches récentes ont révélé que les proanthocyanidines présentes dans les grains de raisin induisent l'apoptose dépendante des caspases des lignées leucémiques U937, HL-60 et Jurkat après activation de la voie JNK (*c-jun N-terminal kinase*) [16].

Le resvératrol (figure 2, p. 106), un polyphénol présent dans de nombreux végétaux alimentaires tels que le raisin et que l'on retrouve notamment dans le vin rouge, est capable de diminuer la

>>>

CLAIRYG 50 mg/ml, solution pour perfusion : Composition : Immunglobuline humaine normale 50 mg/ml, mannitol, glycine, polysorbate 80. IgG \geq 95% de la quantité totale en protéines (IgG1 : 55 – 67 %, IgG2 : 29 – 37 %, IgG3 : 1 – 4 %, IgG4 : 1 – 3 %). IgA \leq 0.022 mg/ml. **Indications :** Traitement substitutif : Déficits immunitaires primitifs tels que : agammaglobulinémie congénitale et hypogammaglobulinémie congénitale, déficit immunitaire commun variable, déficit immunitaire combiné sévère, syndrome de Wiskott Aldrich. Myélome ou leucémie lymphoïde chronique avec hypogammaglobulinémie secondaire sévère et infections récurrentes. Infections récurrentes chez l'enfant infecté par le VIH. Traitement immunomodulateur : Purpura thrombopénique idiopathique (PTI) chez les enfants ou les adultes en cas de risque hémorragique important ou avant un acte chirurgical pour corriger le taux de plaquettes. Syndrome de Guillain et Barré. Maladie de Kawasaki. Allogreffe de moelle osseuse. Posologie* : La dose et la posologie dépendent de l'indication et de la réponse pharmacocinétique et clinique pour les traitements de substitution. A titre indicatif : Déficit immunitaire primitif : Assurer un taux d'IgG résiduel d'au moins 4 à 6 g/l. La persistance des infections peut amener à maintenir un seuil d'IgG résiduel de 8 voire 10 g/l. Dose de charge : 0,4 à 0,8 g/kg suivie d'une dose d'au moins 0,2 g/kg toutes les 3 semaines (doses d'IgIV nécessaires pour un taux résiduel de 6 g/l : 0,2 à 0,8 g/kg/mois). Intervalle entre les doses : 2 à 4 semaines. Perfusions plus fréquentes si survenue d'infections. Les niveaux résiduels doivent être mesurés afin d'ajuster la posologie et l'intervalle d'administration. Myélome ou leucémie lymphoïde chronique avec hypogammaglobulinémie secondaire sévère et infections récurrentes ; infections récidivantes chez l'enfant infecté par le VIH : 0,2 à 0,4 g/kg de poids corporel toutes les 3 à 4 semaines. PTI : 0,8 à 1 g/kg à J1, éventuellement renouvelé dans les 3 jours, ou 0,4 g/kg/j pendant 2 à 5 jours. Renouveler en cas de rechute. Syndrôme de Guillain-Barré : 0,4 g/kg/j pendant 3 à 7 jours. Expérience clinique limitée chez les enfants. Maladie de Kawasaki : 1,6 à 2,0 g/kg administrés en plusieurs doses réparties sur 2 à 5 jours ou 2 g/kg en dose unique, associées à l'acide acétylsalicylique. Allogreffe de moelle osseuse : Lors de la phase de conditionnement et après la greffe. Traitement d'infections et prévention de la maladie du greffon contre l'hôte : posologie adaptée individuellement. Généralement 0,5 g/kg/semaine, 7 jours avant la greffe et jusqu'à 3 mois après la greffe. Si déficit persistant de production d'anticorps : 0,5 g/kg/mois jusqu'au retour à la normale. **Mode et voie d'administration :** Perfusion IV à un débit initial \leq 1 ml/kg/h pendant 30 minutes. S'il est bien toléré, accélérer progressivement jusqu'à un maximum de 4 ml/kg/h. **Contre-indications :** Hypersensibilité à l'un des constituants de la préparation. Hypersensibilité aux Ig, en particulier chez les patients présentant un déficit en IgA et avec des anticorps circulants anti-IgA. **Mises en garde spéciales et précautions d'emploi :** Respecter le débit de perfusion recommandé. S'assurer initialement de la tolérance par une perfusion lente (\leq 1ml/kg/h). Garder les patients sous surveillance pendant toute la durée de la perfusion et pendant 20 mn après la perfusion voire 1h en cas de première perfusion, ou changement de produit ou lorsque la dernière perfusion remonte à une longue période. Toutes les précautions doivent être prises chez les patients obèses et les patients présentant des facteurs de risque thrombotique préexistants (âge avancé, hypertension, diabète sucré, et antécédents de maladie vasculaire ou d'épisodes thrombotiques, troubles thrombotiques héréditaires ou acquis, périodes prolongées d'immobilisation, patients sévèrement hypovolémiques et ceux atteints de maladies provoquant une augmentation de la viscosité sanguine). Chez les patients présentant un facteur de risque d'atteinte rénale (insuffisance rénale préexistante, diabète sucré, hypovolémie, surpoids, administration concomitante de médicaments néphrotoxiques ou sujet âgé de plus de 65 ans), l'utilisation d'IgIV sans saccharose doit être envisagée. CLAIRYG ne contient pas de saccharose ni de maltose. En cas d'atteinte rénale une interruption d'IgIV doit être envisagée. Chez les patients à risque d'insuffisance rénale aiguë ou de réaction thromboembolique : - débit de perfusion et dose minimaux - hydratation appropriée avant le début de la perfusion d'IgIV, - surveillance de la diurèse, - surveillance de la créatininémie, - éviter l'utilisation concomitante de diurétiques de l'anse, ou médicaments néphrotoxiques. En cas d'effets indésirables, diminuer le débit d'administration ou arrêter la perfusion. En cas de choc, instaurer un traitement symptomatique. En cas d'obésité (IMC \geq 30), réduire la dose de 20% en cas d'immunomodulation ou l'adapter au poids maigre calculé. Utiliser avec précaution chez les patients ayant un traitement diurétique et les patients en état de déshydratation, en raison de la présence de mannitol (32 mg/ml). Les mesures de prévention du risque de transmission d'agents infectieux comprennent la sélection clinique des donneurs, la recherche des marqueurs spécifiques d'infection sur chaque don et sur les mélanges de plasma et la mise en œuvre dans le procédé de fabrication d'étapes efficaces pour l'inactivation/élimination virale. Ces mesures sont considérées comme efficaces vis-à-vis des virus enveloppés tels que le VIH, le VHB et le VHC, et vis-à-vis des virus non enveloppés VHA et parovirus B19. Cependant, le risque de transmission d'agents infectieux ne peut être totalement exclu. **Interactions* :** Risque d'altérer l'efficacité des vaccins constitués de virus vivants atténués pour une période de 6 semaines à 3 mois (attendre 3 mois avant administration), voire de 1 an dans le cas de la rougeole (contrôle des anticorps protecteurs post-vaccinaux). **Grossesse et allaitement :** N'administrer chez la femme enceinte qu'en cas de nécessité bien établie. Passage dans le lait maternel. **Effets indésirables* :** Les plus fréquemment rapportés : fièvre pendant l'administration, céphalées dans les 24 heures qui suivent la perfusion. Liés au traitement : Très fréquents : nausées, céphalées, hypertension, fièvre. Fréquents : frissons, légère augmentation réversible et transitoire de la créatinine sérique sans répercussion clinique. Décrits avec l'ensemble des IgIV : vomissements, réactions allergiques, arthralgie, baisse de la pression artérielle et lombalgies modérées. Rarement : chute brutale de la pression artérielle et dans des cas isolés, chocs anaphylactiques. Cas de méningites aseptiques réversibles, cas isolés d'anémies hémolytiques/hémolyses réversibles et rares cas de réactions cutanées transitoires. Cas d'insuffisance rénale aiguë. Très rarement : réactions thromboemboliques telles que : infarctus du myocarde, accident vasculaire cérébral, embolie pulmonaire, thrombose veineuse profonde. **Surdosage :** Pourrait entraîner une hypervolémie et une hyperviscosité, particulièrement chez les patients à risque. **Incompatibilités :** Ne mélanger avec aucun autre produit et (ou) médicament. **Conservation :** 18 mois entre 2 et 8°C (ou 12 mois \leq 25°C sans être à nouveau réfrigéré avec inscription de la nouvelle date de péremption sur la boîte), à l'abri de la lumière. Ne pas congeler. Utiliser immédiatement après ouverture. **Titulaire de l'autorisation de mise sur le marché : LFB BIOMEDICAMENTS - 3 AVENUE DES TROPIQUES - ZA DE COURTABŒUF - 91940 LES ULIS. AMM n° 34009 576 186 7 4 (20 ml) - 34009 576 187 3 5 (50 ml) - 34009 576 189 6 4 (100 ml) - 34009 576 190 4 6 (200 ml) - 34009 576 191 0 7 (400 ml), DECEMBRE 2009. Conditions de prescription et de délivrance :** Liste I. Médicament soumis à prescription hospitalière. La prescription par un médecin exerçant dans un établissement de transfusion sanguine autorisé à dispenser des médicaments aux malades qui y sont traités est également autorisée. Agréé Coll.

* Pour une information complète, se reporter au Résumé des Caractéristiques du Produit disponible sur le site de l'AFSSAPS <http://afssaps.sante.fr/>

10G0441/3.0

>>>

viabilité et la capacité de synthèse de l'ADN dans les cellules HL-60 (*Human promyelocytic Leukemia cells*) [17], mais également de provoquer un arrêt du cycle cellulaire en phase G₁, de déclencher l'apoptose et de diminuer l'activation par phosphorylation du facteur de transcription STAT3 (*Signal Transducer and Activator of Transcription 3*) [18] des lignées leucémiques HL-60, SUP-B15 et Kasumi-1. Le cacao et les produits chocolatés sont également une grande source de molécules bioactives. Ils sont connus pour leur richesse en catéchines et en procyanidines, des molécules de la famille des flavonoïdes ayant des effets inhibiteurs sur différents processus de cancérogenèse (19).

✓ **Effet de la préparation des aliments**

Ces agents chimiopréventifs se retrouvent également dans les préparations alimentaires ayant

comme ingrédients de base des fruits ou des légumes. Cependant, la cuisson peut avoir un effet délétère sur la quantité de certaines molécules chimiopréventives thermosensibles contenues dans les légumes, les fruits et les épices. En revanche, leur cuisson en présence d'huile, notamment d'huile d'olive, permet d'augmenter la biodisponibilité de ces molécules grâce à un processus de micellisation. Ainsi, l'absorption des caroténoïdes contenus dans les carottes crues n'est que de 29%, alors que ce taux passe à 52% lorsque ces mêmes légumes ont été cuisinés avec de l'huile (20).

De même, la faible biodisponibilité de la curcumine se voit augmenter de 2 000% lorsque celle-ci est combinée à de la pipérine, l'alkaloïde responsable de la saveur piquante du poivre (21). Le lycopène (figure 2), un terpène que l'on retrouve dans de nombreux fruits et légumes

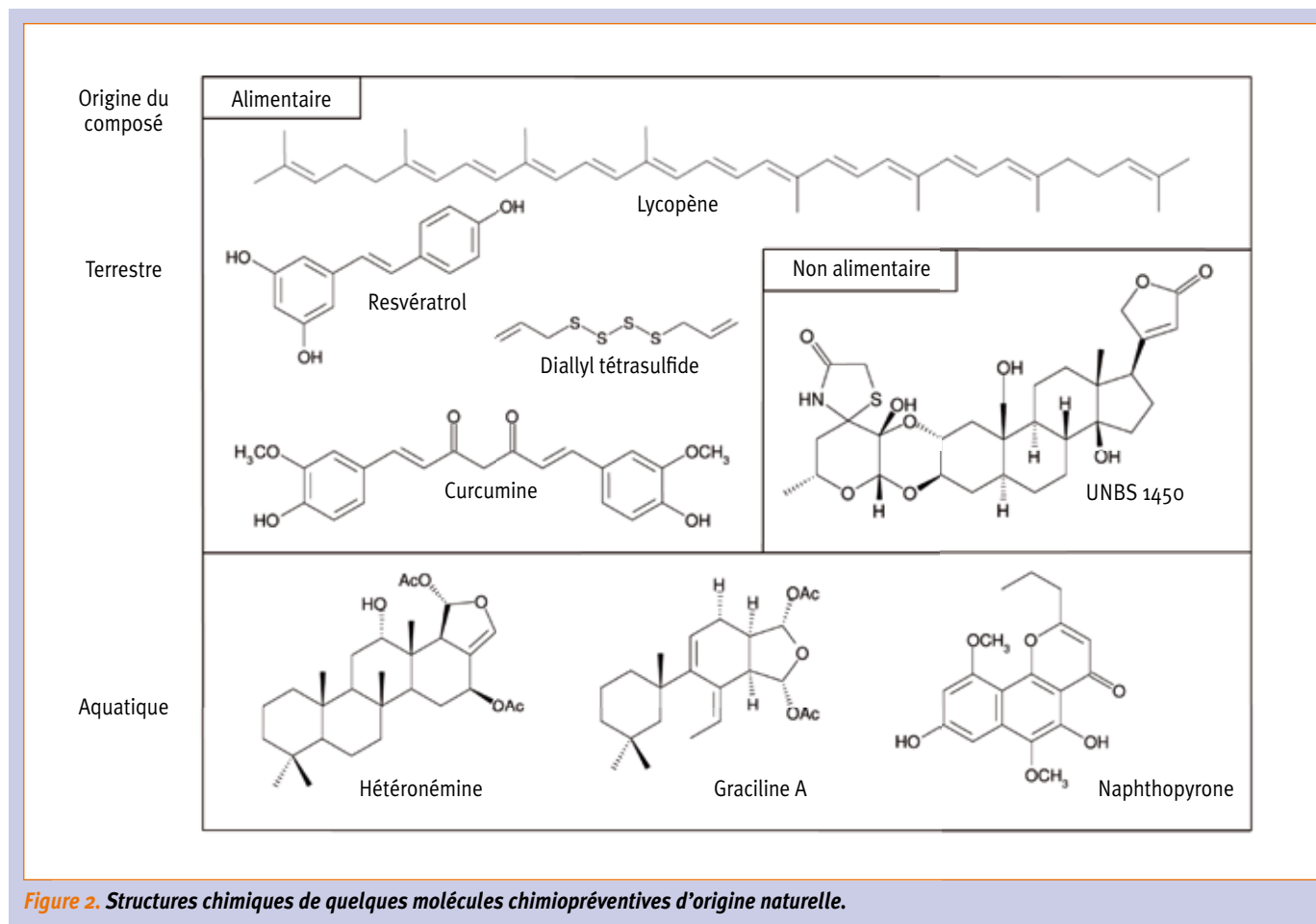


Figure 2. Structures chimiques de quelques molécules chimiopréventives d'origine naturelle.

de couleur rouge ou orange (tomates, pastèques, carottes, papayes, etc.), est surtout connu pour son potentiel chimiopréventif dans le cas du cancer de la prostate, mais il présente également un effet antiprolifératif et proapoptotique dans les lignées leucémiques EHEB et K562 (22). Une autre étude a également mis en évidence que la biodisponibilité du lycopène est bien meilleure dans la sauce tomate que dans une quantité équivalente de tomates crues ingérées. Cette nette augmentation de la biodisponibilité serait liée au hachage et à la cuisson des tomates, qui lysent énormément de cellules et permettent ainsi une plus grande libération de lycopène. L'adjonction d'huile lors de la préparation de la sauce tomate augmente également la biodisponibilité de ce métabolite secondaire chimiopréventif (23).

Ainsi, une consommation équilibrée et régulière d'aliments contenant des agents protecteurs (fruits, légumes, épices et céréales) associée à une réduction des aliments à haute teneur en matière grasse, des produits laitiers et de la viande rouge diminue de façon significative le risque de développer un cancer (24, 25) et améliore l'efficacité de nombreux traitements chimiothérapeutiques et radiothérapeutiques (4).

✓ Les produits naturels issus de végétaux à caractère non alimentaire

Les végétaux à caractère non alimentaire constituent également une source attractive de molécules présentant un potentiel chimiopréventif. Ainsi, le latex de l'arbre tropical *Calotropis procera* contient des cardénolides, substances hautement toxiques ayant la capacité d'influencer les pulsations cardiaques. Des modifications de la structure chimique de ces cardénolides permettent de diminuer leur toxicité et d'accroître leur potentiel anticancéreux. C'est, par exemple, le cas de la molécule UNBS1450 (figure 2), un cardénolide modifié qui diminue la prolifération cellulaire tout en détruisant les cellules cancéreuses par un mécanisme de mort cellulaire par autophagie (26).

Des travaux menés sur un extrait d'écorce de pin maritime commercialisé en tant que complément alimentaire (Pycnogenol®) ont évalué son effet anticancéreux sur des lignées leucémiques (HL-60, U937 et K562). Les résultats ont révélé que cet extrait réduit la prolifération cellulaire et induit notamment un arrêt du cycle cellulaire en G₀/G₁ ainsi qu'une différenciation des cellules HL-60. Ce composé provoque également la mort des

différentes lignées par apoptose via l'activation de la caspase-3 (27).

✓ Les produits naturels d'origine marine

Le monde marin regorge lui aussi de molécules à caractère chimiopréventif et à action antitumorale. Parmi ces substances marines d'origine animale ou végétale, nous pouvons citer, par exemple, l'hétéronémine, l'hémiasterline (éponges), la kahalalide F (limace de mer), les naphthopyrones (échinoderme) et les amphidinolides (algues) [28-31]. L'hétéronémine (figure 2), un sesterterpénoïde isolé à partir d'une famille d'éponges marines (*Hyrtios* sp.) est capable d'inhiber l'activation de NF-κB requise pour l'expression de gènes impliqués dans la prolifération, la survie cellulaire ainsi que dans les phénomènes de résistance aux traitements conventionnels. Cette molécule polycyclique marine est également capable d'inhiber l'activité du protéasome et d'induire la mort des cellules K562 par apoptose (32). Parmi une série de dérivés rares de diterpènes isolés à partir d'éponges (*Spongionella* sp.), tous se sont révélés dotés d'une activité cytotoxique. Ces substances testées sur des cellules mononucléées de sang périphérique se sont montrées moins cytotoxiques que vis-à-vis des cellules leucémiques K562 (33). Isolés à partir d'une extraction méthanolique d'un échinoderme originaire des îles Fidji, *Comanthus parvicirrus*, 2 naphthopyrones (figure 2) se sont révélés être des inhibiteurs de l'activation de la voie NF-κB induite par le TNFα (*Tumor Necrosis Factor α*) par inhibition de l'activité enzymatique de la kinase IKKβ (*I kappa kinase β*) dans la lignée K562 (34). D'autres études ont montré que les acétates d'éthyles, stérols et acides gras contenus dans des extraits d'algues sont capables d'inhiber la croissance des cellules des lignées leucémiques U937 et HL-60 et d'induire leur mort par apoptose grâce à la libération de substances réactives de l'oxygène (35). Les différents polysaccharides, isolés à partir de l'algue brune *Sargassum latifolium*, sont des molécules capables d'agir à tous les niveaux de la cancérogenèse. Certains sont capables d'inhiber l'enzyme P450 responsable de l'activation des carcinogènes, alors que d'autres peuvent activer l'expression d'enzymes de détoxification (glutathion S-transférases) ou induire la mort des cellules 1301 par apoptose, celle-ci résultant d'un arrêt du cycle cellulaire en phase S. Lors de ces recherches, certains polysaccharides se sont donc révélés être des

molécules dotées de propriétés anti-inflammatoires et cytotoxiques dans la lignée leucémique lymphoblastique 1301 (36). Les Diatomées, algues unicellulaires, représentent également une grande source de molécules anticancéreuses potentielles, mais qui ont été peu étudiées jusqu'à présent. Sur 10 extraits aqueux de Diatomées, tous se sont révélés capables de provoquer la mort des cellules leucémiques. Les mécanismes de mort cellulaire mis en jeu se traduisent par l'apoptose et l'autophagie procédant de l'inhibition de la protéine Bcl-2 (37).

CONCLUSION

Depuis des millénaires, les produits d'origine naturelle ont été utilisés par l'homme comme remède en médecine traditionnelle. Les recherches récentes ont révélé que de telles substances naturelles sont capables d'empêcher l'apparition et de bloquer le développement de nombreux cancers, dont les leucémies. La découverte et la caractérisation de nouvelles molécules permettront d'étoffer la pharmacothèque de molécules thérapeutiques, qui se doit de s'agrandir du fait de l'émergence de nouvelles maladies et de l'apparition de résistances à l'égard des traitements conventionnels. ■

RÉFÉRENCES

1. Anand P, Kunnumakkara AB, Sundaram C et al. Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. *Pharm Res* 2008;25:2097-116.
2. Boffetta P, Tubiana M, Hill C et al. The causes of cancer in France. *Ann Oncol* 2009;20:550-5.
3. Jankun J, Selman SH, Swiercz R et al. Why drinking green tea could prevent cancer. *Nature* 1997;387:561.
4. Singh RP, Agarwal R. Mechanisms of action of novel agents for prostate cancer chemoprevention. *Endocr Relat Cancer* 2006;13:751-78.
5. Steinmetz KA, Potter JD. Vegetables, fruit, and cancer prevention: a review. *J Am Diet Assoc* 1996;96:1027-39.
6. Surh YJ. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nat Rev Cancer* 2003;3:768-80.
7. Xu B, Monsarrat B, Gairin JE et al. Effect of ajoene, a natural antitumor small molecule, on human 20S proteasome activity in vitro and in human leukemic HL-60 cells. *Fundam Clin Pharmacol* 2004;18:171-80.
8. Cerella C, Scherer C, Cristofanon S et al. Cell cycle arrest in early mitosis and induction of caspase-dependent apoptosis in U937 cells by diallyl tetrasulfide (Al2S4). *Apoptosis* 2009;14:641-54.

9. Scherer C, Jacob C, Dicato M et al. Potential role of organic sulfur compounds from *Allium* species in cancer prevention and therapy. *Phytochemistry Reviews* 2009;8:349-68.
10. Reuter S, Charlet J, Juncker T et al. Effect of curcumin on nuclear factor kappaB signaling pathways in human chronic myelogenous K562 leukemia cells. *Ann NY Acad Sci* 2009;1171:436-47.
11. Duvoix A, Morceau F, Schnekenburger M et al. Curcumin-induced cell death in two leukemia cell lines: K562 and Jurkat. *Ann NY Acad Sci* 2003;1010:389-92.
12. Reuter S, Eifes S, Dicato M et al. Modulation of anti-apoptotic and survival pathways by curcumin as a strategy to induce apoptosis in cancer cells. *Biochem Pharmacol* 2008;76:1340-51.
13. Teiten MH, Eifes S, Dicato M et al. Curcumin - the paradigm of a multi-target natural compound with applications in cancer prevention and treatment. *Toxins* 2010;2(1):128-62.
14. Lee YK, Bone ND, Strega AK et al. VEGF receptor phosphorylation status and apoptosis is modulated by a green tea component, epigallocatechin-3-gallate (EGCG), in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2004;104:788-94.
15. Pilatova M, Sarissky M, Kutschy P et al. Cruciferous phytoalexins: antiproliferative effects in T-Jurkat leukemic cells. *Leuk Res* 2005;29:415-21.
16. Gao N, Budhraj A, Cheng S et al. Induction of apoptosis in human leukemia cells by grape seed extract occurs via activation of c-Jun NH2-terminal kinase. *Clin Cancer Res* 2009;15:140-9.
17. Surh YJ, Hurh YJ, Kang JY et al. Resveratrol, an antioxidant present in red wine, induces apoptosis in human promyelocytic leukemia (HL-60) cells. *Cancer Lett* 1999;140:1-10.
18. Li T, Wang W, Chen H et al. Evaluation of anti-leukemia effect of resveratrol by modulating SAT3 signaling. *Int Immunopharmacol* 2010;10(1):18-25.
19. Maskarinec G. Cancer protective properties of cocoa: a review of the epidemiologic evidence. *Nutr Cancer* 2009;61:573-9.
20. Hornero-Méndez DM, Mínguez-Mosquera MI. Bioaccessibility of carotenoids from carrots: effect of cooking and addition of oil. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 2007;8:407-12.
21. Shoba G, Joy D, Joseph T et al. Influence of piperine on the pharmacokinetics of curcumin in animals and human volunteers. *Planta Med* 1998;64:353-6.
22. Salman H, Bergman M, Djaldetti M et al. Lycopene affects proliferation and apoptosis of four malignant cell lines. *Biomed Pharmacother* 2007;61:366-9.

Retrouvez l'intégralité des références bibliographiques sur www.edimark.fr

Remerciements

F. Gaascht est soutenu par le Marie-Curie Initial Training Network du FP7 People Programme "RedCat" (ITN 215009). M.H. Teiten et M. Schumacher sont rémunérés par des projets Télévie (Fonds national de la recherche scientifique, Belgique). Les travaux de recherche de M. Diederich au Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire du Cancer (LBMCC) sont financés par la Fondation Recherche Cancer et Sang et par les associations Recherches Scientifiques Luxembourg, Een Häerz fir Kriibskrank Kanner, Action Lions "Vaincre le Cancer" Luxembourg et Télévie Luxembourg ainsi que par le projet Corena (Interreg IVa).

Chemopreventive potential of curcumin in prostate cancer

Marie-Hélène Teiten · François Gaascht ·
Serge Eifes · Mario Dicato · Marc Diederich

Received: 30 March 2009 / Accepted: 21 September 2009
© Springer-Verlag 2009

Abstract The long latency and high incidence of prostate carcinogenesis provides the opportunity to intervene with chemoprevention in order to prevent or eradicate prostate malignancies. We present here an overview of the chemopreventive potential of curcumin (diferuloylmethane), a well-known natural compound that exhibits therapeutic promise for prostate cancer. In fact, it interferes with prostate cancer proliferation and metastasis development through the down-regulation of androgen receptor and epidermal growth factor receptor, but also through the induction of cell cycle arrest. It regulates the inflammatory response through the inhibition of pro-inflammatory mediators and the NF- κ B signaling pathway. These results are consistent with this compound's ability to up-induce pro-apoptotic proteins and to down-regulate the anti-apoptotic counterparts. Alone or in combination with TRAIL-mediated immunotherapy or radiotherapy, curcumin is also reported to be a good inducer of prostate cancer cell death by apoptosis. Curcumin appears thus as a non-toxic alternative for prostate cancer prevention, treatment or co-treatment.

Keywords Curcumin · Prostate cancer ·
Androgen receptor · Inflammation · Apoptosis

Introduction

Prostate diseases are among the most common malignancies in men in the Western world and prostate cancer is the

third cause of death from cancer in men. There is a huge difference in the rate of incidence of prostate cancer between Western (120 per 100,000 in Northern America) and East Asian countries (less than 10 per 100,000 in Asia) [82]. Moreover, when Asian people migrate to Western countries, their rate of prostate cancer incidence increases. This supports the idea that lifestyle, aspects of the diet and environmental factors as well as genetic factors promote prostate cancer development [49, 84, 116]. Current therapies (radical prostatectomy, chemotherapy, local radiotherapy, or hormoneotherapy), although successful to treat localized, androgen-dependent, prostate cancer are of limited efficacy against androgen-independent, metastatic disease [42]. Novel treatment modalities are therefore needed to treat hormone-resistant tumors and to prevent progression of hormone-sensitive prostate cancer to the hormone-refractory stage. Primary prevention appears as an attractive strategy to eradicate prostate cancer if one considers the high prevalence of prostate cancer and the slow progressive development of healthy prostatic epithelium to dysplasia, prostatic intraepithelial neoplasia (PIN), locally invasive adenocarcinoma and finally, metastatic disease [16, 68].

Chemoprevention with dietary phytochemicals

Chemoprevention is a prophylactic method using non-toxic natural or synthetic compounds that reverse, inhibit, or prevent the development of cancer by inhibiting specific molecular steps in the carcinogenic pathway. The goal of chemoprevention consists in the decrease of cancer incidence, by reducing simultaneously both treatment-related side effects and mortality. Most of these natural substances are present in food, notably in fruits and vegetables. These

M.-H. Teiten · F. Gaascht · S. Eifes · M. Dicato ·
M. Diederich (✉)
Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire du Cancer,
Hôpital Kirchberg, 9 rue Edward Steichen, 2540 Luxembourg,
Luxembourg
e-mail: marc.diederich@lbmcc.lu

chemopreventive agents regulate cell proliferation, cell survival or cell death as well as angiogenesis, and development of metastasis [33, 99, 107].

Curcumin

Curcumin or diferuloylmethane, a polyphenolic molecule extracted from the rhizome of the plant *Curcuma longa*, is a promising chemopreventive compound. This natural compound is a yellow spice used as curry ingredient and is used since centuries in Ayurvedic, Chinese, and Hindu medicine systems as a potent anti-inflammatory agent. It is under investigation since several years for its major mechanisms of action and functions [3, 48, 51]. The reported studies revealed that curcumin possesses anti-oxidant [11, 56, 86], anti-inflammatory [71, 109], anti-proliferative [40, 85], and anti-angiogenic [13, 117] properties against several cancer cell types [3, 62] and also demonstrates anti-microbial activities [24, 26]. Nowadays, curcumin is under clinical trials mainly for cancer and related diseases (Tables 1, 2) [34, 59]. Interestingly, phase I clinical trials already demonstrated the safety of curcumin even at high doses (12 g/day); the clinical advancement of this promising natural compound is hampered by its poor water solubility and short biological half-life, resulting in low bioavailability in both plasma and tissues [5]. In fact, after oral administration of free curcumin (up to 12 g/day), only nanomolar concentrations of curcumin or corresponding metabolites were found in patient serum [23, 45]. A more recent phase II clinical study has pointed out that these low concentrations of curcumin were able to reach a similar biological impact on NF- κ B, COX-2 and phosphoSTAT-3 in peripheral blood mononuclear cells derived from treated patients than the ones observed in vitro with 5–50 μ M of curcumin [34, 65]. The poor bioavailability of curcumin as well as its high hydrophobicity should be overcome for future clinical applications and i.v. administration of curcumin.

Curcumin safety and bioavailability

The potential safety of curcumin was initially demonstrated in animal models [93] and was confirmed by pharmacokinetic studies carried out in healthy human volunteers [63]. These studies revealed a high tolerance to curcumin (0.5–12 g) administered orally with only few side effects (nausea, diarrhea). No free curcumin was found in the plasma of patients but glucuronide and sulfate conjugates could be detected [115]. Phase I clinical trials conducted in high-risk patients with pre-malignant or malignant lesions also presented curcumin as a safe and well-tolerated molecule even at high doses during several months [21, 23, 94, 95].

Albeit its high safety, the clinical advancement of curcumin has been hindered by its low solubility and its low bioavailability after oral administration (only 51.2 ng/ml in human serum after 12 g administered orally) [5]. The low solubility (11 ng/ml in aqueous buffer pH 5.0) [113] is responsible for the poor absorption of curcumin by the human digestive tract. The low bioavailability of curcumin seems to be linked to its poor absorption, rapid metabolism, and rapid systemic elimination from the organism. In fact, the intestinal tractus is equipped with specific enzymes (UDP-glucuronosyltransferase, sulfotransferase, alcohol dehydrogenase, and p450) able to convert curcumin in relative inactive substances [57]. In order to overcome these limitations, several approaches have been tested. They include the combination of curcumin with adjuvants (e.g. piperine), and the development of delivery vehicles consisting of liposomes, nanoparticles, and phospholipid formulations of curcumin.

Curcumin analogs and structure-related activity

The comparison of curcumin with its naturally occurring analogs, corresponding to its demethoxy derivatives (demethoxycurcumin, bisdemethoxycurcumin) and to its active hydrogenated metabolites (tetrahydrocurcumin,

Table 1 Completed clinical trials with curcumin in patients affected by cancer

Subjects	Cancer type	Dose	References
10 volunteers	Healthy	500 mg/day for 1 week	Soni and Kuttan [103]
25 patients	Pre-malignant lesions	500–12,000 mg/day for 3 months	Cheng et al. [23]
15 patients	Advanced colorectal cancer	18 mg	Plummer et al. [83]
15 patients	Colorectal cancer	36–180 mg	Sharma et al. [95]
15 patients	Advanced colorectal cancer	450–3,600 mg/day for 4 months	Sharma et al. [94]
12 patients	Hepatic metastases from colorectal cancer	450–3,600 mg/day for 1 week	Garcea et al. [45]
12 patients	Colorectal cancer	450–3,600 mg/day for 1 week	Garcea et al. [46]
24 volunteers	Healthy	500–12,000 mg/day	Lao et al. [63]
17 patients	Advanced pancreatic cancer	8,000 mg/day for 2 months	Dhillon et al. [34]

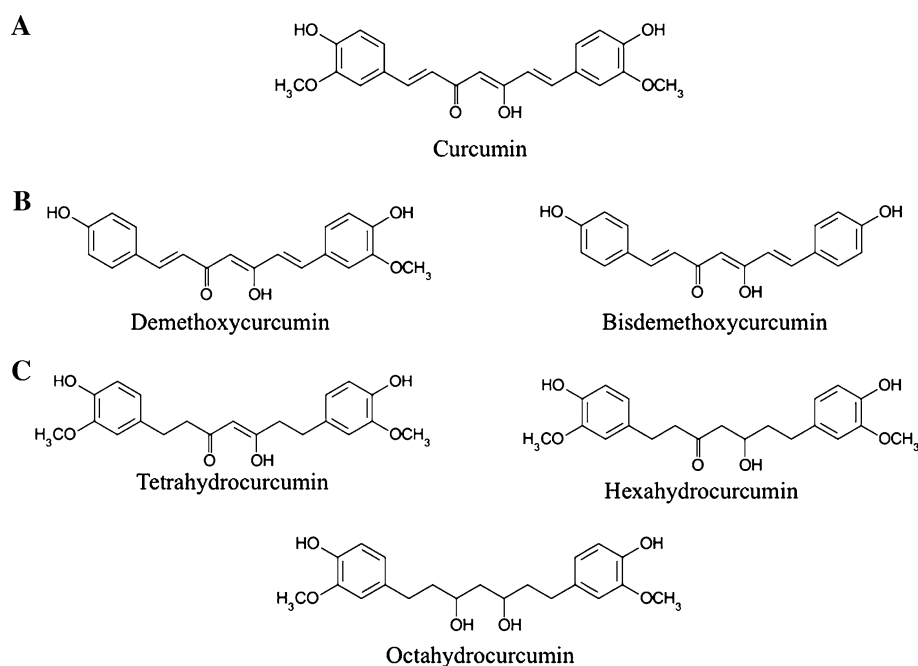
Table 2 Ongoing clinical trials involving curcumin in patients affected by cancer

Status	Trial name	Disease	Treatment applied	Clinical phase study
Active, not recruiting	Curcumin (diferuloylmethane derivative) with or without bioperine in patients with multiple myeloma	Multiple myeloma	Curcumin; bioperine	nd
Recruiting	Curcumin with pre-operative capecitabine and radiation therapy followed by surgery for rectal cancer	Rectal cancer	Radiation: radiotherapy; capecitabine; curcumin; placebo	Phase II
Recruiting	Curcumin for prevention of oral mucositis in children chemotherapy	Chemotherapy induced mucositis	Curcumin liquid extract	Phase III
Completed	Pharmacokinetics of curcumin in healthy volunteers	Healthy	Curcumin	nd
Active, not recruiting	Trial of curcumin in advanced pancreatic cancer	Adenocarcinoma; pancreatic neoplasms	Curcumin	Phase II
Active, not recruiting	Curcumin in preventing colon cancer in smokers with aberrant crypt foci	Colorectal cancer; precancerous/nonmalignant condition	Dietary supplement: curcumin	Phase II
Not yet recruiting	Bio-availability of a new liquid tumeric extract	Healthy	Liquid tumeric/curcumin extract	Phase I
Recruiting	Pilot study of curcumin formulation and Ashwagandha extract in advanced osteosarcoma	Osteosarcoma	Dietary supplement: curcumin powder, Ashwagandha extract	Phase I and II
Recruiting	Gemcitabine with curcumin for pancreatic cancer	Pancreatic cancer	Curcumin (+gemcitabine)	Phase II
Not yet recruiting	Phase III trial of gemcitabine, curcumin and celebrex in patients with metastatic colon cancer	Colon Neoplasm	Celecoxib; curcumin	Phase III
Suspended	Curcumin for treatment of intestinal adenomas in familial adenomatous polyposis (FAP)	Familial adenomatous polyposis	Dietary supplement: curcumin; dietary supplement: placebo	Phase II
Recruiting	Curcumin for treatment of intestinal adenomas in familial adenomatous polyposis (FAP)	Familial adenomatous polyposis	Curcumin	nd
Terminated	Use of curcumin in the lower gastrointestinal tract in familial adenomatous polyposis patients	Familial adenomatous polyposis	Curcumin	Phase II
Recruiting	Phase III Trial of Gemcitabine, Curcumin and Celebrex in patients with advance or inoperable pancreatic cancer	Pancreatic cancer	Gemcitabine; Curcumin; Celebrex	Phase III
Completed	Curcumin for the prevention of colon cancer	Colorectal cancer	Dietary supplement: curcumin	Phase I
Completed	The effects of curcuminoids on aberrant crypt foci in the human colon	Aberrant crypt foci	Sulindac; curcumin	nd
Not yet recruiting	A nutritional supplement capsule containing curcumin, green tea extract, polygonum cuspidatum extract, and soybean extract in healthy participants	Healthy, no evidence of disease	Dietary supplement: curcumin/green tea extract/Polygonum cuspidatum extract/soybean extract capsule	nd
Suspended	Sulindac and plant compounds in preventing colon cancer	Colorectal cancer	Dietary supplement: curcumin, rutin Drug: quercetin, sulindac	nd
Recruiting	Curcumin for the chemoprevention of colorectal cancer	Adenomatous polyps	Curcuminoids	Phase II
Recruiting	Effect of oral curcumin on Heme-1 (HO-1) in healthy male subjects	Healthy	Dietary supplement: curcumin	Phase I

The table was generated by using the registry of federally and privately supported clinical trials conducted in the United States and around the world (<http://clinicaltrials.gov>)

nd non-defined

Fig. 1 Chemical structure of curcuminoids. Curcumin (a), Curcumin demethoxy derivatives (Demethoxycurcumin and Bisdemethoxycurcumin) (b) and Curcumin hydrogenates metabolites (Tetrahydrocurcumin, Hexahydrocurcumin and Octahydrocurcumin) (c)



hexahydrocurcumin and octahydrocurcumin) (Fig. 1) pointed out structure–activity correlations. In fact, these studies revealed that the high number of *ortho*-methoxy substitutions and the high level of hydrogenation of the heptadiene moiety of curcumin are responsible for the high radical scavenging potential of the curcuminoids [86, 101]. In contrast, the highest anti-inflammatory and anti-tumoral potential of curcuminoids are related to the lowest hydrogenation, to the highest level of unsaturation of the diketone moiety, and to the highest methoxylation status of the molecules [106].

Structure–activity relationships were taken into account in order to design synthetic analogs with enhanced bioactivities [6]. The modification of the basic structure of curcumin can be achieved by acetylation, alkylation, and glycosylation of the phenolic hydroxyl group as well as by alterations of the number of carbons in the middle linker chain. Glycosylation of the curcumin aromatic ring provides a more water-soluble compound with a greater kinetic stability and a good therapeutic index [43].

Several curcumin analogs have also been designed and evaluated as potential androgen receptor antagonists to be used against androgen-dependent and -independent prostate cancer cells. These experiments revealed that the co-planarity of the β -diketone moiety and the presence of strong hydrogen bond donor group were crucial for the anti-androgenic activity of these curcumin analogs. By this way, these curcumin analogs seem to be good candidates to control androgen–receptor mediated prostate cancer growth as they may function as 17α -substituted dihydrotestosterone [81]. Following studies established an advanced structure–activity relationship for the design of new curcumin analogs

to be used as potential anti-prostate cancer agents. First, the aromatic rings are required for the cytotoxic and anti-androgenic activities. The C-2' positions of the phenyl rings should be unsubstituted. The C-3' and C-4' positions should be substituted with 3' and 4'-dimethoxy and 3'-methoxy-4'-hydroxy substituents on the phenyl ring. Elongation of the linkers results in the loss of cytotoxicity and anti-androgenic activity. Finally, an unsaturated and conjugated linker is required for the cytotoxic and anti-androgenic activities [69]. Recent synthesis led to the design of a highly specific analog, containing a pentadienone moiety. It was reported to be 50 times more potent than curcumin to inhibit the growth of androgen-dependent and -independent prostate cancer cells with IC50 values in sub-micromolar range [44].

Curcumin formulations

To enhance the bioavailability of curcumin and to bring this natural compound to the forefront of therapeutic agents, numerous other approaches have been investigated [6].

The use of adjuvant like piperine (that inhibits UGTs and p450s), quercetin (that inhibits sulfotransferases) and genistein (that inhibits alcohol dehydrogenase) are mainly used to counteract the enzymes implicated in curcumin metabolism. Piperine from black pepper increases the bioavailability of curcumin by 154% in rats and by 2000% in humans without adverse effects [97].

On the other hand, nanoparticles, liposomes [77], micelles [64], and phospholipid complexes appear also as promising novel formulations as they provide longer circulation, lower hydrophobicity, better permeability of

membrane barriers, and resistance to metabolic stress [5]. Curcumin encapsulated in polymeric nanoparticles demonstrates in vitro therapeutic efficacy and mechanisms of action (induction of apoptosis, inactivation of NF- κ B...) comparable to free curcumin, but with a higher solubility in aqueous media [15]. Moreover, the bioavailability of encapsulated curcumin appears to be ninefold increased when compared to curcumin administered with piperine as absorption enhancer [89]. Evaluation of liposomal curcumin pointed out that this nanotechnology increases the anti-proliferative properties of curcumin in prostate cancer cells with tenfold lower dose compared to free curcumin [110].

Curcumin: a chemopreventive agent for prostate cancer

Curcumin is a highly pleiotropic molecule that modulates numerous cell signaling pathways implicated in the growth and survival of several cancer cell types, including prostate cancer [1]. In the following we report the state-of-the-art concerning the chemopreventive potential of curcumin on the different stages of prostate cancer and the signaling pathways implicated (Figs. 2, 3). Curcumin was effectively shown to have a positive impact against non-cancerous chronic bacterial prostatitis [18], androgen sensitive LNCaP and 22rv1, but also against androgen-independent

DU145, and bone metastatic LNCaP-derivative C4-2B prostate cancer cells.

Down-regulation of the androgen receptors and co-factors

Androgens, including testosterone and their corresponding androgen receptors (AR), are essential for the morphogenesis and development of the prostate but are also involved into the malignant transformation of this gland [87]. Hormonotherapy by androgen depletion was thus considered as a potential treatment to eradicate prostate cancer. Unfortunately, these therapies are often ineffective as prostate cancer cells become progressively androgen-independent and lead to metastasis [42]. Uncontrolled AR gene amplification, AR mutations, and increase of AR expression appear to be a selective driving force for the progression of prostate cancer to the hormone refractory state. Curcumin was shown to have an influence on the expression level of typical prostate marker proteins. In fact, in response to curcumin treatment, the AR expression was strikingly down-regulated as well as the AR binding activity to the androgen response element of the prostate-specific antigen protein (PSA) gene, and the PSA expression in LNCaP cells [38, 76, 114]. This phenomenon is expected to deprive these cells of a critical growth advantage and classifies thus this phytochemical as a

Fig. 2 Molecular events targeted by curcumin at different stages of prostate cancer development

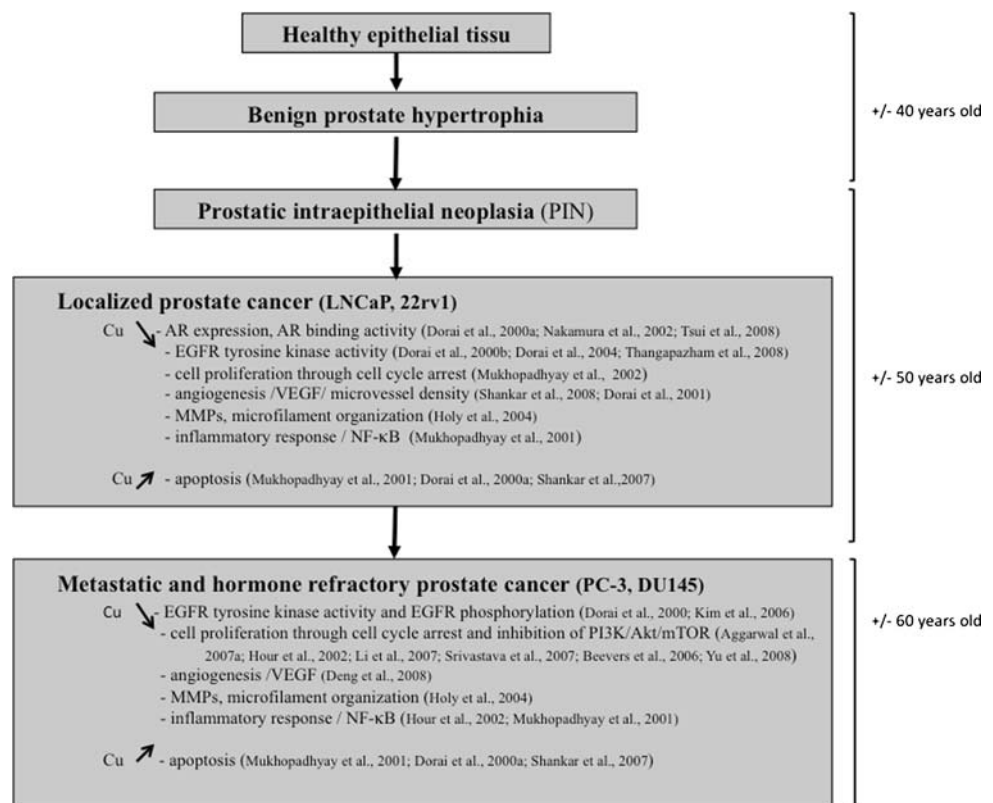
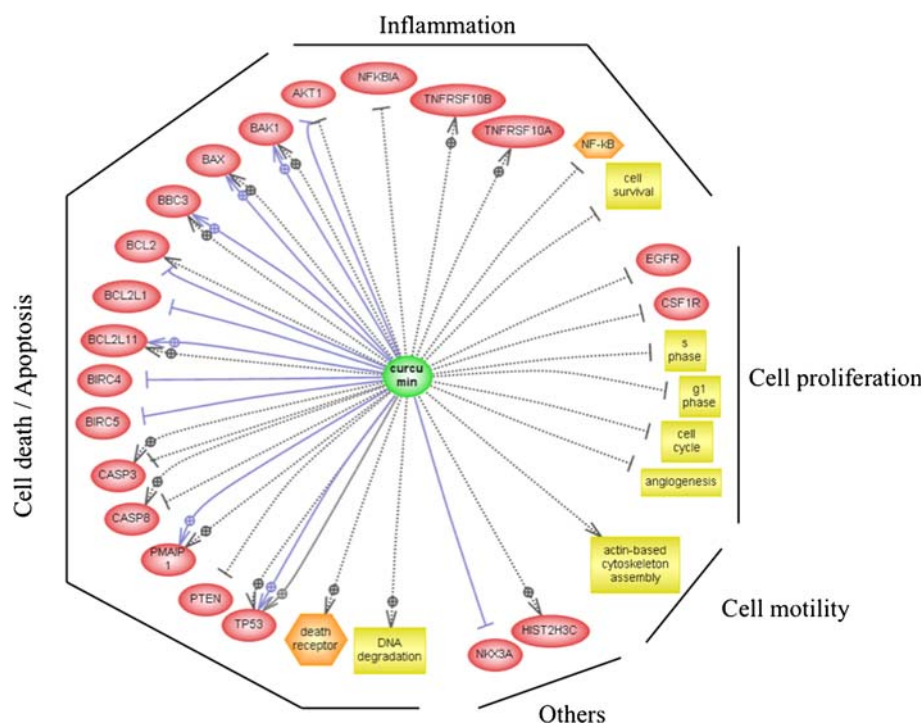


Fig. 3 Network of proteins, functional classes and cell processes modulated in prostate cancer cells after curcumin treatment. All of these data were extracted from PubMed abstracts using the MedScan Reader software (version 1.1) [25, 80] and then imported to the Pathway Studio software tool (Version 5.0) [78] for visualization. Nodes correspond to proteins (in red), functional classes (in orange). Lines represented the different types of interactions and relationships between the corresponding nodes and curcumin: expression (in black), regulation (in blue). Arrow line represented induction/activation, blunt-ended line represented repression/inactivation



non-toxic approach to the management of AR-dependent prostate cancer [38]. Several analogs of curcumin were also shown to act as androgen receptor antagonists [81]. Such a downregulation of AR expression and the blockage of its DNA binding activity by curcumin lead also to the inhibition of the homeobox gene NKX3.1 [119], an androgen-regulated NK-class homeobox gene thought to play an important role in normal prostate organogenesis and carcinogenesis [14].

Impact on prostate cancer cell proliferation

The inappropriate and accelerated proliferation of cancer cells is linked not only to the over-expression of epidermal growth factor receptor (EGFR), to modifications of the balance between the cell cycle checkpoint and the different cyclins, but also to the deregulation of specific signaling pathways (Fig. 4).

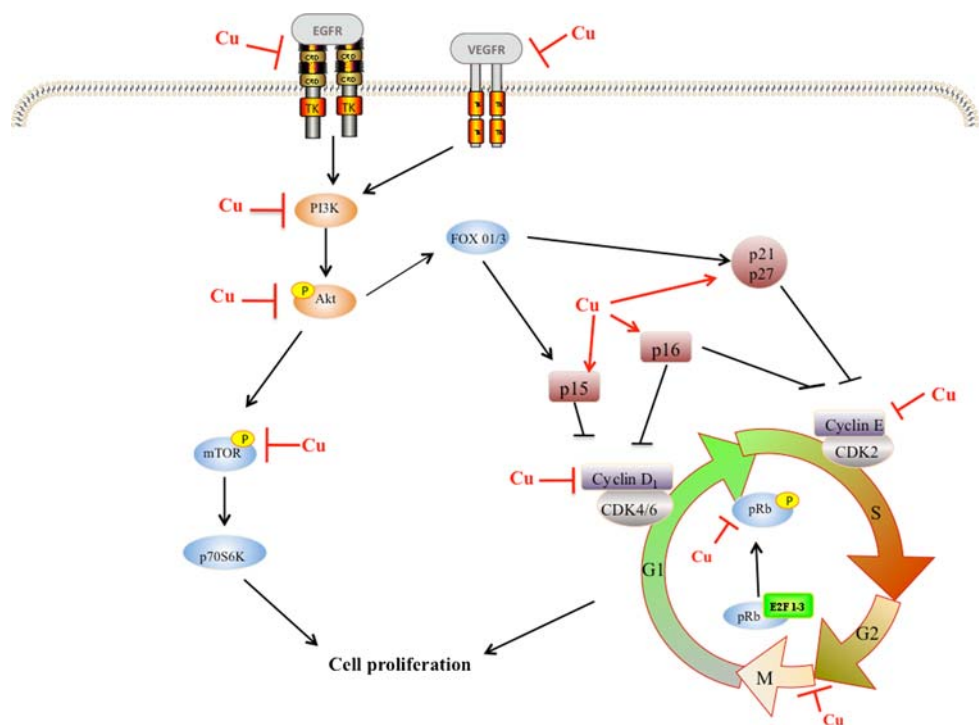
The EGFR family, including HER2, is an important mediator of cell proliferation and is highly expressed in prostate cancer cells in which it is associated with poor prognosis [41]. Experiments performed on LNCaP and PC-3 cells revealed that curcumin is a potent inhibitor of EGFR signaling as it down-regulates the EGFR expression, inhibits the EGFR tyrosine kinase activity and the ligand-induced activation of the EGFR [39]. This polyphenolic compound was also shown to suppress the EGFR phosphorylation (Y845 and Y1068) in PC-3 cells [61]. Such results were confirmed by clustering methods and functional classification of the curcumin–gene expression profile that revealed that curcumin is

able to down-regulate EGFR in LNCaP cells [111], and in cells derived from LNCaP with high metastatic potential in which it also inhibits the EGFR tyrosine kinase activity [37].

Curcumin was also shown to have an impact on cyclins implicated in the cell cycle. Cyclin D1, for instance, is a proto-oncogene that plays an important role in cell proliferation through the activation of cyclin-dependant kinases and is required for the progression of cells from the G1 to the S phase. Curcumin was shown to down-regulate cyclin D1 expression through activation of both transcriptional and post-transcriptional mechanisms in LNCaP prostate cancer cells [74]. Such a cell cycle arrest in G1/S phase was also observed in DU145 and PC-3 cells not only through the up-regulation of the expression of cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitors p16, p21, and p27 and the inhibition of the expression of cyclin E, cyclin D1, but also through the hyperphosphorylation of retinoblastoma (Rb) protein [104]. The down-regulation of cyclin E was shown to be mediated by the proteasome [2]. These effects lead to cell proliferation arrest and disruption of cell cycle control resulting in cell death by apoptosis. Others studies showed that curcumin induces an arrest in G2/M phase in PC-3 and LNCaP cells [96].

The anti-proliferative property of curcumin was confirmed in vivo by the observation of the growth of LNCaP cells tumors heterotypically implanted in nude mice. BrDU incorporation assays revealed that curcumin causes a marked decrease in the extent of prostate cell proliferation in mice [36], which is consistent with the observed induction of p21 and p27 and the inhibition of cyclin D1 [91].

Fig. 4 Curcumin's targets intracellular components implicated in cell proliferation signaling pathway in prostate cancer cells. Curcumin highly repressed the EGFR and VEGFR signaling pathways as well as cyclins implicated in cell cycle regulation in prostate cancer cells. *Arrow line* represented induction/activation and *blunt-ended line* represented repression/inactivation. This figure was generated by using ScienceSlides software with modifications



The phosphatidylinositol 3-kinase (PI3 K)/Akt (protein kinase B)/mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling plays a central role in tumorigenesis and is often deregulated in metastatic prostate cancers through the mutation of the phosphatase and tensin homolog (PTEN) leading to the constitutive activation of Akt [20, 105]. Curcumin was shown to inhibit the phosphorylation of mTOR in DU145 [12] and PC-3 [66]. Other studies explored the molecular mechanisms implicated and revealed that curcumin activates the PP2A serine/threonine protein phosphatase and subsequently inhibits the phosphorylation of Akt/PKB, mTOR, and their downstream substrates in a concentration- and time-dependent manner in PC-3 cells leading thus to the inhibition of cell proliferation [118]. Curcumin was shown to inhibit the expression of phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K) p110 and p85 subunits, and phosphorylation of Ser 473 AKT/PKB [92].

In order to stop the growth of solid tumors, it is important to block angiogenesis and its major mediator, vascular endothelial growth factor (VEGF), highly associated with metastasis development [67]. In fact, VEGF facilitates the entry of tumor cells into the blood stream and the development of distant metastasis by enhancing the hyper-permeability of vessels, the endothelial cell proliferation, and migration. VEGF is known to be highly involved in prostate cancer development [31]. Curcumin was shown to inhibit angiogenesis *in vitro* and *in vivo* [10] by suppressing the proliferation of human endothelial cells [98] and by abrogating the fibroblast growth factor-2-induced angiogenic response *in vivo* [73]. The effect of

curcumin on the regulation of angiogenesis revealed that this natural compound down-regulates the expression of pro-angiogenic genes (*angiopoietin 1*, *angiopoietin 2*, *VEGF* and *Kinase Domain Region (KDR)*) in HUVECs and EAT cells [50]. Due to the presence of NF- κ B binding sites on the promoter of *KDR* gene [55], the downregulation of *KDR* gene expression could be explained by the inhibitory activity of curcumin on NF- κ B signaling.

Deng et al. [32] have reported that curcumin reduces the expression of VEGF mRNA and proteins in PC-3 cells. Similar results were obtained with LNCaP xenografts growing in nude mice in which curcumin decreased the number of VEGF receptor-2 positive endothelial cells and VEGF protein expression [91] and also the microvessel density [36].

Prevention of prostate cancer cell motility and metastasis

Highly proliferative prostate cancer cells also acquire the ability to invade surrounding tissues. Curcumin was shown to induce a marked reduction of matrix metalloproteinases (MMPs) MMP-2 and MMP-9 activity leading to a reduction of metastatic nodules in tumor-bearing mice as MMPs are known to be important prerequisite for tumor invasion and metastasis [53].

Moreover, the propensity of prostate cancer cells to establish osseous metastasis is wide as these cells are able to acquire “bone-like” properties that are facilitated by several surrounding factors. Curcumin is also able to

counteract this potential as it was shown to inhibit the ligand-stimulated autophosphorylation of EGF-R and CSF1-R (colony stimulating factor 1 receptor) that were crucially involved in the development of osteomimetic properties of prostate cancer C4-2B cells. This natural compound is also able to inhibit the expression of the core-binding factor α -1 that is responsible for the expression of several bone-specific proteins. By this way, curcumin could inhibit the growth factor collaboration between the prostate cancer cells and the osteoblast/stromal cells in order to prevent the establishment of bone metastasis [37].

Using time-lapse video and immunofluorescence, curcumin was shown to significantly alter microfilament organization and cell motility in PC-3 and LNCaP human prostate cancer cells in vitro [52]. Curcumin increases stress fibers and the overall quantity of f-actin and also appears to be a potential inhibitor of angiogenesis and metastasis in prostate cancer.

The regulation of metastasis by curcumin was confirmed in vivo as the treatment of xenograft nude mice with curcumin results in the inhibition of MMPs and urokinase-type Plasminogen Activator (uPA) expression normally associated with the metastatic potential of prostatic cells [91].

Regulation of the inflammatory response

Inflammation emerges as a major risk factor for the development of prostate cancer and is associated with poor prognosis of treatment. In parallel, modulation of cellular signaling involved in inflammatory response (TNF α /NF- κ B) seems to be an important strategy for chemoprevention. The anti-inflammatory potential of curcumin was first described by Aggarwal and coworkers. They pointed out that curcumin inhibits the nuclear transcription factor- κ B (NF- κ B) activation through the inhibition of I κ B α proteasomal degradation and thereby the nuclear translocation of p65 subunit [100]. Further investigations of curcumin mechanism of action revealed that the inhibition of p65 nuclear translocation was due to the sequential suppression of I κ B α kinase activity, I κ B α phosphorylation, I κ B α degradation, p65 phosphorylation, p65 nuclear translocation, and p65 acetylation. Curcumin was also reported to inhibit the subsequent NF- κ B-regulated gene expression through the inhibition of IKK and Akt activation [4]. Such an inhibitory effect of curcumin on NF- κ B activation was reported to be linked to the impairment of the proteasome function by curcumin [35, 72].

In prostate cancer cell lines and in patients affected by prostate cancer, curcumin was shown to be a promising regulator of many proteins implicated in the regulation of the inflammatory response, especially as a potent inhibitor of the constitutively activated or TNF α -induced NF- κ B [54, 75]. Mechanistic studies revealed that curcumin

inhibits the expression of NF- κ B expression by blocking the phosphorylation of I κ B α and its degradation by the proteasome [28], but also by suppressing the phosphorylated Akt kinase in prostate cancer cell lines [27].

Curcumin also up-regulates the mitogen-activated protein kinase phosphatase-5 (MKP5) [79]. This protein selectively dephosphorylates the jun N-terminal kinase (JNK) and stress-activated protein kinase p38, that is a mediator of cellular pro-inflammatory responses, known to contribute to prostate cancer development. Downstream anti-inflammatory effects of p38 inhibition can include decreased activation of NF- κ B, reduced COX-2 expression and decreased the production of pro-inflammatory cytokines such as IL-6, an autocrine growth factor for prostate cancer [47]. The subsequent decrease of COX-2 is highly relevant for prostate cancer eradication as high constitutive levels of COX-2 expression are considered as survival factors for prostate cancer [70]. So, this up-regulation of MPK5 may thus subsequently decrease pro-inflammatory signaling in both normal prostatic epithelial cells and prostate cancer cells (Fig. 5).

Induction of prostate cancer cell death by apoptosis

Prostate cancer cells express several anti-apoptotic proteins that play an important role in cell survival and resistance to conventional treatment. Using curcumin seems really interesting as this natural compound was shown to induce apoptosis in both androgen-dependent and androgen-independent prostate cancer cells (Fig. 6).

In several cancers, curcumin was shown to induce apoptosis not only through intrinsic (mitochondrial) and extrinsic (receptor-mediated) pathways but also through increased stress of the endoplasmic reticulum [60, 85]. The intrinsic induction of apoptosis by curcumin is activated in response to cellular signals including stress or DNA damage. It implicates the up-regulation of pro-apoptotic proteins from the Bcl-2 family (Bim, Bax, Bak, Puma and Noxa) and the down-regulation of anti-apoptotic proteins (XIAP, Bcl-2, Bcl-xL). This leads to the opening of permeability transition pore, the release of cytochrome c, the activation of the apoptosome (caspase-9/apaf-1/cytochrome c) and the subsequent cleavage of caspase-3, -6 and -7, Poly (ADP-ribose) polymerase (PARP), and finally the death of cells [19, 102, 112]. After curcumin treatment, the extrinsic pathway is initiated by the activation of receptors (Fas, TRAIL) at the cell surface [9, 17]. This leads to the assembly of the DISC (death-inducing signaling complex) containing Fas, FAD, and caspase-8 and -10. These activated caspases converged then to the intrinsic pathway by the induction of Bid cleavage and the subsequent release of cytochrome c, and the activation of the cascade of caspases.

Fig. 5 Effect of curcumin on intracellular network implicated in inflammation signaling in prostate cancer cells. Curcumin regulates mainly proteins implicated in NF- κ B and AP-1 signaling. *Arrow line* represented induction/activation and *blunt-ended line* represented repression/inactivation. This figure was generated by using ScienceSlides software with modifications

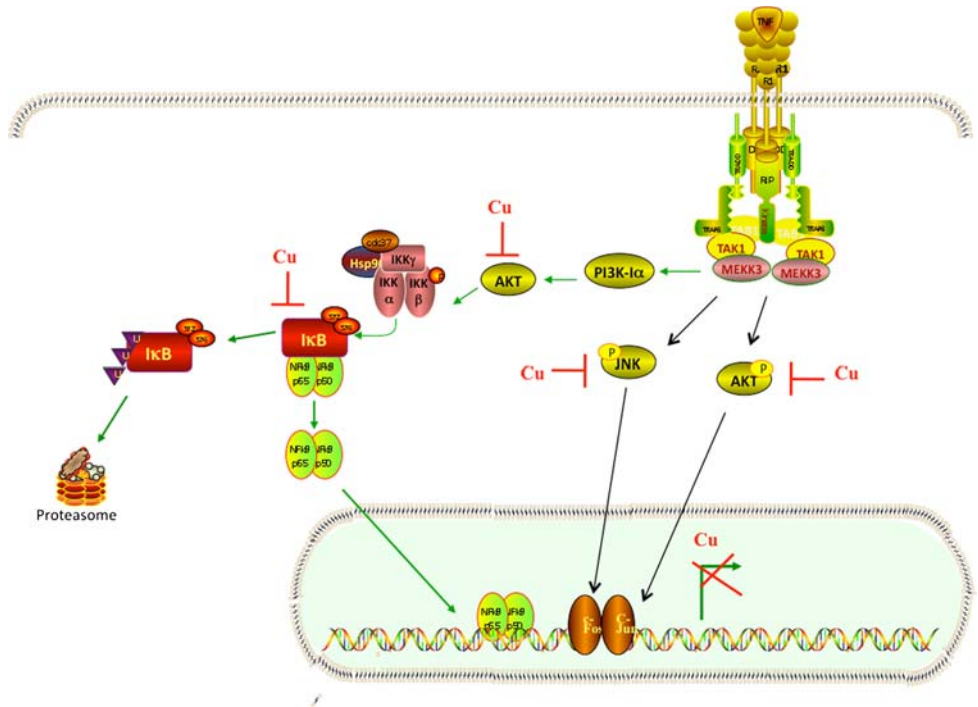
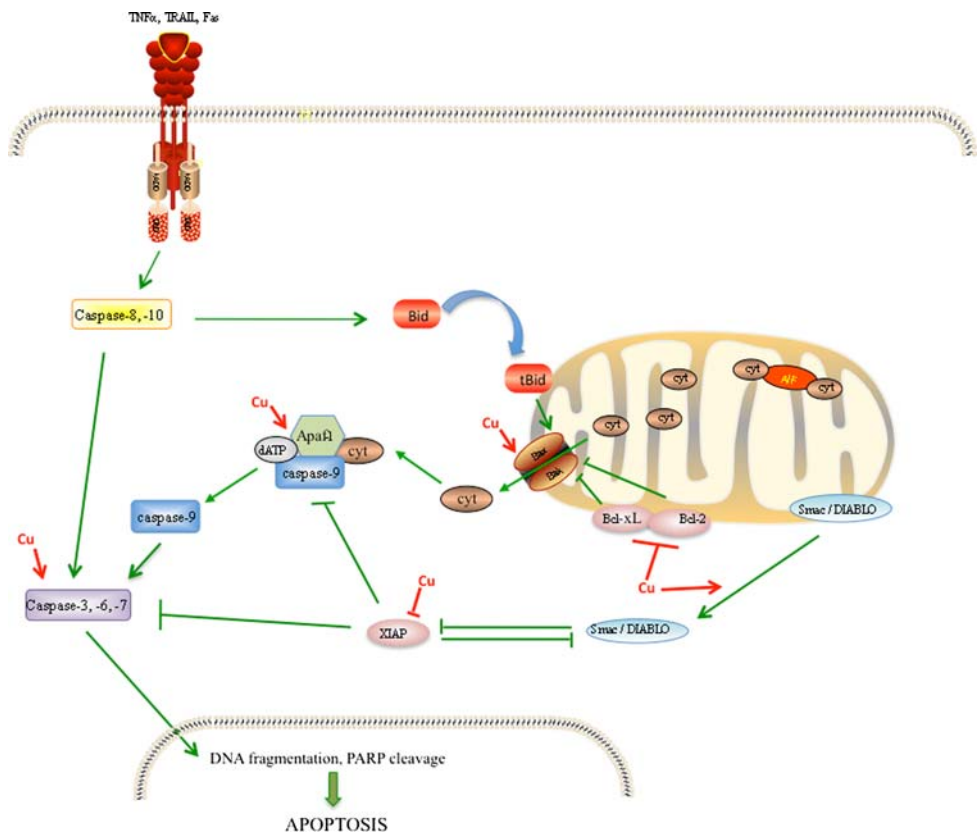


Fig. 6 Impact of curcumin on molecules implicated in signaling pathways leading to prostate cancer cell death by apoptosis. Curcumin appears as a good inhibitor of anti-apoptotic proteins (Bcl-2, Bcl-xL, XIAP) and as a good inducer of pro-apoptotic proteins (Bax, Bak), of the release of cytochrome c, and of the cascade of caspases. *Arrow line* represented induction/activation and *blunt-ended line* represented repression/inactivation. This figure was generated by using ScienceSlides software with modifications



In the case of prostate cancer, several studies revealed that this natural compound is able to down-regulate apoptosis suppressor protein such as Bcl-2 and Bcl-xL and to induce the cleavage of PARP and the appearance of

apoptotic figures [38, 75]. Other experiments were performed to analyze the cascade of events leading to apoptosis after curcumin treatment of prostate cancer cells. They pointed out that curcumin treatment results in the

translocation of Bax and p53 to mitochondria, the production of reactive oxygen species, a decrease of mitochondrial membrane potential, the release of cytochrome c, Smac/DIABLO, and the activation of caspase-3. They concluded that Akt plays an important role in modulating the direct action of p53 on the caspase-dependent mitochondrial death pathway and they suggested that these important biological molecules interact at the level of the mitochondria to influence curcumin sensitivity [92]. Curcumin also down-regulates murine double minute 2 (MDM2) protein and mRNA, an important negative regulator of the p53 tumor suppressor allowing thus prostate cancer cells to undergo apoptosis [66]. The pro-apoptotic potential of curcumin was confirmed in vivo in nude mice implanted heterotopically with LNCaP cells [36].

Experiments performed on cervical cancer HeLa and neuroblastoma Neuro2a cells reported that the induction of apoptosis by curcumin, through mitochondrial pathway involving caspase-9 activation, could also be mediated through the impairment of the ubiquitin–proteasome system [58].

Curcumin also appeared to be a good candidate to sensitize prostate cancer cells for TRAIL-mediated immunotherapy. TNF α related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) is an inducer of apoptosis in many cancer cells and is an attractive cytokine for the treatment of advanced cancers including prostate cancer. Although prostate cancer cells (DU145, PC-3 and LNCaP) are mostly resistant to TRAIL, they can be sensitized with curcumin to TRAIL-induced apoptosis [28, 29, 90]. In fact, the combined curcumin and TRAIL treatment induced DNA fragmentation, the cleavage of pro-caspase-3, pro-caspase-8 and pro-caspase-9, as well as the truncation of Bid and cytochrome c release [29, 30, 90]. This chemosensitization to TRAIL involved the inhibition of constitutively active NF- κ B through the suppression of I κ B α phosphorylation [28]. It was also related to the down-regulation of p-Akt, which leads to the inhibition of Akt-regulated NF- κ B-dependent antiapoptotic Bcl-2, Bcl-xL and XIAP [27]. These results were confirmed by pre-clinical studies performed in PC-3 xenografts [8] and in TRAIL-resistant LNCaP xenografts [91].

Moreover, curcumin used in combination with radiation enhanced significantly the radiation-induced clonogenic inhibition and induced apoptosis. The combination of treatment alters the Bax/Bcl2 ratio but activates cytochrome c, caspase-9 and caspase-3. This means that curcumin exhibits also a potent radiosensitizing effect in prostate cancer [22].

Conclusion

The initiation of prostate cancer from non-malignant prostate is a relative lengthy process that takes several years and is often related to fatty diet, inflammation, and

oxidative stress [88]. The blockade of prostate carcinogenesis at really early stage by the use of chemopreventive molecules found mainly in our diet (fruits, vegetables, spices, seeds) appears then promising. In fact, as we reported here, curcumin is able to prevent prostate cancer initiation or progression as it inhibits inflammation signaling pathway highly implicated in prostate cancer progression through the regulation of NF- κ B and cofactors. However, despite the fact that curcumin is well described in several cancer types for its anti-oxidant potential through the induction of phase II enzymes (glutathione S-transferase, heme oxygenase), especially by the regulation of the transcription factor Nrf2 (nuclear factor-erythroid 2-related factor 2 erythroid) [7, 11, 108], nothing was published until today concerning prostate cancer.

Several data pointed out that curcumin is able to suppress the proliferation of both androgen-dependent and androgen-independent prostate cancer cell line but also of LNCaP xenografts by interfering with growth factor receptors, cell cycle, angiogenesis, and metastasis potential of prostate cancer cells. This natural compound also promotes the induction of prostate cancer cell death by apoptosis through a well-described cascade of events and could be useful in combination with conventional treatment such as immunotherapy and radiotherapy.

With this in mind, the use of curcumin in diet or as a treatment appears as an alternative, non toxic modality for prostate cancer prevention, treatment or co-treatment with conventional therapy by which the clinician may prevent the progression of prostate cancer to its hormone refractory state or to treat advanced prostate cancer. This also gives a rationale for the prospective of curcumin in translational studies in prostate cancer cells.

Acknowledgments M.H. Teiten and S. Eifes were supported by Télévie grants (Fonds National de la Recherche Scientifique, Belgium). F. Gaascht is recipient of an Action Lions “Vaincre le Cancer” fellowship. Dr. Diederich’s research at the Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire du Cancer (LBMCC) is financially supported by “Recherche Cancer et Sang” foundation, by «Recherches Scientifiques Luxembourg» asbl, by «Een Häerz fir Kriibskrank Kanner» association, the Action Lions “Vaincre le Cancer” Luxembourg and Televie Luxembourg. Print costs were covered by FNR, Luxembourg.

References

1. Aggarwal BB (2008) Prostate cancer and curcumin: add spice to your life. *Cancer Biol Ther* 7:1436–1440
2. Aggarwal BB, Banerjee S, Bharadwaj U, Sung B, Shishodia S, Sethi G (2007) Curcumin induces the degradation of cyclin E expression through ubiquitin-dependent pathway and up-regulates cyclin-dependent kinase inhibitors p21 and p27 in multiple human tumor cell lines. *Biochem Pharmacol* 73:1024–1032
3. Aggarwal BB, Bhatt ID, Ichikawa H, Ahn KS, Sethi G, Sandur SK, Sundaram C, Seeram N, Shishodia S (2007) Curcumin:

- biological and medicinal properties. In: Turmeric: the genus *Curcuma*, vol 45. CRC Press, New York
4. Aggarwal S, Ichikawa H, Takada Y, Sandur SK, Shishodia S, Aggarwal BB (2006) Curcumin (diferuloylmethane) down-regulates expression of cell proliferation and antiapoptotic and metastatic gene products through suppression of I κ B α kinase and Akt activation. *Mol Pharmacol* 69:195–206
 5. Anand P, Kunnumakkara AB, Newman RA, Aggarwal BB (2007) Bioavailability of curcumin: problems and promises. *Mol Pharm* 4:807–818
 6. Anand P, Thomas SG, Kunnumakkara AB, Sundaram C, Harikumar KB, Sung B, Tharakan ST, Misra K, Priyadarsini IK, Rajasekharan KN et al (2008) Biological activities of curcumin and its analogues (Congeners) made by man and mother nature. *Biochem Pharmacol* 76:1590–1611
 7. Andreadi CK, Howells LM, Atherfold PA, Manson MM (2006) Involvement of Nrf2, p38, B-Raf, and nuclear factor- κ B, but not phosphatidylinositol 3-kinase, in induction of hemoxygenase-1 by dietary polyphenols. *Mol Pharmacol* 69:1033–1040
 8. Andrzejewski T, Deeb D, Gao X, Danyluk A, Arbab AS, Dulchavsky SA, Gautam SC (2008) Therapeutic efficacy of curcumin/TRAIL combination regimen for hormone-refractory prostate cancer. *Oncol Res* 17:257–267
 9. Anto RJ, Mukhopadhyay A, Denning K, Aggarwal BB (2002) Curcumin (diferuloylmethane) induces apoptosis through activation of caspase-8, BID cleavage and cytochrome c release: its suppression by ectopic expression of Bcl-2 and Bcl-xl. *Carcinogenesis* 23:143–150
 10. Arbiser JL, Klauber N, Rohan R, van Leeuwen R, Huang MT, Fisher C, Flynn E, Byers HR (1998) Curcumin is an in vivo inhibitor of angiogenesis. *Mol Med* 4:376–383
 11. Balogun E, Hoque M, Gong P, Killeen E, Green CJ, Foresti R, Alam J, Motterlini R (2003) Curcumin activates the haem oxygenase-1 gene via regulation of Nrf2 and the antioxidant-responsive element. *Biochem J* 371:887–895
 12. Beevers CS, Li F, Liu L, Huang S (2006) Curcumin inhibits the mammalian target of rapamycin-mediated signaling pathways in cancer cells. *Int J Cancer* 119:757–764
 13. Bhandarkar SS, Arbiser JL (2007) Curcumin as an inhibitor of angiogenesis. *Adv Exp Med Biol* 595:185–195
 14. Bieberich CJ, Fujita K, He WW, Jay G (1996) Prostate-specific and androgen-dependent expression of a novel homeobox gene. *J Biol Chem* 271:31779–31782
 15. Bisht S, Feldmann G, Soni S, Ravi R, Karikar C, Maitra A (2007) Polymeric nanoparticle-encapsulated curcumin (“nanocurcumin”): a novel strategy for human cancer therapy. *J Nanobiotechnology* 5:3
 16. Bostwick DG (1996) Progression of prostatic intraepithelial neoplasia to early invasive adenocarcinoma. *Eur Urol* 30:145–152
 17. Bush JA, Cheung KJ Jr, Li G (2001) Curcumin induces apoptosis in human melanoma cells through a Fas receptor/caspase-8 pathway independent of p53. *Exp Cell Res* 271:305–314
 18. Cai T, Mazzoli S, Bechi A, Addonisio P, Mondaini N, Pagliai RC, Bartoletti R (2009) Serenoa repens associated with Urtica dioica (ProstaMEV®) and curcumin and quercetin (FlogMEV®) extracts are able to improve the efficacy of prulifloxacin in bacterial prostatitis patients: results from a prospective randomised study. *Int J Antimicrob Agents* 33:549–553
 19. Cao J, Liu Y, Jia L, Zhou HM, Kong Y, Yang G, Jiang LP, Li QJ, Zhong LF (2007) Curcumin induces apoptosis through mitochondrial hyperpolarization and mtDNA damage in human hepatoma G2 cells. *Free Radic Biol Med* 43:968–975
 20. Carnero A, Blanco-Aparicio C, Renner O, Link W, Leal JF (2008) The PTEN/PI3K/AKT signalling pathway in cancer, therapeutic implications. *Curr Cancer Drug Targets* 8:187–198
 21. Chainani-Wu N (2003) Safety and anti-inflammatory activity of curcumin: a component of tumeric (*Curcuma longa*). *J Altern Complement Med* 9:161–168
 22. Chendil D, Ranga RS, Meigooni D, Sathishkumar S, Ahmed MM (2004) Curcumin confers radiosensitizing effect in prostate cancer cell line PC-3. *Oncogene* 23:1599–1607
 23. Cheng AL, Hsu CH, Lin JK, Hsu MM, Ho YF, Shen TS, Ko JY, Lin JT, Lin BR, Ming-Shiang W et al (2001) Phase I clinical trial of curcumin, a chemopreventive agent, in patients with high-risk or pre-malignant lesions. *Anticancer Res* 21:2895–2900
 24. Cui L, Miao J (2007) Cytotoxic effect of curcumin on malaria parasite *Plasmodium falciparum*: inhibition of histone acetylation and generation of reactive oxygen species. *Antimicrob Agents Chemother* 51:488–494
 25. Daraselia N, Yuryev A, Egorov S, Novichkova S, Nikitin A, Mazo I (2004) Extracting human protein interactions from MEDLINE using a full-sentence parser. *Bioinformatics* 20:604–611
 26. De R, Kundu P, Swarnakar S, Ramamurthy T, Chowdhury A, Nair GB, Mukhopadhyay AK (2009) Antimicrobial activity of curcumin against Indian *Helicobacter pylori* and also during mice infection. *Antimicrob Agents Chemother* 53:1592–1597
 27. Deeb D, Jiang H, Gao X, Al-Holou S, Danyluk AL, Dulchavsky SA, Gautam SC (2007) Curcumin [1, 7-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1-6-heptadine-3, 5-dione; C₂₁H₂₀O₆] sensitizes human prostate cancer cells to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand/Apo2L-induced apoptosis by suppressing nuclear factor-kappaB via inhibition of the prosurvival Akt signaling pathway. *J Pharmacol Exp Ther* 321:616–625
 28. Deeb D, Jiang H, Gao X, Hafner MS, Wong H, Divine G, Chapman RA, Dulchavsky SA, Gautam SC (2004) Curcumin sensitizes prostate cancer cells to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand/Apo2L by inhibiting nuclear factor-kappaB through suppression of IkappaB α phosphorylation. *Mol Cancer Ther* 3:803–812
 29. Deeb D, Xu YX, Jiang H, Gao X, Janakiraman N, Chapman RA, Gautam SC (2003) Curcumin (diferuloyl-methane) enhances tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis in LNCaP prostate cancer cells. *Mol Cancer Ther* 2:95–103
 30. Deeb DD, Jiang H, Gao X, Divine G, Dulchavsky SA, Gautam SC (2005) Chemosensitization of hormone-refractory prostate cancer cells by curcumin to TRAIL-induced apoptosis. *J Exp Ther Oncol* 5:81–91
 31. Delongchamps NB, Peyromaure M, Dinh-Xuan AT (2006) Role of vascular endothelial growth factor in prostate cancer. *Urology* 68:244–248
 32. Deng G, Yu JH, Ye ZQ, Hu ZQ (2008) Curcumin inhibits the expression of vascular endothelial growth factor and androgen-independent prostate cancer cell line PC-3 in vitro. *Zhonghua Nan Ke Xue* 14:116–121
 33. Deorukhkar A, Krishnan S, Sethi G, Aggarwal BB (2007) Back to basics: how natural products can provide the basis for new therapeutics. *Expert Opin Investig Drugs* 16:1753–1773
 34. Dhillon N, Aggarwal BB, Newman RA, Wolff RA, Kunnumakkara AB, Abbruzzese JL, Ng CS, Badmaev V, Kurzrock R (2008) Phase II trial of curcumin in patients with advanced pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* 14:4491–4499
 35. Dikshit P, Goswami A, Mishra A, Chatterjee M, Jana NR (2006) Curcumin induces stress response, neurite outgrowth and prevent NF-kappaB activation by inhibiting the proteasome function. *Neurotox Res* 9:29–37
 36. Dorai T, Cao YC, Dorai B, Buttyan R, Katz AE (2001) Therapeutic potential of curcumin in human prostate cancer. III. Curcumin inhibits proliferation, induces apoptosis, and inhibits

- angiogenesis of LNCaP prostate cancer cells in vivo. *Prostate* 47:293–303
37. Dorai T, Dutcher JP, Dempster DW, Wiernik PH (2004) Therapeutic potential of curcumin in prostate cancer—V: interference with the osteomimetic properties of hormone refractory C4-2B prostate cancer cells. *Prostate* 60:1–17
 38. Dorai T, Gehani N, Katz A (2000) Therapeutic potential of curcumin in human prostate cancer—I. Curcumin induces apoptosis in both androgen-dependent and androgen-independent prostate cancer cells. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 3:84–93
 39. Dorai T, Gehani N, Katz A (2000) Therapeutic potential of curcumin in human prostate cancer—II. Curcumin inhibits tyrosine kinase activity of epidermal growth factor receptor and depletes the protein. *Mol Urol* 4:1–6
 40. Duvoix A, Blasius R, Delhalle S, Schnekenburger M, Morceau F, Henry E, Dicato M, Diederich M (2005) Chemopreventive and therapeutic effects of curcumin. *Cancer Lett* 223:181–190
 41. Edwards J, Mukherjee R, Munro AF, Wells AC, Almushatat A, Bartlett JM (2004) HER2 and COX2 expression in human prostate cancer. *Eur J Cancer* 40:50–55
 42. Feldman BJ, Feldman D (2001) The development of androgen-independent prostate cancer. *Nat Rev Cancer* 1:34–45
 43. Ferrari E, Lazzari S, Marverti G, Pignedoli F, Spagnolo F, Saladini M (2009) Synthesis, cytotoxic and combined cDDP activity of new stable curcumin derivatives. *Bioorg Med Chem* 17:3043–3052
 44. Fuchs JR, Pandit B, Bhasin D, Etter JP, Regan N, Abdelhamid D, Li C, Lin J, Li PK (2009) Structure–activity relationship studies of curcumin analogues. *Bioorg Med Chem Lett* 19:2065–2069
 45. Garcea G, Jones DJ, Singh R, Dennison AR, Farmer PB, Sharma RA, Steward WP, Gescher AJ, Berry DP (2004) Detection of curcumin and its metabolites in hepatic tissue and portal blood of patients following oral administration. *Br J Cancer* 90:1011–1015
 46. Garcea G, Berry DP, Jones DJ, Singh R, Dennison AR, Farmer PB, Sharma RA, Steward WP, Gescher AJ (2005) Consumption of the putative chemopreventive agent curcumin by cancer patients: assessment of curcumin levels in the colorectum and their pharmacodynamic consequences. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14:120–125
 47. Giri D, Ozen M, Ittmann M (2001) Interleukin-6 is an autocrine growth factor in human prostate cancer. *Am J Pathol* 159:2159–2165
 48. Goel A, Kunnumakkara AB, Aggarwal BB (2008) Curcumin as “Curecumin”: from kitchen to clinic. *Biochem Pharmacol* 75:787–809
 49. Gronberg H (2003) Prostate cancer epidemiology. *Lancet* 361:859–864
 50. Gururaj AE, Belakavadi M, Venkatesh DA, Marme D, Salimath BP (2002) Molecular mechanisms of anti-angiogenic effect of curcumin. *Biochem Biophys Res Commun* 297:934–942
 51. Hatcher H, Planalp R, Cho J, Torti FM, Torti SV (2008) Curcumin: from ancient medicine to current clinical trials. *Cell Mol Life Sci* 65:1631–1652
 52. Holy J (2004) Curcumin inhibits cell motility and alters microfilament organization and function in prostate cancer cells. *Cell Motil Cytoskeleton* 58:253–268
 53. Hong JH, Ahn KS, Bae E, Jeon SS, Choi HY (2006) The effects of curcumin on the invasiveness of prostate cancer in vitro and in vivo. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 9:147–152
 54. Hour TC, Chen J, Huang CY, Guan JY, Lu SH, Pu YS (2002) Curcumin enhances cytotoxicity of chemotherapeutic agents in prostate cancer cells by inducing p21(WAF1/CIP1) and C/EBP-beta expressions and suppressing NF-kappaB activation. *Prostate* 51:211–218
 55. Illi B, Puri P, Morgante L, Capogrossi MC, Gaetano C (2000) Nuclear factor-kappaB and cAMP response element binding protein mediate opposite transcriptional effects on the Flk-1/KDR gene promoter. *Circ Res* 86:E110–E117
 56. Iqbal M, Okazaki Y, Okada S (2009) Curcumin attenuates oxidative damage in animals treated with a renal carcinogen, ferric nitrilotriacetate (Fe-NTA): implications for cancer prevention. *Mol Cell Biochem* 324:157–164
 57. Ireson CR, Jones DJ, Orr S, Coughtrie MW, Boocock DJ, Williams ML, Farmer PB, Steward WP, Gescher AJ (2002) Metabolism of the cancer chemopreventive agent curcumin in human and rat intestine. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 11:105–111
 58. Jana NR, Dikshit P, Goswami A, Nukina N (2004) Inhibition of proteasomal function by curcumin induces apoptosis through mitochondrial pathway. *J Biol Chem* 279:11680–11685
 59. Johnson JJ, Mukhtar H (2007) Curcumin for chemoprevention of colon cancer. *Cancer Lett* 255:170–181
 60. Khan N, Adhami VM, Mukhtar H (2008) Apoptosis by dietary agents for prevention and treatment of cancer. *Biochem Pharmacol* 76:1333–1339
 61. Kim JH, Xu C, Keum YS, Reddy B, Conney A, Kong AN (2006) Inhibition of EGFR signaling in human prostate cancer PC-3 cells by combination treatment with beta-phenylethyl isothiocyanate and curcumin. *Carcinogenesis* 27:475–482
 62. Kunnumakkara AB, Anand P, Aggarwal BB (2008) Curcumin inhibits proliferation, invasion, angiogenesis and metastasis of different cancers through interaction with multiple cell signaling proteins. *Cancer Lett* 269:199–225
 63. Lao CD, Ruffin MTT, Normolle D, Heath DD, Murray SI, Bailey JM, Boggs ME, Crowell J, Rock CL, Brenner DE (2006) Dose escalation of a curcuminoid formulation. *BMC Complement Altern Med* 6:10
 64. Lapenna S, Bilia AR, Morris GA, Nilsson M (2009) Novel artemisinin and curcumin micellar formulations: drug solubility studies by NMR spectroscopy. *J Pharm Sci* 98(10):3666–3675
 65. Li L, Aggarwal BB, Shishodia S, Abbruzzese J, Kurzrock R (2004) Nuclear factor-kappaB and IkappaB kinase are constitutively active in human pancreatic cells, and their down-regulation by curcumin (diferuloylmethane) is associated with the suppression of proliferation and the induction of apoptosis. *Cancer* 101:2351–2362
 66. Li M, Zhang Z, Hill DL, Wang H, Zhang R (2007) Curcumin, a dietary component, has anticancer, chemosensitization, and radiosensitization effects by down-regulating the MDM2 oncogene through the PI3K/mTOR/ETS2 pathway. *Cancer Res* 67:1988–1996
 67. Li Y, Cozzi PJ (2009) Angiogenesis as a strategic target for prostate cancer therapy. *Med Res Rev*
 68. Lieberman R, Bermejo C, Akaza H, Greenwald P, Fair W, Thompson I (2001) Progress in prostate cancer chemoprevention: modulators of promotion and progression. *Urology* 58:835–842
 69. Lin L, Shi Q, Nyarko AK, Bastow KF, Wu CC, Su CY, Shih CC, Lee KH (2006) Antitumor agents. 250. Design and synthesis of new curcumin analogues as potential anti-prostate cancer agents. *J Med Chem* 49:3963–3972
 70. Liu XH, Yao S, Kirschenbaum A, Levine AC (1998) NS398, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, induces apoptosis and down-regulates bcl-2 expression in LNCaP cells. *Cancer Res* 58:4245–4249
 71. Menon VP, Sudheer AR (2007) Antioxidant and anti-inflammatory properties of curcumin. *Adv Exp Med Biol* 595:105–125
 72. Milacic V, Banerjee S, Landis-Piowar KR, Sarkar FH, Majumdar AP, Dou QP (2008) Curcumin inhibits the proteasome activity in human colon cancer cells in vitro and in vivo. *Cancer Res* 68:7283–7292

73. Mohan R, Sivak J, Ashton P, Russo LA, Pham BQ, Kasahara N, Raizman MB, Fini ME (2000) Curcuminoids inhibit the angiogenic response stimulated by fibroblast growth factor-2, including expression of matrix metalloproteinase gelatinase B. *J Biol Chem* 275:10405–10412
74. Mukhopadhyay A, Banerjee S, Stafford LJ, Xia C, Liu M, Aggarwal BB (2002) Curcumin-induced suppression of cell proliferation correlates with down-regulation of cyclin D1 expression and CDK4-mediated retinoblastoma protein phosphorylation. *Oncogene* 21:8852–8861
75. Mukhopadhyay A, Bueso-Ramos C, Chatterjee D, Pantazis P, Aggarwal BB (2001) Curcumin downregulates cell survival mechanisms in human prostate cancer cell lines. *Oncogene* 20:7597–7609
76. Nakamura K, Yasunaga Y, Segawa T, Ko D, Moul JW, Srivastava S, Rhim JS (2002) Curcumin down-regulates AR gene expression and activation in prostate cancer cell lines. *Int J Oncol* 21:825–830
77. Narayanan NK, Nargi D, Randolph C, Narayanan BA (2009) Liposome encapsulation of curcumin and resveratrol in combination reduces prostate cancer incidence in PTEN knockout mice. *Int J Cancer* 125:1–8
78. Nikitin A, Egorov S, Daraselia N, Mazo I (2003) Pathway studio—the analysis and navigation of molecular networks. *Bioinformatics* 19:2155–2157
79. Nonn L, Duong D, Peehl DM (2007) Chemopreventive anti-inflammatory activities of curcumin and other phytochemicals mediated by MAP kinase phosphatase-5 in prostate cells. *Carcinogenesis* 28:1188–1196
80. Novichkova S, Egorov S, Daraselia N (2003) MedScan, a natural language processing engine for MEDLINE abstracts. *Bioinformatics* 19:1699–1706
81. Ohtsu H, Xiao Z, Ishida J, Nagai M, Wang HK, Itokawa H, Su CY, Shih C, Chiang T, Chang E et al (2002) Antitumor agents. 217. Curcumin analogues as novel androgen receptor antagonists with potential as anti-prostate cancer agents. *J Med Chem* 45:5037–5042
82. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P (2005) Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 55:74–108
83. Plummer SM, Hill KA, Festing MF, Steward WP, Gescher AJ, Sharma RA (2001) Clinical development of leukocyte cyclooxygenase 2 activity as a systemic biomarker for cancer chemopreventive agents. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 10:1295–1299
84. Rastogi T, Devesa S, Mangtani P, Mathew A, Cooper N, Kao R, Sinha R (2008) Cancer incidence rates among South Asians in four geographic regions: India, Singapore, UK and US. *Int J Epidemiol* 37:147–160
85. Reuter S, Eifes S, Dicato M, Aggarwal BB, Diederich M (2008) Modulation of anti-apoptotic and survival pathways by curcumin as a strategy to induce apoptosis in cancer cells. *Biochem Pharmacol* 76:1340–1351
86. Sandur SK, Pandey MK, Sung B, Ahn KS, Murakami A, Sethi G, Limtrakul P, Badmaev V, Aggarwal BB (2007) Curcumin, demethoxycurcumin, bisdemethoxycurcumin, tetrahydrocurcumin and turmerones differentially regulate anti-inflammatory and anti-proliferative responses through a ROS-independent mechanism. *Carcinogenesis* 28:1765–1773
87. Schulz WA, Burchardt M, Cronauer MV (2003) Molecular biology of prostate cancer. *Mol Hum Reprod* 9:437–448
88. Sciarra A, Mariotti G, Salciccia S, Gomez AA, Monti S, Toscano V, Di Silverio F (2008) Prostate growth and inflammation. *J Steroid Biochem Mol Biol* 108:254–260
89. Shaikh J, Ankola DD, Beniwal V, Singh D, Kumar MN (2009) Nanoparticle encapsulation improves oral bioavailability of curcumin by at least 9-fold when compared to curcumin administered with piperine as absorption enhancer. *Eur J Pharm Sci* 37:223–230
90. Shankar S, Chen Q, Sarva K, Siddiqui I, Srivastava RK (2007) Curcumin enhances the apoptosis-inducing potential of TRAIL in prostate cancer cells: molecular mechanisms of apoptosis, migration and angiogenesis. *J Mol Signal* 2:10
91. Shankar S, Ganapathy S, Chen Q, Srivastava RK (2008) Curcumin sensitizes TRAIL-resistant xenografts: molecular mechanisms of apoptosis, metastasis and angiogenesis. *Mol Cancer* 7:16
92. Shankar S, Srivastava RK (2007) Involvement of Bcl-2 family members, phosphatidylinositol 3'-kinase/AKT and mitochondrial p53 in curcumin (diferuloylmethane)-induced apoptosis in prostate cancer. *Int J Oncol* 30:905–918
93. Shankar TN, Shantha NV, Ramesh HP, Murthy IA, Murthy VS (1980) Toxicity studies on turmeric (*Curcuma longa*): acute toxicity studies in rats, guineapigs & monkeys. *Indian J Exp Biol* 18:73–75
94. Sharma RA, Euden SA, Platton SL, Cooke DN, Shafayat A, Hewitt HR, Marczylo TH, Morgan B, Hemingway D, Plummer SM et al (2004) Phase I clinical trial of oral curcumin: biomarkers of systemic activity and compliance. *Clin Cancer Res* 10:6847–6854
95. Sharma RA, McLelland HR, Hill KA, Ireson CR, Euden SA, Manson MM, Pirmohamed M, Marnett LJ, Gescher AJ, Steward WP (2001) Pharmacodynamic and pharmacokinetic study of oral Curcuma extract in patients with colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 7:1894–1900
96. Shenouda NS, Zhou C, Browning JD, Ansell PJ, Sakla MS, Lubahn DB, Macdonald RS (2004) Phytoestrogens in common herbs regulate prostate cancer cell growth in vitro. *Nutr Cancer* 49:200–208
97. Shoba G, Joy D, Joseph T, Majeed M, Rajendran R, Srinivas PS (1998) Influence of piperine on the pharmacokinetics of curcumin in animals and human volunteers. *Planta Med* 64:353–356
98. Singh AK, Sidhu GS, Deepa T, Maheshwari RK (1996) Curcumin inhibits the proliferation and cell cycle progression of human umbilical vein endothelial cell. *Cancer Lett* 107:109–115
99. Singh RP, Agarwal R (2006) Mechanisms of action of novel agents for prostate cancer chemoprevention. *Endocr Relat Cancer* 13:751–778
100. Singh S, Aggarwal BB (1995) Activation of transcription factor NF-kappa B is suppressed by curcumin (diferuloylmethane) [corrected]. *J Biol Chem* 270:24995–25000
101. Somporn P, Phisalaphong C, Nakornchai S, Unchern S, Morales NP (2007) Comparative antioxidant activities of curcumin and its demethoxy and hydrogenated derivatives. *Biol Pharm Bull* 30:74–78
102. Song G, Mao YB, Cai QF, Yao LM, Ouyang GL, Bao SD (2005) Curcumin induces human HT-29 colon adenocarcinoma cell apoptosis by activating p53 and regulating apoptosis-related protein expression. *Braz J Med Biol Res* 38:1791–1798
103. Soni KB, Kuttan R (1992) Effect of oral curcumin administration on serum peroxides and cholesterol levels in human volunteers. *Indian J Physiol Pharmacol* 36:273–275
104. Srivastava RK, Chen Q, Siddiqui I, Sarva K, Shankar S (2007) Linkage of curcumin-induced cell cycle arrest and apoptosis by cyclin-dependent kinase inhibitor p21/WAF1/CIP1). *Cell Cycle* 6:2953–2961
105. Steelman LS, Stadelman KM, Chappell WH, Horn S, Basecke J, Cervello M, Nicoletti F, Libra M, Stivala F, Martelli AM et al (2008) Akt as a therapeutic target in cancer. *Expert Opin Ther Targets* 12:1139–1165
106. Sugiyama Y, Kawakishi S, Osawa T (1996) Involvement of the beta-diketone moiety in the antioxidative mechanism of tetrahydrocurcumin. *Biochem Pharmacol* 52:519–525

107. Surh YJ (2003) Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nat Rev Cancer* 3:768–780
108. Surh YJ, Na HK (2008) NF-kappaB and Nrf2 as prime molecular targets for chemoprevention and cytoprotection with anti-inflammatory and antioxidant phytochemicals. *Genes Nutr* 2:313–317
109. Teiten MH, Reuter S, Schmucker S, Dicato M, Diederich M (2009) Gene expression profiling related to anti-inflammatory properties of curcumin in K562 leukemia cells. *Ann N Y Acad Sci* 1171:391–398
110. Thangapazham RL, Puri A, Tele S, Blumenthal R, Maheshwari RK (2008) Evaluation of a nanotechnology-based carrier for delivery of curcumin in prostate cancer cells. *Int J Oncol* 32:1119–1123
111. Thangapazham RL, Shaheduzzaman S, Kim KH, Passi N, Tadese A, Vahey M, Dobi A, Srivastava S, Maheshwari RK (2008) Androgen responsive and refractory prostate cancer cells exhibit distinct curcumin regulated transcriptome. *Cancer Biol Ther* 7:1427–1435
112. Tian B, Wang Z, Zhao Y, Wang D, Li Y, Ma L, Li X, Li J, Xiao N, Tian J et al (2008) Effects of curcumin on bladder cancer cells and development of urothelial tumors in a rat bladder carcinogenesis model. *Cancer Lett* 264:299–308
113. Tonnesen HH, Masson M, Loftsson T (2002) Studies of curcumin and curcuminoids. XXVII. Cyclodextrin complexation: solubility, chemical and photochemical stability. *Int J Pharm* 244:127–135
114. Tsui KH, Feng TH, Lin CM, Chang PL, Juang HH (2008) Curcumin blocks the activation of androgen and interleukin-6 on prostate-specific antigen expression in human prostatic carcinoma cells. *J Androl* 29:661–668
115. Vareed SK, Kakarala M, Ruffin MT, Crowell JA, Normolle DP, Djuric Z, Brenner DE (2008) Pharmacokinetics of curcumin conjugate metabolites in healthy human subjects. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 17:1411–1417
116. Whittemore AS, Kolonel LN, Wu AH, John EM, Gallagher RP, Howe GR, Burch JD, Hankin J, Dreon DM, West DW et al (1995) Prostate cancer in relation to diet, physical activity, and body size in blacks, whites, and Asians in the United States and Canada. *J Natl Cancer Inst* 87:652–661
117. Yoysungnoen P, Wirachwong P, Changtam C, Suksamram A, Patumraj S (2008) Anti-cancer and anti-angiogenic effects of curcumin and tetrahydrocurcumin on implanted hepatocellular carcinoma in nude mice. *World J Gastroenterol* 14:2003–2009
118. Yu S, Shen G, Khor TO, Kim JH, Kong AN (2008) Curcumin inhibits Akt/mammalian target of rapamycin signaling through protein phosphatase-dependent mechanism. *Mol Cancer Ther* 7:2609–2620
119. Zhang HN, Yu CX, Zhang PJ, Chen WW, Jiang AL, Kong F, Deng JT, Zhang JY, Young CY (2007) Curcumin downregulates homeobox gene NKX3.1 in prostate cancer cell LNCaP. *Acta Pharmacol Sin* 28:423–430

Anti-proliferative potential of curcumin in androgen-dependent prostate cancer cells occurs through modulation of the Wingless signaling pathway

MARIE-HÉLÈNE TEITEN¹, FRANÇOIS GAASCHT¹, MARCUS CRONAUER²,
ESTELLE HENRY¹, MARIO DICATO¹ and MARC DIEDERICH¹

¹Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire du Cancer, Hôpital Kirchberg, 9 rue Edward Steichen, L-2540 Luxembourg, Luxembourg; ²Institute of General Zoology and Endocrinology, Ulm University, Albert Einstein Allee 11, D-89069 Ulm, Germany

Received November 2, 2010; Accepted December 30, 2010

DOI: 10.3892/ijo.2011.905

Abstract. Activation of the Wingless (Wnt)/ β -catenin signaling pathway contributes to prostate tumorigenesis and metastasis. Depending of the stage of prostate cancer development, current drug therapies are of limited efficiency, so that prevention with natural compounds appears as an attractive strategy especially due to the slow progressive development of prostate cancer. We report here that the chemopreventive agent curcumin from the rhizome of *Curcuma longa* was able to affect cell proliferation of androgen-dependent prostate cancer through the induction of cell cycle arrest in G2 and modulation of Wnt signaling. Curcumin decreases the level of Tcf-4, CBP and p300 proteins implicated in the Wnt transcriptional complex that leads to the decrease of β -catenin/Tcf-4 transcriptional activity and of the expression of β -catenin target genes (*cyclin D1* and *c-myc*). Subsequent cell death induction is linked to autophagy. Interestingly, in androgen-independent prostate cancer cells, curcumin does not affect Wnt/ β -catenin transcriptional activity. Altogether our results suggest that curcumin is an interesting chemopreventive agent for early stage prostate cancer.

Introduction

Deregulation of the Wingless (Wnt/ β -catenin) signaling pathway is well described to contribute to prostate cancer progression (1-4). The canonical Wnt signaling pathway is a complex process that regulates the ability of the multi-functional β -catenin protein to activate the transcription of

specific target genes involved in cell proliferation (e.g., *c-myc*, *cyclin D1*), cell adhesion (e.g., *E-cadherin*) and other signaling pathways [e.g., *cyclooxygenase-2 (Cox-2)*, *matrix metalloproteinase (MMP)*, *vascular endothelial growth factor (VEGF)*] (5).

In the absence of Wnt ligands, β -catenin binds to a multi-protein degradation complex composed of Axin, glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β), adenomatous polyposis coli (APC), protein phosphatase 2A (PP2A) and casein kinase 1 α (CK1 α). β -catenin is then phosphorylated by GSK-3 β and degraded by the proteasome. In contrast, binding of Wnt ligands to the Frizzled cell surface receptor and its low-density lipoprotein receptor-related protein 5 or 6 (LRP 5/6) co-receptor inhibits the assembly of the β -catenin degradation complex and favours the translocation of β -catenin to the nucleus where it dimerizes with the T-cell factor/lymphoid enhancer factor (Tcf/Lef) transcription factor to activate the transcription of Wnt target genes (6).

Many natural compounds were reported to exhibit their chemopreventive potential through the modulation of the canonical Wnt signaling pathway in several cancer cell types (7-11). Curcumin (diferuloylmethane), from the roots of *Curcuma longa* and well characterized for its anti-carcinogenic, anti-proliferative, anti-inflammatory, anti-angiogenic and anti-oxidant properties (12,13) was also shown to affect the Wnt signaling especially in colon, gastric, intestinal and breast cancer cells (14-17). Studies evaluating the effect of curcumin on prostate cancer cell proliferation mainly focused on the impact of this natural compound on epidermal growth factor receptor (EGFR), on cyclins implicated in cell cycle and on phosphatidylinositol 3-kinase (PI3)/Akt/mammalian target of rapamycin (mTOR) (18). Here we evaluate the effect of curcumin on prostate cancer cell proliferation by focusing on cell cycle and Wnt/ β -catenin in both androgen-dependent and independent prostate cancer cells, representative respectively of the early localized and late metastatic stages of prostate cancer development (19).

We report that curcumin essentially affects cell proliferation of androgen-dependent prostate cancer cells through the induction of cell cycle arrest in G2/M phase and through the

Correspondence to: Dr Marc Diederich, Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire du Cancer, Hôpital Kirchberg, 9 rue Edward Steichen, L-2540 Luxembourg, Luxembourg
E-mail: marc.diederich@lbmcc.lu

Key words: curcumin, prostate cancer, proliferation, Wingless signaling, cell cycle, cell death

decrease expression of β -catenin target genes due to the modulation of Wnt transcriptional activity mediated by the decrease of the level of expression of proteins implicated in the Wnt transcriptional complex. Interestingly, this natural compound induces cell death by autophagy in these androgen-dependent prostate cancer cells.

Materials and methods

Cell culture and chemicals. Androgen-sensitive (22rv1, LNCaP) and androgen-independent (DU145, PC-3) prostate cancer cells were cultured in RPM-1640 medium (Lonza, Verviers, Belgium) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) (Lonza) and 1% (v/v) antibiotic-antimycotic (Lonza) at 37°C, in a 5% CO₂, humidified atmosphere. Curcumin (Sigma, Bornem, Belgium) was dissolved in 100% DMSO (Sigma) at 20 mM. Subsequent dilutions were made in cell culture medium. Exponentially growing cells were subjected to curcumin treatment.

Cell viability. Prostate cancer cells in exponential growing phase were incubated with different concentrations (10, 20, 50, 75, 100 μ M) of curcumin for 4 or 24 h. Cell viability was assessed by trypan-blue exclusion test.

Fluorescence microscopy. After incubation with 20 μ M curcumin for 24 h, 22rv1 and DU145 cells were subjected to nuclear staining with 1 μ g/ml Hoechst 33342 (Calbiochem, VWR International, Leuven, Belgium). Analysis of labeled cells was realized using an inverted Cell M microscope (Olympus, Aartselaar, Belgium) and the related Cell M software.

Preparation of total RNA. Nucleic acids were extracted from 10⁷ treated or untreated cell pellets with 'Nucleospin RNA II' kit (Macherey-Nagel, Hoerd, France) according to the manufacturer's instructions. Dosage of RNA content was performed by using Nanodrop system and their quality was evaluated by absorbance ratio 260/280 nm of Warburg-Christian.

Real-time PCR. cDNA was synthesized by reverse transcription (RT) of 1 μ g of total RNA in a final volume of 20 μ l using oligo(dT) primers, dNTP mix, RNase out and Superscript II Reverse Transcriptase (Invitrogen, Tournai, Belgium). The resulting cDNA products were used for subsequent quantification by real-time PCR amplification with a 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Halle, Belgium). Samples were amplified with different human gene specific primers (Eurogentec, Seraing, Belgium) presented in Table I. PCR was performed in a reaction mixture containing 1X Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) and 0.1 μ M of each primer. Cycling conditions were 1 cycle at 50°C for 2 min, 1 cycle at 95°C for 10 min, 40 cycles through a denaturing step at 95°C for 15 sec and 1 annealing-elongation step at 60°C for 1 min. The 7300 System Sequence Detection Software Version 1.3.1.21 (Applied Biosystems) was used for the estimation of the C_T parameter (threshold cycle). The 2^{- $\Delta\Delta$ C_T} method was applied for the quantification and β -actin was used as housekeeping gene for the normalization (20).

Preparation of protein extracts. After treatment, 10⁷ cells were harvested and total, nuclear or cytoplasmic proteins were extracted as previously described (21). Protein content was determined for each sample using the Bradford assay (Bio-Rad protein Assay, Biorad, Nazareth, Belgium).

Western blot analysis. Proteins from total, cytoplasmic or nuclear extracts were subjected to SDS-PAGE and transferred onto a Hybond™-P membrane (GE Healthcare, Diegem, Belgium). Membranes were pre-hybridized overnight at 4°C in PBS 1X containing 0.1% (v/v) Tween-20 (PBS-T) and 5% milk. Hybridizations with primary antibodies, directed against β -catenin, Tcf-4 (Cell Signaling), PCNA, CBP, cyclin D1 (Santa Cruz), cyclin B1, phospho-histone H3, p300 (Millipore), c-myc (BD Pharmingen), survivin (R&D Systems) or β -actin (Sigma-Aldrich) used as a loading control, were then carried out in PBS-T containing 5% milk or 5% bovine serum albumin for 1 h at room temperature or overnight at 4°C. Membranes were then washed and probed with horseradish peroxidase-labeled secondary antibodies for 1 h at room temperature. Proteins of interest were visualized with Ecl Plus Western blotting Detection System (GE Healthcare) reagent using the Kodak Image Station (Analis, Suarlée, Belgium).

Transient transfection. Transient transfections of 22rv1 and PC-3 cells were performed by electroporation using the Bio-Rad gene Pulser. For each experiment, 3.75x10⁶ cells at a concentration of 1.5x10⁷ cells/ml were electroporated at 250 V and 975 μ F in the presence of 5 μ g of pTOPFlash or pFOPFlash reporter gene construct harboring three copies of Tcf-4 binding site (wild-type or mutated respectively) upstream of the thymidine kinase minimal promoter and the open reading frame of luciferase gene (Upstate, Biognost, Heule, Belgium) and 5 μ g ph-RG-tk Renilla plasmid, used as a control for transfection efficiency (Promega, Leiden, The Netherlands). Co-transfections were performed by addition of pbCAT expression vector coding for mutated β -catenin containing an activating S33Y mutation. After 48 h, transfected cells were treated or not with 10, 20 or 50 μ M curcumin during 24 h. At the end of the treatment, 75 μ l of 10⁶ cells/ml were placed in microtitration plates. Dual-Glo™ Luciferase Reagent (Promega) (75 μ l) were added to the cells for 10 min at 22°C and then, 75 μ l Dual-Glo Stop&Glo® Reagent (Promega) for 10-min incubation at 22°C. Luciferase and Renilla activities were measured on Orion microplate luminometer (Berthold Detection Systems). Results are expressed as a ratio of pTOPFlash/pFOPFlash luciferase activity normalized to Renilla activity.

Cell cycle. Cell cycle was analyzed according to standard procedures (22). Briefly, cells were fixed with an ethanolic solution in water (70% v/v) and DNA stained by treatment with propidium iodide (1 μ g/ml; Becton-Dickinson Biosciences, Erembodegem, Belgium) and RNase A (100 μ g/ml; Roche, Luxembourg) in PBS. Events were recorded statistically (10,000 events/sample) using CellQuest software associated with FACSCalibur (Becton-Dickinson Biosciences). Data were further analyzed by using WinMDI software (<http://facscs.cripts.edu/software.html>).

Table I. Sequence of primers used for real-time PCR analysis.

Primer	Orientation (5'→3')	Sequence	Amplicon length (bp)
β-actin	Forward	CTCTTCCAGCCTTCCTTCCT	116
	Reverse	AGCACTGTGTTGGCGTACAG	
p21	Forward	GACTCTCAGGGTCGAAAACG	93
	Reverse	GGATTAGGGCTTCCTCTTGG	
PCNA	Forward	GGCGTGAACCTCACCAGTAT	91
	Reverse	AGGTATCCGCGTTATCTTCG	
Cyclin B1	Forward	CACTTCCTTCGGAGAGCATC	117
	Reverse	AGAAGGAGGAAAAGTGCACCA	
Cyclin D1	Forward	CGTGGCCTCTAAGATGAAGG	127
	Reverse	CCACTTGAGCTTGTTACCA	
C-myc	Forward	TGCTCCATGAGGAGACACC	73
	Reverse	TCGATTTCTTCCTCATCTTCTTG	

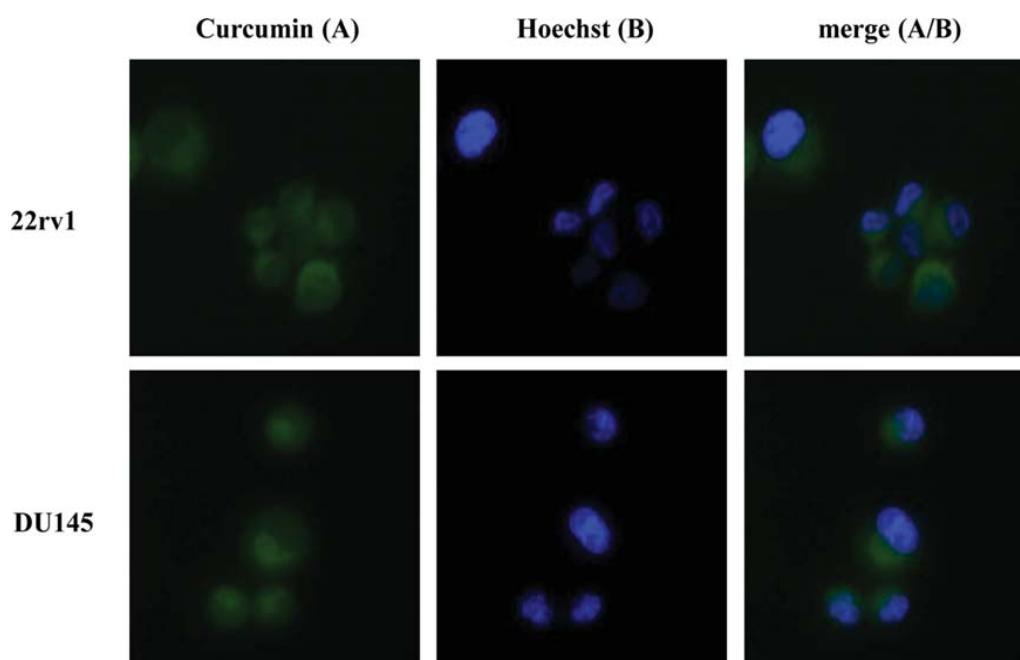


Figure 1. Cytoplasmic localization of curcumin in prostate cancer cells. Intracellular localization of curcumin was evaluated in both androgen-dependent (22rv1) and androgen-independent (DU145) prostate cancer cells following 24 h of incubation with 20 μ M curcumin by using an inverted Cell M Olympus microscope; objective x40.

Statistical analysis. Results from at least three independent experiments were analyzed for statistical significant differences using the Student's t-test. They are expressed as the mean \pm SD. p-values <0.05 (*) or 0.01 (**) were considered as statistically significant.

Results

Curcumin intracellular localization in prostate cancer cells. Fluorescent micrographs of 22rv1 and DU145 prostate cancer cells double stained with Hoechst 33342 and curcumin are

presented in Fig. 1. The representative images of curcumin are shown in green (left panel), nuclei are visualized in blue (middle panel), and the merge of these two panels correspond to the right panel on which overlapped area should appear in yellow. In both cell lines, curcumin presents an intracellular fluorescence distribution in cytoplasmic compartments with no obvious localization inside the nucleus.

Effect of curcumin on prostate cancer cells viability. Cell viability assessed by trypan-blue exclusion test after curcumin treatment revealed that this natural compounds is cytotoxic

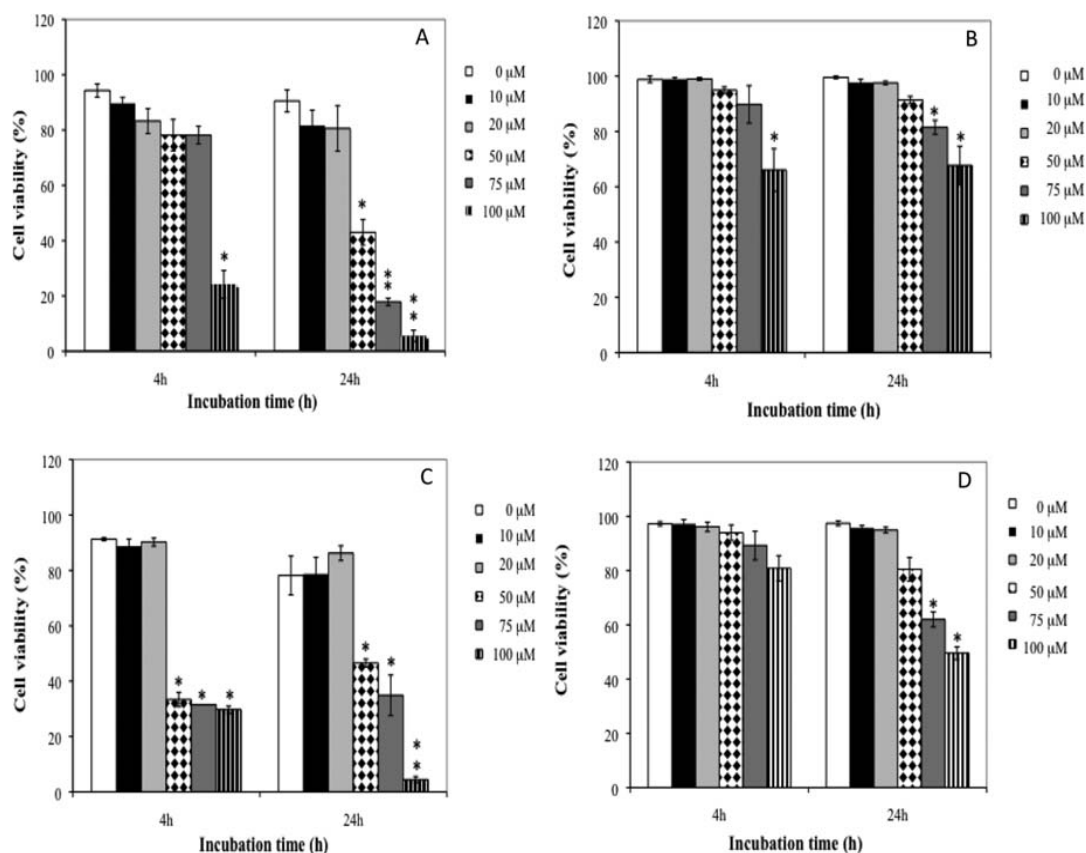


Figure 2. Effect of curcumin on prostate cancer cell viability. Cell viability was assessed by trypan-blue exclusion test after 4 and 24 h of treatment with curcumin in androgen-dependent 22rv1 (A) and LNCaP (C) but also in androgen-independent DU145 (B) and PC-3 (D) prostate cancer cells. Data are the mean \pm SEM of at least 3 independent experiments. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ compared to non-treated cells, respectively.

in both androgen-dependent and -independent prostate cancer cells for concentration $>75 \mu\text{M}$. However, androgen sensitive prostate cancer cells are more sensitive to curcumin treatment ($\text{IC}_{50} = 44$ and $48 \mu\text{M}$ for 22rv1 and LNCaP, respectively) than their androgen-independent ($\text{IC}_{50} = 115$ and $170 \mu\text{M}$ for PC-3 and DU145 respectively) counterpart (Fig. 2).

Curcumin induces cell death by autophagy in 22rv1 cell. In order to understand whether the reduction of cell viability observed after curcumin treatment was due to apoptotic or autophagic cell death mechanisms, we performed Western blot analysis monitoring the cleavage of several caspases implicated in the extrinsic or intrinsic apoptotic cell death pathway but also LC3B linked to autophagy process (Fig. 3). In contrast to the positive control U937 cells treated with etoposide, curcumin does not induce the cleavage of procaspase-8, -9, -3, -7 and PARP but leads to the appearance of LC3B-II isoform, which amount is closely correlated with the number of autophagosomes, that serves as a good indicator of autophagy (23). Altogether these results support the idea that curcumin does not trigger cell death by apoptosis in our prostate cancer cell model, but is linked to the induction of autophagy.

Curcumin modulates 22rv1 cell cycle. The analysis by flow cytometry of propidium iodide stained cells revealed that

curcumin is able to induce an arrest in G2/M transition phase of the cell cycle that fits with a decrease of the amount of cells in G1 phase after 24 h of 22rv1 cells treatment with $20 \mu\text{M}$ of curcumin (Fig. 4A). These modulations of cell cycle after curcumin treatment were confirmed by real-time PCR and Western blotting showing that curcumin decreases cyclin B1, PCNA (proliferating cell nuclear antigen) and phospho-histone H3 mRNA and protein level of expression (Fig. 4B and C). No significant increase of the percentage of 22rv1 cells was observed in sub-G1, reflecting normally cells dying by apoptosis (Fig. 4A). Here it represents $<8\%$ of total cell amount.

Inhibitory effect of curcumin on Wingless transcriptional activity and target genes. To determine whether androgen-dependent and -independent cells differ in their proliferative potential after curcumin treatment, we evaluated the effect of this natural compound on Wnt/ β -catenin/Tcf-4 transcriptional activity. Activation of the Wnt pathway was monitored by co-transfection of Tcf-reporter plasmid pTOP-Flash (TOP) and pFOPFlash (FOP). These experiments revealed that curcumin is able to decrease the β -catenin/Tcf-4 transcriptional activity in androgen-dependent cells (22rv1), but not in androgen-independent (PC-3) prostate cancer cells. In fact, $20 \mu\text{M}$ of curcumin inhibits β -catenin/Tcf-4 signaling by 30% in 22rv1 cells and increases it by 50% in PC-3 cells

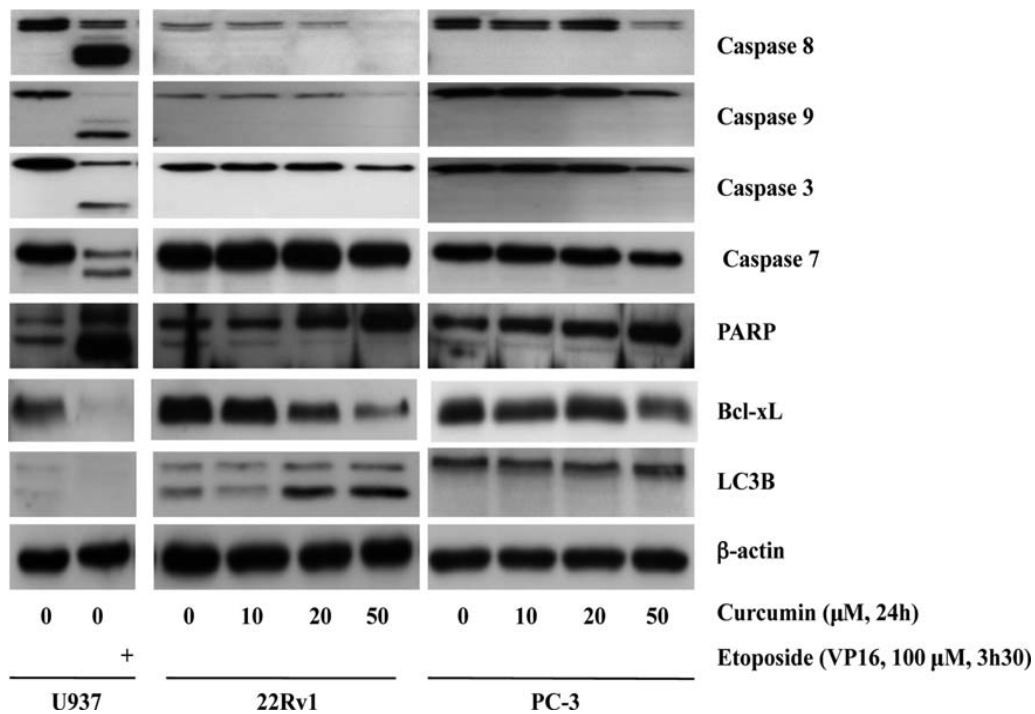


Figure 3. Curcumin induces cell death by autophagy in 22rv1 cells. Western blot analysis of the cleavage of pro-caspases -8,-9,-3,-7, Bcl-xL, cleavage of PARP (specific markers of cell death by apoptosis) and of the appearance of LC3B-II isoform (specific marker of autophagy). Results are representative of at least three independent experiments.

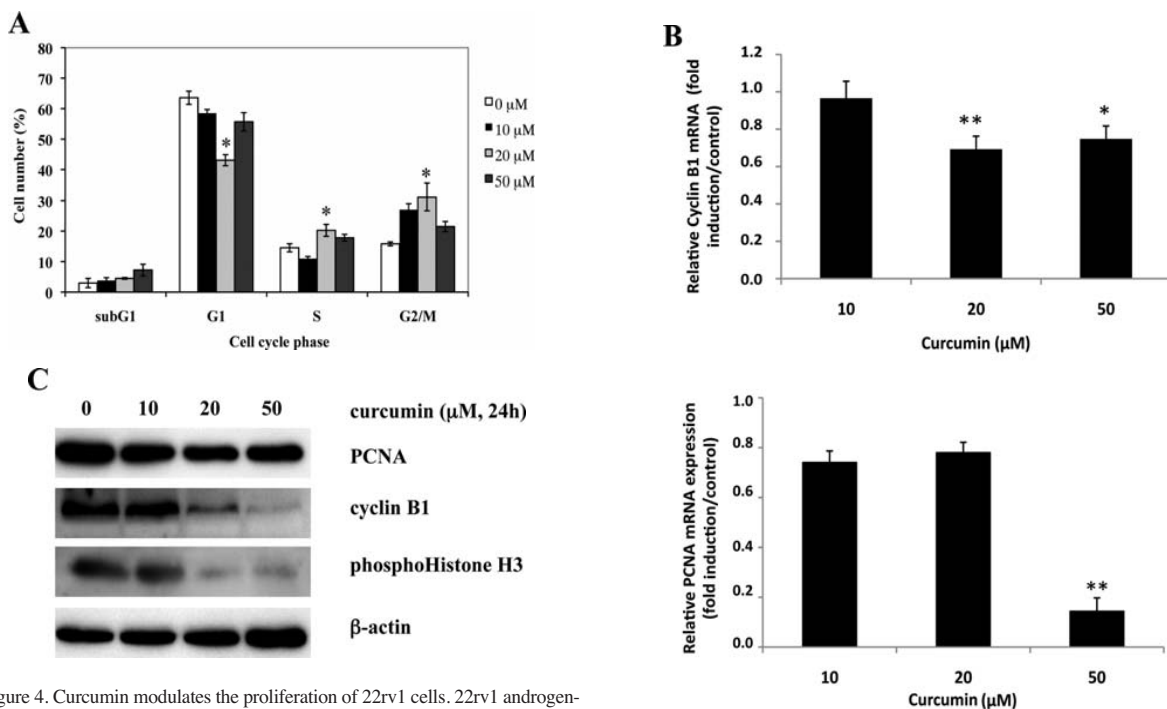


Figure 4. Curcumin modulates the proliferation of 22rv1 cells. 22rv1 androgen-dependent prostate cancer cells were treated with different concentration of curcumin for 24 h. (A) After harvesting, cells were stained with propidium iodide and cell cycle was analysed by flow cytometry. (B) The relative amount of PCNA and cyclin B1 mRNA was determined by real-time PCR analysis. Actin was used as internal control. A value of 1 was assigned to non-treated cells. (C) Total protein level of PCNA, cyclin B1 and phosphoHistone H3 were analysed by Western blotting. Results are the mean \pm SD of at least three independent experiments. * p <0.05 and ** p <0.01 compared to non-treated cells, respectively.

(Fig. 5). The decrease of β -catenin/Tcf-4 signaling transcriptional activity subsequently leads to a decrease of the expression of β -catenin target genes such as c-myc, cyclin D1 and survivin (Fig. 6).

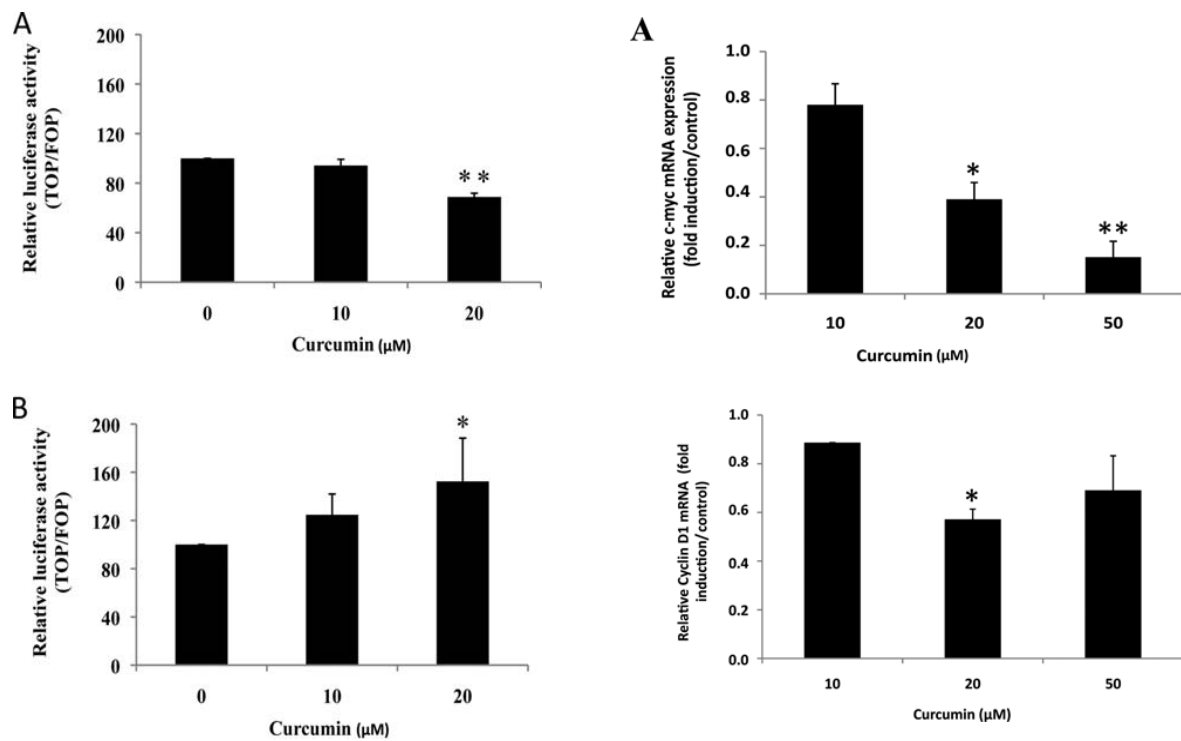


Figure 5. Inhibitory effect of curcumin on Wingless transcriptional activity and targets genes. The effect of curcumin on β -catenin/Tcf-4 transcriptional activity was evaluated in 22rv1 (A) and PC-3 (B) cells transfected with the reporter gene constructs pTOPFlash and pFOPFlash and treated during 24 h with different concentrations of curcumin. Renilla vector pRL-tk-LUC was used as a control of transfection efficiency. Results, expressed as a ratio between pTOPFlash and pFOPFlash, are the mean of at least three independent experiments (TOP/FOP) \pm SD. * $p < 0.05$ compared to non-treated cells, respectively.

Effect of curcumin proteins implicated in the Wnt transcriptional complex. In order to determine the mechanism of action of curcumin on Wnt signaling in 22rv1 cells, we activated the Wnt-pathway by cotransfection of a β -catenin expression vector, containing an activating S33Y mutation (pbCAT), with pTOPFlash (TOP) and pFOPFlash (FOP) Tcf-reporter plasmids. We observed that even mutant β -catenin was able to activate β -catenin-dependent transcription (24), curcumin was unable to modulate this activation (Fig. 7A). This suggests that curcumin does not decrease Wnt transcriptional activity through an effect on β -catenin by itself. This hypothesis was confirmed by Western blot analysis showing that curcumin does not affect the level of expression of β -catenin protein (Fig. 7B). On the contrary, we report that curcumin decreases the expression of Tcf-4 and of its co-repressor CREB binding protein (CBP) and p300, three proteins involved in the Wnt transcriptional complex (Fig. 7B).

Discussion

On the one hand the aberrant activation of the canonical Wingless/ β -catenin signaling pathway is a key element involved in prostate cancer development and progression (3,25), on the other hand, the anti-proliferative potential of curcumin was reported to be highly mediated by the

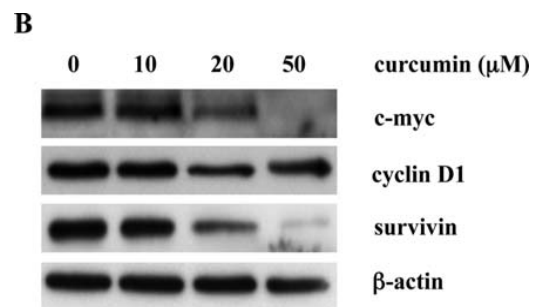


Figure 6. Effect of curcumin on β -catenin-target genes. (A) The relative amount of cyclin D1 and c-myc mRNA was determined by real-time PCR analysis. Actin was used as internal control. A value of 1 was assigned to non-treated cells. (B) Total protein level of cyclin D1, c-myc and survivin were analysed by Western blotting. Results are the mean \pm SD of at least three independent experiments. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ compared to non-treated cells, respectively.

modulation of cyclins, especially through the modulation of the Wnt transcriptional activity in colon, osteosarcoma and breast cancer cells (13,14,16,17,26,27). In the present study, we presented evidence that this natural chemopreventive compound has an effect on cell death and on cell proliferation-mediated by Wnt signaling in androgen-dependent but not in androgen-independent prostate cancer cell lines, and that the difference observed is not linked to a different intracellular localization of curcumin (Fig. 1).

In several cancer cell lines, including prostate cancer cells, curcumin was mainly reported to be an inducer of cell death by apoptosis through the intrinsic and extrinsic pathways (28-32). However, this natural compound was also shown to induce cytotoxicity, G2/M arrest and non-apoptotic/autophagic cell death in malignant glioma cell lines through the inhibition of Akt signaling pathway, the increase

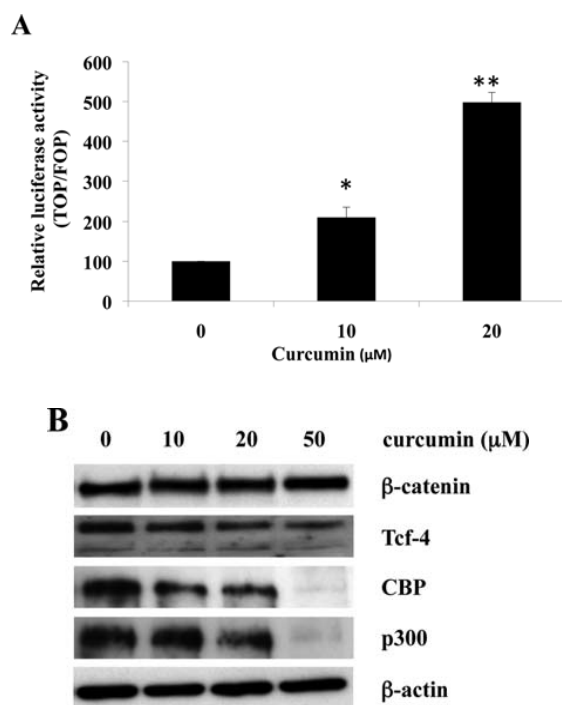


Figure 7. Effect of curcumin on proteins implicated in the Wnt transcriptional complex. (A) 22rv1 cells were co-transfected with pcDNA S33Y and pTOPFlash or FOPFlash and treated with different concentrations of curcumin for 24 h. Renilla vector pRL-tk-LUC was used as a control of transfection efficiency. Results, expressed as a ratio between pTOPFlash and pFOPFlash, are the mean of at least three independent experiments (TOP/FOP) \pm SD. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ compared to non-treated cells, respectively. (B) Nuclear protein level of β -catenin, Tcf-4, p300 and CBP were analyzed by Western blotting. Results are representative of at least three independent experiments.

of Beclin 1 expression level and the appearance of LC3II isoform (33-35). In our experimental approach, we pointed out that curcumin does not induce cell death by apoptosis in androgen-dependent 22rv1 cells (no cleavage of caspases nor PARP, <8% of cells in sub-G1) (Figs. 3 and 4A) but leads to cell death by autophagy as shown by the appearance of LC3B-II isoform and the decrease of Bcl-xL expression (Fig. 3). A link has been established between autophagic cell death and Bcl-2 anti-apoptotic proteins level of expression as it was reported that Bcl-xL binds and inhibits Beclin 1, an essential mediator of autophagy (36,37). Similarly, induction of specific features of apoptosis-independent cell death corresponding to autophagy was observed in oesophageal cancer cells after curcumin treatment (38). Autophagy was reported to be a back-up cell death mechanism when other cell deaths mechanisms failed and is now considered as a target for novel approaches in anticancer therapy (39).

Moreover, depending of cell lines tested, curcumin was shown to induce cell cycle arrest in G1 phase in glioma (40) and prostate cancer cells (41,42) or in G2/M phase in colon (17,31,43) and breast cancer cells (14). In our experimental approach, flow cytometry analysis pointed out that curcumin was able to induce cell cycle arrest in G2/M. The decrease of protein expression of cyclin B1, PCNA and of phospho-histone H3 specific mitosis marker specified that this natural compound

effectively induces an arrest in G2 phase of the cell cycle in 22rv1 cells (Fig. 4). Such an arrest in G2/M and concomitant decrease in cyclin B1 expression or decrease in PCNA expression were also observed in HCT-116 colon cancer cells (17), in BxPC-3 human pancreatic cancer cells (44), in human breast cancer cells (14,45) and in human bladder cancer T24 cells (46) after curcumin treatment. Jaiswal *et al.*, suggested that such arrest in G2/M cell cycle phase in HCT-116 cells could result from an impairment of both Wnt signaling and cell-cell adhesion pathways.

This decrease of 22rv1 cell proliferation suggests that curcumin could exhibit an effect on the Wnt signaling pathway as it was reported that the suppression of this Wnt pathway inhibits prostate cancer cell proliferation (11). We then assessed the effectiveness of curcumin on prostate cancer cell proliferation and especially on the Wnt pathway.

We observed that curcumin is able to decrease the level of the Wnt/ β -catenin/Tcf-4 transcriptional activity in androgen-dependent (22rv1) cells that leads to a decrease of the expression of β -catenin target genes (47,48) such as c-myc, cyclin D1 and survivin (Fig. 6), that are critical for tumor growth and survival, whereas no inhibitory effect was observed on Wnt transcriptional activity in androgen-independent (PC-3) cells. Survivin, a well-described member of the inhibitor of apoptosis (IAP), is an attractive curcumin target in cancer as it is differentially expressed in tumor vs. normal tissues (not expressed in normal prostate secretory epithelium but strongly expressed in prostate cancer cells). Survivin appears as an important regulator of the G2/M phase of the cell cycle and is normally required for maintaining cancer-cell viability and invasion by prostate cancer metastasis (49). Cyclin D1 is a known proto-oncogene that usually forms a complex with cyclin-dependent kinase (CDK), which activity is required for the transition from G1 \rightarrow S (50) and which down-regulation by curcumin was already related to the suppression of cell proliferation in breast, prostate and squamous cell carcinoma (14,51). Such decrease of cyclin D1 observed after curcumin treatment (Fig. 6B) fits with previously published experiments performed in LNCaP androgen-dependent cells (51) and with the decrease of cell amount in G1 phase observed in Fig. 4A. By the same way, c-myc, another β -catenin target gene (48) was shown to be decreased by curcumin treatment in correlation with a G2/M cell cycle arrest, a decrease of β -catenin/Tcf-4 transcriptional activity and of nuclear β -catenin and Tcf-4 expression in HCT-116 colon cancer cells (16,17) but never in prostate cancer cells.

Such inhibitory effect of curcumin on the Wnt transcriptional activity was thus already observed in human osteosarcoma cell lines (52), in colon (16,17) and breast cancer cells (14) but till now nothing was reported in the literature concerning the effect of curcumin on the Wnt signaling pathway in prostate cancer cells. In the case of breast cancer, low cytostatic dose of 20 μ M curcumin was reported to induce an arrest in G2/M cell cycle phase, that was linked to the decrease of Wnt/ β -catenin pathway components, such as nuclear dishevelled and β -catenin proteins, but also the positively-regulated β -catenin targets, cyclin D1 and slug (14). Such curcumin-induced suppression of cell proliferation was correlated with down-regulation of cyclin D1 expression in breast, prostate and squamous cell carcinoma (51).

In the last part of our experimental approach, we determine at which step of the Wnt signaling cascade acts curcumin in order to understand the mechanisms by which curcumin leads to the decrease of Wnt transcriptional activity observed in 22rv1 cells. Co-transfection performed in the presence of mutated β -catenin vector as well as Western blot analysis of β -catenin expression (Fig. 7) revealed that curcumin has no effect on β -catenin by itself, but acts on the transcriptionally active complex through the decrease of expression of Tcf-4 and of its co-activators CBP and p300 (53). This fits with previous published data reporting that curcumin is a potent *in vitro* inhibitor of p300/CBP (15,54) and that natural derivatives of curcumin (demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin) are able to attenuate the expression of p300 co-activator and subsequently the Wnt transcriptional activity in human embryonic HEK293 cells (15).

In conclusion, we demonstrate that curcumin affects cell proliferation of androgen-dependent but not of androgen-independent prostate cancer cells through the modulation of the Wnt transcriptional complex and activity leading to a decrease of expression of β -catenin targets genes highly implicated in cell cycle regulation. As the inhibition of the Wnt signaling appears at the level of downstream effectors, this avoids interference with the physiological role of the Wnt signaling pathway, so that curcumin appears as a considerable anti-neoplastic natural compound against androgen-dependent prostate cancer cells with reduced side-effects. Further investigations are needed to understand the inefficiency of curcumin on the Wnt signaling in androgen-independent prostate cancer cells and to evaluate the effect of promising curcumin analogs or derivatives on these cellular model representative of late stage of prostate cancer development.

Acknowledgements

M.H.T. is supported by Télévie grants (Fonds National de la Recherche Scientifique, Belgium). F.G. is a recipient of the European Community's Seventh Framework Programme (FP7/2007-2013) under grant agreement 215009 RedCat. The research of M. Diederich at the Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire du Cancer (LBMCC) is financially supported by 'Recherche Cancer et Sang' foundation, by 'Recherches Scientifiques Luxembourg' asbl, by 'Een Häerz fir Kriibskrank Kanner' association, the Action Lions 'Vaincre le Cancer' Luxembourg, The Fonds National de la Recherche Luxembourgeois, Télévie Luxembourg and the Foundation for Scientific Cooperation between Germany and Luxemburg for additional support. Further support was received from the European Union (ITN 'RedCat' 215009 and Interreg IVa project 'Corena'). Print costs were covered by the Fonds National de la Recherche (FNR) Luxembourg.

References

- Polakis P: Wnt signaling and cancer. *Genes Dev* 14: 1837-1851, 2000.
- Verras M and Sun Z: Roles and regulation of Wnt signaling and beta-catenin in prostate cancer. *Cancer Lett* 237: 22-32, 2006.
- Yardy GW and Brewster SF: Wnt signalling and prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 8: 119-126, 2005.
- Clevers H: Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell* 127: 469-480, 2006.
- Camilli TC and Weeraratna AT: Striking the target in Wnt-y conditions: intervening in Wnt signaling during cancer progression. *Biochem Pharmacol* (In press).
- Hurlstone A and Clevers H: T-cell factors: turn-ons and turn-offs. *EMBO J* 21: 2303-2311, 2002.
- Barker N and Clevers H: Mining the Wnt pathway for cancer therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 5: 997-1014, 2006.
- Janssens N, Janicot M and Perera T: The Wnt-dependent signaling pathways as target in oncology drug discovery. *Invest New Drugs* 24: 263-280, 2006.
- Surh YJ: Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nat Rev Cancer* 3: 768-780, 2003.
- Kundu JK, Choi KY and Surh YJ: beta-catenin-mediated signaling: a novel molecular target for chemoprevention with anti-inflammatory substances. *Biochim Biophys Acta* 1765: 14-24, 2006.
- Lu W, Tinsley HN, Keeton A, Qu Z, Piazza GA and Li Y: Suppression of Wnt/beta-catenin signaling inhibits prostate cancer cell proliferation. *Eur J Pharmacol* 602: 8-14, 2009.
- Aggarwal BB, Kumar A and Bharti AC: Anticancer potential of curcumin: preclinical and clinical studies. *Anticancer Res* 23: 363-398, 2003.
- Teiten MH, Eifes S, Dicato M and Diederich M: Curcumin - the paradigm of multi-target natural compound with applications in cancer prevention and treatment. *Toxins* 2: 128-162, 2010.
- Prasad CP, Rath G, Mathur S, Bhatnagar D and Ralhan R: Potent growth suppressive activity of curcumin in human breast cancer cells: modulation of Wnt/beta-catenin signaling. *Chem Biol Interact* 181: 263-271, 2009.
- Ryu MJ, Cho M, Song JY, *et al.*: Natural derivatives of curcumin attenuate the Wnt/beta-catenin pathway through down-regulation of the transcriptional coactivator p300. *Biochem Biophys Res Commun* 377: 1304-1308, 2008.
- Park CH, Hahm ER, Park S, Kim HK and Yang CH: The inhibitory mechanism of curcumin and its derivative against beta-catenin/Tcf signaling. *FEBS Lett* 579: 2965-2971, 2005.
- Jaiswal AS, Marlow BP, Gupta N and Narayan S: Beta-catenin-mediated transactivation and cell-cell adhesion pathways are important in curcumin (diferuylmethane)-induced growth arrest and apoptosis in colon cancer cells. *Oncogene* 21: 8414-8427, 2002.
- Teiten MH, Gaascht F, Eifes S, Dicato M and Diederich M: Chemopreventive potential of curcumin in prostate cancer. *Genes Nutr* 5: 61-74, 2010.
- Bostwick DG: Progression of prostatic intraepithelial neoplasia to early invasive adenocarcinoma. *Eur Urol* 30: 145-152, 1996.
- Livak KJ and Schmittgen TD: Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2[-Delta Delta C(T)] method. *Methods* 25: 402-408, 2001.
- Schreiber E, Matthias P, Muller MM and Schaffner W: Rapid detection of octamer binding proteins with 'mini-extracts', prepared from a small number of cells. *Nucleic Acids Res* 17: 6419, 1989.
- Gray JW and Coffino P: Cell cycle analysis by flow cytometry. *Methods Enzymol* 58: 233-248, 1979.
- Mizushima N and Yoshimori T: How to interpret LC3 immunoblotting. *Autophagy* 3: 542-545, 2007.
- Cronauer MV, Schulz WA, Ackermann R and Burchardt M: Effects of WNT/beta-catenin pathway activation on signaling through T-cell factor and androgen receptor in prostate cancer cell lines. *Int J Oncol* 26: 1033-1040, 2005.
- Robinson DR, Zylstra CR and Williams BO: Wnt signaling and prostate cancer. *Curr Drug Targets* 9: 571-580, 2008.
- Kakarala M, Brenner DE, Korkaya H, *et al.*: Targeting breast stem cells with the cancer preventive compounds curcumin and piperine. *Breast Cancer Res Treat* (In press).
- Narayan S: Curcumin, a multi-functional chemopreventive agent, blocks growth of colon cancer cells by targeting beta-catenin-mediated transactivation and cell-cell adhesion pathways. *J Mol Histol* 35: 301-307, 2004.
- Reuter S, Eifes S, Dicato M, Aggarwal BB and Diederich M: Modulation of anti-apoptotic and survival pathways by curcumin as a strategy to induce apoptosis in cancer cells. *Biochem Pharmacol* 76: 1340-1351, 2008.
- Dorai T, Gehani N and Katz A: Therapeutic potential of curcumin in human prostate cancer-I. curcumin induces apoptosis in both androgen-dependent and androgen-independent prostate cancer cells. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 3: 84-93, 2000.

30. Mukhopadhyay A, Bueso-Ramos C, Chatterjee D, Pantazis P and Aggarwal BB: Curcumin downregulates cell survival mechanisms in human prostate cancer cell lines. *Oncogene* 20: 7597-7609, 2001.
31. Lin SS, Huang HP, Yang JS, *et al*: DNA damage and endoplasmic reticulum stress mediated curcumin-induced cell cycle arrest and apoptosis in human lung carcinoma A-549 cells through the activation of caspase cascade- and mitochondrial-dependent pathway. *Cancer Lett* 272: 77-90, 2008.
32. Song G, Mao YB, Cai QF, Yao LM, Ouyang GL and Bao SD: Curcumin induces human HT-29 colon adenocarcinoma cell apoptosis by activating p53 and regulating apoptosis-related protein expression. *Braz J Med Biol Res* 38: 1791-1798, 2005.
33. Aoki H, Takada Y, Kondo S, Sawaya R, Aggarwal BB and Kondo Y: Evidence that curcumin suppresses the growth of malignant gliomas *in vitro* and *in vivo* through induction of autophagy: role of Akt and extracellular signal-regulated kinase signaling pathways. *Mol Pharmacol* 72: 29-39, 2007.
34. Shinjima N, Yokoyama T, Kondo Y and Kondo S: Roles of the Akt/mTOR/p70S6K and ERK1/2 signaling pathways in curcumin-induced autophagy. *Autophagy* 3: 635-637, 2007.
35. Jia YL, Li J, Qin ZH and Liang ZQ: Autophagic and apoptotic mechanisms of curcumin-induced death in K562 cells. *J Asian Nat Prod Res* 11: 918-928, 2009.
36. Pattinre S, Tassa A, Qu X, *et al*: Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell* 122: 927-939, 2005.
37. Maiuri MC, Le Toumelin G, Criollo A, *et al*: Functional and physical interaction between Bcl-X(L) and a BH3-like domain in Beclin-1. *EMBO J* 26: 2527-2539, 2007.
38. O'Sullivan-Coyne G, O'Sullivan GC, O'Donovan TR, Piwocka K and McKenna SL: Curcumin induces apoptosis-independent death in oesophageal cancer cells. *Br J Cancer* 101: 1585-1595, 2009.
39. Moretti L, Yang ES, Kim KW and Lu B: Autophagy signaling in cancer and its potential as novel target to improve anticancer therapy. *Drug Resist Updat* 10: 135-143, 2007.
40. Choi BH, Kim CG, Bae YS, Lim Y, Lee YH and Shin SY: p21 Waf1/Cip1 expression by curcumin in U-87MG human glioma cells: role of early growth response-1 expression. *Cancer Res* 68: 1369-1377, 2008.
41. Hour TC, Chen J, Huang CY, Guan JY, Lu SH and Pu YS: Curcumin enhances cytotoxicity of chemotherapeutic agents in prostate cancer cells by inducing p21(WAF1/CIP1) and C/EBPbeta expressions and suppressing NF-kappaB activation. *Prostate* 51: 211-218, 2002.
42. Aggarwal BB, Banerjee S, Bharadwaj U, Sung B, Shishodia S and Sethi G: Curcumin induces the degradation of cyclin E expression through ubiquitin-dependent pathway and up-regulates cyclin-dependent kinase inhibitors p21 and p27 in multiple human tumor cell lines. *Biochem Pharmacol* 73: 1024-1032, 2007.
43. Hanif R, Qiao L, Shiff SJ and Rigas B: Curcumin, a natural plant phenolic food additive, inhibits cell proliferation and induces cell cycle changes in colon adenocarcinoma cell lines by a prostaglandin-independent pathway. *J Lab Clin Med* 130: 576-584, 1997.
44. Sahu RP, Batra S and Srivastava SK: Activation of ATM/Chk1 by curcumin causes cell cycle arrest and apoptosis in human pancreatic cancer cells. *Br J Cancer* 100: 1425-1433, 2009.
45. Ramachandran C and You W: Differential sensitivity of human mammary epithelial and breast carcinoma cell lines to curcumin. *Breast Cancer Res Treat* 54: 269-278, 1999.
46. Park C, Kim GY, Kim GD, Choi BT, Park YM and Choi YH: Induction of G2/M arrest and inhibition of cyclooxygenase-2 activity by curcumin in human bladder cancer T24 cells. *Oncol Rep* 15: 1225-1231, 2006.
47. Tetsu O and McCormick F: Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature* 398: 422-426, 1999.
48. He TC, Sparks AB, Rago C, *et al*: Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science* 281: 1509-1512, 1998.
49. Altieri DC: Validating survivin as a cancer therapeutic target. *Nat Rev Cancer* 3: 46-54, 2003.
50. Sherr CJ: Cancer cell cycles. *Science* 274: 1672-1677, 1996.
51. Mukhopadhyay A, Banerjee S, Stafford LJ, Xia C, Liu M and Aggarwal BB: Curcumin-induced suppression of cell proliferation correlates with down-regulation of cyclin D1 expression and CDK4-mediated retinoblastoma protein phosphorylation. *Oncogene* 21: 8852-8861, 2002.
52. Leow P, Tian Q, Ong Z, Yang Z and Ee P: Antitumor activity of natural compounds, curcumin and PKF118-310, as Wnt/beta-catenin antagonists against human osteosarcoma cells. *Invest New Drugs* (In press).
53. Hecht A, Vleminckx K, Stemmler MP, van Roy F and Kemler R: The p300/CBP acetyltransferases function as transcriptional coactivators of beta-catenin in vertebrates. *EMBO J* 19: 1839-1850, 2000.
54. Balasubramanyam K, Varier RA, Altamirano M, *et al*: Curcumin, a novel p300/CREB-binding protein-specific inhibitor of acetyltransferase, represses the acetylation of histone/nonhistone proteins and histone acetyltransferase-dependent chromatin transcription. *J Biol Chem* 279: 51163-51171, 2004.

Natural compounds as inflammation inhibitors

Marc Schumacher · Tom Juncker · Michael Schnekenburger ·
François Gaascht · Marc Diederich

Received: 25 June 2010 / Accepted: 23 August 2010 / Published online: 3 May 2011
© Springer-Verlag 2011

Since 1998, Dr. Marc Diederich and his research team successfully managed eight cell signaling meetings in Luxembourg attracting more than 5,500 scientists. In January 2010, over 550 scientists and exhibitors came together for the meeting Inflammation 2010, which was held from January 27th to 30th. Invited and selected talks followed the keynote session from Dr. Jurg Tschopp (Department of Biochemistry, Switzerland), and more than 210 posters reported recent research results in cell signaling, cancer, inflammation, apoptosis, and innate immunity. This editorial aims at giving insight into natural compounds-related research covered by the meeting.

Known in traditional medicines for several centuries, nature remains a potent source of drugs for the treatment of a large variety of diseases. More than 70 percent of today's anticancer drugs originate from natural compounds or are synthetic derivatives of natural compounds. High-throughput screening of synthetic libraries gained raising importance during the last 15 years; however, the research on natural products as promising drug candidates is kept actually at a high level.

Recent published data report that innate immunity operates as a complex system to sense and differentiate danger signals from non-danger inputs. Though the immune system will respond to infection or injury, it will remain inactive in case of harmless compounds, food antigens, or microscopes of the gut flora. A deregulated chronic inflammation might lead in some cases to hay

fever, atherosclerosis, and rheumatoid arthritis. Furthermore, the link between inflammation and cancer, discovered by Virchow in the 19th century, has been confirmed by a large number of groups. In 20 percent of all cases, inflammation is a direct cause of cancer, and in 65 percent of malignancies, the diseases has been caused by obesity, other dietary factors, tobacco smoke, and inhaled pollutants indirectly related to inflammation. The effect of inflammation on human health led to increased interest in research in this area.

Interestingly, the keynote session of the meeting reviewed the importance of inflammasomes as guardians of human body presented by Pr Jurg Tschopp (Department of Biochemistry, Switzerland) of the University of Lausanne. The inflammasome is a complex composed of caspase 1, PYCARD, and NALP; its exact composition depends on the activator involved and is triggered by pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), danger-associated molecular patterns (DAMPs), and crystalline substances. Upon activation, ROS-mediated inflammasome complex formation leads to secretion of pro-inflammatory cytokines, such as interleukin-1 β (IL-1 β) or IL-18. Inflammasome-dependent activity results to pyroptosis, a highly inflammatory form of cell death. Several human diseases are associated with the activation of inflammasomes: auto-inflammatory diseases such as cryopyrin-associated periodic syndromes (CAPS), gout. It has been reported recently that high extracellular glucose triggers IL-1 β secretion via the NLRP3 inflammasome and the NLRP3-binding protein, TXNIP, and plays a role in triggering type II diabetes. This mentioned research findings of the inflammasome pathway linked to inflammatory diseases might lead to better treatment of the latter, as it is more advantageous to inhibit a deregulated signaling cascade at an upstream position. Clinical trials evaluate the injection of Anakinra (brand

M. Schumacher · T. Juncker · M. Schnekenburger ·
F. Gaascht · M. Diederich (✉)
Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire du Cancer,
Fondation de Recherche Cancer et Sang, Hôpital Kirchberg,
9 Rue Edward Steichen, 2540 Luxembourg, Luxembourg
e-mail: marc.diederich@lbmcc.lu

name Kineret[®]), a recombinant form of the naturally occurring antagonist, IL-1RA, for the treatment of gout, CAPS, type II diabetes, and rheumatoid arthritis.

Interestingly, a considerable number of talks reported the implicit use of natural compounds and synthetic derivatives for the treatment of inflammatory diseases. Dr. Ajay Goel (Baylor University Medical Center, USA) raised the attention to the fact that besides genetics, the field of epigenetic gene regulation recently emerged as one of the key driving factors in chronic inflammatory diseases. Goel discussed the regulatory mechanisms that control the expression of various major inflammatory genes and how diet/natural compounds could influence this regulation. Since epigenetic regulatory mechanisms are potentially reversible, this field gains further interest especially related to the re-exploration of anti-inflammatory bioactive food compounds for their properties as potential epigenetic modulators/inhibitors, by targeting the enzymatic activities of chromatin modifier proteins belonging to the DNA methyl transferase (DNMT), histone deacetylase (HDAC), and histone acetyl transferase (HAT) families. To date, a very limited body of experimental evidence addresses molecular mechanisms involved in diet-induced epigenetic alterations in *in vitro* or pre-clinical studies. Therefore, it is only the beginning of the investigation of epigenetic mechanisms and their modulation by dietary agents in inflammation-related disorders, which provides an exciting opportunity for the development of potential new therapeutic approaches for treatment as well as for prevention of many diseases. In light of this, it is very encouraging to witness the promise of dietary agents as modulators of epigenetic mechanisms. Most epigenetic modulators described belong to the polyphenol family, and for some of those dietary agents, they are already known for other properties; curcumin and epigallocatechin gallate (EGCG) apparently act as HAT inhibitors, DNMT1 inhibitors, as well as miRNA modulators. Genestein, acetyl-keto-beta boswellic acid (AKBA), and caffeic acid were described as DNMT1 inhibitors. Finally, it was mentioned anarcadic acid and garcinol as potent HAT inhibitors, genestein and sulforaphanes as HDAC inhibitors, and resveratrol as a sirtuin (Sirt 1) activator.

NF- κ B (NF-kappaB) is a key transcription factor associated with inflammatory diseases. Pr. Young-Joon Surh (Research Institute of Pharmaceutical Sciences, South Korea) reported the crosstalk between the transcription factor NF- κ B and redox-sensitive transcription factors. In detail, the nuclear factor E2-related factor-2 (Nrf2) activates antioxidant enzymes via binding to antioxidant responsive element (ARE), which strengthens cellular antioxidant potential. Therefore, Nrf2 is a key target gene for inflammatory disorders. Many phytochemicals—such as the organosulfur compound sulforaphane, the

polyphenol curcumin and the sesquiterpene zerumbone—exerted antioxidant gene expression, by oxidation or covalent modification of thiol groups associated with the presented transcription factors and in this way maintain cellular homeostasis. Though, these mentioned molecules play a crucial role in chemoprevention and cytoprotection.

Nicotine and muscarine, natural products isolated of the tobacco plant and mushrooms, respectively, despite their known toxic to human health, are known to affect the inflammatory pathway. Dr Wouter de Jonge (Academic Medical Center, Amsterdam) reported the effect of especially nicotinic agonists and their stimulation on the vagus nerve, which down-regulate pro-inflammatory cytokine production and modulates JAK/STAT and NF- κ B signaling pathways. Future studies have to elucidate the inhibition of the NF- κ B pathway via α 7nAChR agonists while circumventing their neurotoxicity.

New therapies for the treatment of cystic fibrosis patients are emerging during the last years. Pr. Roberto Gambari (Department of Biochemistry and Molecular Biology, Italy) reported the extraction of two natural products citropten and bergapten from bergamot, which expressed a high inhibition potential against the expression of IL-8; NF- κ B plays a key role in IL-8 expression. Furthermore, the investigation into a furocoumarin database led to the discovery of furo(3,2-c)chromen-4-one derivative, which could be a potential pharmaceutical drug to control lung inflammation in CF patients.

Pr. Bharat Aggarwal (Department of Experimental Therapeutics, MD Anderson Cancer Center, Houston, USA) assessed the impact of major risk factors, such as chronic infections, obesity, alcohol, tobacco, radiation, and pollutants, leading to the development of the most common types of cancer. NF- κ B and STAT3, two inflammation pathways, are constitutively activated in most cancers and therefore play a crucial role in the development of most cancers. The potential of phytochemicals extracted from traditional Indian and Chinese medicine, like berberine, curcumin and celastrol, for cancer prevention and therapy was discussed.

As one of the most common cancer worldwide with still increasing incident rates, skin cancer requires particular attention and accurate treatments. The signal transduction pathways triggered by the epidermal growth factor receptor (EGFR), protein kinase C (PKC), the mitogen-activated protein (MAP) kinases c-Jun N-terminal kinase (JNK)1/2, p38, extracellular-regulated kinase (ERK)1/2, and cyclooxygenase (COX)-2 are activated by exposure of the skin to ultraviolet (UV) A and B irradiation. Inhibition of these signals by natural products should decrease skin carcinogenesis. Pr Zigang Dong and collaborators (Hormel Institute, Austin, MN, USA) were the first to elucidate the effect

of dietary compounds on specific cell signaling pathways and discovered a series of chemopreventive agents such as EGCG from green tea, myricetin, quercetin, 5-deoxykaempferol, 6-gingerol, and resveratrol, all isolated from fruits and vegetables, which are able to prevent skin carcinogenesis. Fewer secondary effects should result from the natural origin from these drugs in contrast to synthetic therapeutic agents.

Radiotherapy is a pre-operative treatment for patients with a variety of cancer. However, the pathological response level to this therapy is low as pro-survival pathways are activated after radiation by a large percentage of resistant tumor cells. For this reason, Krishnan and coworkers (MD Anderson Cancer Center, Houston, TX, USA) developed a method to sensitize resistant colorectal cancer cells to radiation therapy. As previously reported, the inducible signaling pathway NF- κ B protects cells from cell death via up-regulation of pro-survival genes. The research team used curcumin to increase the efficiency of radiation therapy. Curcumin down-regulated the radiation-induced phosphorylation and degradation of inhibitor of kappa B kinase (IKK). In addition, NF- κ B-regulated genes (Bcl-2, Bcl-xL, inhibitor of apoptosis (IAP)-2, COX-2, and cyclin D1) were inhibited. Furthermore, this molecule attenuates in parallel side effects including fatigue associated with radiotherapy. These results led to the identification of curcumin as a radiosensitizer in colorectal cancer. Very recently, the team of Krishnan reported that the histone deacetylase inhibitor vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid, SAHA) exerted a similar sensitization activity compared to curcumin.

A persistent gathering of mature resting B cells in the peripheral blood, bone marrow, and lymphatic tissue is one characteristic of chronic lymphocytic leukemia (CLL). This accumulation is a result of aberrant apoptosis and not due to increased proliferation. Pr. Varsha Gandhi (MD Anderson Cancer Center, Houston, TX, USA) reported about Bcl-2 antagonists, including the polyphenol gossypol and its analog AT-101 derived from the cotton plant, which targets pro-survival proteins. In fact, these compounds displace Bim from Bcl-2's BH3-binding pocket, and then Bim activates BAX, which induces mitochondrial permeabilization and finally leads to cancer cell death.

Flavonoids from plants have been reported to exert anti-inflammatory activity *in vitro* and *in vivo*. They have an impact on the pro-inflammatory gene expression, like cyclooxygenase-2, nitric oxide synthase and pivotal cytokine. Pr. De-Xing Hou (Department of Biochemical Science and Technology, Japan) reported the effect of flavonoids on protein kinases, which can bind directly to protein kinases or inhibit the phosphorylation of the protein kinases JAK1, Akt, MEK1, Fyn, MKK4, ZAP-70, and PI3K. It is noteworthy that Akt, PI3K, and ZAP-70 act upstream of the NF- κ B pathway. As protein kinases act on

a wide range of intracellular signaling pathways, it is not surprising that flavonoids are reported to exert an impact on multiple biomolecular functions, which will be elucidated in future by the authors.

In vine, resveratrol is produced in large quantity as a response to biotic or abiotic stress; this secondary metabolite activates plant defense mechanisms by antioxidative protection and inhibition of fungi infection. Pr Norbert Latruffe (Laboratory of Biochemistry of Metabolism and Nutrition, INSERM, Dijon, France) investigated the different pathways affected by resveratrol. The latter modulates a large variety of signaling mechanisms, exerts antioxidant potential, and acts as a radical scavenger molecule; this polyphenol inhibits the NF- κ B as well as the COX-2 pathway. The secretion of IL-6 and IL-8 is down-regulated, and it blocks cells in the G2/M phase. Recently, the author published a structure–activity relationship study about 14 different resveratrol analogs; it concludes that the trimethoxy derivative of (*Z*)-resveratrol exerts the highest bioactivity.

Marine organisms produce secondary metabolites as an innate defense. Dr. Marc Schumacher (Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire du Cancer, Luxembourg) reported the isolation and bioactivity determination of a variety of natural products isolated from marine sponges and bacteria. The most active compound, the sesterterpene heteronemin, inhibited proteasome activity at nanomolar concentrations. Furthermore, this product induced apoptotic cell death to the resistant cancer cell line K562 and the NF- κ B pathway was down-regulated. Future research will be carried out on natural and synthetic derivatives of this terpene.

Rheumatoid arthritis is a severe autoimmune disease resulting in articulation inflammation and bone lesions. With regard to its impressive incident rates, there is a huge need for new, additional therapeutic agents. Dr. Veera R. Konda (KinDex Therapeutics, USA) described a mixture of synthetic substituted cyclopentadiones, named META060. The latter has a US GRAS status as bittering additives in beer. Apart of the NF- κ B pathway inhibition, this mixture blocks the kinases SyK, BTK, GSK3 β , and PI3K. Bioactivity tests show that this mixture is able to inhibit inflammation in arthritis mice models. These results suggest that these molecules might act as an efficient and safe therapeutics for the treatment of chronic inflammation.

As a conclusion, multiple presentations surveyed the role of inflammation in cancer and other diseases. There exist a large network of different signaling pathways involved in inflammation processes; hence, it is noteworthy more than 10 oral presentations reported the tight link between the NF- κ B pathway and inflammation. So the NF- κ B pathway remains one key role player for the development of novel therapeutics for the treatment of diseases based on inflammation. Interestingly, natural compounds

especially from dietary origins underline the increasing impact of this research area. Hence, the next meeting in Luxembourg-Kirchberg, organized by Dr. Marc Diederich and his research team, will focus on natural compounds as regulators of cell signaling pathways and novel therapeutic tools.

Acknowledgments We would like to thank “Recherches Scientifiques Luxembourg asbl” who organized the meeting. The Fonds National de la Recherche, Luxembourg, Kuwait Petroleum SA, The City of Luxembourg, The Fondation de Recherche “Cancer et Sang”, Computer Home and Canon are thanked for additional support. Finally all members of the organization team are thanked for their great organization.



UNBS1450, a steroid cardiac glycoside inducing apoptotic cell death in human leukemia cells

Tom Juncker¹, Claudia Cerella¹, Marie-Hélène Teiten¹, Franck Morceau, Marc Schumacher, Jenny Ghelfi, François Gaascht, Michael Schnekenburger, Estelle Henry, Mario Dicato, Marc Diederich*

Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire du Cancer, Fondation de Recherche Cancer et Sang, Hôpital Kirchberg, 9 Rue Edward Steichen, 2540 Luxembourg, Luxembourg

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 June 2010

Accepted 27 August 2010

Keywords:

UNBS1450

NF- κ B

Apoptosis

Cardenolide

Cancer

ABSTRACT

Cardiac steroids are used to treat various diseases including congestive heart failure and cancer. The aim of this study was to investigate the anti-leukemic activity of UNBS1450, a hemi-synthetic cardenolide belonging to the cardiac steroid glycoside family. Here, we report that, at low nanomolar concentrations, UNBS1450 induces apoptotic cell death. Subsequently, we have investigated the molecular mechanisms leading to apoptosis activation. Our results show that UNBS1450 inhibits NF- κ B transactivation and triggers apoptosis by cleavage of pro-caspases 8, 9 and 3/7, by decreasing expression of anti-apoptotic Mcl-1 and by recruitment of pro-apoptotic Bak and Bax protein eventually resulting in cell death.

© 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Most anti-cancer drugs are isolated from natural sources or are at least bearing close structural relationships to natural compounds. Both, marine and terrestrial organisms are considered today as important sources for novel lead compounds.

Non-cardiotonic steroid glycosides obtained from the tropical plant *Calotropis procera* possess anti-cancer potential via binding to the $\alpha 3\beta 1$ Na⁺/K⁺-ATPase isozymes. The cardenolide UNBS1450 (Fig. 1A) has been analyzed *in vitro* as well as *in vivo* on non small cell lung cancer (NSCLC) and glioblastoma xenograft mice models [1,2]. UNBS1450 is a chemically modified form of 2-oxovoruscharin, a derivative of voruscharin; despite its already promising anti-cancer potential, the high toxicity of 2-oxovoruscharin required chemical modifications to improve tolerance *in vivo* [3]. The improved hemi-synthetic compound UNBS1450 revealed itself to be significantly less toxic when compared to its mother compound and in the same time was proven to be even more potent in cancer therapy: with an average MTD of up to 120 mg/kg, chronic administration increased mouse survival and reduced glioblastoma cell migration. Mijatovic et al. showed that UNBS1450-mediated antitumor activity is due to activation of non-apoptotic cell death mechanisms in Na⁺/K⁺-ATPase $\alpha 1$ over-

expressing glioma cells [4]. UNBS1450 has the capacity to disorganize nucleolar structure and functions via impairment of cyclin-dependent kinase and c-Myc expressions accompanied by disorganization of cancer cell-specific perinucleolar bodies. This non-apoptotic cancer cell death was a new cardenolide-induced mechanism of antitumor action [5] and this drug was described to be able to circumvent glioblastoma resistance to apoptosis [6].

Nuclear factor (NF)- κ B has been shown previously to be implicated in (1) cell death (apoptosis), (2) cell adhesion, (3) cell proliferation, (4) innate- and adaptive-immune response and (5) cancer development. This dimeric protein complex can both induce and repress gene expression, by binding to DNA sequences found in promoter and enhancer regions. NF- κ B hetero- and homodimers can be constituted of five different family members: RelA (p65), RelB, c-Rel, p50/p105 (NF- κ B1) and p52/p100 (NF- κ B2) [7]. In the absence of an extrinsic cell signal, NF- κ B dimers remain sequestered in the cytoplasm, inactivated by the NF- κ B inhibitor I κ B. Upon cell stimulation by cytokines, proliferating agents, carcinogens or physical stress, I κ B phosphorylation by the I κ kinase (IKK) frees the NF- κ B dimer, then rapidly translocating into the nucleus and transactivating more than 550 genes.

Deregulation of NF- κ B leads to various pathologies including chronic inflammations and cancer [8]. NF- κ B has become a major target in drug engineering. To date, a number of natural NF- κ B inhibitors are being investigated, many of them being plant-derived isoprenoids and polyphenols.

As NF- κ B is responsible for increased cell resistance towards possible cytotoxic treatments currently applied in clinics, apoptosis

* Corresponding author. Tel.: +352 2468 4040; fax: +352 2468 4060.

E-mail address: marc.diederich@lbmcc.lu (M. Diederich).

¹ These authors contributed equally to this work.

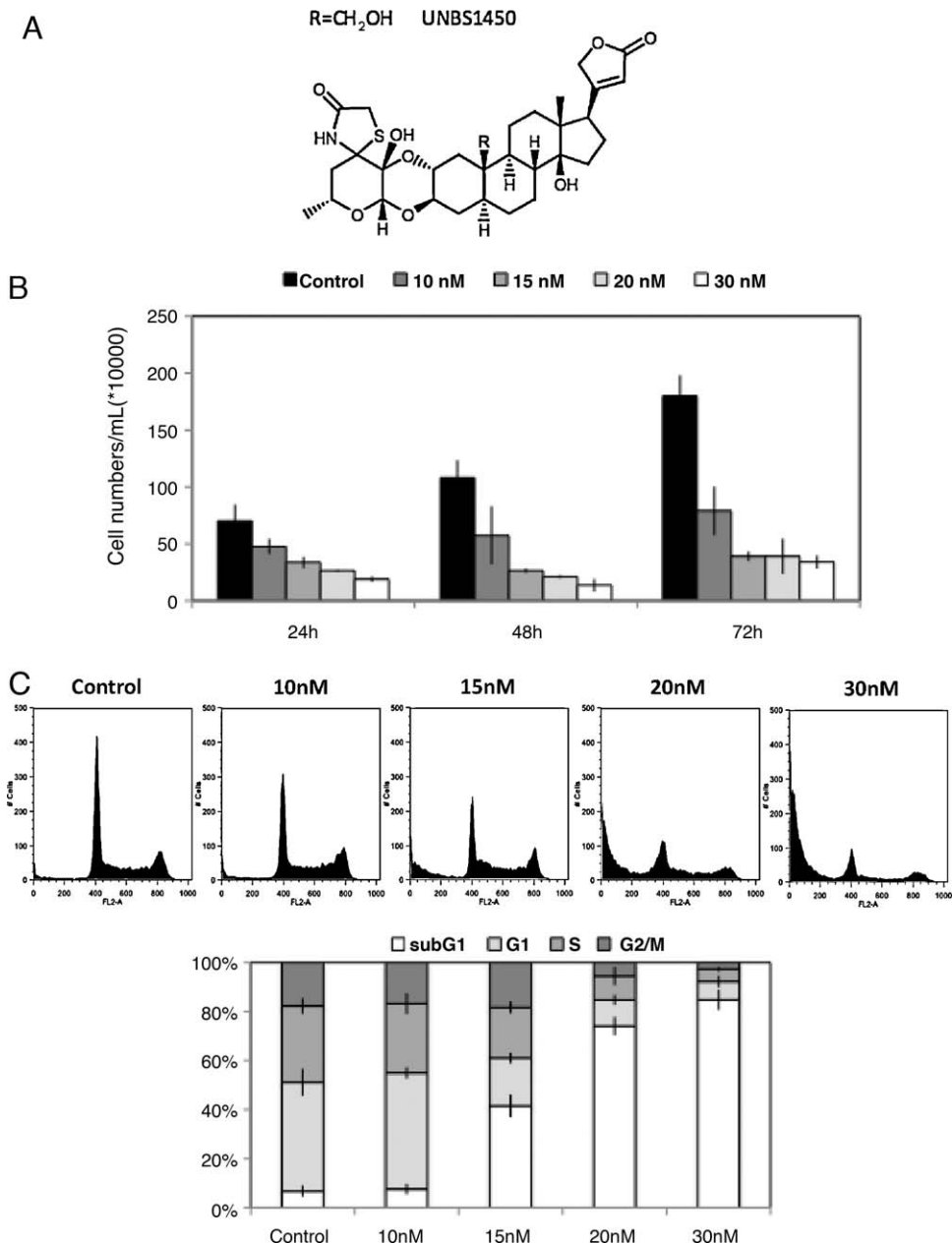


Fig. 1. UNBS1450 induces apoptotic cell death in U937 cells. (A) Molecular structure. (B) Analysis of UNBS1450-induced cell death was performed by Trypan Blue staining after 24, 48 and 72 h of treatment with UNBS1450 at 10, 15, 20 and 30 nM. (C) Cell cycle analysis after 24 h of incubation time with indicated concentrations. (D) Hoechst staining (upper panel) and quantification (lower panel) of the fraction of cells presenting fragmented nuclei. (E) Flow cytometry analysis after 24 h of incubation time at indicated concentrations. (F) Analysis of PBMCs viability after UNBS1450 treatment. PBMCs were seeded at 2×10^6 , then after 24 h treated for 24 h with various concentrations (0–100 nM) of UNBS1450. Cells were then stained either by Trypan Blue (upper panel) or by Hoechst (panel below) to analyze either cell integrity or apoptosis induction. The data shown here were representative for three independent experiments.

induction through NF- κ B inhibition and/or extrinsic and intrinsic pathway activation is considered as a main aim in cancer research. Apoptosis induction through NF- κ B inhibition and subsequent extrinsic and intrinsic cell death pathway activation is considered a main target in cancer research. During apoptosis induction, many different activation cascades eventually lead to caspase-3 or -7 cleavage and subsequent cell death [9].

In the absence of concluding investigations of anti-cancer effects of UNBS1450 in human leukemia cells, we hereby analyzed the effect of UNBS1450 on activation of cell death mechanisms and NF- κ B pathway inhibition in human leukemia cells and demonstrate for the first time that nanomolar concentrations of UNBS1450 induce canonical apoptotic cell death mechanisms.

2. Material and methods

2.1. Compounds and purification

TNF α was purchased from Sigma–Aldrich (Bornem, Belgium) and dissolved to a concentration of 10 mg/mL in PBS 1 \times supplemented with 0.5% (w/v) BSA according to the manufacturer's instructions.

UNBS1450 was a gift of Unibioscreen (Pr Robert Kiss, Brussels, Belgium): the compound, with a molecular weight of 605.8 g and received as dry powder, was solubilized in 52.95% DMSO (Sigma–Aldrich, Bornem, Belgium) and then further diluted to 5% DMSO/95% H₂O to get working aliquots with a concentration of 5 mM.

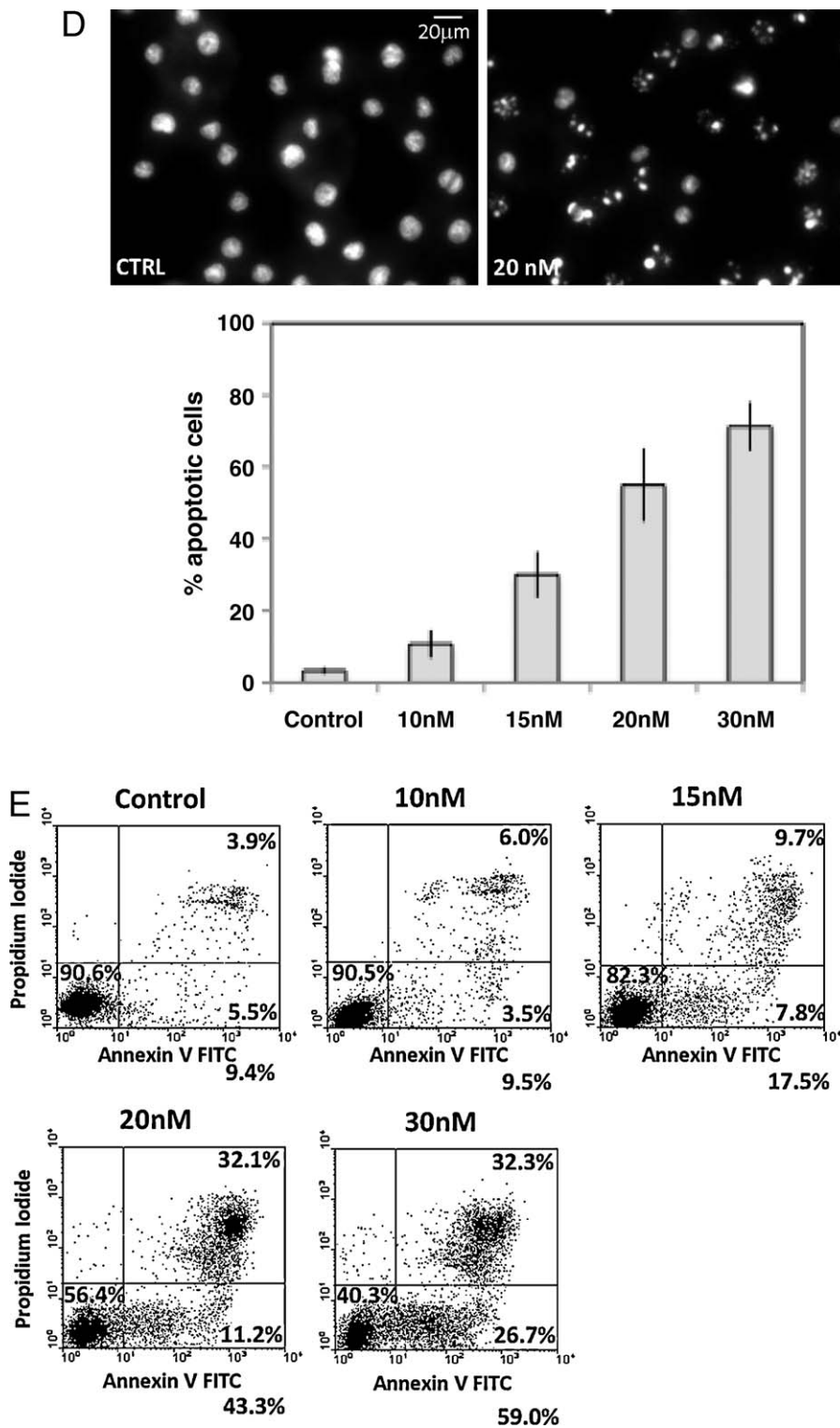


Fig. 1. (Continued).

Both were frozen at -20°C . Control cells were treated with equivalent amounts of DMSO.

2.2. Cell culture

K562 (human chronic myelogenous leukemia), U937 (histiocytic lymphoma), Jurkat (T-cell leukemia), Raji (Burkitt's Lymphoma), Hel (erythroleukemia), Molt (human acute lymphoblastic leukemia), Meg01 (human megacaryoblastic cells), HL60 (human promyelo-

cytic leukemia), TF1 (erythroleukemia) and KBM5 (chronic myelogenous leukemia) cells (DSMZ) were cultured in RPMI medium (Lonza, Verviers, Belgium) supplemented with 10% (v/v) fetal calf serum (Lonza, Verviers, Belgium) and 1% (v/v) antibiotic-antimycotic (BioWhittaker, Verviers, Belgium) at 37°C and 5% of CO_2 . At T_0 cells had been pre-treated with UNBS1450 at various concentrations. At $T_0 + 2$ h cells were activated by $\text{TNF}\alpha$ (20 ng/mL).

Healthy blood samples were kindly donated as buffy coats by the Red Cross (Luxembourg, Luxembourg). By applying diluted (1/3)

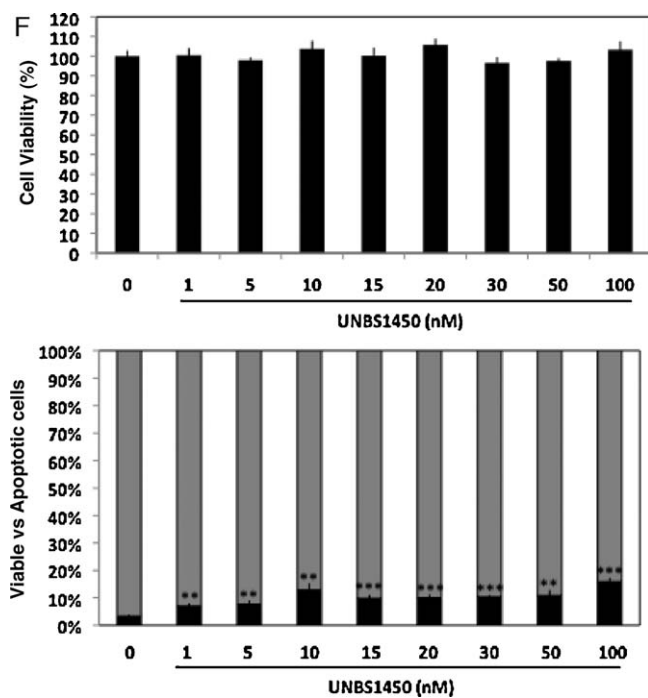


Fig. 1. (Continued).

blood onto a Ficoll layer followed by centrifugation ($400 \times g$, 20 min), mononuclear cells were isolated and collected. The isolated peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were kept in culture at 37°C and $5\% \text{CO}_2$ for 24 h before they were subjected to treatments.

2.3. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

Both, K562 and Jurkat cells, cultured in growth medium (RPMI, 10% FCS) at a concentration of 3×10^5 cells/mL, were pre-treated or not for 2 h with UNBS1450, respectively at 40 nM and 20 nM before being activated by $\text{TNF}\alpha$ (20 ng/mL) for 6 h. Cells were then harvested and washed twice in PBS $1\times$; supernatants were discarded and cell pellets were stored overnight at -80°C . Nuclear protein extractions were performed as described previously before being stored at -80°C [10]. The oligonucleotide NF- κB (consensus NF- κB site) (Eurogentec, Liège, Belgium) (5'-AGTTGAGGG-GACTTTCCAGGC-3') and its complementary sequence were used as probe. After being hybridized, the probes were radiolabelled using [g - ^{32}P]ATP (MP Biomedicals, Illkirch, France) and the EMSA assay was realized according to conditions established before [10].

2.4. Transient transfection and luciferase reporter gene assay

K562 and Jurkat cells were transiently transfected as described previously [10]. For each electroporation we used $5 \mu\text{g}$ of a luciferase reporter gene construct containing five repeats of a consensus NF- κB site (Stratagene, Genomics Agilent, Diegem, Belgium) and $5 \mu\text{g}$ of a *Renilla* luciferase plasmid (Promega, Leiden, Netherlands). Cells were resuspended in normal culture medium (RPMI, 10% FCS) after electroporation and cultured at 37°C and $5\% \text{CO}_2$ for 24 h. After the required incubation time, cells were harvested and resuspended in fresh growth medium (RPMI, 10% FCS) to a final concentration of 3×10^5 cells/mL and pre-treated for 2 h with UNBS1450 40 nM for K562 and 20 nM for Jurkat. Activation with 20 ng/mL of $\text{TNF}\alpha$ for 6 h followed the pre-treatment. After the 8 h of total challenge, $75 \mu\text{L}$ of Dual-GloTM luciferase reagent (Promega, Leiden, Netherlands) were added to $75 \mu\text{L}$ of the cellular suspension for 10 min incubation at 22°C before luciferase activity measurement. Further on, $75 \mu\text{L}$ of

Dual-GloTM Stop&Glo[®] Reagent (Promega, Leiden, Netherlands) were added for 10 min at 22°C to the cell suspension to assay *Renilla* activity. An Orion microplate luminometer (Berthold) was used to measure luciferase and *Renilla* activity. The results are expressed as a ratio of arbitrary units of firefly luciferase activity normalized to *Renilla* luciferase activity.

2.5. Cell viability assessment

Percentages of cell survival were evaluated using Promega's CellTiter-Glo[®] Luminescent Cell Viability Assay (Promega, Leiden, Netherlands) kit, according to the manufacturer's instructions. Alternatively, Trypan Blue staining was used to determine cell integrity. Data were normalized to the control and reported as percentage of viable cells.

2.6. Analysis of apoptosis

2.6.1. Analysis of nuclear fragmentation

Percentages of apoptotic cells, quantified as the fraction of apoptotic nuclei, were assessed by fluorescence microscopy (Leica-DM IRB microscope, Lecuit, Luxembourg) upon staining with the DNA-specific dye Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich, Bornem, Belgium) as previously described [11]. The fraction of cells with nuclear apoptotic morphology was counted (at least 300 cells in at least three independent fields). The images were analyzed using the Image J software (<http://rsb.info.nih.gov/ij/docs/index.html>).

2.6.2. Flow cytometric analysis (Annexin V-FITC/propidium iodide staining) of phosphatidylserine exposure

At the indicated times and doses of treatment, K562, U937 and Jurkat cells were assayed for phosphatidylserine exposure, by using the Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit I (Becton Dickinson Biosciences, Erembodegem, Belgium) according to the manufacturer's instructions. Stained samples were analyzed by FACS (FACSCalibur, Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). Data were recorded using the CellQuest software (<http://www.bdbiosciences.com/features/products>) for further analysis.

2.7. Extraction of cellular proteins

After indicated incubation times with UNBS1450 and $\text{TNF}\alpha$, K562, U937 and Jurkat cells were lysed; nuclear and cytoplasmic extracts were prepared according to Duvoix et al. [10].

2.8. RT-PCR analysis

Isolation of total RNA was performed using a NucleoSpin[®] (Macherey-Nagel, Hoerdt, France) kit. One microgram of total RNA were submitted to reverse transcription (RT) using Oligo(dT) primers (SuperScript First-Strand Synthesis System, Invitrogen, Fisher Scientific, Tournai, Belgium). The resulting RT products were used as templates for PCR amplification using SYBR[®] Green (Power SYBR Green PCR Master mix $1\times$, Applied Biosystems, Halle, Belgium) and Na^+/K^+ -ATPase α -subunit mRNA specific primers (F: 5'-CTA-CCT-GGC-TTG-CTC-TGT-CC-3'; R: 5'-GCT-GAC-TCA-GAG-GCA-TCT-CC-3') (Eurogentec, Liège, Belgium). The amount of cDNA synthesized was evaluated by amplification of the GAPDH gene (F: 5'-ACA-GTC-AGC-CGC-ATC-TTC-TT-3'; R: 5'-ACG-ACC-AAA-TCC-GTT-GAC-TC-3') (Eurogentec, Liège, Belgium) as a standard. After amplification, the PCR products were separated on a 2% agarose gel.

2.9. Immunofluorescence staining

U937 cells were fixed and permeabilised according to the manufacturer's instructions using the BD Cytofix/Cytoperm Kit

(Becton Dickinson, Erembodegem, Belgium). Incubations with primary antibodies were performed in BD Perm/Wash solution for 1 h at room temperature with 10 mg/ml of one of the following antibodies: anti-Bax (6A7) [mouse, monoclonal (Santa Cruz Biotechnology, Boechout, Belgium)], anti-Bak (AB-1) [mouse, monoclonal, (Calbiochem, Leuven, Belgium)], both recognizing active/activated forms of the proteins. After washing twice with PBS, cells were incubated with the corresponding secondary antibody at concentrations of 8 mg/ml at room temperature for 30 min on a shaking Platform (mouse, Alexafluor 488, green fluorescence; rabbit or mouse, Alexafluor 568, red fluorescence; Invitrogen/Molecular Probes, Merelbeke, Belgium). After two additional washing steps with PBS, cells were counterstained with Hoechst 33342 (DNA specific, blue fluorescence) and monitored by fluorescence microscopy (Olympus, Hamburg, Germany). The images were analyzed and elaborated using the Cell^M software (Olympus Soft Images Solutions GMBH, Germany).

2.10. Western blot analysis

Proteins of total extracts were separated by size using sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE, 10%), transferred onto nitrocellulose membranes and blocked with 5% non-fat milk in phosphate buffered saline (PBS)-Tween overnight. Equal loading of samples was controlled using β -actin or lamin B and α -tubulin for cytosolic and nuclear extracts.

Blots were incubated with primary antibodies: anti-pI κ B α (1/3000, Cell Signaling 9246, Bioké, Leiden, Netherlands), anti-I κ B α (1/500, Santa Cruz SC-371, Tebu-Bio, Boechout, Belgium), anti-p50 (1/5000, Santa Cruz SC-7178X), anti-p65 (1/5000, Santa Cruz SC-8008), anti- α -tubulin (1/5000, Calbiochem CP06, VWR, Leuven, Belgium), anti-lamin- β (1/1000, Santa Cruz SC-6216), anti- β -actin (1/10000, Sigma-Aldrich A5441, Bornem, Belgium), anti-caspase-3 (1/5000, Cell Signaling 9668), anti-caspase-7 (1/1000, Cell Signaling 9494), anti-caspase-8 (1/1000, Cell Signaling 9746), anti-caspase-9 (1/1000, Cell Signaling 9502), anti-XIAP (1/1000, BD Pharmingen 610763, Erembodegem, Belgium), anti-Bcl-2 (1/2000, Calbiochem OP60) and anti-Mcl-1 (1/1000, Cell Signaling 4572). All antibodies were diluted in a PBS-Tween solution containing 5% of bovine serum albumin (BSA) or 5% of milk according to the providers' protocols. After incubation with primary antibodies, membranes were washed 3 \times 10 min with PBS-Tween, followed by an incubation of 1 h at RT with the corresponding secondary (HRP-conjugated) antibodies. After washing 3 \times 10 min with PBS-Tween, specific immunoreactive proteins were visualized by autoradiography using the ECL Plus Western Blotting Detection System Kit[®] (GE Healthcare, Roosendaal, Netherlands).

2.11. Elisa

IL-8 concentrations in culture supernatants of activated K562, U937 and Jurkat cells were measured by sandwich ELISA (R&D Systems, Abingdon, United Kingdom). According to the manufacturer's guide, 50 μ L of cell supernatants were added together with 100 μ L of assay diluent to anti-IL-8 pre-coated wells, followed by 2 h of incubation at RT. After washing, a polyclonal peroxidase-conjugated anti-IL-8 antibody was added for another 60 min at RT. Colorimetric visualization and protein dosage were rendered possible by addition of the H₂O₂ and TMB (tetramethylbenzidine) containing substrate. After 30 min of reaction at RT, in the dark, the enzymatic reaction was stopped by H₂SO₄ and optical densities were measured at a wavelength of 450 nm.

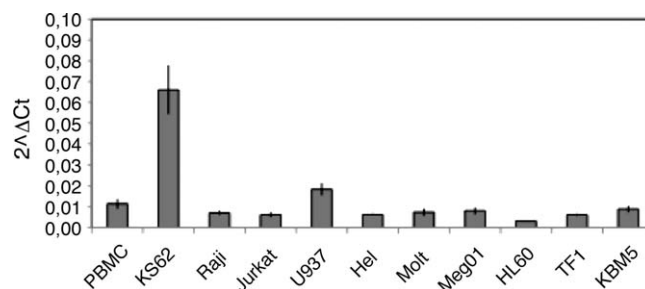


Fig. 2. Na⁺/K⁺-ATPase subunit α 1 mRNA quantification. Na⁺/K⁺-ATPase subunit α 1 mRNA content of untreated PBMCs and a wide panel of hematological cancer cell lines including K562, Jurkat and U937 cells was transcribed and then quantified by RT-PCR. The quantification of three independent experiments is expressed in brute 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} values \pm S.D.

2.12. Statistical analysis

Data is expressed as mean \pm S.D. and its significance degree was analyzed by Student's *t*-tests. *P*-values below 0.05 were considered as statistically significant.

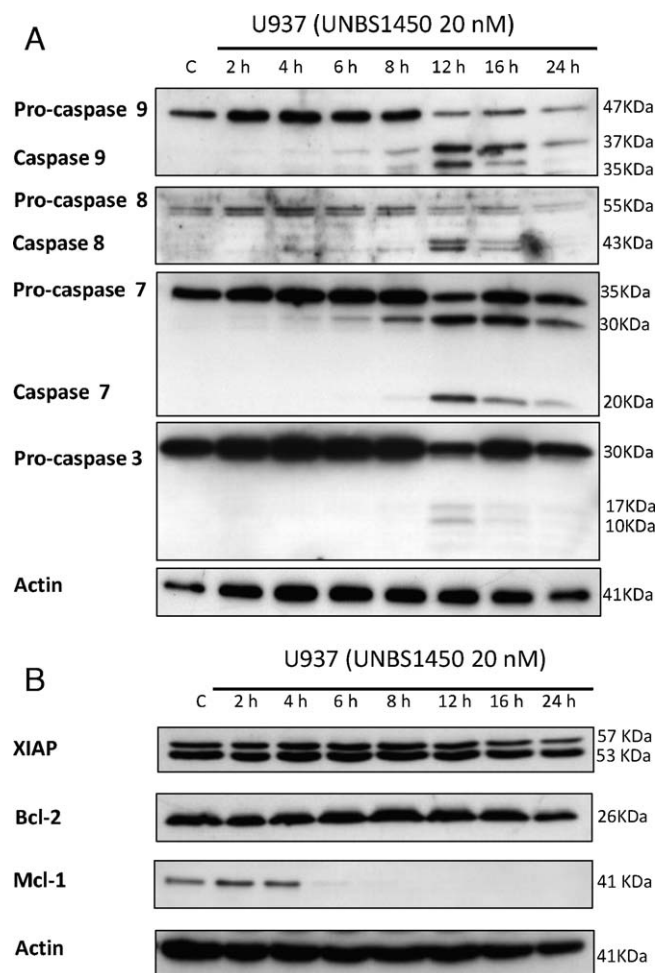


Fig. 3. (A) Caspase activation. U937 cells were incubated in RPMI + 10% FCS \pm UNBS1450 20 nM up to 24 h. Western blot analysis of UNBS1450-induced cleavage of pro-caspases-9, -8, -7 and -3. (B) Analysis of expression levels of anti-apoptotic proteins. UNBS1450-induced expression level alterations of XIAP, Bcl-2 and Mcl-1. The data shown here were representative for three independent experiments.

3. Results

3.1. UNBS1450 induces apoptosis in human leukemia cells

We first evaluated the effect of UNBS1450 on the cell growth of chronic myeloid leukemia K562, histiocytic lymphoma U937 and acute T-cell leukemia Jurkat. Cells were treated for 24, 48 and 72 h with different concentrations of UNBS1450 and their culture concentrations estimated by Trypan Blue exclusion assay. As reported in Fig. 1B, UNBS1450 deeply affected cell growth in a dose-dependent manner with an IC_{50} value of 13.37 ± 2.1 nM in U937.

To disentangle whether the effects of UNBS1450 were due to an impact on cell viability rather than an effect on cell metabolism and, therefore growth, we performed at first a cell cycle analysis to detect and quantify the presence of any sub-G1 phase. The analysis reported in Fig. 1C showed that UNBS1450 lead to accumulation of cells in a sub-G1 phase in a dose-dependent manner, significantly starting from 15 nM, thus confirming that UNBS1450 induced cell death. From 20 nM to 30 nM, UNBS1450 increasingly drove U937 cells into a sub-G1 phase (Fig. 1C).

Next, we investigated the nature of cell death induced by UNBS1450, first by analyzing alterations in cell morphology by Hoechst staining and fluorescence microscopy (Fig. 1D, top). As

shown, the nuclei of U937 cells treated with UNBS1450 underwent morphological alterations typically occurring during apoptosis [11]. Fig. 1D (bottom) shows the quantification of apoptosis after UNBS1450 treatment, as estimated by counting the fraction of cells stained with Hoechst and presenting fragmented nuclei. Annexin V/PI double staining confirmed apoptotic cell death (Fig. 1E) starting from 15 nM, thus giving similar results to Hoechst analysis.

In order to generalize our effects, we used K562 cells and observed similar findings. Again, UNBS1450 reduced cell proliferation in a dose- and time-dependent manner with an IC_{50} value of 32.65 ± 3.10 nM at 48 h (Supplemental Fig. 1A). Cell cycle analysis (Supplemental Fig. 1B) showed that an incubation time of 48 h in the presence of UNBS1450 50 nM drove a fraction of cells into a sub-G1 phase while overall cell status remained rather unchanged; G1 and G2/M phases still showed control-comparable patterns. Hoechst staining indicated fragmented cell nuclei of cells dying via apoptosis (Supplemental Fig. 1C). FACS analysis for the exposure of phosphatidylserine/plasma membrane integrity by Annexin V/PI analysis confirmed the activation of an apoptotic program (Supplemental Fig. 1D). Similar effects of UNBS1450 on cell death induction were observed in Jurkat T cells (Supplemental Fig. 2A and B).

Concerning the specificity of UNBS1450 for cancer cells, we further analyzed the effects of UNBS1450 on normal, healthy PBMCs (Fig. 1F). After 24 h of incubation time, PBMCs had been treated by

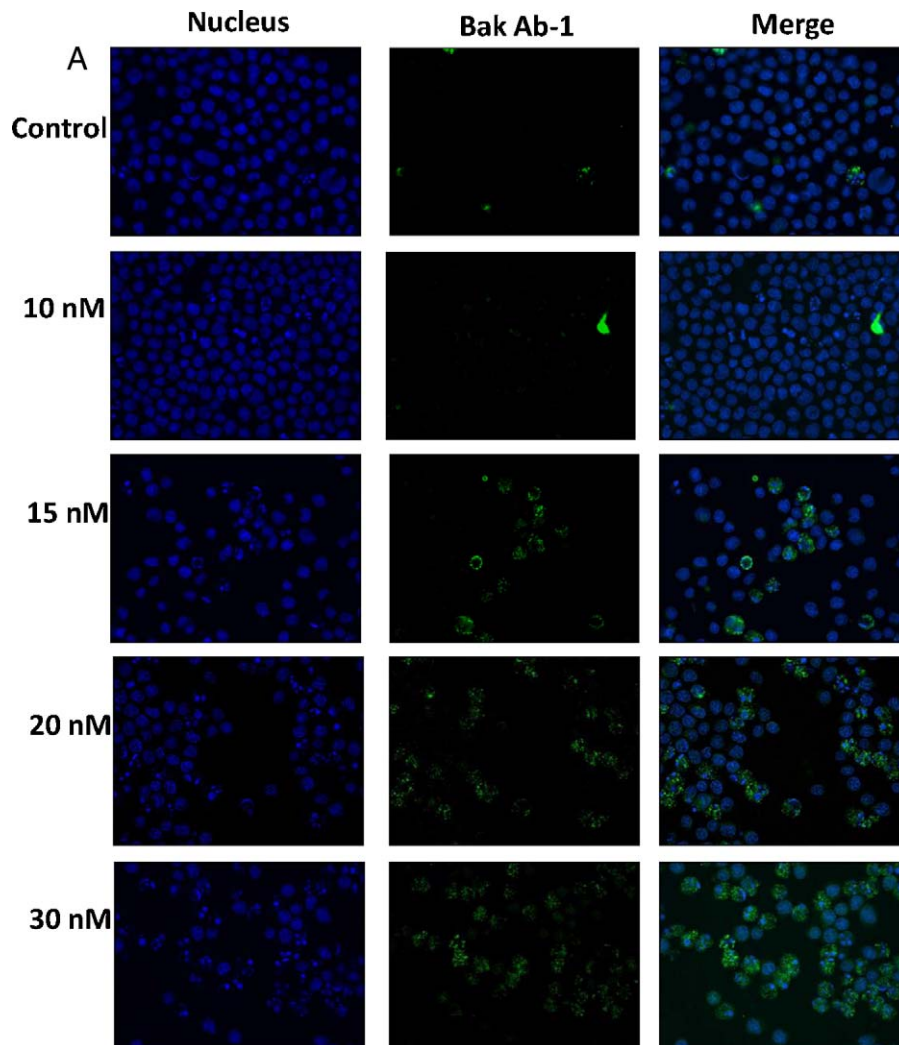


Fig. 4. UNBS1450 enables Bak/Bax activation. U937 cells were incubated for 24 h in RPMI + 10% FCS in presence or in absence of UNBS1450. Bak (A.) and Bax (B.) activation status were assessed by using primary antibodies specifically targeting activated forms of Bak (Ab-1; Calbiochem) and Bax (6A7; Santa Cruz). Counterstaining was done by Hoechst staining to assess apoptotic nuclei. The data shown here were representative for three independent experiments with similar results.

various concentrations of UNBS1450 (0–100 nM) for 24 h. Sample volumes were then divided: Trypan Blue staining was performed to assess cell integrity (upper panel) whereas Hoechst staining allowed determination of apoptotic percentages (lower panel). Altogether, UNBS1450 did not change cell permeability to Trypan Blue thus allowing us to conclude that cell viability of PBMCs is not compromised by UNBS1450. These results were confirmed by quantification of apoptotic cells: only a weak effect was observed at 100 nM ($\leq 16\%$) which was not comparable to what we obtained in leukemia cell lines ($>60\%$ for UNBS1450 at 30 nM in U937; Fig. 1D).

As it has been shown that the $\alpha 1$ subunit of Na^+/K^+ -ATPases is a target for UNBS1450 [2] and that it is frequently overexpressed in solid tumor cells where UNBS1450 is severely inhibiting proliferation [2], we compared $\alpha 1$ subunit mRNA expression levels of a panel of hematological cancer cell lines to those of normal healthy PBMCs (Fig. 2). Our results indicate all cell lines express the corresponding mRNA but that only K562 produces significantly higher amounts compared to PBMCs ($2^{\Delta\Delta\text{Ct}}$ values of 0.06 versus 0.011, respectively, * S.D.). For all other cell lines, subunit $\alpha 1$ specific mRNA levels were not significantly different compared to PBMCs.

3.2. Effect on anti-apoptotic cell signaling pathways

We subsequently investigated whether UNBS1450 was able to trigger a caspase-dependent apoptotic cell death (Fig. 3A). To this purpose, a kinetic analysis (0–24 h) was performed on U937 cells treated with UNBS1450 at 20 nM. We demonstrated that UNBS1450 at 20 nM induced the cleavage of the pro-caspases-9 and -8 starting after 12 h of incubation time. The executor pro-caspases-3 and -7, were cleaved into active caspase-3 and 7 (Fig. 3A).

Induction of apoptosis can be triggered by both inhibition of anti-apoptotic- and/or by activation of pro-apoptotic mechanisms. Here, overall expression of XIAP and Bcl-2 were not influenced by UNBS1450 (Fig. 3B). The expression level of Mcl-1 however, another anti-apoptotic Bcl-2 family member, was sensibly affected by the treatment with UNBS1450 as a strong reduction in the protein level was noticeable after 4 h of treatment while after 12 h of treatment, no expression level was detectable anymore.

3.3. Activation of pro-apoptotic mechanisms

We then analyzed *in situ* the activation status of pro-apoptotic Bak and Bax in U937 cells, untreated and treated with 10–30 nM of

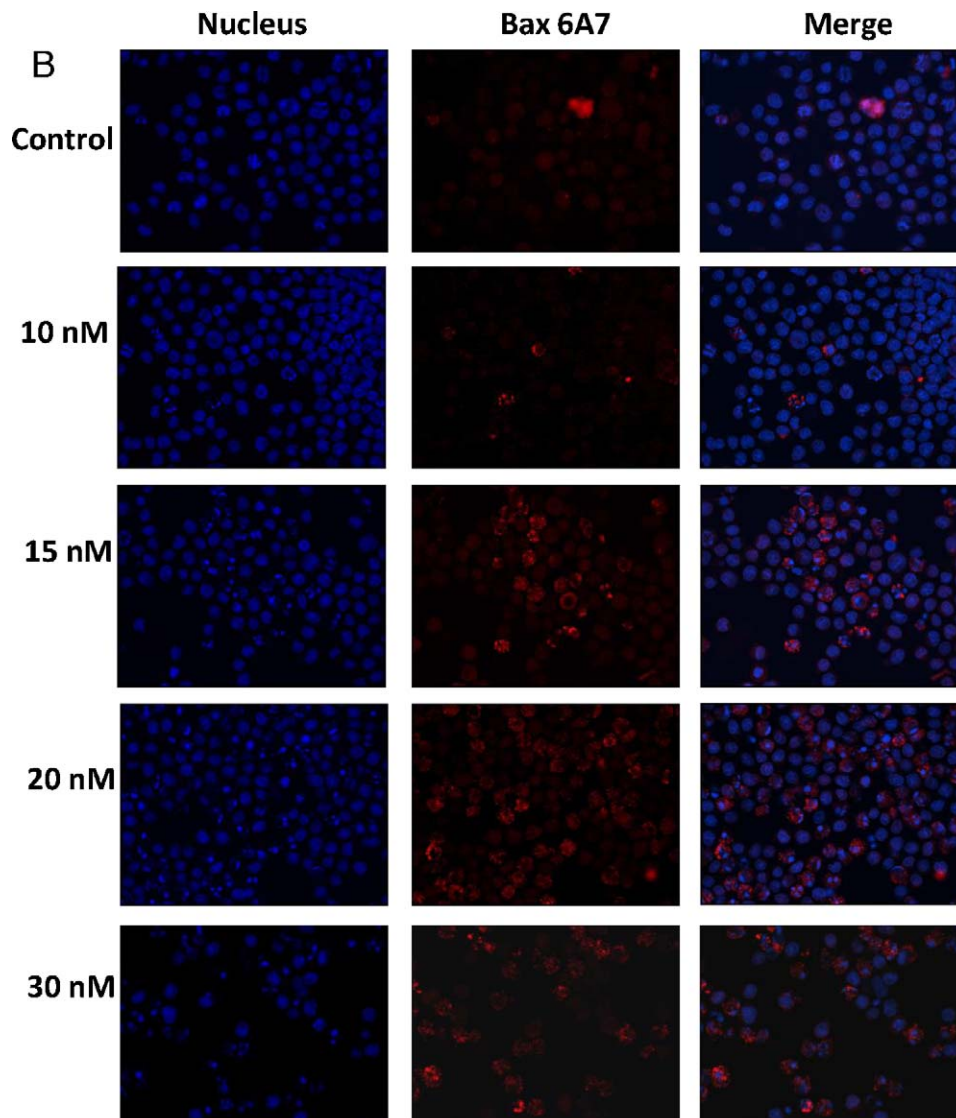


Fig. 4. (Continued).

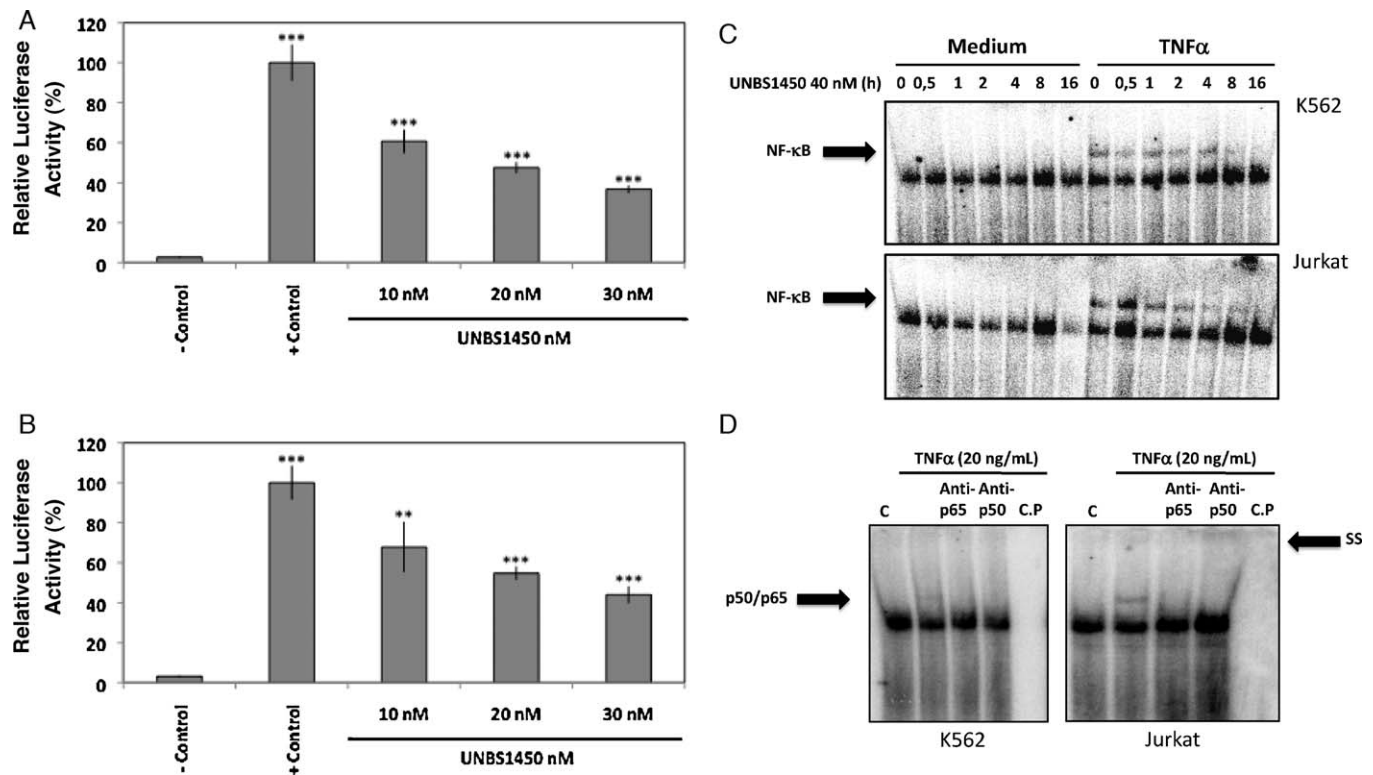


Fig. 5. Inhibition by UNBS1450 of TNF α -induced NF- κ B activation. (A) K562 and (B) Jurkat cells were pretreated with UNBS1450 at various concentrations from 10 to 50 nM and incubated for 2 h, followed by TNF α addition (20 ng/ml) and an additional incubation period of 6 h. Results are represented as the ratio of the measured luminescence of the firefly luciferase vector divided by the measured luminescence of the *Renilla* plasmid. Untreated cells were used as a negative control, cells treated with TNF α only as a positive control. Results are presented as mean \pm S.D. of 3 individual measurements performed in triplicates. (C) Effect of UNBS1450 on the binding affinity of NF- κ B was assessed by an EMSA on the K562 and Jurkat cell lines. The data shown here were representative for three independent experiments with similar results. (D) For supershift/immunodepletion experiments, the nuclear extracts and labelled probes were incubated in the reaction mixture for 30 min on ice prior to a 30 min incubation with 2 μ g of anti-p50 or anti-p65 antibodies. SS designates supershifted bands. (E) Jurkat cells were incubated with UNBS1450 (40 nM) for 2 h, followed by a TNF α (20 ng/ml) activation for the indicated time periods. Cytoplasmic and nuclear extracts were prepared, fractionated on a 10% SDS-page gel, transferred to a membrane and then tested for I κ B α and p65. Protein loading and purity of nuclear/cytosolic extracts were verified by lamin B and α -tubulin Western blots. Data shown are representative for three independent experiments with similar results. K562 (F), and U937 (G) cells were incubated for 2 h in RPMI + 10% FCS in presence or in absence of various concentrations (10–50 nM) of UNBS1450 before being activated by TNF α during 22 h. After 24 h of incubation IL-8 concentrations in supernatants were measured. Untreated cells served as negative control whereas cells activated by TNF α only were used as a positive control. The data shown here were representative for three independent experiments with similar results.

UNBS1450, by using antibodies specifically recognizing activated forms of both pro-apoptotic Bcl-2 family members. Immunostained cells were counterstained with Hoechst to detect apoptotic nuclei. Bak resulted activated by treatments with 15 nM UNBS1450 and higher (Fig. 4A). Similar results were observed for activated Bax (Bax 6A7) (Fig. 4B). As expected, both activated Bak and Bax co-localized with cells presenting fragmented, apoptotic nuclei, witnessing apoptotic cell death triggered by UNBS1450 a hemi-synthetic cardenolide originally from the plant *C. procera*.

3.4. Inhibition of NF- κ B pathway activation

NF- κ B transcription factor is well known to act as an inhibitor of apoptotic cell signaling specifically via transactivation. Moreover Mijatovic et al. [12] already provided first insights into UNBS1450-induced inhibition of NF- κ B activation. Here we observed that UNBS1450 reduced TNF α -driven NF- κ B activation in a dose-dependent manner in K562 and Jurkat cells (Fig. 5A and B). As illustrated in Table 1, UNBS1450 has however no repressing effect on constitutive, basal NF- κ B activity in K562 cells.

In order to further confirm the inhibitory effect of UNBS1450 on the TNF α -induced NF- κ B signaling pathway, we realized EMSA. Fig. 5C clearly shows that UNBS1450, at a concentration of 40 nM inhibits TNF α -induced NF- κ B–DNA binding. By applying various

pre-treatment times from 0 to 16 h, we obtained a complete inhibition after 8 h of pre-incubation. Incubation with p50 and p65 antibodies enabled us to identify the NF- κ B dimer composition as p50 and p65. Similar results were obtained for Jurkat cells (Fig. 5D).

NF- κ B activation is generally initiated by the degradation of its natural inhibitor I κ B α ; we thus assessed I κ B α integrity as well as the translocation of p65 from the cytoplasm to the nucleus by Western blot analysis (Fig. 5E). Both degradation of I κ B α as well as translocation of p65 into the nucleus, were analyzed by Western blot. In control cells without UNBS1450 pre-treatment, I κ B α degradation was observed after 10 min of TNF α stimulation; consequently, p65 translocation to the nucleus was observed in parallel. In contrast, the presence of UNBS1450 inhibited TNF α -induced degradation of I κ B α and considerably prevented the translocations of p65 into the nucleus (Fig. 5E, right panel).

To further investigate the influence of UNBS1450 on downstream NF- κ B signaling in K562, U937 and Jurkat cells, we chose IL-8 as it was described that this gene product is under the control of NF- κ B. We observed that UNBS1450-pre-treated cells produced significantly lower quantities of IL-8 (less than 600 pg/mL) compared to TNF α only activated K562 cells (1300 pg/mL) (Fig. 5F). Similar results were obtained for U937 (Fig. 5G). Unstimulated U937 cells produced low amounts of IL-8 (92 pg/mL) and TNF α activation resulted in increased IL-8 release (1002 pg/mL). A significant

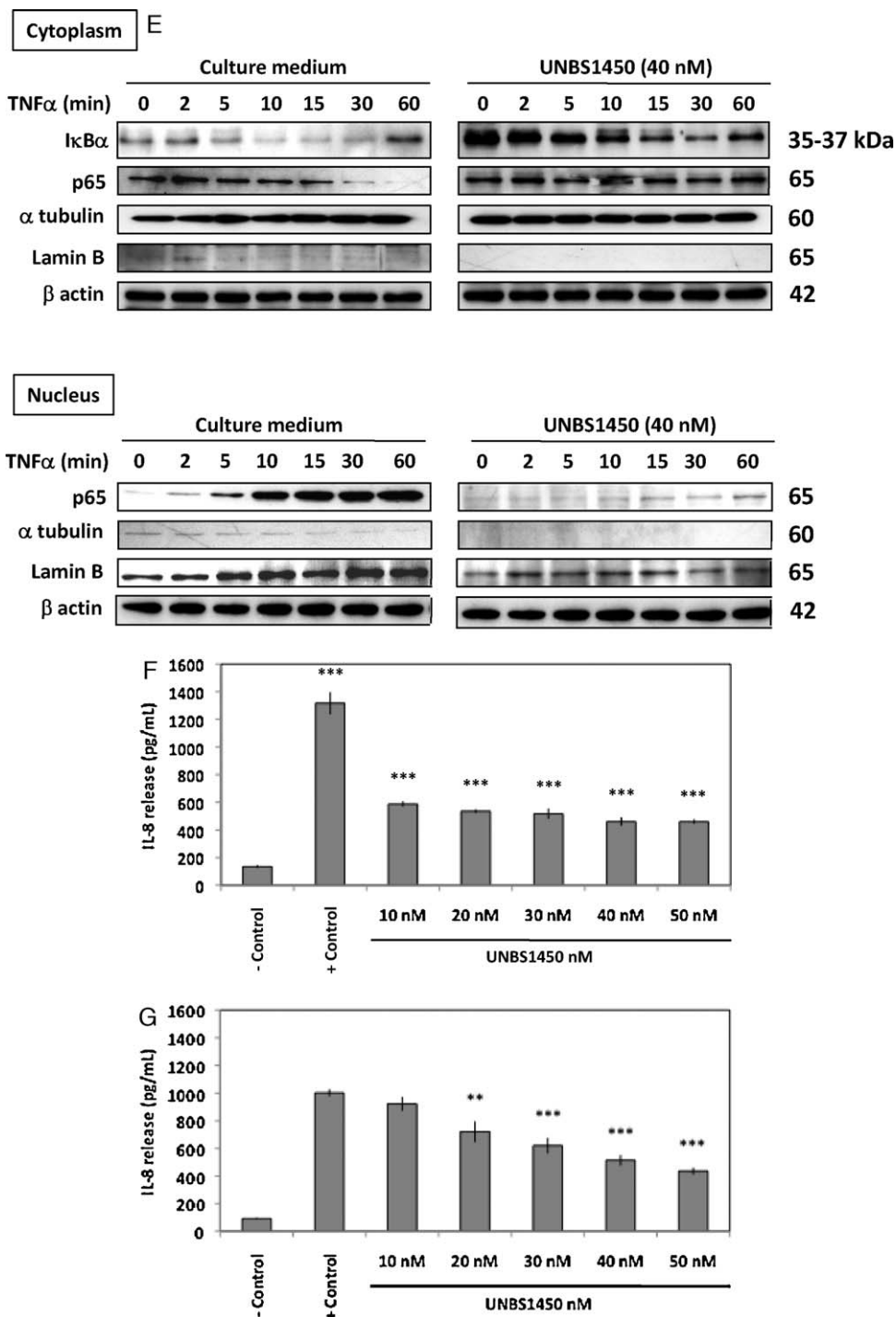


Fig. 5. (Continued).

inhibition was obtained after UNBS1450 treatment at 20 nM (IL-8 release: 721 pg/mL). In Jurkat cells, TNF α stimulation could not trigger IL-8 release; neither did UNBS1450 show any significant effect on IL-8 release (results not shown).

Table 1
Effect of UNBS1450 (40 nM) on basal and TNF α -induced NF- κ B activity.

K562	R.L.A. (%)	S.D. (%)
Untreated	0.574	0.147
UNBS1450 (40 nM)	0.587	0.178
TNF α	100	2.850
UNBS1450 (40 nM) + TNF α	42.578	7.761

4. Discussion

We show here that UNBS1450, belonging to the cardenolide family of the steroid cardiac glycosides, efficiently reduces viability of leukemia cancer cell lines by inducing apoptotic cell death. We focused our efforts on possible modifications of inflammation and cell death induction by UNBS1450. To this purpose, we used chronic myeloid leukemia K562, histiocytic lymphoma U937 as well as acute T-cell leukemia Jurkat cells stimulated by TNF α as a model of investigation to mimic pro-inflammatory surroundings stimulating the NF- κ B transcription factor.

While UNBS1450 has so far mainly been applied on solid tumors [1,12], we hereby confirm that deactivation of NF- κ B

activity through UNBS1450 is also true in human leukemia cells as indicated by reduced induction of NF- κ B transcriptional activity, reduced binding to target DNA as well as repressed synthesis of NF- κ B-dependent genes. TNF α -induced p50/p65 dimer translocation to the nucleus is strongly reduced in the presence of UNBS1450 due to repressed I κ B α degradation.

We also analyzed the impact of UNBS1450 on leukemia cell survival capacity. As finally indicated by increased Annexin V/PI staining, fragmented nuclei after Hoechst staining and thus reduced cell numbers, UNBS1450 is beneficial to an apoptosis induction. We observed that nanomolar concentrations of UNBS1450 were able to induce the cleavages of the initiator caspases 8 and 9 as shown by Western blot. Furthermore, we obtained a cleavage induction of the pro-caspase-7, leading to hypothetical thoughts that UNBS1450 might induce apoptosis by processing and concomitant activation of executors caspases such as caspase-7 and caspase-3. Consequently, we assessed expression levels of various Bcl-2 family proteins in order to conclude on a possible amplification of the death signal through activation of the intrinsic mitochondrial cell death pathways [13,14]. The analysis of cell proliferation in the presence of UNBS1450 in both cell lines investigated reveals that the compound is able to affect cell proliferation at concentrations lower than those requested to induce apoptosis (see Fig. 1B and Supplemental Fig. 1A). This is in line with previous findings [15] and prompts to elucidate in the future whether this cytostatic potential may be also implicated in determining the cytotoxic effect.

Several studies underline their pivotal role [16] in apoptosis induction [17–19]. Loss of expression as well as over-expression of Bcl-2 family genes, depending on the pro- or anti-apoptotic potential, can lead to oncogenesis by decreased malignant cell death. It is for instance known that over-expression of anti-apoptotic Bcl-2 or Mcl-1 disables apoptosis induced by TNF-related ligands [20–22]. Consequently, we assessed by Western blot the expression levels of XIAP, a member of the inhibitor of apoptosis family, and Bcl-2 as well as Mcl-1, each a member of the anti-apoptotic Bcl-2 subfamily. Whereas expression levels remained unaltered for XIAP and Bcl-2 in the presence of UNBS1450, Mcl-1 was found to be strongly down-regulated by UNBS1450. Combined to the fact that noticeably low concentration levels in a nanomolar range were largely sufficient to influence the expression of Mcl-1 in the observed manner suggests this anti-apoptotic protein may play a major role in apoptosis induction due to UNBS1450.

Mcl-1 acts by directly binding to Bak and Bax proteins that are two pro-apoptotic Bcl-2 family members. From the perspective of the Bcl-2 family proteins, the intrinsic apoptosis pathway is initiated by various signals. BH3-only proteins such as Bim, Bid, Bad, Noxa or Puma engage with anti-apoptotic members such as Mcl-1 to relieve inhibition of Bak and Bax as reviewed by Kang and Reynolds [23]. Direct or indirect repression of Mcl-1 expression results in Bak and Bax activation and oligomerization eventually leading to mitochondrial outer membrane permeabilization and cell death through apoptosis [24]. Our results strongly suggest this pathway to be stimulated by UNBS1450 in human leukemia cell lines. Further point-by-point investigations are necessary to elucidate the exact molecular cascades closing the gap between Na⁺/K⁺-ATPase binding of UNBS1450 and Mcl-1 expression inhibition and thus apoptosis induction.

Today, NF- κ B is considered by most as a key anti-apoptotic factor [25,26]. Besides frequent constitutive expression of NF- κ B in various human cancer cell lines, contributing to the onset of drug resistance of tumor cells or to increased aggressiveness [27–29], it is well documented nowadays that TNF α release by the tumor microenvironment is a characteristic of many malignant tumors and acts as a sort of a master switch between activation of inflammatory

processes and oncogenesis [8,30]. Through its receptors both on epithelial and stromal cell membranes, TNF α either directly influences cell proliferation and malignant cell survival or indirectly drives surrounding stromal cells, macrophages, dendritic cells and fibroblasts into releasing general inflammatory cytokines such as TNF α itself, IL-1, IL-6 and IL-8 [31]. Altogether, this creates a beneficial situation for the onset of genetic alterations and enhanced survival and proliferation of the tumor cells.

As a conclusion, we hereby further described the mechanism by which UNBS1450 inhibits tumor expansion by cell death induction. As an addition to existing knowledge of anti-cancer activities of UNBS1450 due to autophagy [4,5] mainly on human glioblastoma and NSCLC, we demonstrate here that this hemi-synthetic cardenolide rapidly and effectively induces cell death through apoptosis in human leukemia cell lines. While down-regulating induced NF- κ B pathway, UNBS1450 activates the extrinsic caspase-dependent apoptotic pathway, represses the expression of Mcl-1, activating pro-apoptotic Bak and Bax and eventually leading to cell death via the mitochondrial apoptotic pathway. However, we do not have obvious evidence that a downregulation of the NF- κ B pathway is linked to the observed induction of apoptosis as UNBS1450 does not show any inhibitory activities on constitutive NF- κ B activity in K562 cells where induced apoptosis is significant.

While additional analysis thus remain requested to further analyze signaling cascades involved, these findings show for the first time that UNBS1450 acts as an apoptogenic inducer, specifically affecting cancer cell lines. This makes of UNBS1450 a promising candidate as a new potential anti-cancer drug for leukemia and lymphoma treatments.

Acknowledgments

This work was supported by Télévie, the “Fondation de Recherche Cancer et Sang” and “Recherches Scientifiques Luxembourg” asbl. TJ is the recipient of an AFR grant (Fonds National de la Recherche Luxembourg). CC, FM, MHT and MS were supported by Télévie grants (Fonds National de la Recherche Scientifique, Belgium). FG was a recipient of RedCat grant. The authors thank “Een Häerz fir Kriibskrank Kanner” association and the Action Lions “Vaincre le Cancer” for generous support. Further support was received from the Foundation for Scientific Cooperation between Germany and Luxemburg and the European Union (ITN “RedCat” 215009 and Interreg IVa project “Corena”). Print costs were covered by the Fonds National de la Recherche (FNR), Luxembourg.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found in the online version, at [doi:10.1016/j.bcp.2010.08.025](https://doi.org/10.1016/j.bcp.2010.08.025).

References

- [1] Mijatovic T, Lefranc F, Van Quaquebeke E, Van Vynckt F, Darro F, Kiss R. UNBS1450: a new hemi-synthetic cardenolide with promising anti-cancer activity. *Drug Dev Res* 2007;68:164–73.
- [2] Lefranc F, Mijatovic T, Kondo Y, Sauvage S, Roland I, Debeir O, et al. Targeting the alpha 1 subunit of the sodium pump to combat glioblastoma cells. *Neurosurgery* 2008;62:211–21 (Discussion 21–22).
- [3] Juncker T, Schumacher M, Dicato M, Diederich M. UNBS1450 from *Calotropis procera* as a regulator of signaling pathways involved in proliferation and cell death. *Biochem Pharmacol* 2009;78:1–10.
- [4] Mijatovic T, Mathieu V, Gaussin JF, De Neve N, Ribaucour F, Van Quaquebeke E, et al. Cardenolide-induced lysosomal membrane permeabilization demonstrates therapeutic benefits in experimental human non-small cell lung cancers. *Neoplasia* 2006;8:402–12.

- [5] Mijatovic T, De Neve N, Gailly P, Mathieu V, Haibe-Kains B, Bontempi G, et al. Nucleolus and c-Myc: potential targets of cardenolide-mediated antitumor activity. *Mol Cancer Ther* 2008;7:1285–96.
- [6] Lefranc F, Mijatovic T, Kiss R. The sodium pump could constitute a new target to combat glioblastomas. *Bull Cancer* 2008;95:271–81.
- [7] Perkins ND. Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007;8:49–62.
- [8] Balkwill F. Tumour necrosis factor and cancer. *Nat Rev Cancer* 2009;9:361–71.
- [9] Coppola S, Ghibelli L. GSH extrusion and the mitochondrial pathway of apoptotic signalling. *Biochem Soc Trans* 2000;28:56–61.
- [10] Duvoix A, Delhalle S, Blasius R, Schnekenburger M, Morceau F, Fougere M, et al. Effect of chemopreventive agents on glutathione S-transferase P1-1 gene expression mechanisms via activating protein 1 and nuclear factor kappaB inhibition. *Biochem Pharmacol* 2004;68:1101–11.
- [11] Cerella C, Scherer C, Cristofanon S, Henry E, Anwar A, Busch C, et al. Cell cycle arrest in early mitosis and induction of caspase-dependent apoptosis in U937 cells by diallyltetrasulfide (Al2S4). *Apoptosis* 2009;14:641–54.
- [12] Mijatovic T, Op De Beeck A, Van Quaquebeke E, Dewelle J, Darro F, de Launoit Y, et al. The cardenolide UNBS1450 is able to deactivate nuclear factor kappaB-mediated cytoprotective effects in human non-small cell lung cancer cells. *Mol Cancer Ther* 2006;5:391–9.
- [13] Daniel PT, Wieder T, Sturm I, Schulze-Osthoff K. The kiss of death: promises and failures of death receptors and ligands in cancer therapy. *Leukemia* 2001;15:1022–32.
- [14] Kaufmann SH, Steensma DP. On the trail of a new therapy for leukemia. *Leukemia* 2005;19:2195–202.
- [15] Mijatovic T, Roland I, Van Quaquebeke E, Nilsson B, Mathieu A, Van Vynckt F, et al. The alpha1 subunit of the sodium pump could represent a novel target to combat non-small cell lung cancers. *J Pathol* 2007;212:170–9.
- [16] Lomonosova E, Chinnadurai G. BH3-only proteins in apoptosis and beyond: an overview. *Oncogene* 2008;27(Suppl. 1):S2–19.
- [17] Bouillet P, Metcalf D, Huang DC, Tarlinton DM, Kay TW, Kontgen F, et al. Proapoptotic Bcl-2 relative Bim required for certain apoptotic responses, leukocyte homeostasis, and to preclude autoimmunity. *Science* 1999;286:1735–1738.
- [18] Arena V, Martini M, Luongo M, Capelli A, Larocca LM. Mutations of the BIK gene in human peripheral B-cell lymphomas. *Genes Chromosomes Cancer* 2003;38:91–6.
- [19] Bouillet P, Strasser A. BH3-only proteins – evolutionarily conserved proapoptotic Bcl-2 family members essential for initiating programmed cell death. *J Cell Sci* 2002;115:1567–74.
- [20] Henson ES, Gibson EM, Villanueva J, Bristow NA, Haney N, Gibson SB. Increased expression of Mcl-1 is responsible for the blockage of TRAIL-induced apoptosis mediated by EGF/ErbB1 signaling pathway. *J Cell Biochem* 2003;89:1177–92.
- [21] Taniai M, Grambihler A, Higuchi H, Werneburg N, Bronk SF, Farrugia DJ, et al. Mcl-1 mediates tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand resistance in human cholangiocarcinoma cells. *Cancer Res* 2004;64:3517–24.
- [22] Zhang XD, Nguyen T, Thomas WD, Sanders JE, Hersey P. Mechanisms of resistance of normal cells to TRAIL induced apoptosis vary between different cell types. *FEBS Lett* 2000;482:193–9.
- [23] Kang MH, Reynolds CP. Bcl-2 inhibitors: targeting mitochondrial apoptotic pathways in cancer therapy. *Clin Cancer Res* 2009;15:1126–32.
- [24] Spierings D, McStay G, Saleh M, Bender C, Chipuk J, Maurer U, et al. Connected to death: the (unexpurgated) mitochondrial pathway of apoptosis. *Science* 2005;310:66–7.
- [25] Gilmore TD. Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. *Oncogene* 2006;25:6680–4.
- [26] Reuter S, Eifes S, Dicato M, Aggarwal BB, Diederich M. Modulation of anti-apoptotic and survival pathways by curcumin as a strategy to induce apoptosis in cancer cells. *Biochem Pharmacol* 2008;76:1340–51.
- [27] Karin M, Greten FR. NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nat Rev Immunol* 2005;5:749–59.
- [28] Ahn KS, Sethi G, Aggarwal BB. Reversal of chemoresistance and enhancement of apoptosis by statins through down-regulation of the NF-kappaB pathway. *Biochem Pharmacol* 2008;75:907–13.
- [29] Wu Y, Zhou BP. TNF-alpha/NF-kappaB/Snail pathway in cancer cell migration and invasion. *Br J Cancer* 2010;102:639–44.
- [30] Mantovani A. Cancer: inflaming metastasis. *Nature* 2009;36–7.
- [31] Sethi G, Sung B, Aggarwal BB. TNF: a master switch for inflammation to cancer. *Front Biosci* 2008;13:5094–107.

Aurones: Interesting Natural and Synthetic Compounds with Emerging Biological Potential

Clemens Zwergel^{a,b}, François Gaascht^{a,b}, Sergio Valente^a, Marc Diederich^b, Denyse Bagrel^a and Gilbert Kirsch^{a,*}

^aLaboratoire d'Ingenierie Moléculaire et Biochimie Pharmacologique, Institut Jean Barriol, Université Paul Verlaine-Metz, 1 Boulevard Arago, 57070 Metz, France

^bLaboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire du Cancer, Hôpital Kirchberg, 9 rue Edward Steichen, L-2540 Luxembourg, Luxembourg

kirsch@univ-metz.fr

Received: August 18th, 2011; Accepted: December 16th, 2011

Aurones [2-benzylidenebenzofuran-3(2H)-ones] are either natural or synthetic compounds, belonging to the flavonoid family. They are isomeric to flavones and provide a bright yellow color to the plants in which they occur. Today, a literature survey indicates that the related flavonoids have been studied not only for their physiological properties and effects on Nature, but also for their therapeutic potential. Aurones are recently attracting the interest of an increasing number of research groups, and, since the last review, some interesting advances have been made in understanding the aurones.

In this review, we report the recent advances made on the synthetic routes towards aurones. We also highlight their activity in different biological areas, as well as applied genetic plant modifications to produce these colored compounds. Their synthesis, structure–activity relationships and the importance of the substitution pattern will also be mentioned. Finally, some aspects regarding the possible development of aurones will be discussed briefly.

Keywords: Aurones, 2-Benzylidenebenzofuran-3(2H)-ones, Biological activity, Synthesis.

Flavonoids represent a large class of natural products in the plant kingdom, exhibiting multiple biological activities [1]. Aurones play an important role in the pigmentation of some flowers and fruits and contribute especially to the bright yellow color of flowers [2]. They also exhibit a strong and broad variety of biological activities. For example they have been described as antifungal agents [3], as insect antifeedant agents [4], as inhibitors of tyrosinase [5], and as antioxidants [6]. Not widely distributed in nature, aurones, (*Z*)-2-benzylidene-benzofuran-3(2H)-ones, are one of the less common and lesser-known representatives of a flavonoid subclass [7]. This is probably the reason why they have received little attention in comparison to the structurally similar and widely investigated flavones and isoflavones [8].

There are, however, a few notable exceptions. Aureusidin, a common aurone (**1**), is an inhibitor of iodothyronine- deiodinase, an enzyme involved in hormone synthesis and regulation [9]. Synthetic aurones bind to the nucleotide-binding domain of P-glycoprotein [10], to inhibit cyclin-dependent kinases in connection with antiproliferative properties [11], and to act as anticancer agents [12].

Synthesis of aurone derivatives: A very popular way to prepare aurones was developed by Varma *et al.* His method is based on the aldol-like condensation of benzofuran-3(2H)-ones with benzaldehydes [13]. This, and some other more or less classical methods for the synthesis, were reviewed by Boumendjel *et al.* in 2003 [7]. Since then, several new or refined methods have been published:

Lawrence *et al.* studied the naturally occurring aurone **1**, isolated from *Uvaria hamiltonii*, and prepared a series of analogues based structurally on known tubulin binding agents, which were

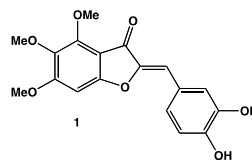
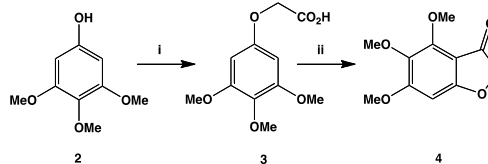


Figure 1: Aureusidin, an example of a common aurone.

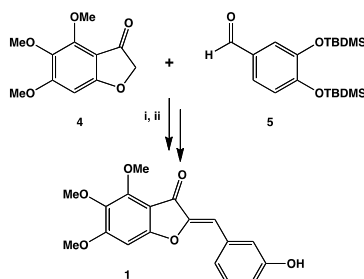
subsequently evaluated for anticancer activity [8]. The authors employed well-known methods to afford their aurone derivatives. The synthetic avenue described by Lawrence *et al.*, for example, consisted of the preparation of benzofuranone (**4**) (Scheme 1) via a polyphosphoric acid (PPA) cyclisation of the phenoxyacetic acid **3**, which was in turn prepared by the condensation of phenol **2** with chloroacetic acid.

The synthesis of aurone **1** required the use of the TBDMS-protected benzaldehyde **5**, prepared in high yield from 3,4-dihydroxybenzaldehyde using *tert*-butyldimethylsilyl chloride in the presence of imidazole [14].



Scheme 1: Reagents and conditions (i) $\text{ClCH}_2\text{CO}_2\text{H}$, NaH, DMF, rt, overnight; (ii) PPA, 80°C, 8h [8].

To obtain the aurone, the protected benzaldehyde is condensed with the appropriate benzofuranone **4** in the presence of neutral alumina. This method was originally described by Varma *et al.* [13]. Subsequent treatment with tetra-butylammonium fluoride afforded the deprotected aurone **1** (Scheme 2).



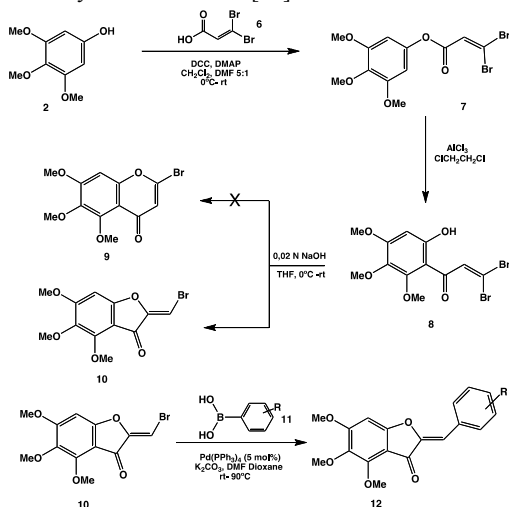
Scheme 2: (i) Al_2O_3 , DCM, rt, overnight, (ii) to remove TBDMS TBAF, DCM, rt, 30 min.

As for all the natural derivatives isolated by Atta ur Rahman and Choudhary *et al.* [15], an example of which is aurone **1**, the synthetic approach yielded the geometric (*Z*)-isomer, this being generally more stable thermodynamically than the (*E*)-isomer.

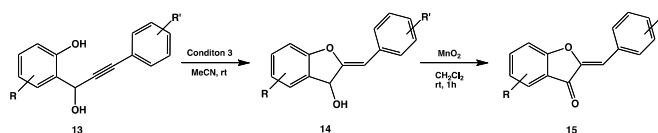
As part of an alternative synthetic approach, Kraus *et al.*, employed a Steglich esterification followed by a Suzuki coupling [15]. They started with the esterification of commercially available phenol **2** with 3,3-dibromoacrylic acid **6**. A Fries rearrangement led from the ester **7** to ketone **8**. After cyclisation of **8**, the authors initially expected a bromoketone, originally assigned as **9**. However, Suzuki coupling with phenylboronic acid **11** provided a different compound. After considering alternative structures through NMR studies, they revised **9** to **10**. This implies that the Suzuki coupling led to aurone **12** (Scheme 3).

The Suzuki reaction is more commonly conducted with aryl bromides or iodides than with chlorides [16]. Interestingly, when the authors exchanged 3,3-dibromoacrylic acid to 3,3-dichloroacrylic acid the reaction led to flavones **9** and not to aurones. The rationale for the remarkable divergence still remains unclear.

As a further alternative synthetic pathway, Harkat *et al.* described a three-step procedure to form aurone derivatives using a gold(I)-catalyzed cyclisation of 2-(1-hydroxyprop-2-ynyl)phenols. The classical aldol-like coupling reaction sometimes results in low yields and requires the synthesis of benzofuran-3(2H)-ones from substituted 2-phenoxyacetic acids by an intramolecular Friedel–Craft reaction. Such a reaction is usually carried out under harsh conditions and yields are modest [17].



Scheme 3: Synthetic route towards aurones via Steglich esterification followed by Suzuki coupling [15].



Scheme 4: Three-step procedure to form aurone derivatives using a gold (I)-catalyst R= H-, Br-, MeO-, NO_2 - and R' Cl-, MeO- [17].

Table 1: Reaction conditions for catalytic condensation of aurones.

Conditions	Catalyst (mol%)	Additive (mol%)	Time (h)	Yield (%)
1	none	K_2CO_3 (10)	24	0
2	AuCl (10)	none	0.5	<i>a</i>
3	AuCl (10)	K_2CO_3 (10)	2	78

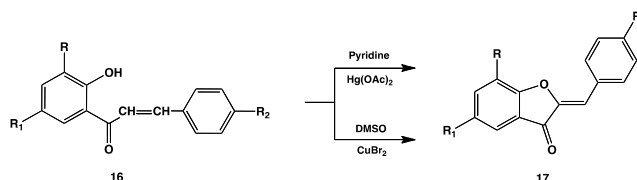
Conditions	Catalyst (mol%)	Additive (mol%)	Time (h)	Yield (%)
1	none	K_2CO_3 (10)	24	0
2	AuCl (10)	none	0.5	<i>a</i>
3	AuCl (10)	K_2CO_3 (10)	2	78

a: decomposition

In contrast, the group prepared various 2-(1-hydroxy-3-arylprop-2-ynyl) phenols (**13**) by addition of 2 equivalents of lithium arylacetylides, with or without substituents, at low temperature in THF to yield several substituted salicylaldehydes (Scheme 4). The propynol obtained was then subjected to cyclisation (Table 1).

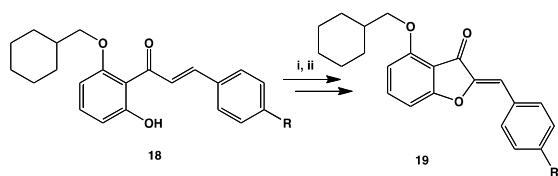
Only the combination of gold(I)chloride and potassium carbonate enabled the cyclisation to the arylidene alcohol **14**. Oxidation with MnO_2 afforded the corresponding aurones (**15**). Using this method, the synthesis of different natural aurones was achieved, including the 4'-chloroaurone from *Spatoglossum variable*, which has been isolated previously by Atta ur Rahman and Choudhary [18].

Agrawal *et al.* described a similar cyclisation using pyridine-Hg(OAc)₂, as well as CuBr_2 , in dimethylsulfoxide (Scheme 5). As part of this procedure, to a molar amount of Hg(OAc)_2 in cold pyridine the 2'-hydroxychalcone **16** was added and the solution refluxed for 10-15 min. Then the reaction was cooled, treated with diluted HCl, and then diluted with ice-cold water. Recrystallization led to the pure *Z*-isomer of **17**. As part of a second method, the authors used a few milligram of CuBr_2 in DMSO and 2-hydroxychalcones. After refluxing this mixture for about 60 to 90 min, the reaction was cooled and quenched with water. Filtration and recrystallization in EtOH yielded the desired aurones (**17**) [19].



Scheme 5: Cyclisation by mercury (II) acetate in pyridine and cupric bromide in dimethylsulfoxide R= H-, Br-, R₁= H-, CH₃-; R₂= H-, OCH₃-, Cl- [19].

Thanigaimalai and Yang described a synthetic route to aurones via oxidation of 2-hydroxy-6-cyclohexylmethoxychalcones with thallium (III) nitrate (Scheme 6) [20]. In continuation of their previous work [21,22] they treated different chalcones (**18**) with thallium (III) nitrate in methanol, first at room temperature for 24 h, and then heated to 65°C, followed by addition of hydrochloric acid in a one pot oxidative cyclisation to achieve the corresponding isoflavones (not shown) and/or aurones (**19**) depending on the electronic nature of substituents on ring B of the chalcones. The strong electron donating groups in the para-position of ring B led to isoflavones, the weak electron donating group to a mixture of both aurones and isoflavones, and the electron withdrawing groups ended with aurones (**19**). Again NMR studies of the aurone

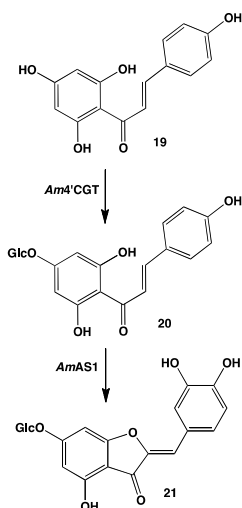


Scheme 6: (i) Thallium (III) nitrate (TTN), methanol, overnight at rt; (ii) hydrochloric acid, 50°C, 5 h. R= -H, -Cl, -CHO, -COOCH₃, -NO₂, -COOH [20].

derivatives revealed that their oxidative cyclisation method gave only Z- isomers, as reported in the literature [23,24].

Aurones and their role in coloring flowers: There are many beautiful flowers in nature and they show a variety of shapes and colors. Such diversity is acquired through evolutionary processes to ensure successful reproduction by attracting pollinators or by promotion of wind pollination [25]. The color is especially important to attract pollinators, such as insects and birds. For plant breeders, the color of flowers is one of their most important targets. Such breeders have come up with many different-colored hybrids and cultivars using natural mutants or genetically related species. Recent advances in genetic modification techniques enable the production of desirable and novel flower colors [26]. Many researchers exploit the knowledge of flavonoid biosynthesis effectively to obtain unique flower colors. Transgenic blue-violet flowers, for instance, are already on the market today and transgenic blue roses have been reported [27].

For creating transgenic plants with yellow colors, aurones are often used as pigments of choice. Ono and Fukuchi-Mizutani revealed that regulation of aurone biosynthesis led to production of yellow flowers in a *Torenia* hybrid [2].



Scheme 7: Biosynthetic route towards aurones.

Interestingly, the biosynthetic avenue leading to aurones differs somewhat from the chemical synthetic pathways discussed earlier. In transgenic flowers, the coexpression of *Antirrhinum majus* chalcone 4'-O-glucosyltransferase (*Am4'CGT*) in the cytoplasm and *A. majus* aureusidin synthase (*AmAS1*) in the vacuole combined with down-regulation of anthocyanin biosynthesis by RNA interference (RNAi) resulted in yellow flowers. These two enzymes will produce aureusidin 6-O-glucoside (**21**) via a 2',4',6',4-tetrahydrochalcone 4'-O-glucoside **20**. The authors suggested that the chalcones (**19**) are 4'-O-glucosylated in the cytoplasm, their 4'-O-glucosides transported to the vacuole, and therein enzymatically converted to aurone 6-O-glucosides (Scheme 7).

Since chalcones are common throughout the plant kingdom, the strategy to generate yellow flowers by production of aureusidin 6-O-glucoside is widely applicable to most plant species producing chalcones. Moreover, this genetic “trick” opens the door to molecular breeding strategies which generate monotonous yellow flowers that dominantly produce aurone 6-O-glucoside [2].

Aurones as fluorescent probes with potential applications:

Organic molecules that fluoresce in the visible region of the electromagnetic spectrum might be useful as probes in biological systems [28]. Such probes should cause minimal perturbation of the biological macromolecule, possess background fluorescence and be easy to use. There are three general types of fluorophores of interest here: xanthenes (fluorescein, rhodamine), boron dipyrromethenes and cyanines. Some of them already absorb and fluoresce in the visible region, but most of these molecules are relatively bulky with small Stokes' shifts [1, 2]. Shanker and Dilek recently published aurone derivatives as potential fluorescent probes for biomolecules that can be observed with visible light [28]. Even the largest molecule they prepared for this study is smaller than the xanthene dyes. The UV-Vis absorption characteristics of naturally occurring aurones have been well documented [14, 15]. An amine substituent at the 4-position of aurone **22** leads to the largest red shift in the absorption maximum compared with that of the parent molecule. Acetylation of the amine (aurone **23**) shifts the absorption and emission maxima to shorter wavelengths, while restricting the rotation of the amine nitrogen in **24** shifts the absorption and emission maxima to longer wavelengths.

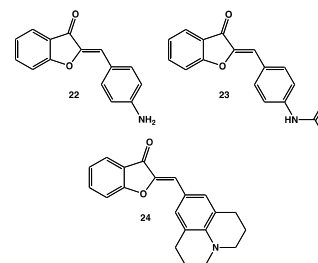


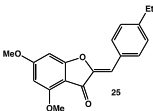
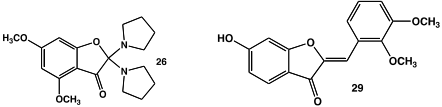
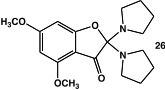
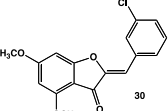
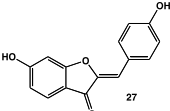
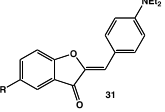
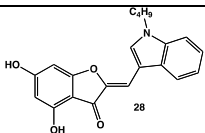
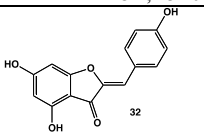
Figure 2: Aurones which may serve as potential fluorescent probes [28].

On one hand, xanthenes have high quantum yields in polar environments, while on the other hand the aminoaurones investigated so far need to have a hydrophobic environment to be useful fluorescent probes. The molecules investigated can also be observed using common microscopy excitation sources. The authors further speculated that Z- and E-isomers can be interconverted photochemically and, therefore, may have applications as photoactivated switches. As a proof of concept, they showed that the absorption and emission maxima of aurones may be varied to suit a particular application through functional group selection [28].

Biological roles, targets and activities: Aurones and others sub-classes of flavonoids, such as flavones and chalcones, have been studied for their numerous biological activities. Aurones, however, are only studied sparingly compared with the others sub-classes [29,30]. Nevertheless, recent studies have revealed promising biological properties of this group of natural molecules. In this review we will describe the most relevant biological properties of aurones discovered so far.

Aurones as antiparasitic agents: Recently, Souard *et al.* synthesized and analyzed 35 aurones for their potential as antimalarial drugs. All of these compounds were found to be non-cytotoxic in human cell lines and among them, seven had an IC₅₀ below 5 μM in the antiplasmodial assay. The most active

Table 2: Overview of some most bioactive aurones reported so far.

Effect/Target	Structure	Effect/Target	Structure
Antimalarial [31]		Anti-inflammatory [32] [35]	
Antimicrobial (antifungal and bacterial) [32]		Anti-cancer (breast cancer) [36]	
Anti-viral (Influenza virus) [33]		Anti cancer (anti-motility and angiogenesis) [12]	
Anti-viral (Hepatitis C virus) [34]		Skin disease [5]	

compound was tested *in vivo* in mice and was not toxic to the mouse itself, but the antiplasmodial effect appeared to be less efficient compared with the *in vitro* studies due to its low solubility. The structure–activity relationship analysis revealed that dimethoxylation at positions C4 and C6, a halogen atom at position 4', and the substitution of the intracyclic oxygen atom with an N-H group increased the activity of the compounds. However, a long chain had an adverse effect. Concerning the azaaurones, an ethyl moiety at C4' rather than C2', substitution of the ethyl group by an acetylenyl group, methoxylation at the 4'-position, and a dimethylamino moiety improve the efficiency of the molecules (**25**) [31].

Aurones as antimicrobial agents: Aurones also exert antibacterial and antifungal properties. A recent article published in 2010 reported that a series of synthetic aurone analogues are efficient antibacterial and antifungal molecules. All of these compounds exhibited moderate to good antibacterial activity against *E. coli*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *K. pneumoniae* and *P. vulgaris*. Concerning their antifungal activity, all of these compounds were able to inhibit different fungal strains, including *A. fumigatus*, *A. niger*, *T. viridie*, *C. albicans* and *P. chrysogenum* at a concentration of 25 µg/mL and with different efficiency (**26**) [32].

Aurones as anti-viral agents: A series of different flavonoids has been analyzed for neuraminidase inhibition potency, a glycoprotein involved in the infection process of the influenza virus. Among this list of 25 flavonoids, most of the aurones tested were described as good neuraminidase inhibitors. The structure–activity relationship revealed that a glycosyl group at any position, and a hetero-function at C3 or C4 decrease this effect, and an OH group at C6 or C4', a double bond between C-2 and the phenylidene, and a hetero-function at C3 are essential for the activity (**27**) [33].

Several aurone derivatives synthesized by Haudecoeur and Ahmed-Belkacem were analyzed to target the hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase. The authors identified the aurone target site by site–directed mutagenesis as the thumb pocket I of the polymerase. They identified seven aurone derivatives as potent inhibitor molecules with an IC₅₀ below 5 µM. Interestingly, all of these compounds are non-cytotoxic towards cultured human Huh7 and HEK293 cells. This data permitted the authors to identify

important substituents for biological activity: on the A ring, a hydroxy group at position C4 or a dihydroxy substitution at positions C4 and C6; on the B ring, hydroxy groups at positions C2', C4' – or C3', C4' or a hydrophobic and a bulky substituent or an alternative core (**28**) [34].

Aurones as anti-inflammatory agents: The aurone derivatives synthesized by Bandgar and Patil, described as antibacterial and antifungal molecules, also show anti-inflammatory properties. They are able to inhibit the production of TNF-α (tumor necrosis factor-alpha) and IL-6 (interleukin-6), two cytokines that are often involved in diseases, such as autoimmune diseases, diabetes, arthrosclerosis and cancer [32].

The anti-inflammatory potential of aurone derivatives was confirmed by a second study. Several aurones were synthesized as sulfuretin derivatives, a molecule already described as an anti-inflammatory agent able to reduce the production of nitric oxide and prostaglandin E₂, two pro-inflammatory molecules. Results show that these synthetic compounds are less cytotoxic and some of them are more efficient than sulfuretin. Analysis of the structure–activity relationships revealed that a hydroxyl-function at C6 is important to decrease the synthesis of prostaglandin E₂ and that methoxy groups on the B ring are useful to reduce the production of nitric oxide (**26**, **29**) [35].

Aurones as anti-cancer agents: A series of aurones have been synthesized and analyzed for their ability to target ABCG2 (ATP – binding cassette sub – family G member 2), an ABC protein transporter responsible for the breast cancer multidrug resistance mechanism. Results have shown that aurones are able to inhibit the ABCG2 efflux transporter in a dose-dependent manner and have a low cytotoxic effect against several cancer and healthy cell lines (**30**) [36].

In another study, Cheng and Zhang synthesized a series of 4'-substituted 5-hydroxyaurone derivatives. These compounds have been tested for their cytotoxic effects on both cancer and non-cancer cell lines. Results show that some aurones are cytotoxic toward cancer cell lines, but exert weaker activities against non-cancer cell lines. These compounds have also been tested *in vitro* regarding their ability to inhibit cell motility and angiogenesis, two

processes implicated in cancer cell invasion and metastasis development. The authors identified two synthetic compounds that are able to beneficially modulate these two mechanisms involved in cancer development (31) [12].

Aurones to treat skin diseases: Some aurones are able to inhibit human tyrosinase, an enzyme which plays a role in the melanin synthesis pathway. Melanin is the natural pigment of human skin and has been implicated in several dermatological diseases. Analysis of the structure–activity relationship indicates that hydroxyl groups on the B ring are necessary for the activity and hydroxyl groups at the 4,6 and 4' positions strongly increase efficiency (32) [5].

Alzheimer's disease: A novel series of aurone derivatives has been synthesized as radiolabelled probes to detect β -amyloid plaques in

Alzheimer's disease. *In vitro* results show that these compounds have only one high affinity binding site for β -amyloid peptides. Biodistribution performed on mice revealed that these molecules have a good brain uptake and a fast clearance from the brain, which are two important properties for *in vivo* amyloid probes [37].

In conclusion, aurones seem to provide a promising scaffold for medicinal chemistry. The possibility to access heterocyclic analogues of benzofuranes, as well as an almost unlimited number of arylaldehydes available, will provide ample opportunities to produce libraries of aurones or related aza-, thio-, and selenoaurones for studies of their possible biological activities.

Acknowledgments - Our work has received funding from the European Community's Seventh Framework Programme (FP7/2007-2013) under grant agreement n° 215009 (RedCat).

References

- [1] Cody V, Middleton E. (1986) Plant flavonoids in biology and medicine: biochemical, pharmacological, and structure-activity relationships; Proceedings of a symposium held in Buffalo, New York, July 22 - 26, 1985. In *Progress in Clinical and Biological Research*. Liss, New York, USA.
- [2] Ono E, Fukuchi-Mizutani M. (2006) Yellow flowers generated by expression of the aurone biosynthetic pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103**, 11075-11080.
- [3] Brooks CJW, Watson DG. (1985) Phytoalexins. *Natural Product Reports*, **2**, 427-459.
- [4] Morimoto M, Fukumoto H. (2007) Synthesis and insect antifeedant activity of aurones against *Spodoptera litura* larvae. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **55**, 700-705.
- [5] Okombi S, Rival D. (2006) Discovery of benzylidenebenzofuran-3(2H)-one (aurones) as inhibitors of tyrosinase derived from human melanocytes. *Journal of Medicinal Chemistry*, **49**, 329-333.
- [6] Venkateswarlu S, Panchagnula GK. (2004) Synthesis and antioxidative activity of 3',4',6,7-tetrahydroxyaurone, a metabolite of *Bidens frondosa*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **68**, 2183-2185.
- [7] Boumendjel A. (2003) Aurones: a subclass of flavones with promising biological potential. *Current Medicinal Chemistry*, **10**, 2621-2630.
- [8] Lawrence NJ, Rennison D. (2003) The total synthesis of an aurone isolated from *Uvaria hamiltonii*: aurones and flavones as anticancer agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **13**, 3759-3763.
- [9] Aufmkolk M, Koehrl J. (1986) Inhibition of rat liver iodothyronine deiodinase. Interaction of aurones with the iodothyronine ligand-binding site. *The Journal of Biological Chemistry*, **261**, 11623-11630.
- [10] Hadjeri M, Barbier M. (2003) Modulation of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance by flavonoid derivatives and analogues. *Journal of Medicinal Chemistry*, **46**, 2125-2131.
- [11] Schoepfer J, Fretz H. (2002) Structure-based design and synthesis of 2-benzylidene-benzofuran-3-ones as flavopiridol mimics. *Journal of Medicinal Chemistry*, **45**, 1741-1747.
- [12] Cheng H, Zhang L. (2010) Design, synthesis and discovery of 5-hydroxyaurone derivatives as growth inhibitors against HUVEC and some cancer cell lines. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **45**, 5950-5957.
- [13] Varma RS, Varma M. (1992) Alumina-mediated condensation. A simple synthesis of aurones. *Tetrahedron Letters*, **33**, 5937-5940.
- [14] Kim D, Li Y. (1990) Synthesis of tunicchromes mm-1 and mm-2, blood pigments of the iron assimilating tunicate, *Molgula manhattensis*. *Tetrahedron Letters*, **31**, 7119-7122.
- [15] Kraus GA, Gupta V. (2010) Divergent approach to flavones and aurones via dihaloacrylic acids. Unexpected dependence on the halogen atom. *Organic letters*, **12**, 5278-5280.
- [16] Corbet JP, Mignani G. (2006) Selected patented cross-coupling reaction technologies. *Chemical Reviews*, **106**, 2651-2710.
- [17] Harkat H, Blanc A. (2008) Versatile and expeditious synthesis of aurones via Au I-catalyzed cyclization. *The Journal of Organic Chemistry*, **73**, 1620-1623.
- [18] Atta ur Rahman, Choudhary MI. (2001) Two new aurones from marine brown alga *Spatoglossum variabile*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, **49**, 105-107.
- [19] Agrawal NN, Soni PA. (2006) A new process for the synthesis of aurones by using mercury (II) acetate in pyridine and cupric bromide in dimethyl sulfoxide. *Indian Journal of Chemistry*, **45B**, 1301-1303.
- [20] Thanigaimalai P, Yang HM. (2010) The scope of thallium nitrate oxidative cyclization of chalcones; synthesis and evaluation of isoflavone and aurone analogs for their inhibitory activity against interleukin-5. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **18**, 4441-4445.
- [21] Jung SH, Cho SH. (2003) Structural requirement of isoflavonones for the inhibitory activity of interleukin-5. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **38**, 537-545.
- [22] Yang HM, Shin HR. (2007) The role of alkoxy group on the A ring of isoflavones in the inhibition of interleukin-5. *Archives of Pharmacological Research*, **30**, 950-954.
- [23] Thakkar K, Cushman M. (1995) A novel oxidative cyclization of 2'-hydroxychalcones to 4,5-dialkoxyaurones by thallium(III) nitrate. *The Journal of Organic Chemistry*, **60**, 6499-6510.
- [24] Detsi A, Majdalani M. (2009) Natural and synthetic 2'-hydroxy-chalcones and aurones: synthesis, characterization and evaluation of the antioxidant and soybean lipoxygenase inhibitory activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **17**, 8073-8085.
- [25] Henry AM, Manicacci D. (2005) Molecular evolution of the opaque-2 gene in *Zea mays* L. *Journal of Molecular Evolution*, **61**, 551-558.
- [26] Nishihara M, Nakatsuka T. (2011) Genetic engineering of flavonoid pigments to modify flower color in floricultural plants. *Biotechnology Letters*, **33**, 433-441.
- [27] Tanaka Y, Katsumoto Y. (2005) Genetic engineering in floriculture. *Journal of Plant Biotechnology*, **80**, 1-24.
- [28] Shanker N, Dilek O. (2011) Aurones: Small molecule visible range fluorescent probes suitable for biomacromolecules. *Journal of Fluorescence*, **6**, 2173-2184.

- [29] Orlikova B, Tasdemir D. (2011) The aromatic ketone 4'-hydroxychalcone inhibits TNF α -induced NF- κ B activation via proteasome inhibition. *Biochemical Pharmacology*, **82**, 620-631.
- [30] Orlikova B, Tasdemir D. (2011) Dietary chalcones with chemopreventive and chemotherapeutic potential. *Genes & Nutrition*, **6**, 125-147.
- [31] Souard F, Okombi S. (2010) 1-Azaaurones derived from the naturally occurring aurones as potential antimalarial drugs. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **18**, 5724-5731.
- [32] Bandgar BP, Patil SA. (2010) Synthesis and biological evaluation of a novel series of 2,2-bisaminomethylated aurone analogues as anti-inflammatory and antimicrobial agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **45**, 3223-3227.
- [33] Liu AL, Wang HD. (2008) Structure-activity relationship of flavonoids as influenza virus neuraminidase inhibitors and their *in vitro* anti-viral activities. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **16**, 7141-7147.
- [34] Haudecoeur R, Ahmed-Belkacem A. (2011) Discovery of naturally occurring aurones that are potent allosteric inhibitors of hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase. *Journal of Medicinal Chemistry*, **54**, 5395-5402.
- [35] Shin SY, Shin MC. (2011) Synthesis of aurones and their inhibitory effects on nitric oxide and PGE(2) productions in LPS-induced RAW 264.7 cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **21**, 4520-4523.
- [36] Sim HM, Lee CY. (2008) Dimethoxyaurones: Potent inhibitors of ABCG2 (breast cancer resistance protein). *European Journal of Pharmaceutical Sciences: official Journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*, **35**, 293-306.
- [37] Ono M, Maya Y. (2007) Aurones serve as probes of beta-amyloid plaques in Alzheimer's disease. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **361**, 116-121.

Targeting the Wingless Signaling Pathway with Natural Compounds as Chemopreventive or Chemotherapeutic Agents

Marie-Hélène Teiten, François Gaascht, Mario Dicato and Marc Diederich*

Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire du Cancer, Hôpital Kirchberg, L-2540 Luxembourg, Luxembourg

Abstract: The aberrant activation of the wingless (Wnt) signaling pathway is a key element involved in carcinogenesis as Wnt regulates a variety of cellular processes including proliferation, differentiation, survival, apoptosis and cell motility. Upon Wnt receptor activation, the canonical “Wnt/beta-catenin” as well as the non canonical “Wnt/planar cell polarity, Wnt/Ca²⁺” pathways are activated. This offers multiple possibilities to target the aberrant regulation of this signaling pathway in order to counteract cancer proliferation. During the last decade, natural compounds from both marine and terrestrial origins were tested for their potential to modulate the expression of specific genes related to the Wnt signaling cascade but also for their anti-carcinogenic properties. It appears that phenolic compounds (e.g., caffeic acid phenethyl ester, curcumin and derivatives, green, white and black tea, resveratrol, quercetin, isoflavone, fisetin, and isoflavone) as well as other small molecules were able to inhibit the Wnt signaling through the modulation of beta-catenin expression, transcriptional activity and of the subsequent expression of Wnt target genes. Altogether, these findings underline the fact that Wnt signaling could be considered as a promising target for innovative strategies for cancer treatment and prevention.

Keywords: Beta-catenin, cancer, chemoprevention, chemotherapy, natural compounds, wingless signaling pathway.

INTRODUCTION

During the last decades, epidemiological studies underlined the importance of dietary patterns in the prevention of cancer. These studies pointed out that consumption of fruits and vegetables can be associated with a reduced risk of cancer development, whereas animal fat takes an active part in cancer promotion and progression [1, 2]. With this in mind, several studies and clinical trials were undertaken in order to highlight the chemopreventive and chemotherapeutic potential of compounds issued from Mother Nature, and to understand the multiple molecular mechanisms implicated. Dietary phytochemicals as well as natural compounds from marine or terrestrial organisms were shown to exhibit chemopreventive and chemotherapeutic activity through the modulation of specific signaling pathways including the Wingless/beta-catenin signaling [3, 4]. The Wingless (Wnt) signaling pathway is physiologically implicated in tissue development in embryos and in tissue maintenance in adults through its implication in cell proliferation, differentiation and epithelial-mesenchymal interactions. Dysregulations or aberrant activation of this pathway are responsible for cancer development [5, 6].

We will summarize hereafter the findings of new Wnt/beta-catenin signaling antagonists among compounds from natural origin and we will detail their impact on the different intermediates implicated in the Wnt signaling pathway.

THE WINGLESS SIGNALING PATHWAY

Wnt signaling pathway is a complex process that implicates a variety of receptors and ligands. Wnt ligands consist

of secreted glycoproteins that bind to the Frizzled receptor family. Depending on the nature of the Wnt ligands/receptor interaction, canonical or non canonical Wnt pathways are activated [7, 8].

Canonical Wingless Signaling Pathway

The Wnt canonical signaling pathway regulates the ability of multi-functional beta-catenin to activate the transcription of specific target genes. In the absence of Wnt ligands Fig. (1), free beta-catenin is degraded and maintained at low level in the cytoplasm due to the multiprotein complex composed by Axin, glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β), adenomatous polyposis coli (APC), protein phosphatase 2A (PP2A) and casein kinase 1 α (CK1 α). In this complex, the scaffolding protein Axin assembles the different partners. APC protects phospho beta-catenin against dephosphorylation by PP2A [9]. CK1 α , that acts as a priming kinase for GSK-3 β , starts to phosphorylate residue Ser45 of beta-catenin. GSK-3 β then phosphorylates residues Ser33, Ser37 and Thr41 [10]. These post-translational modifications of beta-catenin create a binding site recognized by the E3 ubiquitin ligase complex SCF (β -TrCP) [11]. Beta-catenin is then ubiquitinated and degraded by the 26S proteasome [12] so that the intracellular level of free beta-catenin remains low and nuclear beta-catenin/Tcf complex formation is prevented. By this way, the transcription factor T-cell factor/lymphoid enhancer factor (Tcf/Lef) acts in the nucleus as a transcriptional repressor through the recruitment of corepressors (e.g. TLE/Groucho, C-terminal binding protein (CtBP), HMG box repressor protein 1 (HBP1)) to the target gene promoters [13, 14]. The repressing effect of Groucho is mediated by interactions with histones deacetylases (HDAC) [15].

*Address correspondence to this author at the Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire du Cancer, Hôpital Kirchberg, 9 rue Edward Steichen, L-2540 Luxembourg, Luxembourg; Tel: +352 2468 4040; Fax: +352 2468 4060; E-mail: marc.diederich@lbmcc.lu

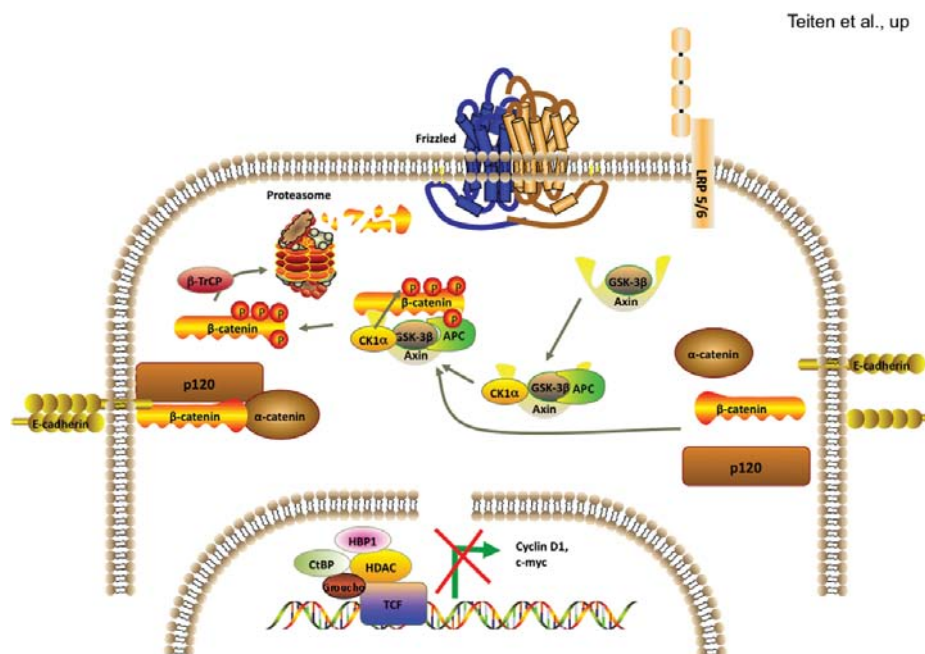


Fig. (1) Schematic representation of the canonical Wnt signaling pathway in “Off-state”. In the absence of the Wnt ligand, beta-catenin implicated in cellular junction with alpha-catenin and p120, interacts with the complex formed by APC (adenomatous polyposis coli), Axin, CK1a (Casein kinase 1a) and GSK-3beta (Glycogen synthase kinase-3beta). Beta-catenin is then phosphorylated and degraded by the proteasome. In the nucleus, the Tcf-dependent transcription of target genes is repressed by HBP1 (HMG box repressor protein 1), CtBP (C-terminal binding protein), HDAC (Histone deacetylase) and Groucho proteins.

In contrast, the binding of Wnt ligands Fig. (2) to the Frizzled (Fzd) cell surface receptor and its low-density lipoprotein receptor-related protein 5 or 6 (LRP 5/6) coreceptor [16] induces the membrane translocation of Axin, a key negative regulator that normally phosphorylates the cytoplasmic scaffolding protein Dishevelled (Dsh). Dsh is so recruited to the cytoplasmic membrane by Fzd and Axin binds to Dsh to recruit GSK-3beta and CK1alpha that phosphorylate LRP 5/6. This phosphorylation triggers the binding of Axin and GSK-3beta to LRP 5/6 and consequently inhibits the formation of the beta-catenin destruction complex [17]. Non-phosphorylated free beta-catenin accumulates into the cytoplasm and translocates to the nucleus. This nuclear translocation is mediated by Bcl-9/legless (Bcl-9) adaptor protein that targets beta-catenin to the nuclear Pygopus (Pygo) protein [18, 19]. In the nucleus, beta-catenin forms then a complex with the Tcf/Lef transcription factor [20], that occurs through displacement of Groucho from Tcf/Lef and recruitment of the CREB-binding protein (CBP)/p300 (cyclic AMP response element-binding protein) coactivator [21]. This leads to the activation of transcription of Wnt target genes involved in cell proliferation (*c-myc*, *cyclin D1*), cell adhesion (*E-cadherin*, *matrilysin*) and even in the Wnt pathway itself (*fzd*, *lef*, *tcf*).

Non Canonical Wnt Signaling Pathways

Non-canonical Wnt signaling pathways which consist of Wnt/Planar cell polarity and Wnt/calcium pathways Fig. (3) are well described in the field of development [22] and cancer [23] and are beta-catenin-independent pathways.

The Non Canonical Planar Cell Polarity (PCP) Pathway

In the Wnt/PCP pathway, binding of Wnt ligand [24] to Fzd is independent on LRP5/6 receptor but is mediated by collagen triple helix repeat containing protein 1 (Cthrc1) [25] and leads to Dsh activation. The signal is then split into three different pathways that will activate profilin as well as two small GTPases: Ras-related C3 botulinum toxin substrate (Rac) and Ras homolog gene family, member A (RhoA) [26]. The first pathway stimulates the binding of the bridging protein Dishevelled associated activator of morphogenesis 1 (Daam-1) to Dsh [26]. This binding leads to the activation of Daam-1 that consequently activates RhoA. This triggers the activation of RhoA associated kinase (ROCK), a molecule able to reorganize actin cytoskeleton [27]. In the second pathway, activation of Rac GTPase permits the phosphorylation and activation of c-Jun-N-terminal-kinase (JNK) [26, 28], involved in many cellular processes such as cell migration. The last branch of the PCP pathway involved profilin [22], an effector of Damm-1 that binds to Dsh after activation of Fzd receptor and also plays a role in actin polymerization. Deregulations of PCP signaling was shown to contribute in the development of metastasis in different kind of cancers [23, 29, 30].

The Wnt/Calcium Pathway

In the Wnt/calcium pathway [31, 32], binding of Wnt ligands to the Fzd receptor leads to the activation of Dsh and to the subsequent activation of phospholipase C. This enzyme then catalyzes the synthesis of diacylglycerol (DAG) and inositol 1,4,5-trisphosphate (IP3) [33]. IP3 messenger

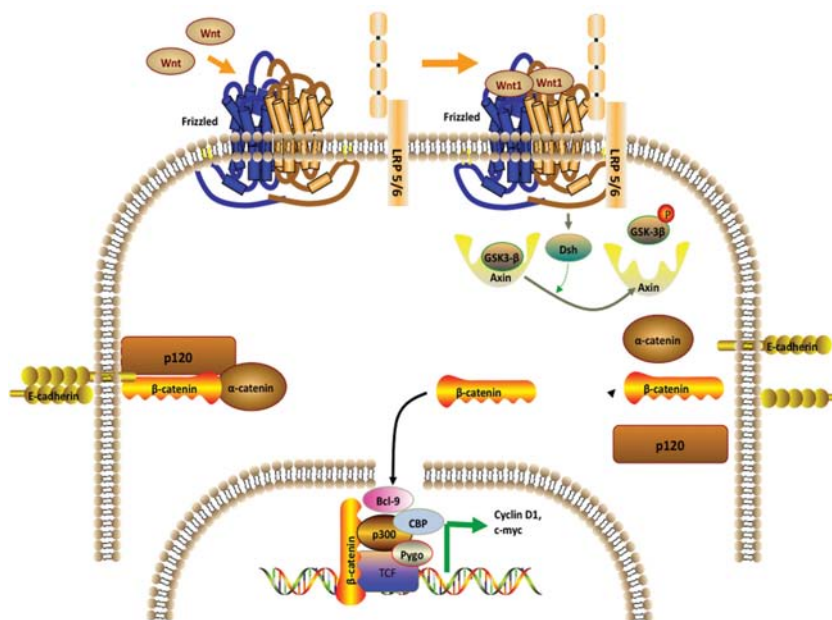


Fig. (2) Schematic representation of canonical Wnt pathway in “On-state”. The presence of Wnt ligands that bind to Frizzled receptor and to its low-density lipoprotein receptor-related protein 5 or 6 (LRP 5/6) co-receptors, induces the nuclear translocation of beta-catenin that is mediated by Bcl-9/legless (Bcl-9) adaptor protein. Beta-catenin then binds to Tcf (T-cell factor) in the presence of Pygo (Pygopus) protein and CREB-binding protein CBP/p300 coactivator. This leads to the transcription of target genes like c-myc or cyclin D1 implicated in cell proliferation.

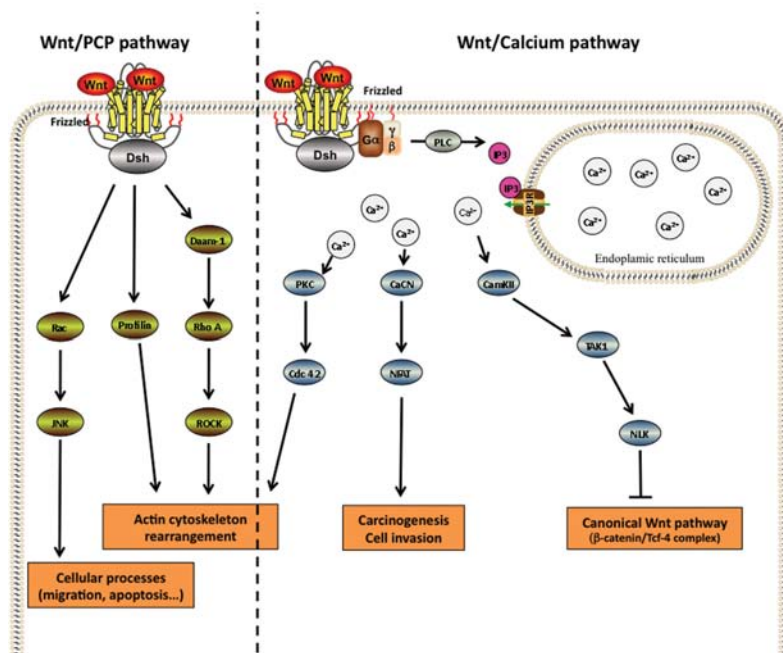


Fig. (3) Schematic representation of non-canonical Wnt/planar cell polarity (PCP) and Wnt/calcium (Ca^{2+}) signal transduction cascades. Binding of Wnt ligands to Frizzled receptor activates Dsh (Dishevelled) protein that stimulates three different GTPases implicated in Wnt/PCP pathway: Ras-related C3 botulinum toxin substrate (Rac), Profilin and Ras homolog gene family, member A (Rho A). On the one hand, Dsh activates profilin but also a cascade of events implicating the activation of Daam-1 (Dishevelled associated activator of morphogenesis 1), Rho A and ROCK (Rho A associated kinase) in order to induce actin cytoskeleton rearrangement. On the other hand, Dsh activates Rac and subsequently JNK (c-Jun-N-terminal-kinase), a protein involved in many cellular processes like cell migration and apoptosis. In the Wnt/ Ca^{2+} pathway, ligation of Wnt ligands to Fzd activates Dsh and a trimeric G-protein. This triggers the synthesis of IP3 (inositol 1,4,5-trisphosphate) by PLC (Phospholipase C) that permits the release of calcium ions (Ca^{2+}) and activation of calcium sensitive proteins: CamKII (calcium/calmodulin-dependant kinase II), PKC (Protein kinase C) and CaCN (Calcineurin phosphatase). These proteins activate different signalling proteins (NFAT (Nuclear factor of activated T-cell), TAK1 (TGF- β activated kinase 1) and NLK (Nemo-like kinase)) involved in different cellular processes. Arrows represent induction/activation, blunt-ended lines represent repression/inactivation.

stimulates the release of Ca^{2+} from intracellular stores such as endoplasmic reticulum [34]. This increase of Ca^{2+} ions in the cytoplasm activates Ca^{2+} sensitive proteins like calcium/calmodulin-dependent kinase II (CamKII) [35], protein kinase C (PKC) [36] and calcineurin phosphatase (CaCN) [37]. CamKII can activate TGF-beta activated kinase 1 (TAK1) and subsequently Nemo-like kinase (NLK), a protein that phosphorylates Tcf and consequently disrupts the beta-catenin/Tcf complex leading thus to the inhibition of the canonical Wnt pathway [38]. PKC is an activator of cdc42, a GTPase protein involved in polarized reorganization of microtubule cytoskeleton [39]. CaCN can activate Nuclear Factor of Activated T-cells (NFAT), a family of transcription factors activating the expression of genes involved in several mechanisms such as angiogenesis [40].

CHEMOTHERAPEUTIC AND CHEMOPREVENTIVE APPROACH BY TARGETING THE WNT SIGNALING

As Wnt signaling is strongly involved in cancer cell proliferation, it appears evident that inhibition of aberrant Wnt activity in cancer cells could provide an opportunity for cancer therapy [41-43].

Molecular Modulators of Wnt Signaling

Several therapeutic strategies have been tested in order to interfere with cancer growth and progression. Strategies, focusing on the inhibition of mutated forms or pathogenic activity of beta-catenin [41], consist in protein knockdown using F-box proteins able to recognize and inactivate pathogenic beta-catenin [11, 44], but also in gene therapy, based on the use of replicating or non replicating virus [45, 46]. Other strategies consist, on the one hand, in targeting extracellular targets (e.g. Wnt ligands, Fzd or Lrp) implicated in the upstream machinery of the Wnt signaling by decreasing Wnt ligand activity by antisense RNA strategy or by inhibition of their activity by antibodies [47-49]. Other interesting results were obtained *in vitro* and *in vivo* by targeting the Wnt downstream machinery (beta-catenin, Tcf, Lef) with antisense RNA [50, 51]. However, despite the promising potential of such strategies, their clinical outcome is limited due to difficult delivery in patients but also by their possible toxic long-term side effect.

Natural Modulators of Wnt Signaling

Natural Compounds From the Diet

Epidemiological studies clearly demonstrated that the diet plays a role in carcinogenesis. Briefly, fat was shown to enhance cellular proliferation [52] and consumption of fruits and vegetables leads to chemoprevention [2].

Curcumin

Curcumin (diferuloylmethane) Fig. (4), is a polyphenol extracted from *Curcuma longa*. Initially characterized for its anti-inflammatory potential, this natural compound appears to be a promising chemopreventive and potentially chemotherapeutic compound able to inhibit specific molecular signaling pathways involved in carcinogenesis, such as Wnt signaling especially in colorectal tumors [53, 54]. Experi-

ments performed on HCT-116 and SW620 colon carcinoma cell lines revealed that curcumin, its derivatives (demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin) and metabolites including tetrahydrocurcumin prevent colorectal carcinogenesis by inhibiting the beta-catenin/Tcf signaling through the reduction of nuclear beta-catenin and Tcf-4 which leads to a decreased association of beta-catenin with Tcf-4, a decrease of their subsequent binding to consensus DNA sequence, a reduction of beta-catenin/Tcf-mediated transcriptional activity and the subsequent modulation of c-myc expression [55, 56]. Such decrease of beta-catenin transcriptional activity was also related to the down-regulation of p300, a positive regulator of the Wnt signaling pathway [57] or to the decrease of beta-catenin due to its cleavage by caspase-3 [58]. In the case of familial adenomatous polyposis, treatment of HCT-116 cells that carry a wild-type *Apc* gene or treatment of Min/+ mice representing a model of colon cancer developing intestinal tumors due to a germline mutation in the *Apc* gene, with 0.1% of curcumin in the diet leads to a reduction of tumor formation in the intestine by 63% which correlated to a 20-fold decrease of the level of expression of beta-catenin in this tissue [59]. In osteosarcoma cell lines, the anti-proliferative potential of curcumin was correlated to a marked reduction of the amount of nuclear beta-catenin, that leads to a decrease of *cyclin D1*, *c-myc* and *survivin* expression [60]. In the case of oral cavity cancer, microarray gene profiling revealed that curcumin was also able to attenuate the expression of Fzd-1 and Wnt signaling [61].

Treatment of breast cancer MCF-7 and MDA-MB-231 cells with low cytostatic doses of 20 microM curcumin leads to G2/M cell cycle arrest and to the inhibition of the expression of several Wnt/beta-catenin pathway components, such as nuclear Dsh and beta-catenin proteins, but also the positively-regulated beta-catenin targets, cyclin D1 and slug [62]. Breast stem cell self-renewal was also inhibited by curcumin through the inhibition of Wnt signaling [63].

Tea Polyphenols

Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) Fig. (4), the major polyphenol present in white and green tea, was reported to inhibit beta-catenin/Tcf-4 transcriptional activity in a concentration-dependent manner by decreasing total beta-catenin protein levels without affecting Tcf-4 expression in HEK293 human embryonic kidney cells. Beta-catenin accumulation in punctate aggregates outside the nucleus after EGCG treatment suggests that EGCG activates the trafficking of beta-catenin into lysosomes, presumably as a mechanism for sequestering beta-catenin and circumventing further nuclear transport and beta-catenin transcriptional activity [64, 65]. Tea compounds could thus suppress the formation of intestinal polyps, normally implicated in intestinal tumorigenesis, *via* down-regulation of beta-catenin and Wnt target genes (*cyclin D1*, *c-jun* and *c-myc*) [66-68]. In the case of lung cancer, EGCG induces a decrease of cytosolic beta-catenin expression levels and the inhibition of Tcf/Lef transcriptional activity through the epigenetic modulation of Wnt inhibitory factor-1 (WIF-1) [69]. In fact, EGCG induces the restoration of WIF-1 expression through the demethylation of its promoter leading the down-regulation of Wnt signaling [70]. Another mechanism of Wnt signaling regulation was reported in breast cancer cells [71], in which EGCG was

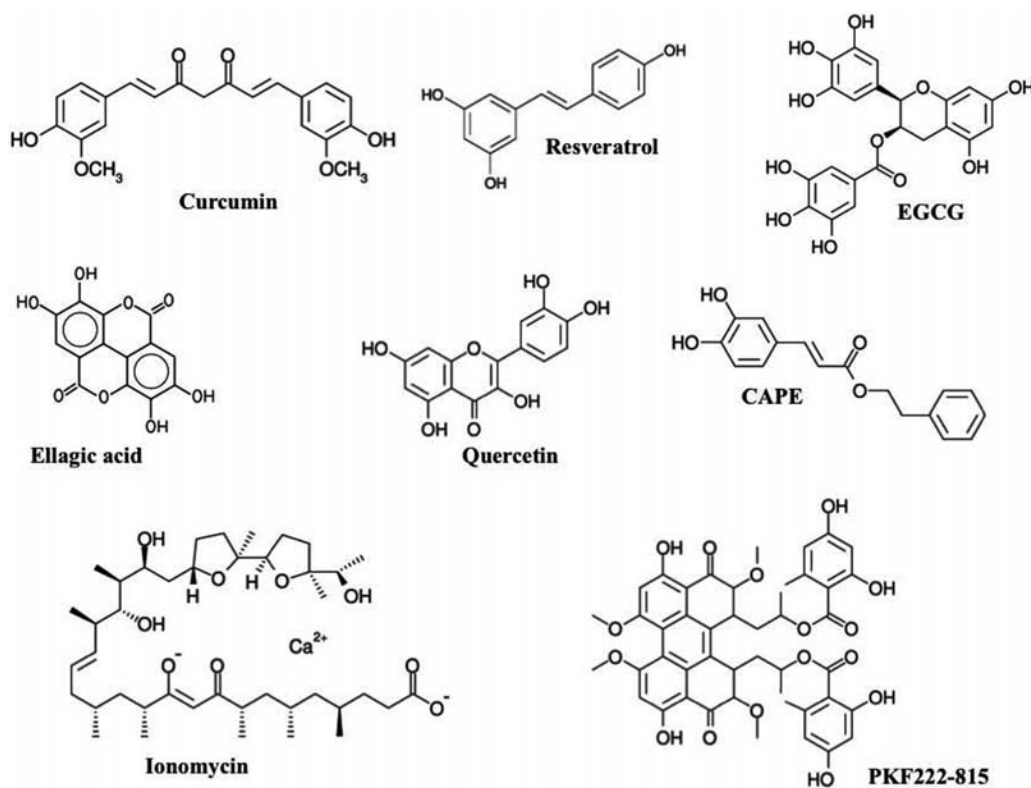


Fig. (4). Chemical structure of natural inhibitors of the Wnt Pathway. Curcumin, resveratrol, EGCG (epigallocatechin-3-gallate), ellagic acid, quercetin and CAPE (Caffeic acid phenethyl ester) are from the diet. Ionomycin and PKF222-815 are from bacterial and fungal origins, respectively.

effectively shown to reduce both tumorigenic proliferation and invasiveness through the stabilization of HBP1 mRNA and the induction of HBP1 protein [14]. Moreover, microarray analysis revealed that EGCG is a negative regulator of human umbilical vein endothelial (HUVEC) cells proliferation through the modulation of Wnt signaling, especially by inducing the expression of Dickkopf homolog 1 (Dkk1), that exhibits a high affinity to LRP5, but also by decreasing Centromere protein E (CENPE) expression, a kinesin-like motor protein responsible for mammalian movement and/or spindle elongation [72].

Polymeric black tea polyphenols (PBPs), were also shown to inhibit colorectal cancer cell proliferation through the regulation of beta-catenin expression by maintaining APC expression and by decreasing the inactivation of GSK-3beta. This results in decreased expression of c-myc, COX-2 and cyclin D1 proteins [73]. Similarly, polyphenon E (polyE), a green tea-catechin mixture was reported to inhibit the growth of human Barrett's and aerodigestive adenocarcinoma cells through the down-regulation of cyclin D1 by decreasing nuclear beta-catenin and beta-catenin/Tcf-4 transcriptional activity [74].

Resveratrol

Resveratrol Fig. (4), a biflavonoid polyphenol belonging to stilbenes phytochemical family, found in the skin of dark grapes, red wine and peanuts, was also reported to induce growth inhibition of several cancer cell lines by decreasing

the level of expression of beta-catenin and cyclin D1 [75]. When used at low (subapoptotic) concentrations, resveratrol was shown to inhibit beta-catenin dependent Wnt signaling throughout in colon-derived cells through the reduction of the expression of Bcl-9, PygoI, and to a lesser extent PygoII, leading thus to colon cancer prevention [76]. Recently, pterostilbene, a natural resveratrol analog, was also reported to down-regulate the expression of key protein markers, such as proliferating cell nuclear antigen (PCNA), beta-catenin, c-myc, cyclin D1 and cox-2 genes implicated in the carcinogenesis of carcinogen-induced F344 colon rat model and in the proliferation of HT29 colon cancer cells [77].

In contrast, in the case of multipotent mesenchymal cells, resveratrol augments the canonical Wnt signaling pathway in promoting their osteoblastic differentiation and subsequent bone formation, by enhancing GSK-3beta phosphorylation on Ser9, responsible for GSK-3beta inactivation and subsequently by increasing the stabilization and the nuclear accumulation of beta-catenin that activates the transcription of beta-catenin/Tcf target genes required for osteoblastic differentiation [78].

Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE)

Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) Fig. (4) is a phenolic component of propolis, issued from honeybee hives and well described for its anti-proliferative and anti-invasive potential [79-81]. CAPE inhibits colorectal cancer cell growth in a dose and time-dependent manner by decreasing

nuclear beta-catenin expression, transcriptional activity and beta-catenin-related genes expression [82-84]. Treatment of Min/+ mice with 0.15% of CAPE in the diet leads to the reduction of tumor formation in the intestine by 63% which correlated with a decrease of beta-catenin expression level in tissue. Similar results were obtained for HCT-116 cells that carries a wild-type *Apc* gene [59].

Berries

Berries are a source of various natural phenolic compounds such as ellagic acid Fig. (4), anthocyanins and other flavonoids. Seminal work of the Stoner group clearly demonstrated that berry constituents influence cellular processes associated with cancer progression including signaling pathways associated with cell proliferation, differentiation, apoptosis and angiogenesis [85, 86]. Feeding Min/+ mice with white currant, containing mainly proanthocyanidins (e.g. hydroxybenzoic acid) and hydroxycinnamic acid derivatives (e.g. caffeic acid and ferulic acid) [87] or with Nordic wild berries with different phenolic profiles [88, 89], was shown to prevent the formation of new adenomas and to reduce the growth of adenomas in the distal small intestine. This effect was related to the decrease of nuclear beta-catenin expression and transcriptional activity.

Lupeol

Lupeol, a diet based triterpene significantly reduces the proliferative and clonogenic potential of LNCaP and DU145 prostate cancer cells by modulating beta-catenin signaling pathway [90]. Lupeol reduces the level of expression of nuclear and cytoplasmic beta-catenin, modulates the expression of GSK-3beta-axin complex, decreases the Tcf transcriptional activation, and finally the expression level of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and cyclin D1. Similar results were obtained in colorectal cancer cells treated with 6-gingerol, a natural product of ginger [91] or with horehound leaf and wild cherry bark extracts [92].

Ellagitannins

Ellagitannins are a class of hydrolysable tannins found in some fruits (strawberry, Jamun berry, pomegranate) and nuts. These natural compounds hydrolyze and lead to release ellagic acid Fig. (4) that can be converted to urolithin A in the stomach and gut. Again these two bioactive components were shown to inhibit the canonical Wnt transcriptional activity in colon cancer cells, the concentrations required are not physiologically relevant [93].

Other Flavonoids

Quercetin Fig. (4), the major representative of the flavonol subclass of flavonoids, appears to be a potent inhibitor of beta-catenin/Tcf signaling in SW480 human colon adenocarcinoma cells by decreasing levels of beta-catenin and Tcf-4 in the nucleus, This compound then leads to decreased binding of beta-catenin to Tcf-4 and of Tcf complexes to DNA, a decreased beta-catenin/Tcf transcriptional activity resulting in a decreased expression of *c-myc*, *cyclin D1* and *survivin* [94, 95]. Similar results were obtained in HT29 and HCT116 cells for another flavonol called fisetin [96]. Moreover, quercetin and its glucose derivate, isoquercitrin

found in onions, were also reported to modulate the Wnt signaling activity through the decrease of beta-catenin nuclear localization in human Gbm95 glioblastoma cells [97].

Flavanone as well as naringenin, a 4',5,7-trihydroxyflavanone, were reported to inhibit the transcription of beta-catenin/Tcf responsive genes (*cyclin D1*) by modulating Tcf transcriptional activity without decreasing the level of nuclear beta-catenin and Tcf-4 proteins nor by disrupting beta-catenin/Tcf in HEK293 gastric cancer cells [98, 99].

Apigenin and genistein are belonging to the flavone subclass. Apigenin was shown to suppress prostate carcinogenesis in TRAMP mice but also in DU145 prostate cancer cells by blocking beta-catenin signaling through the decrease of the level of nuclear beta-catenin, c-myc and cyclin D1 [100]. Similarly genistein, a soy isoflavone, used at nanomolar concentrations, inhibits basal and Wnt-1-induced mammary epithelial proliferation, suppresses Wnt-1-induced nuclear accumulation of beta-catenin and up-regulates E-cadherin protein expression, promoting the formation of beta-catenin-E-cadherin cell adhesion complex in HC11 mouse mammary epithelial cell line *in vitro* and *in vivo* [101].

In contrast, flavonoids issued from *Herba epimedii* were shown to induce Wnt signaling through the increase of beta-catenin expression level in bone marrow-derived mesenchymal stem cells from healthy donors. Authors pointed out that such flavonoids can promote osteogenesis of human mesenchymal stem cells [102].

Indole-3-Carbinol

Indole-3-carbinol (I3C) is a constituent of *Brassica* vegetables. Depending on the initiator and exposure protocols as well as tissues treated, this natural compound can act as a promotor or inhibitor of carcinogenesis [103]. Authors pointed out that the spectrum of possible beta-catenin mutations affecting codons 41 and 45 of *Ctnnb1* gene found in F344 rat model can be altered by post-initiation exposure to the phytochemical I3C that can suppress or promote tumors in different tissues [104, 105].

Miscellaneous Natural Compounds From Plants

Natural compounds from various parts of plants (leaves, stems, roots) also appeared as potential Wnt modulators.

Chlorophyllin is a semi-synthetic sodium/copper derivative of chlorophyll. Depending on the beta-catenin mutations in *Ctnnb1* gene, found in F344 colon rat model, post-initiation exposure to chlorophyllin phytochemical suppresses or promotes tumor formation in different tissues [104-106].

Decursin, a pyranocoumarin isolated from *Angelica gigas* root, was reported to inhibit the growth of PC-3 human prostate cancer cells through the attenuation of the Wnt/beta-catenin pathway due to the degradation of beta-catenin, the subsequent inhibition of beta-catenin transcriptional activity and the decrease of target genes expression (*c-myc* and *cyclin D1*) [107].

Dammarane-type triterpene sapogenin (20 (S)-25-OCH₃-PPD; PPD25) isolated from the leaves of *Panax notoginseng* reduces the beta-catenin expression, transcriptional activity and targets genes expression which leads to the inhibition of human colorectal and lung cancer cell proliferation [108].

Several naphthalene derivatives from *Eleutherine palmifolia* extracts from bulbs of *Iridaceae*, were shown to decrease the level of nuclear beta-catenin protein that leads to the inhibition of beta-catenin/Tcf transcriptional activity [109].

Wogonin, a monoflavonoid isolated from the roots of *Scutellaria baicalensis*, induces the inhibition of cell growth and/or cell death by apoptosis in various tumor cells. Studies performed on estrogen receptor (ER)-positive or -negative human breast cancer cells *in vitro* revealed that, independently of the ER status, wogonin attenuates cell proliferation in a time and dose dependent manner through the induction of cell death by apoptosis and down-regulation of the Akt-mediated canonical Wnt signaling pathway by reducing Akt activity and subsequently GSK-3beta phosphorylation. This effect on cell proliferation was confirmed *in vivo* in human breast xenografts implanted in nude mice [110].

By the same way, microarray analysis revealed that deguelin, a derivative of rotenone, could be considered as a good inhibitor of human breast cancer cell growth through the modulation of the expression of key members of the Wnt signaling pathways [111].

Natural Compounds From Marine Origins

Marine sources of natural compounds also appeared as modulators of Wnt signaling. Gwak *et al.* [112], reported that a methanol extract from the marine algae *Polysiphonia japonica* suppresses Wnt signaling and reduced the expression of cyclin D1 through the activation of NF-kappa B signaling in the colon cancer cells tested. In contrast, the screening of thousands of bromotyrosine derivatives isolated from numerous sponges revealed that the known nanomolar HDAC inhibitor, psammaphin A, obtained from the sponge *P. purpurea*, activates Wnt signaling through HDAC inhibition rather than through a specific Wnt pathway in STF3a cells [113]. Similar results were obtained for carteriosulfonic acid isolated from the sponge *Carteriospongia sp.* and were related to low micromolar inhibition of GSK-3beta [114].

Natural Compounds From Microbial and Fungal Origins

Small molecules such as PKF115-584, CGP049090, PKF222-815 Fig. (4) from fungal organisms and PKF118-744, PKF222-310 or ZTM000990 from actinomycete strains were reported to inhibit association between Tcf-4 and beta-catenin and subsequently decrease c-myc and cyclin D1 expression as well as cell proliferation in colon cancer [115], osteosarcoma cell lines [60], in hepatocellular carcinoma cells and in xenograft models [116]. Ionomycin Fig. (4), a calcium ionophore produced by the bacterium *Streptomyces conglobatus* was also shown to inhibit beta-catenin/Tcf signaling though the decrease of nuclear beta-catenin and the disruption of beta-catenin/Tcf-4 association. Ionomycin strongly suppresses the binding of Tcf complexes to DNA [117]. A fumagilin analog, called TNP-470, was shown to have no effect on Wnt canonical pathway whereas it blocks the Wnt non canonical pathway through the inhibition of methionine aminopeptidase -2, that results in the blockade of the signaling downstream of Fzd, and upstream of CamKII, RhoA and JNK [118].

CONCLUSIONS

Wnt signaling has emerged as an important pathway regulating the expression of genes implicated in cell proliferation that plays a central role in development and carcinogenesis. Hence, disruption of this signaling pathway holds important promise for the development of new anti-cancer drugs. Unlike canonical Wnt/beta-catenin signaling, for which several well known or newly described natural compounds from plants, fungal/microbial or marine origins, and containing phenolic groups in their chemical structure, were reported to be potent inhibitors, only the small TNP-470 molecule, a fumagilin analog, that does not contain phenolic compound, was reported to be a good inhibitor of the Wnt non canonical signaling. Thereby, further investigations would be needed to define new modulators of the non canonical Wnt pathway and to evaluate if the inhibitors of the Wnt canonical pathway are also effective against the non canonical counterpart of this signaling pathway. Moreover, before any clinical translation, additional investigations are needed in order to define the therapeutic window in which these natural Wnt inhibitors achieve their anti-tumor effects without affecting beta-catenin complexes that are essential for maintaining cell adhesion and tissue renewal in non-tumor tissues.

ACKNOWLEDGEMENTS

MHT is supported by Télévie grants (Fonds National de la Recherche Scientifique, Belgium). FG is a recipient of the European Community's Seventh Framework Programme (FP7/2007-2013) under grant agreement 215009 RedCat. M. Diederich's research at the Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire du Cancer (LBMCC) is financially supported by "Recherche Cancer et Sang" foundation, by «Recherches Scientifiques Luxembourg» asbl, by «Een Häerz fir Kriibskrank Kanner» association, the Action Lions "Vaincre le Cancer" Luxembourg, The Fonds National de la Recherche Scientifique Luxembourg, Télévie Luxembourg and the Foundation for Scientific Cooperation between Germany and Luxembourg for additional support. Further support was received from the European Union (ITN "RedCat" 215009 and Interreg IVa project "Corena"). Print costs were covered by the "Fonds National de la Recherche (FNR) Luxembourg".

REFERENCES

- [1] Fernandez, E.; Gallus, S.; La Vecchia, C. Nutrition and cancer risk: an overview. *J. Br. Menopause Soc.*, **2006**, *12*(4), 139-142.
- [2] La Vecchia, C. Association between Mediterranean dietary patterns and cancer risk. *Nutr. Rev.*, **2009**, *67* (Suppl. 1) (S126-129).
- [3] Surh, Y.J. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nat. Rev. Cancer*, **2003**, *3*(10), 768-780.
- [4] Kundu, J.K.; Choi, K.Y.; Surh, Y.J. beta-Catenin-mediated signaling: a novel molecular target for chemoprevention with anti-inflammatory substances. *Biochim. Biophys. Acta.*, **2006**, *1765*(1), 14-24.
- [5] Clevers, H. Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell*, **2006**, *127*(3), 469-480.
- [6] Polakis, P. The many ways of Wnt in cancer. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **2007**, *17*(1), 45-51.
- [7] Camilli, T.C.; Weeraratna, A.T. Striking the target in Wnt-y conditions: Intervening in Wnt signaling during cancer progression. *Biochem. Pharmacol.*, **2010**, *80*(5): 702-711.
- [8] Kikuchi, A.; Kishida, S.; Yamamoto, H. Regulation of Wnt signaling by protein-protein interaction and post-translational modifications. *Exp. Mol. Med.*, **2006**, *38*(1), 1-10.

- [9] Su, Y.; Fu, C.; Ishikawa, S.; Stella, A.; Kojima, M.; Shitoh, K.; Schreiber, E.M.; Day, B.W.; Liu, B. APC is essential for targeting phosphorylated beta-catenin to the SCFbeta-TrCP ubiquitin ligase. *Mol. Cell*, **2008**, *32*(5), 652-661.
- [10] Liu, C.; Li, Y.; Semenov, M.; Han, C.; Baeg, G.H.; Tan, Y.; Zhang, Z.; Lin, X.; He, X. Control of beta-catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism. *Cell*, **2002**, *108*(6), 837-847.
- [11] Hart, M.; Concordet, J.P.; Lassot, I.; Albert, I.; del los Santos, R.; Durand, H.; Perret, C.; Rubinfeld, B.; Margottin, F.; Benarous, R.; Polakis, P. The F-box protein beta-TrCP associates with phosphorylated beta-catenin and regulates its activity in the cell. *Curr. Biol.*, **1999**, *9*(4), 207-210.
- [12] Aberle, H.; Bauer, A.; Stappert, J.; Kispert, A.; Kemler, R. beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *EMBO J.*, **1997**, *16*(13), 3797-3804.
- [13] Hurlstone, A.; Clevers, H. T-cell factors: turn-ons and turn-offs. *EMBO J.*, **2002**, *21*(10), 2303-2311.
- [14] Sampson, E.M.; Haque, Z.K.; Ku, M.C.; Tevosian, S.G.; Albanese, C.; Pestell, R.G.; Paulson, K.E.; Yee, A.S. Negative regulation of the Wnt-beta-catenin pathway by the transcriptional repressor HBPI. *EMBO J.*, **2001**, *20*(16), 4500-4511.
- [15] Arce, L.; Pate, K.T.; Waterman, M.L. Groucho binds two conserved regions of LEF-1 for HDAC-dependent repression. *BMC Cancer*, **2009**, *9*, 159.
- [16] He, X.; Semenov, M.; Tamai, K.; Zeng, X. LDL receptor-related proteins 5 and 6 in Wnt/beta-catenin signaling: arrows point the way. *Development*, **2004**, *131*(8), 1663-1677.
- [17] Zeng, X.; Tamai, K.; Doble, B.; Li, S.; Huang, H.; Habas, R.; Okamura, H.; Woodgett, J.; He, X. A dual-kinase mechanism for Wnt co-receptor phosphorylation and activation. *Nature*, **2005**, *438*(7069), 873-877.
- [18] Townsley, F.M.; Cliffe, A.; Bienz, M. Pygopus and Legless target Armadillo/beta-catenin to the nucleus to enable its transcriptional co-activator function. *Nat. Cell Biol.*, **2004**, *6*(7), 626-633.
- [19] Kramps, T.; Peter, O.; Brunner, E.; Nellen, D.; Froesch, B.; Chatterjee, S.; Murone, M.; Zullig, S.; Basler, K. Wnt/wingless signaling requires BCL9/legless-mediated recruitment of pygopus to the nuclear beta-catenin-TCF complex. *Cell*, **2002**, *109*(1), 47-60.
- [20] Behrens, J.; von Kries, J.P.; Kuhl, M.; Bruhn, L.; Wedlich, D.; Grosschedl, R.; Birchmeier, W. Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature*, **1996**, *382*(6592), 638-642.
- [21] Hecht, A.; Vlemminckx, K.; Stemmler, M.P.; van Roy, F.; Kemler, R. The p300/CBP acetyltransferases function as transcriptional co-activators of beta-catenin in vertebrates. *EMBO J.*, **2000**, *19*(8), 1839-1850.
- [22] Sato, A.; Khadka, D.K.; Liu, W.; Bharti, R.; Runnels, L.W.; Dawid, I.B.; Habas, R. Profilin is an effector for Daam1 in non-canonical Wnt signaling and is required for vertebrate gastrulation. *Development*, **2006**, *133*(21), 4219-4231.
- [23] Katoh, M. WNT/PCP signaling pathway and human cancer (review). *Oncol. Rep.*, **2005**, *14*(6), 1583-1588.
- [24] Qian, D.; Jones, C.; Rzadzinska, A.; Mark, S.; Zhang, X.; Steel, K.P.; Dai, X.; Chen, P. Wnt5a functions in planar cell polarity regulation in mice. *Dev. Biol.*, **2007**, *306*(1), 121-133.
- [25] Yamamoto, S.; Nishimura, O.; Misaki, K.; Nishita, M.; Minami, Y.; Yonemura, S.; Tarui, H.; Sasaki, H. Cthrc1 selectively activates the planar cell polarity pathway of Wnt signaling by stabilizing the Wnt-receptor complex. *Dev. Cell*, **2008**, *15*(1), 23-36.
- [26] Habas, R.; Kato, Y.; He, X. Wnt/Frizzled activation of Rho regulates vertebrate gastrulation and requires a novel Formin homology protein Daam1. *Cell*, **2001**, *107*(7), 843-854.
- [27] Winter, C.G.; Wang, B.; Ballew, A.; Royou, A.; Karess, R.; Axelrod, J.D.; Luo, L. Drosophila Rho-associated kinase (Drok) links Frizzled-mediated planar cell polarity signaling to the actin cytoskeleton. *Cell*, **2001**, *105*(1), 81-91.
- [28] Yamanaka, H.; Moriguchi, T.; Masuyama, N.; Kusakabe, M.; Hanafusa, H.; Takada, R.; Takada, S.; Nishida, E. JNK functions in the non-canonical Wnt pathway to regulate convergent extension movements in vertebrates. *EMBO Rep.*, **2002**, *3*(1), 69-75.
- [29] Kurayoshi, M.; Oue, N.; Yamamoto, H.; Kishida, M.; Inoue, A.; Asahara, T.; Yasui, W.; Kikuchi, A. Expression of Wnt-5a is correlated with aggressiveness of gastric cancer by stimulating cell migration and invasion. *Cancer Res.*, **2006**, *66*(21), 10439-10448.
- [30] Wang, Y. Wnt/Planar cell polarity signaling: a new paradigm for cancer therapy. *Mol. Cancer Ther.*, **2009**, *8*(8), 2103-2109.
- [31] Kohn, A.D.; Moon, R.T. Wnt and calcium signaling: beta-catenin-independent pathways. *Cell Calcium*, **2005**, *38*(3-4), 439-446.
- [32] Kuhl, M. The WNT/calcium pathway: biochemical mediators, tools and future requirements. *Front. Biosci.*, **2004**, *9*, 967-974.
- [33] Slusarski, D.C.; Corces, V.G.; Moon, R.T. Interaction of Wnt and a Frizzled homologue triggers G-protein-linked phosphatidylinositol signalling. *Nature*, **1997**, *390*(6658), 410-413.
- [34] Streb, H.; Irvine, R.F.; Berridge, M.J.; Schulz, I. Release of Ca²⁺ from a nonmitochondrial intracellular store in pancreatic acinar cells by inositol-1,4,5-trisphosphate. *Nature*, **1983**, *306*(5938), 67-69.
- [35] Kuhl, M.; Sheldahl, L.C.; Malbon, C.C.; Moon, R.T. Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase II is stimulated by Wnt and Frizzled homologs and promotes ventral cell fates in Xenopus. *J. Biol. Chem.*, **2000**, *275*(17), 12701-12711.
- [36] Sheldahl, L.C.; Park, M.; Malbon, C.C.; Moon, R.T. Protein kinase C is differentially stimulated by Wnt and Frizzled homologs in a G-protein-dependent manner. *Curr. Biol.*, **1999**, *9*(13), 695-698.
- [37] Saneyoshi, T.; Kume, S.; Amasaki, Y.; Mikoshiba, K. The Wnt/calcium pathway activates NF-AT and promotes ventral cell fate in Xenopus embryos. *Nature*, **2002**, *417*(6886), 295-299.
- [38] Ishitani, T.; Ninomiya-Tsuji, J.; Nagai, S.; Nishita, M.; Meneghini, M.; Barker, N.; Waterman, M.; Bowerman, B.; Clevers, H.; Shibuya, H.; Matsumoto, K. The TAK1-NLK-MAPK-related pathway antagonizes signalling between beta-catenin and transcription factor TCF. *Nature*, **1999**, *399*(6738), 798-802.
- [39] Schlessinger, K.; McManus, E.J.; Hall, A. Cdc42 and noncanonical Wnt signal transduction pathways cooperate to promote cell polarity. *J. Cell Biol.*, **2007**, *178*(3), 355-361.
- [40] Courtwright, A.; Siamakpour-Reihani, S.; Arbiser, J.L.; Banet, N.; Hilliard, E.; Fried, L.; Livasy, C.; Ketelsen, D.; Nepal, D.B.; Perou, C.M.; Patterson, C.; Klauber-Demore, N. Secreted frizzle-related protein 2 stimulates angiogenesis via a calcineurin/NFAT signaling pathway. *Cancer Res.*, **2009**, *69*(11), 4621-4628.
- [41] Dihlmann, S.; von Knebel Doeberitz, M. Wnt/beta-catenin-pathway as a molecular target for future anti-cancer therapeutics. *Int. J. Cancer*, **2005**, *113*(4), 515-524.
- [42] Gehrke, I.; Gandhirajan, R.K.; Kreuzer, K.A. Targeting the WNT/beta-catenin/TCF/LEF1 axis in solid and haematological cancers: Multiplicity of therapeutic options. *Eur. J. Cancer*, **2009**, *45*(16), 2759-2767.
- [43] Herbst, A.; Kolligs, F.T. Wnt signaling as a therapeutic target for cancer. *Methods Mol. Biol.*, **2007**, *361*, 63-91.
- [44] Liu, J.; Stevens, J.; Matsunami, N.; White, R.L. Targeted degradation of beta-catenin by chimeric F-box fusion proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2004**, *313*(4), 1023-1029.
- [45] Brunori, M.; Malerba, M.; Kashiwazaki, H.; Iggo, R. Replicating adenoviruses that target tumors with constitutive activation of the wnt signaling pathway. *J. Virol.*, **2001**, *75*(6), 2857-2865.
- [46] Chen, R.H.; McCormick, F. Selective targeting to the hyperactive beta-catenin/T-cell factor pathway in colon cancer cells. *Cancer Res.*, **2001**, *61*(11), 4445-4449.
- [47] You, L.; He, B.; Xu, Z.; Uematsu, K.; Mazieres, J.; Fujii, N.; Mikami, I.; Reguart, N.; McIntosh, J.K.; Kashani-Sabet, M.; McCormick, F.; Jablons, D.M. An anti-Wnt-2 monoclonal antibody induces apoptosis in malignant melanoma cells and inhibits tumor growth. *Cancer Res.*, **2004**, *64*(15), 5385-5389.
- [48] Nagayama, S.; Fukukawa, C.; Katagiri, T.; Okamoto, T.; Aoyama, T.; Oyaizu, N.; Imamura, M.; Toguchida, J.; Nakamura, Y. Therapeutic potential of antibodies against FZD 10, a cell-surface protein, for synovial sarcomas. *Oncogene*, **2005**, *24*(41), 6201-6212.
- [49] You, L.; Kim, J.; He, B.; Xu, Z.; McCormick, F.; Jablons, D.M. Wnt-1 signal as a potential cancer therapeutic target. *Drug News Perspect.*, **2006**, *19*(1), 27-31.
- [50] Roh, H.; Green, D.W.; Boswell, C.B.; Pippin, J.A.; Drebin, J.A. Suppression of beta-catenin inhibits the neoplastic growth of APC-mutant colon cancer cells. *Cancer Res.*, **2001**, *61*(17), 6563-6568.
- [51] Verma, U.N.; Surabhi, R.M.; Schmaltieg, A.; Becerra, C.; Gaynor, R.B. Small interfering RNAs directed against beta-catenin inhibit the *in vitro* and *in vivo* growth of colon cancer cells. *Clin. Cancer Res.*, **2003**, *9*(4), 1291-1300.
- [52] Fujise, T.; Iwakiri, R.; Kakimoto, T.; Shiraishi, R.; Sakata, Y.; Wu, B.; Tsunada, S.; Ootani, A.; Fujimoto, K. Long-term feeding of various fat diets modulates azoxymethane-induced colon carcino-

- genesis through Wnt/beta-catenin signaling in rats. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, **2007**, *292*(4), G1150-1156.
- [53] Thangapazham, R.L.; Sharma, A.; Maheshwari, R.K. Multiple molecular targets in cancer chemoprevention by curcumin. *AAPS J.*, **2006**, *8*(3), E443-449.
- [54] Teiten, M.H.; Eifes, S.; Dicato, M.; Diederich, M. Curcumin –the paradigm of multi-target natural compound with applications in cancer prevention and treatment *Toxins*, **2010**, *2*(1), 128-162.
- [55] Park, C.H.; Hahm, E.R.; Park, S.; Kim, H.K.; Yang, C.H. The inhibitory mechanism of curcumin and its derivative against beta-catenin/Tcf signaling. *FEBS Lett.*, **2005**, *579*(13), 2965-2971.
- [56] Narayan, S. Curcumin, a multi-functional chemopreventive agent, blocks growth of colon cancer cells by targeting beta-catenin-mediated transactivation and cell-cell adhesion pathways. *J. Mol. Histol.*, **2004**, *35*(3), 301-307.
- [57] Ryu, M.J.; Cho, M.; Song, J.Y.; Yun, Y.S.; Choi, I.W.; Kim, D.E.; Park, B.S.; Oh, S. Natural derivatives of curcumin attenuate the Wnt/beta-catenin pathway through down-regulation of the transcriptional coactivator p300. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2008**, *377*(4), 1304-1308.
- [58] Jaiswal, A.S.; Marlow, B.P.; Gupta, N.; Narayan, S. Beta-catenin-mediated transactivation and cell-cell adhesion pathways are important in curcumin (diferulylmethane)-induced growth arrest and apoptosis in colon cancer cells. *Oncogene*, **2002**, *21*(55), 8414-8427.
- [59] Mahmoud, N.N.; Carothers, A.M.; Grunberger, D.; Bilinski, R.T.; Churchill, M.R.; Martucci, C.; Newmark, H.L.; Bertagnolli, M.M. Plant phenolics decrease intestinal tumors in an animal model of familial adenomatous polyposis. *Carcinogenesis*, **2000**, *21*(5), 921-927.
- [60] Leow, P.C.; Tian, Q.; Ong, Z.Y.; Yang, Z.; Ee, P.L. Antitumor activity of natural compounds, curcumin and PKF118-310, as Wnt/beta-catenin antagonists against human osteosarcoma cells. *Invest. New Drugs*, **2010**, *2*(6), 766-782.
- [61] Yan, C.; Jamaluddin, M.S.; Aggarwal, B.; Myers, J.; Boyd, D.D. Gene expression profiling identifies activating transcription factor 3 as a novel contributor to the proapoptotic effect of curcumin. *Mol. Cancer Ther.*, **2005**, *4*(2), 233-241.
- [62] Prasad, C.P.; Rath, G.; Mathur, S.; Bhatnagar, D.; Ralhan, R. Potent growth suppressive activity of curcumin in human breast cancer cells: Modulation of Wnt/beta-catenin signaling. *Chem. Biol. Interact.*, **2009**, *181*(2), 263-271.
- [63] Kakarala, M.; Brenner, D.E.; Korkaya, H.; Cheng, C.; Tazi, K.; Gimestier, C.; Liu, S.; Dontu, G.; Wicha, M.S. Targeting breast stem cells with the cancer preventive compounds curcumin and piperine. *Breast Cancer Res. Treat.*, **2010**, *122*(3), 777-785.
- [64] Dashwood, W.M.; Orner, G.A.; Dashwood, R.H. Inhibition of beta-catenin/Tcf activity by white tea, green tea, and epigallocatechin-3-gallate (EGCG): minor contribution of H(2)O(2) at physiologically relevant EGCG concentrations. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2002**, *296*(3), 584-588.
- [65] Dashwood, W.M.; Carter, O.; Al-Fageeh, M.; Li, Q.; Dashwood, R.H. Lysosomal trafficking of beta-catenin induced by the tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate. *Mutat. Res.*, **2005**, *591*(1-2), 161-172.
- [66] Orner, G.A.; Dashwood, W.M.; Blum, C.A.; Diaz, G.D.; Li, Q.; Al-Fageeh, M.; Tebbutt, N.; Heath, J.K.; Ernst, M.; Dashwood, R.H. Response of Apc(min) and A33 (delta N beta-cat) mutant mice to treatment with tea, sulindac, and 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP). *Mutat. Res.*, **2002**, *506*-507, 121-127.
- [67] Ju, J.; Hong, J.; Zhou, J.N.; Pan, Z.; Bose, M.; Liao, J.; Yang, G.Y.; Liu, Y.Y.; Hou, Z.; Lin, Y.; Ma, J.; Shih, W.J.; Carothers, A.M.; Yang, C.S. Inhibition of intestinal tumorigenesis in Apcmin/+ mice by (-)-epigallocatechin-3-gallate, the major catechin in green tea. *Cancer Res.*, **2005**, *65*(22), 10623-10631.
- [68] Issa, A.Y.; Volate, S.R.; Muga, S.J.; Nitcheva, D.; Smith, T.; Wargovich, M.J. Green tea selectively targets initial stages of intestinal carcinogenesis in the AOM-ApcMin mouse model. *Carcinogenesis*, **2007**, *28*(9), 1978-1984.
- [69] Gao, Z.; Xu, Z.; Hung, M.S.; Lin, Y.C.; Wang, T.; Gong, M.; Zhi, X.; Jablon, D.M.; You, L. Promoter demethylation of WIF-1 by epigallocatechin-3-gallate in lung cancer cells. *Anticancer Res.*, **2009**, *29*(6), 2025-2030.
- [70] Mazieres, J.; He, B.; You, L.; Xu, Z.; Lee, A.Y.; Mikami, I.; Reguart, N.; Rosell, R.; McCormick, F.; Jablons, D.M. Wnt inhibitory factor-1 is silenced by promoter hypermethylation in human lung cancer. *Cancer Res.*, **2004**, *64*(14), 4717-4720.
- [71] Kim, J.; Zhang, X.; Rieger-Christ, K.M.; Summerhayes, I.C.; Wazer, D.E.; Paulson, K.E.; Yee, A.S. Suppression of Wnt signaling by the green tea compound (-)-epigallocatechin 3-gallate (EGCG) in invasive breast cancer cells. Requirement of the transcriptional repressor HBP1. *J. Biol. Chem.*, **2006**, *281*(16), 10865-10875.
- [72] Liu, L.; Lai, C.Q.; Nie, L.; Ordovas, J.; Band, M.; Moser, L.; Meydani, M. The modulation of endothelial cell gene expression by green tea polyphenol-EGCG. *Mol. Nutr. Food Res.*, **2008**, *52*(10), 1182-1192.
- [73] Patel, R.; Ingle, A.; Maru, G.B. Polymeric black tea polyphenols inhibit 1,2-dimethylhydrazine induced colorectal carcinogenesis by inhibiting cell proliferation via Wnt/beta-catenin pathway. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **2008**, *227*(1), 136-146.
- [74] Song, S.; Krishnan, K.; Liu, K.; Bresalier, R.S. Polyphenol E inhibits the growth of human Barrett's and aerodigestive adenocarcinoma cells by suppressing cyclin D1 expression. *Clin. Cancer Res.*, **2009**, *15*(2), 622-631.
- [75] Joe, A.K.; Liu, H.; Suzui, M.; Vural, M.E.; Xiao, D.; Weinstein, I.B. Resveratrol induces growth inhibition, S-phase arrest, apoptosis, and changes in biomarker expression in several human cancer cell lines. *Clin. Cancer Res.*, **2002**, *8*(3), 893-903.
- [76] Hope, C.; Planutis, K.; Planutiene, M.; Moyer, M.P.; Johal, K.S.; Woo, J.; Santoso, C.; Hanson, J.A.; Holcombe, R.F. Low concentrations of resveratrol inhibit Wnt signal throughput in colon-derived cells: implications for colon cancer prevention. *Mol. Nutr. Food Res.*, **2008**, *52* Suppl. 1(S52-61).
- [77] Paul, S.; Decastro, A.; Lee, H.J.; Smolarek, A.K.; So, J.Y.; Simi, B.; Wang, C.X.; Zhou, R.; Rimando, A.M.; Suh, N. Dietary intake of pterostilbene, a constituent of blueberries, inhibits the {beta}-catenin/p65 downstream signaling pathway and colon carcinogenesis in rats. *Carcinogenesis*, **2010**, *31* (7), 1272-1278.
- [78] Zhou, H.; Shang, L.; Li, X.; Zhang, X.; Gao, G.; Guo, C.; Chen, B.; Liu, Q.; Gong, Y.; Shao, C. Resveratrol augments the canonical Wnt signaling pathway in promoting osteoblastic differentiation of multipotent mesenchymal cells. *Exp. Cell Res.*, **2009**, *315*(17), 2953-2962.
- [79] Orsolic, N.; Terzic, S.; Mihaljevic, Z.; Sver, L.; Basic, I. Effects of local administration of propolis and its polyphenolic compounds on tumor formation and growth. *Biol. Pharm. Bull.*, **2005**, *28*(10), 1928-1933.
- [80] Kuo, H.C.; Kuo, W.H.; Lee, Y.J.; Lin, W.L.; Chou, F.P.; Tseng, T.H. Inhibitory effect of caffeic acid phenethyl ester on the growth of C6 glioma cells *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Lett.*, **2006**, *234*(2), 199-208.
- [81] Liao, H.F.; Chen, Y.Y.; Liu, J.J.; Hsu, M.L.; Shieh, H.J.; Liao, H.J.; Shieh, C.J.; Shiao, M.S.; Chen, Y.J. Inhibitory effect of caffeic acid phenethyl ester on angiogenesis, tumor invasion, and metastasis. *J. Agric. Food Chem.*, **2003**, *51*(27), 7907-7912.
- [82] He, Y.J.; Liu, B.H.; Xiang, D.B.; Qiao, Z.Y.; Fu, T.; He, Y.H. Inhibitory effect of caffeic acid phenethyl ester on the growth of SW480 colorectal tumor cells involves beta-catenin associated signaling pathway down-regulation. *World J. Gastroenterol.*, **2006**, *12*(31), 4981-4985.
- [83] Xiang, D.; Wang, D.; He, Y.; Xie, J.; Zhong, Z.; Li, Z. Caffeic acid phenethyl ester induces growth arrest and apoptosis of colon cancer cells via the beta-catenin/T-cell factor signaling. *Anticancer. Drugs*, **2006**, *17*(7), 753-762.
- [84] Wang, D.; Xiang, D.B.; He, Y.J.; Li, Z.P.; Wu, X.H.; Mou, J.H.; Xiao, H.L.; Zhang, Q.H. Effect of caffeic acid phenethyl ester on proliferation and apoptosis of colorectal cancer cells *in vitro*. *World J. Gastroenterol.*, **2005**, *11*(26), 4008-4012.
- [85] Zikri, N.N.; Riedl, K.M.; Wang, L.S.; Lechner, J.; Schwartz, S.J.; Stoner, G.D. Black raspberry components inhibit proliferation, induce apoptosis, and modulate gene expression in rat esophageal epithelial cells. *Nutr. Cancer*, **2009**, *61*(6), 816-826.
- [86] Stoner, G.D.; Wang, L.S.; Casto, B.C. Laboratory and clinical studies of cancer chemoprevention by antioxidants in berries. *Carcinogenesis*, **2008**, *29*(9), 1665-1674.
- [87] Rajakangas, J.; Misikangas, M.; Paivarinta, E.; Mutanen, M. Chemoprevention by white currant is mediated by the reduction of nuclear beta-catenin and NF-kappaB levels in Min mice adenomas. *Eur. J. Nutr.*, **2008**, *47*(3), 115-122.

- [88] Misikangas, M.; Pajari, A.M.; Paivarinta, E.; Oikarinen, S.I.; Rajakangas, J.; Marttinen, M.; Tanayama, H.; Torronen, R.; Mutanen, M. Three Nordic berries inhibit intestinal tumorigenesis in multiple intestinal neoplasia/+ mice by modulating beta-catenin signaling in the tumor and transcription in the mucosa. *J. Nutr.*, **2007**, *137*(10), 2285-2290.
- [89] Mutanen, M.; Pajari, A.M.; Paivarinta, E.; Misikangas, M.; Rajakangas, J.; Marttinen, M.; Oikarinen, S. Berries as chemopreventive dietary constituents--a mechanistic approach with the ApcMin/+ mouse. *Asia Pac. J. Clin. Nutr.*, **2008**, *17 Suppl. 1*(123-125).
- [90] Saleem, M.; Murtaza, I.; Tarapore, R.S.; Suh, Y.; Adhami, V.M.; Johnson, J.J.; Siddiqui, I.A.; Khan, N.; Asim, M.; Hafeez, B.B.; Shekhani, M.T.; Li, B.; Mukhtar, H. Lupeol inhibits proliferation of human prostate cancer cells by targeting beta-catenin signaling. *Carcinogenesis*, **2009**, *30*(5), 808-817.
- [91] Lee, S.H.; Cekanova, M.; Baek, S.J. Multiple mechanisms are involved in 6-gingerol-induced cell growth arrest and apoptosis in human colorectal cancer cells. *Mol. Carcinog.*, **2008**, *47*(3), 197-208.
- [92] Yamaguchi, K.; Liggett, J.L.; Kim, N.C.; Baek, S.J. Anti-proliferative effect of horehound leaf and wild cherry bark extracts on human colorectal cancer cells. *Oncol. Rep.*, **2006**, *15*(1), 275-281.
- [93] Sharma, M.; Li, L.; Celver, J.; Killian, C.; Kovoov, A.; Seeram, N.P. Effects of Fruit Ellagitannin Extracts, Ellagic Acid, and Their Colonic Metabolite, Urolithin A, on Wnt Signaling (dagger). *J. Agric. Food Chem.*, **2010**, *58*(7), 3965-3969.
- [94] Park, C.H.; Chang, J.Y.; Hahm, E.R.; Park, S.; Kim, H.K.; Yang, C.H. Quercetin, a potent inhibitor against beta-catenin/Tcf signaling in SW480 colon cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2005**, *328*(1), 227-234.
- [95] Shan, B.E.; Wang, M.X.; Li, R.Q. Quercetin inhibit human SW480 colon cancer growth in association with inhibition of cyclin D1 and survivin expression through Wnt/beta-catenin signaling pathway. *Cancer Invest.*, **2009**, *27*(6), 604-612.
- [96] Suh, Y.; Afaq, F.; Johnson, J.J.; Mukhtar, H. A plant flavonoid fisetin induces apoptosis in colon cancer cells by inhibition of COX2 and Wnt/EGFR/NF-kappaB-signaling pathways. *Carcinogenesis*, **2009**, *30*(2), 300-307.
- [97] Amado, N.G.; Cerqueira, D.M.; Menezes, F.S.; da Silva, J.F.; Neto, V.M.; Abreu, J.G. Isoquercitrin isolated from Hyptis fasciculata reduces glioblastoma cell proliferation and changes beta-catenin cellular localization. *Anticancer. Drugs*, **2009**, *20*(7), 543-552.
- [98] Park, C.H.; Hahm, E.R.; Lee, J.H.; Jung, K.C.; Yang, C.H. Inhibition of beta-catenin-mediated transactivation by flavanone in AGS gastric cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2005**, *331*(4), 1222-1228.
- [99] Lee, J.H.; Park, C.H.; Jung, K.C.; Rhee, H.S.; Yang, C.H. Negative regulation of beta-catenin/Tcf signaling by naringenin in AGS gastric cancer cell. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2005**, *335*(3), 771-776.
- [100] Shukla, S.; MacLennan, G.T.; Flask, C.A.; Fu, P.; Mishra, A.; Resnick, M.I.; Gupta, S. Blockade of beta-catenin signaling by plant flavonoid apigenin suppresses prostate carcinogenesis in TRAMP mice. *Cancer Res.*, **2007**, *67*(14), 6925-6935.
- [101] Su, Y.; Simmen, R.C. Soy isoflavone genistein upregulates epithelial adhesion molecule E-cadherin expression and attenuates beta-catenin signaling in mammary epithelial cells. *Carcinogenesis*, **2009**, *30*(2), 331-339.
- [102] Zhang, J.F.; Li, G.; Chan, C.Y.; Meng, C.L.; Lin, M.C.; Chen, Y.C.; He, M.L.; Leung, P.C.; Kung, H.F. Flavonoids of Herba Epimedii regulate osteogenesis of human mesenchymal stem cells through BMP and Wnt/beta-catenin signaling pathway. *Mol. Cell. Endocrinol.*, **2010**, *314*(1), 70-74.
- [103] Dashwood, R.H. Indole-3-carbinol: anticarcinogen or tumor promoter in brassica vegetables? *Chem. Biol. Interact.*, **1998**, *110*(1-2), 1-5.
- [104] Blum, C.A.; Tanaka, T.; Zhong, X.; Li, Q.; Dashwood, W.M.; Pereira, C.; Xu, M.; Dashwood, R.H. Mutational analysis of Ctnnb1 and Apc in tumors from rats given 1,2-dimethylhydrazine or 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline: mutational 'hotspots' and the relative expression of beta-catenin and c-jun. *Mol. Carcinog.*, **2003**, *36*(4), 195-203.
- [105] Wang, R.; Dashwood, W.M.; Bailey, G.S.; Williams, D.E.; Dashwood, R.H. Tumors from rats given 1,2-dimethylhydrazine plus chlorophyllin or indole-3-carbinol contain transcriptional changes in beta-catenin that are independent of beta-catenin mutation status. *Mutat. Res.*, **2006**, *601*(1-2), 11-18.
- [106] Blum, C.A.; Xu, M.; Orner, G.A.; Dario Diaz, G.; Li, Q.; Dashwood, W.M.; Bailey, G.S.; Dashwood, R.H. Promotion versus suppression of rat colon carcinogenesis by chlorophyllin and chlorophyll: modulation of apoptosis, cell proliferation, and beta-catenin/Tcf signaling. *Mutat. Res.*, **2003**, *523-524*, 217-223.
- [107] Song, G.Y.; Lee, J.H.; Cho, M.; Park, B.S.; Kim, D.E.; Oh, S. Decursin suppresses human androgen-independent PC3 prostate cancer cell proliferation by promoting the degradation of beta-catenin. *Mol. Pharmacol.*, **2007**, *72*(6), 1599-1606.
- [108] Bi, X.; Zhao, Y.; Fang, W.; Yang, W. Anticancer activity of Panax notoginseng extract 20(S)-25-OCH₃-PPD: Targetting beta-catenin signalling. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, **2009**, *36*(11), 1074-1078.
- [109] Li, X.; Ohtsuki, T.; Koyano, T.; Kowithayakorn, T.; Ishibashi, M. New Wnt/beta-catenin signaling inhibitors isolated from Eleutheria palmifolia. *Chem. Asian J.*, **2009**, *4*(4), 540-547.
- [110] Chung, H.; Jung, Y.M.; Shin, D.H.; Lee, J.Y.; Oh, M.Y.; Kim, H.J.; Jang, K.S.; Jeon, S.J.; Son, K.H.; Kong, G. Anticancer effects of wogonin in both estrogen receptor-positive and -negative human breast cancer cell lines *in vitro* and in nude mice xenografts. *Int. J. Cancer*, **2008**, *122*(4), 816-822.
- [111] Murillo, G.; Peng, X.; Torres, K.E.; Mehta, R.G. Deguelin inhibits growth of breast cancer cells by modulating the expression of key members of the Wnt signaling pathway. *Cancer. Prev. Res. (Phila Pa)*, **2009**, *2*(11), 942-950.
- [112] Gwak, J.; Park, S.; Cho, M.; Song, T.; Cha, S.H.; Kim, D.E.; Jeon, Y.J.; Shin, J.G.; Oh, S. Polysiphonia japonica extract suppresses the Wnt/beta-catenin pathway in colon cancer cells by activation of NF-kappaB. *Int. J. Mol. Med.*, **2006**, *17*(6), 1005-1010.
- [113] McCulloch, M.W.; Coombs, G.S.; Banerjee, N.; Bugni, T.S.; Cannon, K.M.; Harper, M.K.; Veltri, C.A.; Virshup, D.M.; Ireland, C.M. Psammalin A as a general activator of cell-based signaling assays via HDAC inhibition and studies on some bromotyrosine derivatives. *Bioorg. Med. Chem.*, **2009**, *17*(6), 2189-2198.
- [114] McCulloch, M.W.; Bugni, T.S.; Concepcion, G.P.; Coombs, G.S.; Harper, M.K.; Kaur, S.; Mangalindan, G.C.; Mutizwa, M.M.; Veltri, C.A.; Virshup, D.M.; Ireland, C.M. Carteriosulfonic acids A-C, GSK-3beta inhibitors from a Carteriospongia sp. *J. Nat. Prod.*, **2009**, *72*(9), 1651-1656.
- [115] Lepourcelet, M.; Chen, Y.N.; France, D.S.; Wang, H.; Crews, P.; Petersen, F.; Bruseo, C.; Wood, A.W.; Shivdasani, R.A. Small-molecule antagonists of the oncogenic Tcf/beta-catenin protein complex. *Cancer Cell*, **2004**, *5*(1), 91-102.
- [116] Wei, W.; Chua, M.S.; Grepper, S.; So, S. Small molecule antagonists of Tcf4/beta-catenin complex inhibit the growth of HCC cells *in vitro* and *in vivo*. *Int. J. Cancer*, **2010**, *126*(10), 2426-2436.
- [117] Park, C.H.; Hahm, E.R.; Lee, J.H.; Jung, K.C.; Rhee, H.S.; Yang, C.H. Ionocin downregulates beta-catenin/Tcf signaling in colon cancer cell line. *Carcinogenesis*, **2005**, *26*(11), 1929-1933.
- [118] Zhang, Y.; Yeh, J.R.; Mara, A.; Ju, R.; Hines, J.F.; Cirone, P.; Griesbach, H.L.; Schneider, I.; Slusarski, D.C.; Holley, S.A.; Crews, C.M. A chemical and genetic approach to the mode of action of fumagillin. *Chem. Biol.*, **2006**, *13*(9), 1001-1009.

Embellicines A and B: Absolute Configuration and NF- κ B Transcriptional Inhibitory Activity

Weaam Ebrahim,^{†,○} Amal H. Aly,[†] Victor Wray,[‡] Attila Mándi,[§] Marie-Hélène Teiten,^{||} François Gaascht,^{||} Barbora Orlikova,^{||} Matthias U. Kassack,[#] WenHan Lin,[▽] Marc Diederich,^{||,⊥} Tibor Kurtán,[§] Abdessamad Debbab,^{*,†} and Peter Proksch^{*,†}

[†]Institut für Pharmazeutische Biologie und Biotechnologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Universitätsstrasse 1, Geb. 26.23, D-40225 Düsseldorf, Germany

[‡]Helmholtz Centre for Infection Research, Inhoffenstraße 7, D-38124 Braunschweig, Germany

[§]Department of Organic Chemistry, University of Debrecen, POB 20, 4010 Debrecen, Hungary

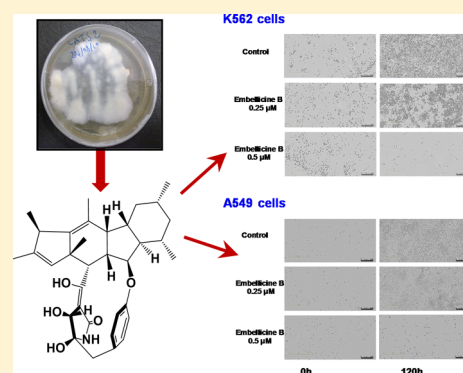
^{||}Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire du Cancer, Hôpital Kirchberg 9, rue Edward Steichen L-2540 Luxembourg, Luxembourg

[⊥]Department of Pharmacy, College of Pharmacy, Seoul National University, 599 Kwanak-ro, Kwanak-gu, Seoul, 151-742, Korea

[#]Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie, Heinrich-Heine-Universität, Universitätsstrasse 1, Geb. 26.23, D-40225 Düsseldorf, Germany

[▽]National Research Laboratories of Natural and Biomimetic Drugs, Peking University, Health Science Center, 100083 Beijing, People's Republic of China

ABSTRACT: Two new metabolites, embellicines A and B (**1** and **2**), were isolated from the EtOAc extract of the fungus *Embellisia eureka*, an endophyte of the Moroccan plant *Cladanthus arabicus* (Asteraceae). The structures of these new compounds were determined on the basis of extensive one- and two-dimensional NMR spectroscopy as well as by high-resolution mass spectrometry. The absolute configuration of embellicine A (**1**) was determined by TDDFT ECD calculations of solution conformers, whereas that of embellicine B (**2**) was deduced based on ROESY correlations and on biogenetic considerations in comparison to **1**. Both embellicines (**1** and **2**) are cytostatic, cytotoxic, and inhibit NF- κ B transcriptional activity, indicating that inhibition of NF- κ B may be a possible mechanism of action of these compounds. Embellicine B (**2**) was the most active compound encountered in this study and acts at nanomolar concentrations without affecting tumor microenvironment.



■ INTRODUCTION

Increasing resistance to chemotherapy is tightly linked to aberrant activation of nuclear factor kappa B (NF- κ B) signaling implicated both in inflammation and in initiation, promotion, and progression of tumorigenesis.^{1–3} Suppression of this proinflammatory pathway may provide opportunities for prevention and treatment of cancer so that the NF- κ B signaling pathway became an interesting target for new bioactive compounds.^{4–6} Natural products and their semisynthetic derivatives have been a rich source of inspiration for chemists and pharmacologists, which allowed them to retain their immense impact on drug discovery over the years, even with the growing advances in high-throughput synthesis and combinatorial chemistry. In the last decades, major efforts have been undertaken with regard to bioprospecting of microorganisms, especially endophytic fungi, that are known for their production of structurally diverse natural products with an amazing array of bioactivities.^{7–10} A recent overview indicated that 51% of bioactive substances isolated from

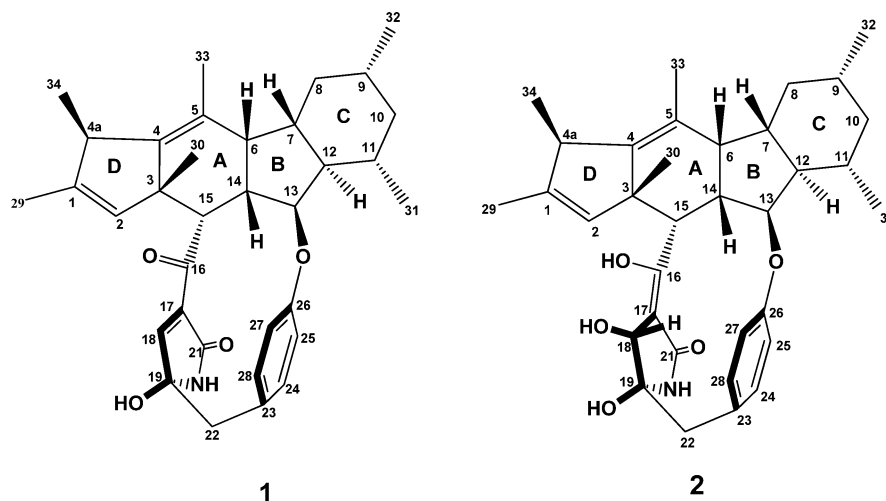
endophytic fungi were previously unknown,¹¹ thus highlighting the vast opportunities for bioprospecting in this group of microorganisms.

In the course of our search for new bioactive secondary metabolites from endophytic fungi,^{12–15} the fungus *Embellisia eureka* (internal strain no. CATS2) was isolated, after surface sterilization, from healthy stem tissues of *Cladanthus arabicus* (Asteraceae) collected in Morocco. To date, the chemical constituents of fungi belonging to the genus *Embellisia* have received only scant attention. Literature survey showed that a heptatrienoic acid-substituted bicyclic ketone derivative¹⁶ and terpestacin¹⁷ were isolated from *Embellisia chlamydospora*. Moreover, hydroxylated indolizidine alkaloids were obtained from *Embellisia oxytropis*.¹⁸ In the present study, we report the isolation and structure elucidation of two new alkaloids, embellicines A (**1**) and B (**2**), produced by *E. eureka*, and

Received: January 8, 2013

Published: March 14, 2013

Chart 1. Structures of Compounds 1 and 2



describe their cytotoxic and cytostatic activities as well as their pronounced inhibition of tumor necrosis factor alpha (TNF α)-induced NF- κ B transcriptional activity that constitutes an important target for anticancer chemotherapy.^{1,2}

RESULTS AND DISCUSSION

The crude ethyl acetate extract of *E. eureka*, cultured on solid rice medium, was taken to dryness and then partitioned between *n*-hexane and 90% methanol. The 90% methanol fraction, which was chromatographed over silica gel F₂₅₄ using gradient elution (*n*-hexane:EtOAc), afforded two new compounds whose structures were elucidated by high resolution ESI mass spectrometry and NMR spectroscopy and identified as embellicines A (**1**) and B (**2**).

Compound **1** was isolated as a yellowish amorphous mass. The HRESI-MS exhibited a strong peak at m/z 528.3108 [$M + H$]⁺, indicating the molecular formula C₃₄H₄₁NO₄ (calcd 528.3108). Comparison of ¹H and ¹³C NMR data of **1** and those of the related pyrrocidines A and B^{19–22} indicated a structural similarity except for the presence of an additional five-membered ring (ring D, Chart 1) and three additional methyl groups (CH₃-29, CH₃-30, and CH₃-34), as well as the absence of a methyl substituent at position 7 in the structure of **1**. The ¹H NMR spectrum showed a signal indicative for an exchangeable proton at δ_H 8.26 ppm that was assigned to the amide proton NH-20. Four double doublet signals, belonging to a homonuclear spin system resonating between δ_H 6.67 and 7.30 ppm, were assigned to a *para*-substituted benzene ring with restricted free rotation. In addition, six methyl signals were observed at δ_H 0.94 (d, $J = 6.2$ Hz), 0.98 (d, $J = 6.8$ Hz), 1.04 (s), 1.05 (d, $J = 7.3$ Hz), 1.45 (s), and 1.75 (s) ppm and assigned to CH₃-32, CH₃-34, CH₃-30, CH₃-31, CH₃-29, and CH₃-33, respectively.

The ¹H–¹H COSY spectrum delineated six spin systems (Figure 1). The first one starting from H-6 to H-15, including CH₃-31 and CH₃-32, a spin system between CH₃-34 and H-4a, a homonuclear long-range correlation between CH₃-29 and H-2, a further homonuclear long-range correlation between NH-20 and H-18, a geminal correlation between H-22A and H-22B, and the last spin system comprising the aromatic protons H-24, H-25, H-27, and H-28. The observed ² J /³ J HMBC correlations confirmed the previous spin systems and the position of the methyl groups as shown in Figure 2, thus establishing the

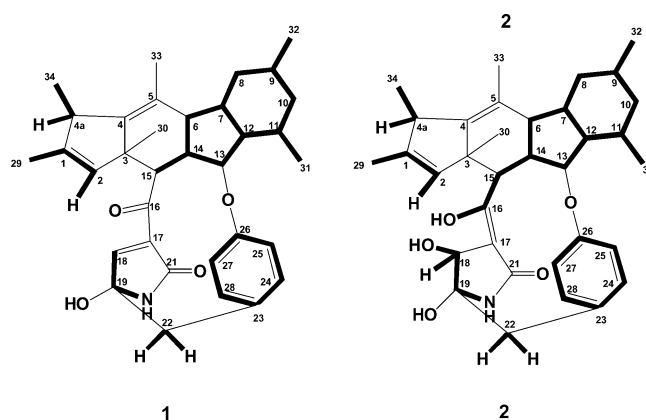


Figure 1. COSY correlations of compounds 1 and 2.

tetracyclic core structure of **1**. The latter was fused to an unusual 13-membered macrocycle based on the weak HMBC correlation of H-13 to C-26 of the phenyl ring and on the chemical shifts observed for CH-13 (δ_H 3.59 and δ_C 91.6 ppm) and C-26 (δ_C 159.4 ppm), which implied that C-13 and C-26 were connected through an ether linkage. On the other hand, proof for the ketone linkage to C-15 was found by examination of ² J and ³ J HMBC correlations of H-14 (δ_H 2.81 ppm), H-15 (δ_H 3.08 ppm), and H-18 (δ_H 7.11 ppm) to the *keto*-group at C-16 (δ_C 195.4 ppm). The five-membered pyrrolidinone ring was identified based on the COSY and HMBC spectra verifying the fragment CH(18)COH(19)NH(20), as well as by its corresponding HMBC correlations. The latter included correlations from the amide proton resonating at δ_H 8.26 ppm to carbons C-17 (δ_C 131.1 ppm), C-18 (δ_C 157.7 ppm), and C-21 (δ_C 167.2 ppm), from 19-OH appearing at δ_H 6.26 ppm to C-18, C-19 (δ_C 86.2 ppm), and C-22 (δ_C 44.7 ppm), and from H-18 (δ_H 7.11 ppm) to C-16 (δ_C 195.4 ppm), C-19, and C-21. Finally, the correlations from CH₂-22 appearing at δ_H 3.10/3.14 ppm to C-19 and C-23 (δ_C 131.9 ppm) indicated that the phenyl and pyrrolidinone substructures were connected through a methylene group. Thus, the elucidation of the planar structure of **1** was completed.

The relative configuration of **1** was established by analysis of the coupling constants and ROESY experiment (Figure 3), which was supported by a 3D model and determination of the interatomic distances of the low-energy DFT conformer (93.9%

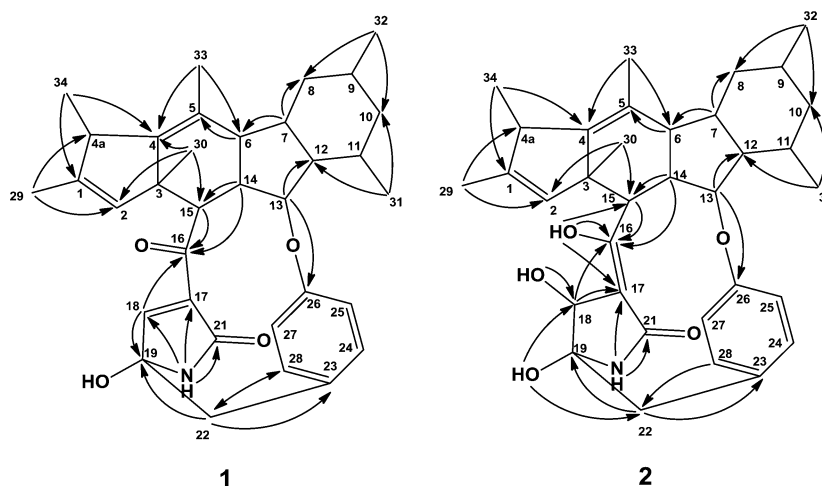


Figure 2. Key HMBC correlations of compounds 1 and 2.

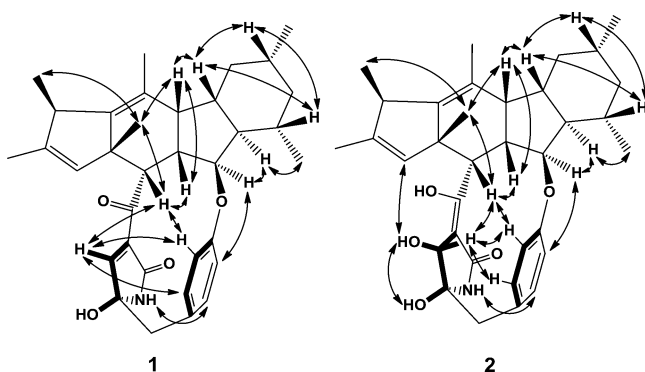


Figure 3. Key ROESY correlations of compounds 1 and 2.

population) obtained by conformational analysis. The methyl substituents CH₃-31 and CH₃-32 have *cis* equatorial arrangement as indicated by their correlations to H-10A and H-10B, whereas they show no ROE correlation to each other. Thus, protons H-9 and H-11 are axial, which is further supported by the fact that they show ROE correlations to the equatorial H-10B and share large diaxial coupling constants with H-10A ($^3J_{H-9,H-10A} = ^3J_{H-11,H-10A} = 12$ Hz). The latter exhibited ROE correlations to H-8A and H-12, showing large coupling constants as well (11.4 Hz for H-8 and 8.1 Hz for H-12), which is a proof of their axial orientations. On the other hand, H-9 and H-11 showed ROE correlations to H-7, indicating its β axial position, and H-7 in turn showed correlations to H-6, H-8B, and H-14. Furthermore, H-14 showed ROEs to H-15, H-27, and CH₃-30. The relative configuration of ring D was deduced from correlations observed between CH₃-34 and CH₃-30, the latter of which in turn showed strong cross peaks to H-15 and H-14. On the basis of the above ROEs, the annulations and the relative configuration of the rigid ABCD ring system could be established. Furthermore, the *sp*² hybridized H-18 correlated only to the aromatic H-27 and H-28, and not to H-24 or H-25, confirming that the benzene ring is not freely rotating but is oriented approximately parallel to the 1,5-dihydro-2*H*-pyrrole-2-one ring and affording the relative configuration of C-19. The restricted rotation of the benzene ring was further confirmed by the observed ROE correlations of H-13 and CH₃-31 to H-25 but not to H-27. Further correlations of H-18 to H-2 and H-15 implied that the pyrrolidinone ring is arranged on a nearly vertical plane

to the ABCD ring system. Thus, the relative configuration of compound 1 was defined as (3*S**,4*aR**,6*R**,7*S**,9*R**,11*S**,12*R**,13*R**,14*S**,15*S**,19*R**) (Chart 1). The observed ROE effects and $^3J_{H,H}$ coupling constants were in agreement with the interatomic distances and orientation of protons observed in the low-energy computed conformer of (3*S*,4*aR*,6*R*,7*S*,9*R*,11*S*,12*R*,13*R*,14*S*,15*S*,19*R*)-1 (vide infra). It is noteworthy that the observed *trans* orientation of H-13 and H-15 in 1 differs from the *cis* configuration of H-13 and H-15 reported for pyrrocidines A and B.^{19–22} However, *trans* relative configuration of H-13 and H-15 is not unprecedented in nature because it was also found in the structurally related hirsutellones A–F,²³ which share a similar structural framework with the pyrrocidines.¹⁹

For the determination of the absolute configuration of 1, the solution ECD spectrum was recorded and TDDFT ECD spectra were calculated for the solution conformers. The solution TDDFT ECD protocol has been found to be a reliable method for the configurational assignment of conformationally rigid natural products.^{24–26} Compound 1 showed a weak negative cotton effect (CE) at 407 nm, more intense positive ones at 284 and 233 nm, and negative ones at 264 and 217 nm. The initial MMFF conformers of 1 were reoptimized by B3LYP/6-31G(d) in vacuum and B3LYP/TZVP levels of theory applying a polarizable continuum model (PCM) solvent model for acetonitrile to afford two conformers with 93.9% and 6.1% population, which differed only in the orientation of the 19-OH group (Figure 4). Then TDDFT ECD calculations of the two conformers were performed with various functionals (B3LYP, BH&HLYP, PBE0) and TZVP basis set and the

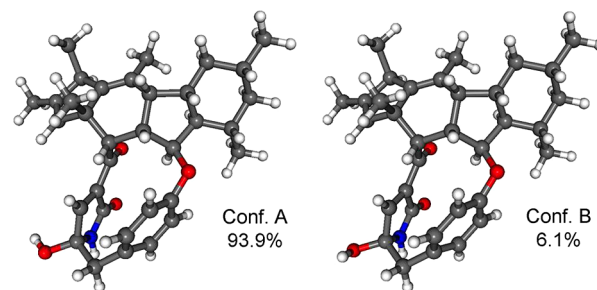


Figure 4. Solution conformers and populations of embellicine A (1) obtained by B3LYP/TZVP with PCM solvent model for acetonitrile.

averaged ECD spectra of the (3*S*,4*aR*,6*R*,7*S*,9*R*,11*S*,12*R*,13*R*,14*S*,15*S*,19*R*)-enantiomer reproduced well the experimental ECD spectrum with PBE0/TZVP giving the best agreement (Figure 5). Thus, the absolute configuration of **1** was

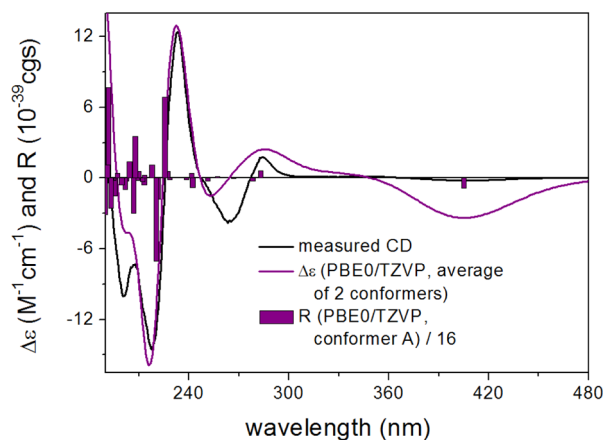


Figure 5. Experimental ECD spectrum of **1** in acetonitrile compared with the Boltzman-weighted PBE0/TZVP spectrum calculated for the two lowest-energy conformers of the (3*S*,4*aR*,6*R*,7*S*,9*R*,11*S*,12*R*,13*R*,14*S*,15*S*,19*R*)-enantiomer. Bars represent rotational strengths of the lowest-energy conformers.

determined as (–)-(3*S*,4*aR*,6*R*,7*S*,9*R*,11*S*,12*R*,13*R*,14*S*,15*S*,19*R*) and the compound named embellicine A. Embellicine A (**1**) differs from pyrrocidines A and B^{19–22} as well as from hirsutellones A–F,²³ both having tricyclic core structures, by the presence of the ABCD tetracyclic ring system. Furthermore, **1** shares the *trans*-fused macrocyclic ring structure with hirsutellones A–F, in contrast to the *cis*-fused ring present in pyrrocidines A and B. In addition, **1** shows the C-9 and C-11 methyl substituents characteristic for pyrrocidines, but in analogy to hirsutellones, it lacks the methyl group at C-7.

Compound **2** was isolated as a white amorphous mass. The HRESI-MS exhibited a strong peak at m/z 546.3212 [$M + H$]⁺, indicating a molecular formula of C₃₄H₄₂NO₅ (calcd 545.3219). Structural elucidation of **2** was established by comparison of NMR spectra and MS data with those of **1** (Table 1). The molecular weight of **2** showed a 18 amu increase compared to **1**, suggesting that **2** contains an additional proton and an OH group. The ¹H NMR spectrum of **2** showed signals comparable to those of **1**, except for two additional exchangeable signals appearing at δ_H 5.18 (d, $J = 6.2$ Hz) and 11.97 ppm (s), which were assigned to 18-OH and 16-OH, respectively, the latter replacing the ketone carbonyl group in **1**. The signal corresponding to H-18 appeared as a doublet signal at δ_H 3.75 ppm and showed a COSY correlation to 18-OH (Figure 1). Inspection of the HMBC spectrum showed correlations of 18-OH to C-17 (δ_C 105.9 ppm), C-18 (δ_C 69.2 ppm), and C-19 (δ_C 87.7 ppm), whereas H-18 correlated to C-16 (δ_C 167.4), C-17, C-21 (δ_C 174.1 ppm), and C-22 (δ_C 45.2 ppm). Furthermore, correlations of 16-OH to C-15 (δ_C 46.9 ppm), C-16, and C-17 were detected (Figure 2).

The relative stereochemistry of **2** was established on the basis of ROESY correlations (Figure 3), a 3D model, and comparison with **1**. Comparison of the ROESY spectra of **1** and **2** showed identical configurations of rings A, B, C, and D, including C-13 and C-15, and of the C-19 chirality center. The relative configuration of the additional C-18 chirality center of **2** was established on the basis of ROE correlations observed for

18-OH to H-2 and 19-OH, as well as for H-18 to H-27 and H-28. Thus, the relative configuration of **2** was established as shown in Chart 1.

It was observed that upon storage, **2** was completely converted to **1**, suggesting a possible direct intramolecular dehydration process from **2** to **1** promoted by the six-membered chelated structure (Figure 6). Thus, both chemical correlation and biogenetic consideration suggest that **1** and **2** are homochiral. Furthermore, because ROE correlations were observed from 18-OH to H-2 and from H-18 to H-27 and H-28, both hydroxyl groups must be oriented to the same side of the pyrrolidinone ring, indicating (18*S*, 19*S*) absolute configuration. Accordingly, the absolute configuration of **2** was deduced as (–)-(3*S*,4*aR*,6*R*,7*S*,9*R*,11*S*,12*R*,13*R*,14*S*,15*S*,18*S*,19*R*) and the compound named embellicine B.

The biological impact of these two embellicine derivatives A (**1**) and B (**2**) was evaluated against human chronic myelogenous leukemia (K562) and human nonsmall cell lung carcinoma (A549) cell lines that represent adherent and nonadherent cancer cell type models. Our experimental approach was already validated for other plant and marine-derived compounds^{12,27} including curcumin,²⁸ heteronemin,⁴ chalcones,⁵ and UNBS1450.⁶ The effect of **1** and **2** on K562 cell viability, assessed by trypan blue exclusion assay, revealed that both compounds were cytotoxic toward K562 cells in a dose and time dependent manner (Table 2) and that both were able to induce cell death with an IC₅₀ lower than 10 μ M. Embellicine B (**2**) appeared to be the most active compound with an IC₅₀ of 0.92, 0.32, 0.25, and 0.21 μ M after 8, 24, 48, and 72 h of treatment, respectively. The evaluation of the effect of **2** on noncancerous peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from healthy donors revealed that a concentration of 12.8 μ M of embellicine B was required to kill 50% of PBMC cells after 24 h of treatment (Figure 7). This clearly indicates a 40-fold differential toxicity of **2** between cancerous cells (IC₅₀ = 0.32 μ M) and noncancerous cells (IC₅₀ = 12.8 μ M). In comparison to already published studies about the cytotoxic/cytostatic potential of pyrrocidine, pyrrospirone, and hirsutellone type compounds,²⁹ embellicine B (**2**) appeared highly active. In fact, pyrrocidines and pyrrospirones A and B isolated from unpolished rice cultures of the endophytic fungus *Neonectria ramulariae* Wollenw KS-246 were reported to be cytotoxic against human promyelocytic leukemia (HL-60), K562 and human prostate carcinoma (LNCaP) cells with IC₅₀ values ranging from 0.12 to 20.24 μ M. In addition, these compounds were also shown to induce apoptosis in HL-60 cells at a concentration of 30 μ M.

In a second step, we evaluated the impact of embellicine A (**1**) and B (**2**) on TNF α -induced NF- κ B transcriptional activity, which is considered as a relevant therapeutic target in hematological cancer and malignancies^{30–32} as well as in lung cancer.^{33,34} NF- κ B is well-known to be highly implicated in inflammation and cancer promotion.¹ We were the first to observe that pyrrocidine-like compounds were able to inhibit TNF α -driven NF- κ B activation in a dose dependent manner in K562 cells. The concentrations of **1** and **2** required to inhibit 50% of NF- κ B transcriptional activity in K562 cells were 3 and 0.35 μ M, respectively (Table 3). This inhibition of NF- κ B most likely contributes to the biological activity of both compounds.

Finally, we evaluated the effect of the most active embellicine derivative, namely embellicine B (**2**), on K562 and A549 cell proliferation by Incucyte live-cell imaging system (EssenBio-science) during 120 h of treatment and found it to inhibit both

Table 1. NMR Data of Embellicines A (1) and B (2) Measured at 600 (¹H) and 150 (¹³C) MHz (DMSO-*d*₆)

Nr.	1				2			
	δ_C	δ_H	HMBC	ROESY	δ_C	δ_H	HMBC	ROESY
1	140.9				137.8			
2	129.5	4.90, s	1,3, 4, 4a, 29, 30	15, 18, 29, 30	132.1	5.26, s	1,3, 4, 4a, 29, 30	15, 18-OH, 29, 30
3	51.8				50.2			
4	145.7				147.9			
4a	44.4	2.99, m	1, 4,34	29, 33, 34	44.1	2.97, m	1, 4, 34	29, 33, 34
5	127.0				126.3			
6	43.5	2.88, m	4, 5, 7, 12, 13	7, 8B, 14, 15, 30	43.7	2.86, m	4, 5, 7, 12, 13	7, 8B, 14, 15, 30
7	45.8	1.91, m	5, 6, 8, 9, 11, 12	6, 8B, 9, 11, 14	45.5	\approx 1.91, ov. with 8B	6, 9, 11, 12, 13	6, 8B, 9, 11, 14
8	38.8	A 1.38, ddd (11.4, 11.4, 11.4) B 1.95, m	9, 10, 12, 32 5, 9, 10, 12	8B, 10A, 12, 32, 33 6, 7, 8A, 9, 32	38.0	A \approx 1.46, ov. with 29 B \approx 1.91, ov. with 7	7, 10, 12 6, 9, 10, 12	8B, 10A, 12, 32, 33 6, 7, 8A, 9, 32
9	33.3	1.34, m		7, 8B, 10B, 11, 32	33.2	1.35, m		7, 8B, 10B, 11, 32
10	43.8	A 0.71, ddd (12.0, 12.0, 12.0) B 1.66, m	9, 11, 12, 31, 32 9, 11, 12	8A, 10B, 12, 31, 32 9, 10A, 11, 31, 32	43.7	A 0.72, ddd (12.1, 12.1, 12.1) B 1.66, br d (12.8)	8, 9, 11, 12, 31, 32 9, 11, 12	8A, 10B, 12, 31, 32 9, 10A, 11, 31, 32
11	31.1	1.77, m	10, 12, 31	7, 9, 10B, 31	31.2	1.81, m	10, 12, 31	7, 9, 10B, 31
12	51.6	0.96, ddd (3.3, 6.8, 8.1)	7	8A, 10A, 13, 31	50.2	\approx 1.06, ov. with 31	7, 11, 31	8A, 10A, 13, 31
13	91.6	3.59, dd (3.5, 7.4)	7, 12, 15, 26	12, 25, 31	90.1	4.63, dd (3.7, 7.3)	7, 12, 26	12, 25, 31
14	50.1	2.81, ddd (3.6, 8.6, 10.6)	5, 6, 13, 15, 16	6, 7, 15, 27, 30	51.3	2.69, ddd (3.8, 7.7, 10.6)	5, 6, 15, 16	6, 7, 15, 27, 30
15	52.6	3.08, d (10.8)	3, 4, 6, 13, 14, 16, 30	2, 6, 14, 18, 27, 30	46.9	2.41, d (10.9)	3, 4, 16, 30	2, 6, 14, 18, 27, 30
16	195.4				167.4			
17	131.1				105.9			
18	157.7	7.11, d (1.7)	16, 19, 21	2, 15, 19-OH, 27, 28	69.2	3.75, d (6.1)	16, 17, 21, 22	15, 18-OH, 22A, 27, 28
19	86.2				87.7			
21	167.2				174.1			
22	44.7	A 3.10, d (12.2) B 3.14, d (12.2)	18, 19, 23, 28 18, 19, 23, 28	19-OH, 22B, 28 22A, 24, NH	45.2	A 2.75, d (12.7) B 3.07, d (12.7)	19, 23, 24 18, 19-OH, 22B, 28 19, 23, 24	22A, 24, NH 22A, 24, NH
23	131.9				130.2			
24	129.4	6.91, dd (8.4, 2.2)	22, 26, 28	22B, 25, NH	122.4	7.01, dd (8.2, 2.1)	22, 26, 28	22B, 25, NH
25	122.8	6.67, dd (8.3, 2.5)	23, 26, 27	13, 24, 31	121.8	6.72, dd (8.3, 2.1)	23, 27	13, 24, 31
26	159.4				159.3			
27	123.5	7.07, dd (8.2, 2.5)	23, 25	14, 15, 18, 28	130.4	6.99, dd (8.5, 1.3)	23, 25	14, 15, 18, 28
28	131.5	7.30, dd (8.2, 2.2)	22, 24, 26	18, 22A, 27	132.1	7.12, dd (8.1, 1.5)	22, 24, 26	18, 22A, 27
29	14.8	1.45, s	1,2, 4a	2, 4a, 34	14.7	1.46, s	1, 2, 4a	2, 4a, 34
30	24.1	1.04, s	2, 3, 4, 15	2, 6, 14, 15, 34	26.0	0.96, s	2, 3, 4, 15	2, 6, 14, 15, 34
31	20.4	1.05, d (7.3)	10, 11, 12	10A, 10B, 11, 12, 13, 25	20.4	1.06, d (6.3)	10, 11, 12	10A, 10B, 11, 12, 13, 25
32	22.5	0.94, d (6.2)	8, 9, 10	8A, 8B, 9, 10A, 10B	22.5	0.94, d (6.4)	8, 9, 10	8A, 8B, 9, 10A, 10B
33	19.6	1.75, s	4, 5, 6	4a, 8A, 34	19.7	1.76, s	4, 5, 6	4a, 8A, 12, 34
34	16.7	0.98, d (6.8)	1, 4, 4a	4a, 29, 30, 33	18.0	0.98, d (6.9)	1, 4, 4a	4a, 29, 30, 33
NH-20		8.26, d (1.7)	17, 18, 21	22B, 24		8.15, s	17, 18, 19, 21	22B, 24
16-OH						11.97, s	15, 16, 17	
18-OH						5.18, d (6.2)	17, 18, 19	2, 18, 19-OH
19-OH		6.26, s	18, 19, 22	18, 22A		5.37, s	18, 19, 22	18-OH, 22A

K562 (Figures 8A,B) and A549 (Figures 8C,D) cell proliferation at concentrations higher or equal to 0.5 μ M.

By combining the newly acquired knowledge about the chemical structure of embellicines A (1) and B (2) and their related biological cytostatic and cytotoxic potential on cancer

cells, we reported here the importance of the distinct structural features of embellicines. In the literature, Shiono et al.²⁹ claimed that the most active pyrrospirones feature a pyrrolidinone unit with a double bond at Δ .^{17,18} In our hands, embellicine B (2), which lacks a Δ ^{17,18} double bond, was

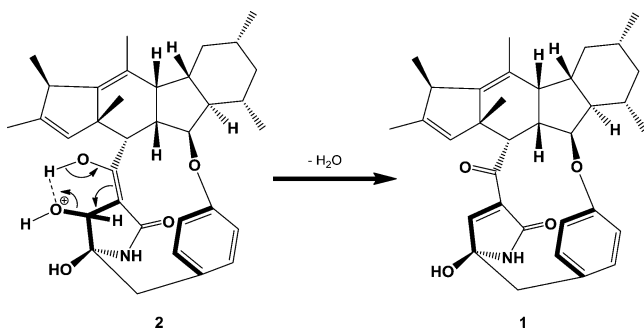


Figure 6. Plausible transformation mechanism from 2 to 1.

Table 2. Effect of Embellicines A (1) and B (2) on Leukemia Cell Viability^a

time of treatment (h)	IC ₅₀ (μM)	
	1	2
8	3.473 ± 0.236	0.917 ± 0.031
24	2.855 ± 0.155	0.323 ± 0.037
48	1.282 ± 0.209	0.250 ± 0.045
72	1.202 ± 0.125	0.210 ± 0.033

^aHuman chronic leukemia K562 cell viability was assessed by trypan blue exclusion test after 8, 24, 48, and 72 h of treatment with embellicines A and B. IC₅₀ values (μM) are the mean of at least three independent experiments.

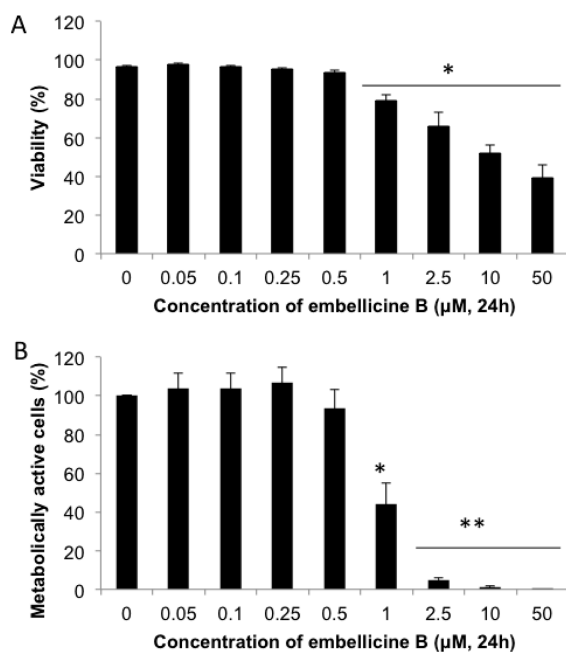


Figure 7. Effect of embellicine B (2) on noncancerous cell viability (A) and metabolism (B). Twenty-four h after isolation, two million PBMCs were treated for 24 h with various concentrations (0–50 μM) of embellicine B. (A) Cell viability was then analyzed by trypan blue exclusion test, and (B) cell metabolism was assessed by Cell Titer-Glo. Data are the mean ± SEM of at least three independent experiments. * and ** indicate $p < 0.05$ and $p < 0.01$ compared to nontreated cells, respectively.

5–10 times more active than embellicine A (1) against K562 cells (Tables 2 and 3) even though the latter features a reactive α,β -unsaturated carbonyl group in the pyrrolidinone ring, which may act as a Michael acceptor. This implies that for

Table 3. Inhibition of TNF α -Induced NF- κ B Transcriptional Activity in K562 Cells Treated with Embellicine A (1) and B (2)^a

compd	IC ₅₀ (μM)
1	3.038 ± 0.343
2	0.352 ± 0.022

^aTransfected K562 cells were pretreated with embellicines A (1) and B (2) at various concentrations for 2 h, followed by an additional incubation period with TNF α (20 ng/mL) for 6 h. Results are represented as arbitrary light units (ratio of firefly luciferase activity/*Renilla* activity). Untreated cells were used as a negative control, cells treated with TNF α only were used as positive control. Results are the mean of at least three independent experiments.

embellicines A (1) and B (2) the hydroxylation pattern in the pyrrolidinone ring is more important for the cytotoxicity in this cellular system than presence of the $\Delta^{17,18}$ double bond. Our results on the structure–activity relationship of these two embellicines isolated from *E. eureka* are interesting for future investigations and for the design of hemisynthetic congeners.

EXPERIMENTAL SECTION

General Experimental Procedures. Optical rotations were measured on a Perkin-Elmer-241 MC polarimeter. 1D and 2D NMR spectra were recorded on an AVANCE DMX 600 NMR spectrometer. ESIMS and HRESIMS were obtained on Finnigan LCQ Deca and Micromass Qtof 2 mass spectrometers, respectively. ECD spectra were recorded on a J-810 spectropolarimeter. Solvents were distilled prior to use, and spectral grade solvents were used for spectroscopic measurements. HPLC/ECD analysis: HPLC separations were carried out with a Jasco HPLC system on a Chiralpak IC column (5 μm, 150 mm × 4.6 mm) using hexane/2-propanol 6:4 as eluent. The HPLC/ECD and HPLC/UV traces were recorded at 270 nm with a Jasco J-810 CD spectropolarimeter equipped with a 1 cm path length HPLC flow cell and the chromatogram was zeroed right after the start of recording, and hence relative absorbance was measured. The online CD and UV spectra (200–400 nm) were recorded simultaneously at the maxima of the UV peaks where the flow was stopped. ECD ellipticity values were not corrected for concentration. For an HPLC-ECD spectrum, three consecutive scans were recorded and averaged with 2 nm bandwidth, 1 s response, and standard sensitivity. The HPLC-ECD spectrum of the eluent recorded in the same way was used as background. The UV-absorption trace was recorded as high tension voltage (HTV) and converted to absorbance. The concentration of the injected sample was set so that the HT value did not exceed 500 V in the HT channel down to 220 nm. The purity of all isolated compounds was examined by LCMS analysis and was found to be ≥95%.

Fungal Material. Fresh, healthy stems of *Cladanthus arabicus* (Asteraceae) were collected in September 2010 in Morocco. Stems were rinsed twice with sterilized distilled water. Surface sterilization was achieved by immersing the leaves in 70% ethanol for 2 min (twice), followed by rinsing twice in sterilized distilled water. Then the stems were aseptically cut into small segments (approximately 1 cm in length). The material was placed on a Petri dish (malt agar medium) containing chloramphenicol to suppress bacterial growth (medium composition: 15 g/L malt extract, 15 g/L agar, and 0.2 g/L chloramphenicol in distilled water, pH 7.4–7.8) and incubated at room temperature (22 °C). After several days, hyphae growing from the plant material were transferred to fresh plates with the same medium, incubated again for 10 days, and periodically checked for culture purity.

Identification of Fungal Cultures. Fungal cultures were identified according to a molecular biological protocol by DNA amplification and sequencing of the ITS region as described previously.³⁵ The sequence data have been submitted to GenBank, accession number HE653395. The fungal strain was identified as

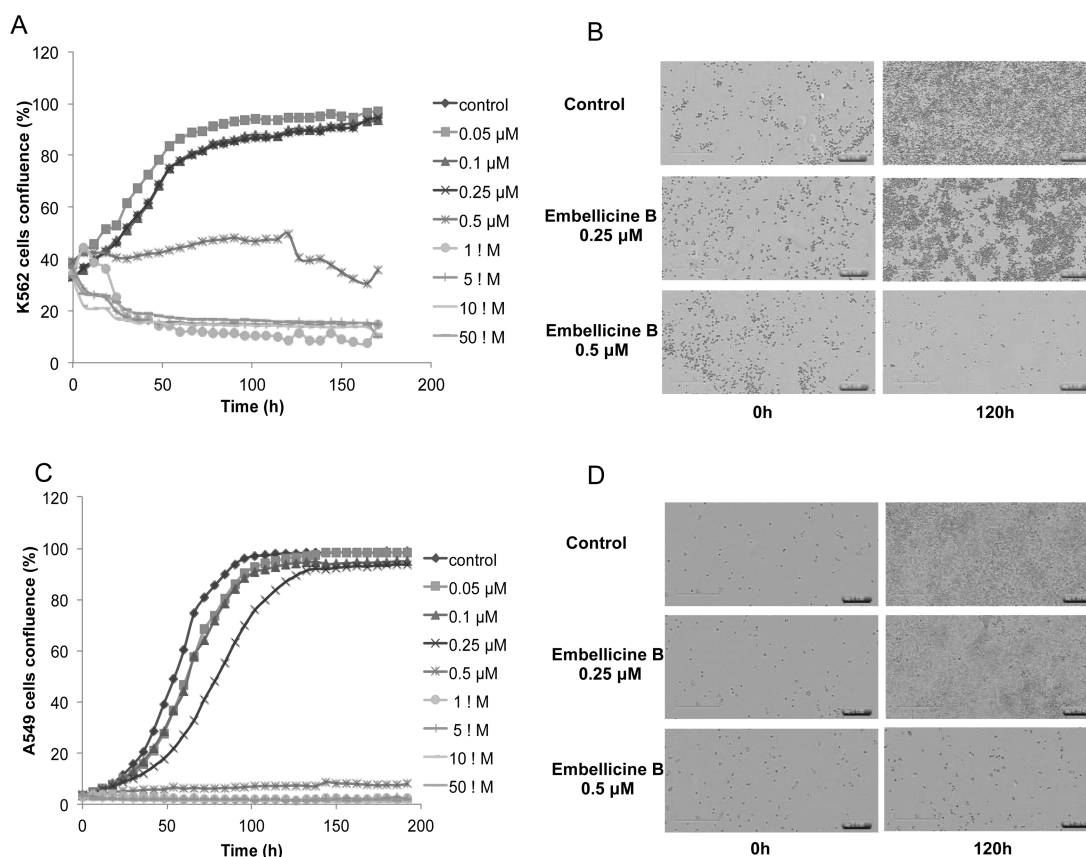


Figure 8. Embellicine B (**2**) affects K562 and A549 cell proliferation. The effect of embellicine B on K562 and A549 cell proliferation was evaluated by using Incucyte live-cell imaging system (EssenBioscience). (A) and (C) represent K562 and A549 cells growth curves plotting confluence vs time at 6 h intervals. Data are representative of at least three independent experiments. (B) and (D) correspond to pictures extracted from the generated video clip corresponding to the live cell proliferation analysis of K562 and A549 cells at the starting point of treatment (time: 0 h) and after 120 h of treatment with embellicine B (0.25 and 0.5 μM).

Embellisia eureka. A voucher strain (strain designation CATS2) is kept in the institute of Pharmaceutical Biology and Biotechnology, Duesseldorf, Germany.

Cultivation. Twenty Erlenmeyer flasks (1L each) containing 100 g of rice and 100 mL of distilled water were autoclaved. A small part of the medium from a Petri dish containing the purified fungus was transferred under sterile conditions to the rice medium. The fungal strain was grown on solid rice medium at room temperature (22 °C) for 40 days.

Extraction and Fractionation. The cultures were extracted with EtOAc. The EtOAc extract was washed with water, taken to dryness, and partitioned between *n*-hexane and 90% MeOH. The 90% MeOH fraction was chromatographed over silica gel F₂₅₄ (Merck, Darmstadt, Germany) using gradient elution (*n*-Hexane: EtOAc). On the basis of detection by TLC (silica gel F₂₅₄, Merck, Darmstadt, Germany) using EtOAc–MeOH–H₂O (77:13:10) as the solvent system, collected fractions were combined. Yields of compounds were as follows: **1** 6.2 mg and **2** 30.0 mg.

Embellicine A (1). Yellowish amorphous mass; [α]_D²⁰ –8 (*c* 0.004, DMSO). ECD (CH₃CN, *c* = 1.4 × 10^{−4}) λ _{max} ($\Delta\epsilon$): 407 (−0.19), 339 sh (0.13), 284 (1.78), 264 (−3.80), 233 (12.26), 217 (−14.61), 200 (−10.06). ¹H and ¹³C in DMSO-*d*₆, see Table 1. HRESI-MS *m/z* 528.3108 [M + H]⁺ (calcd for C₃₄H₄₂NO₄, 528.3108).

Embellicine B (2). White amorphous mass; [α]_D²⁰ –10 (*c* 0.004, DMSO). ¹H and ¹³C in DMSO-*d*₆, see Table 1. HRESI-MS *m/z* 546.3212 [M + H]⁺ (calcd for C₃₄H₄₃NO₅, 546.3219).

Computational Section. Conformational searches were carried out by means of the MacroModel 9.7.211³⁶ software using Merck Molecular Force Field (MMFF) with implicit solvent model for chloroform. Geometry reoptimizations at B3LYP/6-31G(d) in vacuo and B3LYP/TZVP levels of theory applying a PCM solvent model for

MeCN, followed by TDDFT ECD calculations using various functionals (B3LYP, BH&HLYP, PBE0) and TZVP basis set were performed by the Gaussian 09³⁷ package. Boltzmann distributions were estimated from the ZPVE corrected B3LYP/6-31G(d) energies in the gas-phase calculations and from the B3LYP/TZVP energies in the PCM calculations. ECD spectra were generated as the sum of Gaussians³⁸ with 2400 cm^{−1} half-height width (corresponding to ca. 14 at 240 nm), using dipole-velocity computed rotational strengths for conformers above 3%. The MOLEKEL³⁹ software package was used for visualization of the results.

Cell Culture. Human chronic myelogenous leukemia K562 cells and human nonsmall cell lung carcinoma A549 cells were cultured in RPMI 1640 medium (Lonza, Verviers, Belgium) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) (Hyclone, Perbio, Erembodegem, Belgium) and 1% (v/v) antibiotic–antimycotic (BioWhittaker) at 37 °C, in a 5% CO₂ humidified atmosphere. Exponentially growing cells were treated with compounds as indicated. Both compounds were dissolved in DMSO at concentrations unable to affect the biological assays.

Healthy blood samples were kindly donated as buffy coats by the Red Cross (Luxembourg, Luxembourg). By applying diluted (1/3) blood onto a Ficoll layer followed by centrifugation (400 g during 20 min), mononuclear cells were isolated and collected. The isolated peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were kept in culture at 37 °C and 5% CO₂ for 24 h before being subjected to treatment.

Cell Viability Assessment. K562 cells were incubated with different concentrations of embellicines A and B during 8, 24, 48, and 72 h. K562 cell viability was assessed by trypan blue exclusion test. Peripheral Blood Mononuclear Cell (PBMC) viability was assessed by trypan blue exclusion test, and the effect on the metabolism of PBMCs was evaluated by CellTiter-Glo luminescent cell viability assay kit

(Promega, Leiden, The Netherlands) after 24 h of treatment according to the manufacturer's protocol. Data were normalized to the control and reported as percentage of viable or metabolically active cells.

Transient Transfection. K562 cells were transiently transfected as described previously.⁴⁰ For each experiment, 3.75×10^6 cells at a concentration of 1.5×10^7 cells/mL were electroporated at 250 V and 500 μ F in the presence of 5 μ g of a luciferase reporter gene construct containing five repeats of a consensus NF- κ B site (Stratagene, Genomics Agilent, Diegem, Belgium) and 5 μ g of a *Renilla* luciferase plasmid (ph-RG-tk, Promega, Leiden, Netherlands). Twenty-four h after transfection, transfected K562 cells were resuspended in growth medium to reach a final concentration of 10^6 cells/mL and subjected to 2 h of pretreatment with embellicine B followed by 6 h of treatment with 20 ng/mL of TNF α . To assay *Renilla* activity, 75 μ L of Dual-Glo luciferase reagent (Promega) were incubated for 10 min at 22 °C, and then 75 μ L of Dual-Glo Stop&Glo reagent (Promega) were added to the cells for 10 min incubation at 22 °C. Luciferase and *Renilla* activities were measured on an Orion microplate luminometer (Berthold detection systems). Results are expressed as a ratio of arbitrary units of firefly luciferase activity normalized to *Renilla* activity. Treatment with TNF α alone is considered as 100% of induction of NF- κ B transcriptional activity.

Proliferation Assay. The effect of embellicine B on K562 and A549 cell proliferation was monitored in real-time using an Incucyte live-cell imaging system (Essen BioScience, Hertfordshire, United Kingdom). After seeding in a 24-well plate, K562 (coated with poly-D-lysine hydrobromide) and A549 cells were treated with different concentrations of embellicine B. Incucyte microscope permits acquisition of automated phase contrast images. Individual images are processed by an imbedded contrast-based confluence algorithm, which computes monolayer confluence for each image and at each time point. Multiple images are collected per well and averaged to provide a representative statistical measure of confluence.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*For A.D.: phone, +49 211 81 15979; fax, +49 211 81 11923; E-mail, abdessamad.debbab@uni-duesseldorf.de. For P.P.: phone, +49 211 81 14163; fax, +49 211 81 11923; E-mail, proksch@uni-duesseldorf.de.

Present Address

[○]Permanent address: Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Mansoura University, 35516 Mansoura, Egypt.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

This project was supported by grants of the BMBF (to P.P. and A.D.) and MOST (to W.L.). A scholarship (grant no. 10/6/117) granted and financed by the Egyptian Government (Ministry of High Education) to W.E. is gratefully acknowledged. T.K. and A.M. thank the HURO/0901/274/2.2.2 project (websites: www.huro-cbc.eu and www.hungary-romania-cbc.eu) and the National Information Infrastructure Development Institute (NIIFI 10038). M.H.T is supported by a Télévie grant (Fonds National de la Recherche Scientifique, Belgium). M.D.'s research at the Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire du Cancer (LBMCC) is financially supported by "Recherche Cancer et Sang" Foundation, by "Recherches Scientifiques Luxembourg" asbl, by "Een Häerz fir Kriibskrank Kanner" Association, the Action Lions "Vaincre le Cancer" Luxembourg, The Fonds National de la Recherche Luxembourg, Télévie Luxembourg, and the Foundation for Scientific Cooperation between Germany and Luxembourg.

Further support was received from the European Union (ITN "RedCat" 215009 and Interreg IVa project "Corena").

ABBREVIATIONS USED

TNF α , tumor necrosis factor alpha; NF- κ B, nuclear factor kappa B; PBMC, peripheral blood mononuclear cells; RPMI, Roswell Park Memorial Institute medium; ECD, electronic circular dichroism; PCM, polarizable continuum model

REFERENCES

- (1) Karin, M.; Greten, F. R. NF- κ B: Linking Inflammation and Immunity to Cancer Development and Progression. *Nature Rev. Immunol.* **2005**, *5*, 749–759.
- (2) Aggarwal, B. B.; Vijayalakshmi, R. V.; Sung, B. Targeting Inflammatory Pathways for Prevention and Therapy of Cancer: Short-Term Friend, Long-Term Foe. *Clin. Cancer Res.* **2009**, *15*, 425–430.
- (3) Aggarwal, B. B.; Sung, B. NF- κ B in Cancer: A Matter of Life and Death. *Cancer Discovery* **2011**, *1*, 469–671.
- (4) Schumacher, M.; Cerella, C.; Eifes, S.; Chateauvieux, S.; Morceau, F.; Jaspars, M.; Dicato, M.; Diederich, M. Heteronemin, a Spongian Sesterterpene, Inhibits TNF α -induced NF- κ B Activation through Proteasome Inhibition and Induces Apoptotic Cell. *Biochem. Pharmacol.* **2011**, *82*, 620–631.
- (5) Orlikova, B.; Tasdemir, D.; Golais, F.; Dicato, M.; Diederich, M. The Aromatic Ketone 4'-hydroxychalcone Inhibits TNF α -induced NF- κ B Activation via Proteasome Inhibition. *Biochem. Pharmacol.* **2010**, *79*, 610–622.
- (6) Juncker, T.; Cerella, C.; Teiten, M. H.; Morceau, F.; Schumacher, M.; Ghelfi, J.; Gaascht, F.; Schnekenburger, M.; Henry, E.; Dicato, M.; Diederich, M. UNBS1450, A Steroid Cardiac Glycoside Inducing Apoptotic Cell Death in Human Leukemia Cells. *Biochem. Pharmacol.* **2011**, *81*, 13–23.
- (7) Aly, A. H.; Debbab, K.; Kjer, J.; Proksch, P. Fungal Endophytes from Higher Plants: A Proliferous Source of Phytochemicals and other Bioactive Natural Products. *Fungal Diversity* **2010**, *41*, 1–16.
- (8) Aly, A. H.; Debbab, A.; Proksch, P. Fungal Endophytes: Unique Plant Inhabitants with Great Promises. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2011**, *90*, 1829–1845.
- (9) Debbab, A.; Aly, A. H.; Proksch, P. Bioactive Secondary Metabolites from Endophytes and Associated Marine Derived Fungi. *Fungal Diversity* **2011**, *49*, 1–12.
- (10) Debbab, A.; Aly, A. H.; Proksch, P. Endophytes and Associated Marine Derived Fungi—Ecological and Chemical Perspectives. *Fungal Diversity* **2012**, *57*, 45–83.
- (11) Kharwar, R. N.; Mishra, A.; Gond, S. K.; Stierle, A.; Stierle, D. Anticancer Compounds Derived from Fungal Endophytes: Their Importance and Future Challenges. *Nat. Prod. Rep.* **2011**, *28*, 1208–1228.
- (12) Aly, A. H.; Debbab, A.; Clements, C.; Edrada-Ebel, R.; Orlikova, B.; Diederich, M.; Wray, V.; Lin, W. H.; Proksch, P. NF κ B Inhibitors and Antitrypanosomal Metabolites from Endophytic Fungus *Penicillium* sp. Isolated from *Limonium tubiflorum*. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 414–421.
- (13) Zhou, Y.; Mándi, A.; Debbab, A.; Wray, V.; Schulz, B.; Müller, W.; Lin, W. H.; Proksch, P.; Kurtán, T.; Aly, A. H. New Austalides from the Sponge-Associated Fungus *Aspergillus* sp. *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, 6009–6019.
- (14) Debbab, A.; Aly, A. H.; Edrada-Ebel, R. A.; Wray, V.; Müller, W. E. G.; Totzke, F.; Zirrgiebel, U.; Schächtele, C.; Kubbutat, M. H. G.; Lin, W. H.; Mosaddak, M.; Hakiki, A.; Proksch, P.; Ebel, R. Bioactive Metabolites from Endophytic Fungus *Stemphylium globuliferum* Isolated from *Mentha pulegium*. *J. Nat. Prod.* **2009**, *72*, 626–631.
- (15) Debbab, A.; Aly, A. H.; Edrada-Ebel, R.; Wray, V.; Pretsch, A.; Pescitelli, G.; Kurtán, T.; Proksch, P. New Anthracene Derivatives—Structure Elucidation and Antimicrobial Activity. *Eur. J. Org. Chem.* **2012**, 1351–1359.
- (16) Kwon, H. J.; Jung, H.; Shin, J. H.; Kim, C. J.; Rho, J.; Lee, H. Novel Heptatrienoic Acid Substituted Bicyclic Ketone Derivative and

Pharmaceutical Compositions Comprising the same. *Int. Appl. WO* 2005003076 A1 20050113, 2005.

(17) Jung, H. J.; Lee, H. B.; Kim, C. J.; Rho, J. R.; Shin, J. H.; Kwon, H. J. Anti-angiogenic Activity of Terpestacin, a Bicyclo Sesterterpene from *Embellisia chlangdospora*. *J. Antibiot.* **2003**, *56*, 492–496.

(18) Shi, D.; Li, L.; Zheng, M.; Li, G.; Zhang, H.; Wang, Q. Preliminary Study on the Isolation and Purification of Active Secondary Metabolites in the Fermentation Broth of *Embellisia oxytropis*. *Anhui Nongye Kexue* **2009**, *37*, 16213–16215.

(19) He, H. Y.; Yang, H. Y.; Bigelis, R.; Solum, E. H.; Greenstein, M.; Carter, G. T.; Pyrrocidines, A.; New, B. Antibiotics Produced by a Filamentous Fungus. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 1633–1636.

(20) Wicklow, D. T.; Roth, S.; Deyrup, S. T.; Gloer, J. B. A Protective Endophyte of Maize: *Acremonium zeae* Antibiotics Inhibitory to *Aspergillus flavus* and *Fusarium verticillioides*. *Mycol. Res.* **2005**, *109*, 610–618.

(21) Bigelis, R.; He, H. Y.; Yang, H. Y.; Chang, L. P.; Greenstein, M. Production of Fungal Antibiotics Using Polymeric Polid Supports in Solid-State and Liquid Fermentation. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2006**, *33*, 815–826.

(22) Wicklow, D. T.; Poling, S. M. Antimicrobial Activity of Pyrrocidines from *Acremonium zeae* against Endophytes and Pathogens of Maize. *Phytopathology* **2009**, *99*, 109–115.

(23) (a) Isaka, M.; Rugseree, N.; Maithip, P.; Kongsaree, P.; Prabpai, S.; Thebtaranonth, Y. Hirsutellones A–E Antimycobacterial Alkaloids from the Insect Pathogenic Fungus *Hirsutella nivea* BCC 2594. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 5577–5583. (b) Isaka, M.; Prathumpai, W.; Wongsai, P.; Tanticharoen, M. Hirsutellone F, A Dimer of Antitubercular Alkaloids from the Seed Fungus *Trichoderma* Species BCC 7579. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 2815–2817.

(24) Ebrahim, W.; Aly, A. H.; Mándi, A.; Totzke, F.; Kubbutat, M. H.; Wray, V.; Lin, W. H.; Dai, H.; Proksch, P.; Kurtán, T.; Debbab, A. Decalactone Derivatives from *Corynespora cassiicola*, An Endophytic Fungus of the Mangrove Plant *Laguncularia racemosa*. *Eur. J. Org. Chem.* **2012**, 3476–3484.

(25) Cai, Y. S.; Kurtan, T.; Miao, Z. H.; Mandi, A.; Komaromi, I.; Liu, H. L.; Ding, J.; Guo, Y. W. Palmarumycins BG1–BG7 and Preussomerin BG1: Establishment of Their Absolute Configurations Using Theoretical Calculations of Electronic Circular Dichroism Spectra. *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 1821–1830.

(26) Hou, X. F.; Yao, S.; Mandi, A.; Kurtan, T.; Tang, C. P.; Ke, C. Q.; Li, X. Q.; Ye, Y. Biccunningines A and B, Two New Dimeric Diterpenes from *Cunninghamia lanceolata*. *Org. Lett.* **2012**, *14*, 460–463.

(27) Folmer, F.; Jaspars, M.; Solano, G.; Cristofanon, S.; Henry, E.; Tabudravu, J.; Black, K.; Green, D. H.; Küpper, F. C.; Aalbersberg, W.; Feussner, K.; Dicato, M.; Diederich, M. The Inhibition of TNF- α -Induced NF- κ B Activation by Marine Natural Products. *Biochem. Pharmacol.* **2009**, *78*, 592–606.

(28) Reuter, S.; Charlet, J.; Juncker, T.; Teiten, M. H.; Dicato, M.; Diederich, M. Effect of Curcumin on Nuclear Factor κ B Signaling Pathways in Human Chronic Myelogenous K562 Leukemia Cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2009**, *1171*, 436–447.

(29) Shiono, Y.; Shimanuki, K.; Hiramatsu, F.; Koseki, T.; Tetsuya, M.; Fujisawa, N.; Kimura, K. Pyrrospirones A and B, Apoptosis Inducers in HL-60 Cells, from an Endophytic Fungus, *Neonectria ramulariae* Wollenw KS-246. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 6050–6053.

(30) Lim, K. H.; Yang, Y.; Staudt, L. M. Pathogenetic Importance and Therapeutic Implications of NF- κ B in Lymphoid Malignancies. *Immunol. Rev.* **2012**, *246*, 359–378.

(31) Lopez-Guerra, M.; Colomer, D. NF- κ B as a Therapeutic Target in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Expert. Opin. Ther. Targets* **2010**, *14*, 275–288.

(32) Pepper, C.; Hewamana, S.; Brennan, P.; Fegan, C. F- κ B as a Prognostic Marker and Therapeutic Target in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Future Oncol.* **2009**, *5*, 1027–1037.

(33) Tang, X.; Liu, D.; Shishodia, S.; Ozburn, N.; Behrens, C.; Lee, J. J.; Hong, W. K.; Aggarwal, B. B.; Wistuba, I. I. Nuclear Factor- κ B

(NF- κ B) Is Frequently Expressed in Lung Cancer and Preneoplastic Lesions. *Cancer* **2006**, *107*, 2637–2646.

(34) Stathopoulos, G. T.; Sherrill, T. P.; Cheng, D. S.; Scoggins, R. M.; Han, W.; Polosukhin, V. V.; Connelly, L.; Yull, F. E.; Fingleton, B.; Blackwell, T. S. Epithelial NF- κ B Activation Promotes Urethane-Induced Lung Carcinogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007**, *104*, 18514–18549.

(35) Wang, S.; Li, X. M.; Teuscher, F.; Li, D. L.; Diesel, A.; Ebel, R.; Proksch, P.; Wang, B. G. Chaetopyranin, A Benzaldehyde Derivative, and Other Related Metabolites from *Chaetomium globosum*, an Endophytic Fungus Derived from the Darine Red Alga *Polysiphonia urceolata*. *J. Nat. Prod.* **2006**, *69*, 1622–1625.

(36) MacroModel 9.7.211; Schrödinger LLC, 2009; <http://www.schrodinger.com/Products/macromodel.html>.

(37) Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Mennucci, B.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Caricato, M.; Li, X.; Hratchian, H. P.; Izmaylov, A. F.; Bloino, J.; Zheng, G.; Sonnenberg, J. L.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Vreven, T.; Montgomery, J. A.; Peralta, J. E. Jr.; Ogliaro, F.; Bearpark, M.; Heyd, J. J.; Brothers, E.; Kudin, K. N.; Staroverov, V. N.; Kobayashi, R.; Normand, J.; Raghavachari, K.; Rendell, A.; Burant, J. C.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Cossi, M.; Rega, N.; Millam, J. M.; Klene, M.; Knox, J. E.; Cross, J. B.; Bakken, V.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R. E.; Yazyev, O.; Austin, A. J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J. W.; Martin, R. L.; Morokuma, K.; Zakrzewski, V. G.; Voth, G. A.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Dapprich, S.; Daniels, A. D.; Farkas, O.; Foresman, J. B.; Ortiz, J. V.; Cioslowski, J.; Fox, D. J. *Gaussian 09*, revision B.01, Gaussian, Inc.: Wallingford CT, 2010.

(38) Stephens, P. J.; Harada, N. ECD Cotton Effect Approximated by the Gaussian Curve and other Methods. *Chirality* **2010**, *22*, 229–233.

(39) Varetto, U. *Molekel 5.4*; Swiss National Supercomputing Centre: Manno, Switzerland, 2009.

(40) Duvoix, A.; Delhalle, S.; Blasius, R.; Schneckeburger, M.; Morceau, F.; Fougère, M.; Henry, E.; Galteau, M. M.; Dicato, M.; Diederich, M. Effect of Chemopreventive Agents on Glutathione S-transferase P1–1 Gene Expression Mechanisms via Activating Protein 1 and Nuclear Factor κ B Inhibition. *Biochem. Pharmacol.* **2004**, *68*, 1101–1111.



Contents lists available at ScienceDirect

Biochemical Pharmacology

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



Commentary

Anticancer bioactivity of compounds from medicinal plants used in European medieval traditions

Marie-Hélène Teiten^a, François Gaascht^a, Mario Dicato^a, Marc Diederich^{b,*}

^aLaboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire du Cancer, Hôpital Kirchberg, L-2540 Luxembourg, Luxembourg

^bDepartment of Pharmacy, College of Pharmacy, Seoul National University, 599 Gwanak-ro, Gwanak-gu, Seoul 151-742, South Korea

ARTICLE INFO

Article history:

Received 1 May 2013

Accepted 6 August 2013

Available online xxx

Keywords:

Natural compounds

Cancer hallmarks

Inflammation signaling

Cell cycle

Cell death

Immune system

Tumor microenvironment

ABSTRACT

Since centuries, natural compounds from plants, animals and microorganisms were used in medicinal traditions to treat various diseases without a solid scientific basis. Recent studies have shown that plants that were used or are still used in the medieval European medicine are able to provide relief for many diseases including cancer. Here we summarize impact and effect of selected purified active natural compounds from plants used in European medieval medicinal traditions on cancer hallmarks and enabling characteristics identified by Hanahan and Weinberg. The aim of this commentary is to discuss the pharmacological effect of pure compounds originally discovered in plants with therapeutic medieval use. Whereas many reviews deal with Ayurvedic traditions and traditional Chinese medicine, to our knowledge, the molecular basis of European medieval medicinal approaches are much less documented.

© 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

From Antiquity to Modern Times, druids, healers, shamans, witches and modern medicine took advantage of natural remedies from Mother Nature to cure human diseases, as natural products provided a rich source of pharmacophores that found applications in the fields of medicine, pharmacy and biology. The knowledge about herbs, plants, flowers, leaves, tree bark, seeds, oils, or roots can be traced back over centuries from Sumerians to ancient Egyptians, Muslim, Indian, Chinese and European medieval medicines as reported in historical herbal texts [1]. European medieval herbal medicine was derived from the Romans and Greeks (Pedanius Dioscorides), which in turn was influenced by Babylonian and Egyptian medicinal plant traditions [2]. Ancient Greek medical treatises already describe theories of tumor formation and potential therapeutic methods [3]. In medieval times, Benedictine monasteries copied and translated Greek and Roman texts so that corresponding medicinal traditions became also available in Europe and England. In the 12th century, Hildegard von Bingen described tinctures, herbs and healing properties of plants in her treatises “*Causae et Curae*” and “*Liber subtilitatum diversarum naturarum creaturarum*”. Bohemian

herbalist Maria Treben collected and applied traditional German and Eastern European recipes based on the use of medicinal plant preparations including famous “Swedish bitters”, a herbal tonic containing *Aloe vera*, *Angelica*, *Carlina*, *Rheum rhabarbarum*, *Senna alexandrina* and *Curcuma zedoaria* as well as camphor, manna, myrrh, saffron and other less defined ingredients. These traditional herbal are criticized due to side effects and absence of scientific proof of concept. Nevertheless, recognition of the potential of natural products is increasing nowadays (Table 1) and appreciation of traditional medicine is growing, so that these ancestral European findings are again taken into account in the current area of new drug discovery and in large scale screening programs for the discovery of anticancer compounds [4].

So far, many reviews reported the anti-tumor potential of compounds originating from terrestrial or marine plants already used in Ayurvedic and traditional Chinese or African medicines [5–7], however the molecular basis of European traditions is much less documented [8,9] and thus deserves a critical overview. We will highlight hereafter a non-exhaustive list of compounds (Fig. 1) originally discovered in European plants with therapeutic medieval use and their currently documented molecular impact on selected cancer hallmarks (human epidermal growth factors, cell cycle machinery, immune activators, replicative immortality, invasion and metastasis, angiogenesis, cell death, aberrant metabolism and inflammation) (Table 2) in reference to Hanahan and Weinberg classification [10].

* Corresponding author. Tel.: +82 2 880 8919.

E-mail address: marcdiederich@snu.ac.kr (M. Diederich).

Table 1
Medicinal indications for the use of bioactive compounds.

Plant of origin	Usual name	Clinical use or self-medication	Medical indications
<i>Matricaria chamomilla</i>	Chamomile	Herbal tea/essential oil	Stomach, irritable bowel syndrome, gentle sleep aid, mild laxative and anti-inflammatory and bactericidal
<i>Hypericum perforatum</i>	St John's wort	Photodynamic therapy Homeopathy	Cancer Depression
<i>Vitis vinifera</i>	Red grappes	Pills (Resveol [®])	Antioxidant, calories decrease
<i>Silybum marianum</i>	Blessed milk thistle Saint Mary's Thistle	Legalon [®] pills	Digestion disorders in case of acute and chronic hepatitis Cirrhosis
<i>Rosmarinus officinalis</i>	Rosemary	Herbal tea/essential oil	Blood pressure regulation, antidepressant
<i>Allium sativum</i>	Garlic	Homeopathy Garlic supplements (phytotherapy)	Chronic bronchitis High blood pressure
<i>Glycyrrhiza glabra</i> L.	Licorice	Phytotherapy pills (DGL500)	Digestion disorders
<i>Arnica montana</i>	Arnica	Homeopathy	Pain, bruises
<i>Tanacetum parthenium</i>	Feverfew	nd	nd
<i>Crocus sativus</i>	Safran	nd	nd
<i>Calendula officinalis</i>	Marigold	Homeopathy, cream (Homeoplasmin)	Pain, skin disorders
<i>Arctium lappa</i>	Greater burdock	Homeopathy	Excema, acne

2. Molecular targets of compounds from medieval plants

2.1. Human epidermal growth factor (HER)

Cancer sustains uncontrolled proliferation by enhancing growth activators and by inhibiting growth suppressors. Proliferative

signaling is enhanced by overexpression or mutation of cell surface receptors with intracellular tyrosine kinase domains such as epidermal growth factor receptors (EGFR) and human EGF receptor 2 (HER2) [11], an ubiquitous transmembrane tyrosine kinase receptor protein implicated in growth-related processes critical for development and progression of malignant tumors including

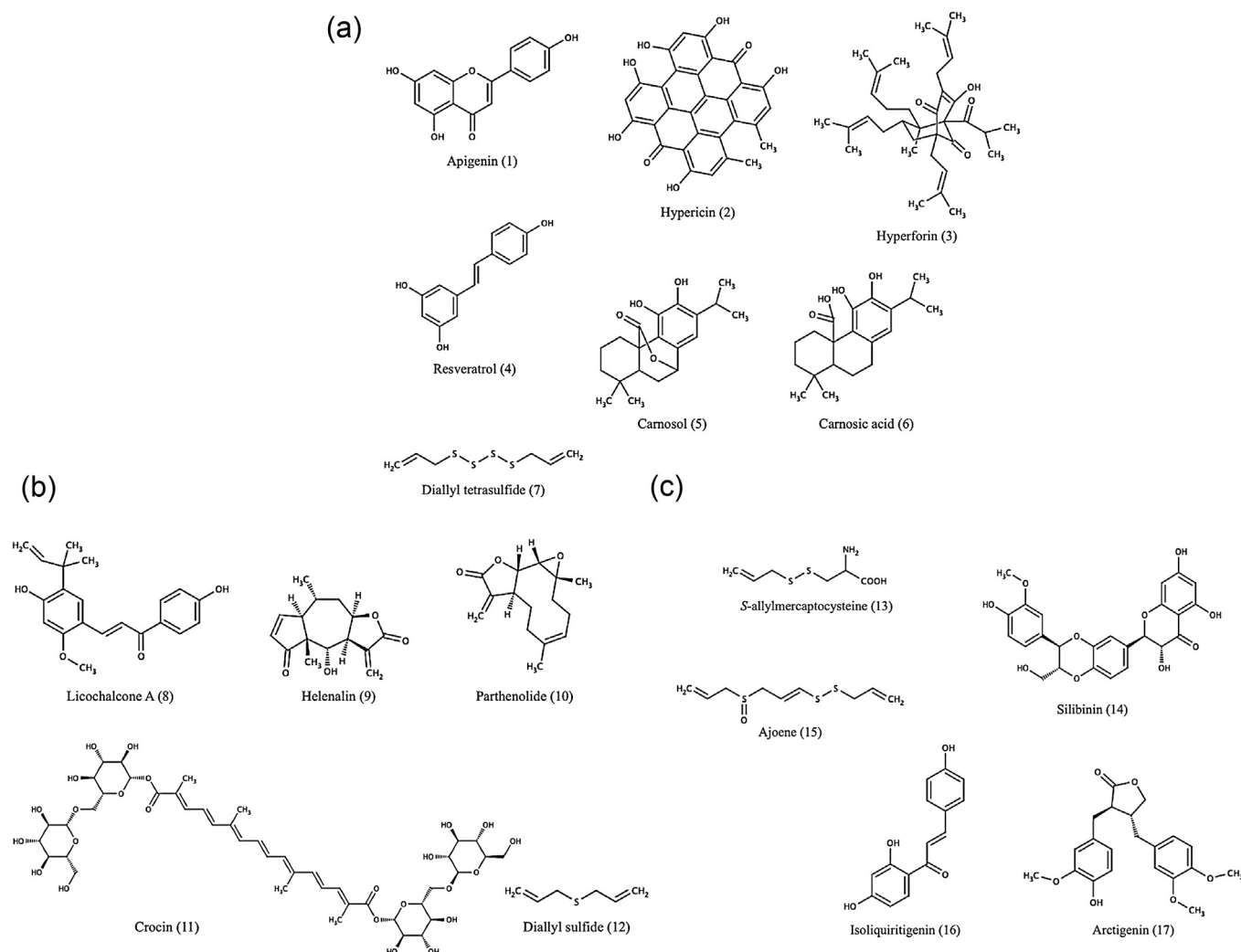


Fig. 1. (A–C) Natural compounds with anti-cancer bioactivities from medicinal plants used in European medieval traditions.

Table 2
Impact of natural compounds extracted from medieval medicinal plants on cell signaling pathways.

Chemical group	Bioactive molecule	Plant of origin	Signaling pathway affected	Dose	Cell type	References
Flavonoid	Apigenin	<i>Matricaria chamomilla</i>	HER	50 μ M, 48 h	Pharynx (FaDU)	[15]
			Invasion and metastasis	40 μ M, 16 h	Ovarian (A2780)	[61]
			Cell death	60 μ M, 24 h	Multiple myeloma (U266, RPMI 8226)	[77]
	Licochalcone-A	<i>Calendula officinalis</i>	Invasion and metastasis	250 mg/Kg body weight	Melanoma (BF16/F10)	[58]
			Cell cycle	25 μ M, 48 h	Prostate (PC3)	[35]
	Resveratrol	<i>Vitis vinifera</i>	Cell death	20 μ M, 12 h	Breast (MCF-7)	[81]
			HER	50 μ M, 4 h or 10 mM, 24 h	Breast (SKBr, MCF-7)	[22,23]
			Cell cycle	300 μ M, 24 h	Esophagus (HCE7), breast (MCF-7), colon (SW480)	[34]
	Silibinin	<i>Silybum marianum</i>	HDAC	10 μ M, 96 h	breast (MCF-7, MDA-MB231)	[52]
			Invasion and metastasis	100 μ M, 24 h	Melanoma (KM3)	[65]
			Cell death	50 μ M, 18 h	(RPMI 8226), melanoma (KM3)	[65]
	Silymarin Silybin	<i>Silybum marianum</i>	Metabolism	10 μ M, 24 h	Liver (HepG2)	[85]
Replication (hTERT)			100 μ g/mL, 48 h	Leukemia (K562)	[47]	
Invasion and metastasis			27 μ M, 48 h	Prostate (LNCaP, DU145),	[67]	
Lignanoid	Arctigenin	<i>Arctium lappa</i>	Angiogenesis	100 μ M, 1 h	Breast (MCF-7)	[69]
			Metabolism	40 μ M, 30 min	Fibroblast (3T3-L1), ovary (CHO)	[87]
			Metabolism	10 mM, 30 min to 12 h	Lung (A549)	[86]
Organosulfur	Allicin Diallyl sulfide	<i>Allium sativum</i>	Cell cycle	5–10 μ M, 8–24 h	Leukemia (U937)	[31,33]
			HDAC modulator	50 μ M, 6–12 h	Breast (MCF-7)	[32]
			Invasion and metastasis	20 μ M to 2 mM, 24 h	Colon (HT29)	[51]
			Invasion and metastasis	10–25 μ M or 2–10 mM	Colon (colo205), prostate (PC-3, DU145), ovary (Skov-3)	[63,64]
			Angiogenesis	10 μ g/kg body weight	Melanoma (BF16/F10)	[73]
Polycyclic quinone	Hypericin Hyperforin	<i>Hypericum perforatum</i>	Cell death	10 μ M, 24 h	Leukemia (U937)	[33,76]
			HER	25 nM, 24 h +light	Breast (SKBR-3, MCF-7)	[20,21]
			Inflammation	50 μ g/mL, 1 h	Lung (A549/8), colon (DLD-1)	[92]
			Invasion and metastasis	0.5 μ M, 6 h	Fibrosarcoma (HT-1080)	[66]
			Angiogenesis	27 μ M, 48 h	Endothelial (HUVEC)	[70]
Polyphenols	Carnosol, carnosic acid	<i>Rosmarinus officinalis</i>	Cell death	20 μ M, 12 h	Breast (MCF-7), lymphoma (Jurkat)	[83]
			Cell cycle	50 mM, 24–48 h	Colon (Caco-2)	[27]
			Invasion and metastasis	5–10 μ M, 9–12 h	Melanoma (B16/F10)	[59,60]
			Angiogenesis	25 μ M, 7 h	Endothelial (HUVEC)	[72]
			Cell death	25 μ M, 14 h	Leukemia (SEM, RS4/11, MV4/11, HT1080, HL60)	[72,79]
Sesquiterpene lactone	Helenalin	<i>Arnica montana</i>	Inflammation	10 μ M, 1 h	Melanoma B16/F10	[59]
			Cell cycle	1 μ M, 24 h	Leukemia (Jurkat)	[36]
			Replication (hTERT)	1–4 μ M, 48 h or 100 μ M, 1 h	Leukemia (HL-60, Jurkat)	[48]
	Parthenolide	<i>Tanacetum parthenium</i>	Metabolism	0.125 mg/day	Mice bearing Ehrlich ascites tumor	[84]
			Inflammation	1–2 μ M, 24 h or 10 μ M, 1 h	Leukemia (Jurkat), ovary (A2780), colon (RKO), breast (MCF-7)	[36,89,90]
			Cell death	2 μ M, 24 h	Ovary (A2780), colon (RKO), breast (MCF-7)	[90]
			Cell cycle	5–10 mM, 24 h	Bladder (5637), cervix (HeLa)	[37]
Terpenoids	Crocin	<i>Crocus sativus</i>	HDAC modulator	15 μ M, up to 3 h	Breast (ZR-75-1), colon HCT-116	[54]
			Inflammation	30 μ M, 1 h	Cervix (HeLa)	[91]
Terpenoids	Crocin	<i>Crocus sativus</i>	Replication (hTERT)	3 mg/mL	Liver (HepG2)	[46]
			Cell death	3 mg/mL	Stomach (AGS)	[80]

proliferation, survival and anchorage-independent growth, cell adhesion, migration and invasion [11,12]. HER is activated specific ligands (e.g. EGF or transforming growth factor; TGF α) and dimerizes in order to stimulate intrinsic intracellular protein-tyrosine kinase activity. By this auto-phosphorylation, it activates downstream signal transduction cascades that lead to DNA synthesis and cell proliferation.

Among the panel of ancestral plants (Table 2), compounds extracted from *Matricaria chamomilla* (chamomile), *Hypericum perforatum* (St John's wort) and *Vitis vinifera* (red grapes) appeared as good modulators of HER. The dried flower heads

of *M. chamomilla* were initially used for their spasmolytic and sedative properties and for the treatment of inflammation-related disorders. Apigenin (**1**) (4',5,7-trihydroxyflavone), a flavonoid [13] was reported to inhibit proliferation of human anaplastic thyroid carcinoma ARO cells by inhibiting both EGFR tyrosine auto-phosphorylation and phosphorylation of its downstream effector mitogen activated protein (MAP) kinase [14]. Moreover in head and neck squamous cell carcinomas (HNSCCs), apigenin was shown to reduce ligand-induced phosphorylation of EGFR and HER2 and impairs downstream signaling [15].

H. perforatum is a herbaceous perennial plant usually used as healing and anti-inflammatory agent since Ancient Greece [16]. Characterization by LC/NMR and LC/UV/MS revealed naphthodianthrones (hypericin, pseudohypericin, protohypericin, protopseudohypericin), phloroglucinols (hyperforin, adhyperforin), flavonoids (quercetin, quercitrin, isoquercitrin, hyperoside, astilbin, miquelianin, I3,I18-biapigenin) and phenolic acids (chlorogenic acid, 3-O-coumaroylquinic acid) [17]. Hypericin (2) and hyperforin (3) synergistically block growth of leukemic K562 and U937 cells [18]. Hypericin is a polycyclic quinone mainly used in photodynamic therapy: in the presence of light and oxygen, hypericin generates superoxide radicals and singlet oxygen molecules that kill tumor cells [19]. Upon photoactivation, hypericin inhibits colony formation of SKBR-3, a HER-2-overexpressing human breast adenocarcinoma cell line, by degrading HER2 thus reducing this signaling cascade [20]. Moreover, hypericin down-regulates expression of HER2 at mRNA and protein levels in SKBR-3 and MCF-7 breast adenocarcinoma cell lines [21].

Resveratrol (4) (3,4',5 tri-hydroxystilbene), a biflavonoid stilbene from the skin of dark grapes (*V. vinifera*), was shown to delay the development of spontaneous mammary tumors by down-regulating expression of HER-2/neu gene expression [22] and growth factor heregulin- β 1 (HRG- β 1)-mediated metalloproteinase (MMP)-9 expression in human breast cancer cells. This leads to the inhibition of tumorigenicity and metastasis in breast cancer cells as HRG- β 1 usually activates the HER-2 signaling pathway through induction of heterodimeric complexes of HER-2 with HER-3 or HER-4 [23].

2.2. Cell cycle machinery

Continuous dividing ability can be abrogated by blocking cells in G1, S, G2 or M phases of the cell cycle. Inhibition of these mechanisms can be mediated by growth-inhibitory signals acting as tumor suppressors (p53 and retinoblastoma (RB) suppressor) proteins or by cyclins and cyclin dependent kinases (Cdks), that mediate cell cycle phase transition [24]. Cell cycle progression can also be regulated at the level of cell division cycle (Cdc) 25 dual-specificity phosphatases, important regulators of cell cycle progression [25].

Cell cycle modulators (Table 2) are found in popular dietary such as in *Rosmarinus officinalis* (rosemary) and *Allium* vegetables (garlic and onion). Rosemary is an herbal spice initially used as divinatory herb, then as a spice in Mediterranean cooking and finally in traditional medicine to improve memory and relieve pain. This plant contains many active components including caffeic acid, carnosol, carnosic acid, rosmarinic acid and ursolic acid [26]. Carnosol (5) and carnosic acid (6) were described to significantly increase the doubling time of colorectal Caco-2 cells and to inhibit their proliferation by inducing predominantly G2/M cell cycle arrest. This cell cycle arrest occurred after pro-metaphase in response to carnosol and caused increase in cyclin B1 protein expression whereas carnosic acid arrested cells prior to pro-metaphase and reduced cyclin A levels [27]. Similarly, *A. sativum* L. (garlic) served for thousands of years in folklore and traditional herbal traditions to increase strength [28]. Many of the effects of garlic have been attributed to sulfur-containing compounds that result from the metabolization of allicin [29], a major component in freshly crushed garlic, formed from alliin by allinase. Allicin gets rapidly metabolized into diallyl sulfide, diallyl disulfide, diallyl trisulfide, ajoene, S-allylmercaptocysteine, S-allyl cysteine and vinyl dithiines [30]. Allicin metabolites, diallyl polysulfides (7), were reported to be strong inducers of early mitotic arrest as they induce accumulation of phosphorylated histone 3 at serine 10, aberrant tubulin depolymerization (dotted-like pattern of α -tubulin) that prevents the formation of normal spindle microtubules and

interrupt microtubular dynamics, thereby leading to G2/M arrest of U937 cells [31]. Organosulfur compounds (OSCs) and mainly tetrasulfides isolated from *A. sativum* (garlic) and *Allium cepa* (onion) are able to decrease growth of sensitive (MCF-7) and resistant (Vcr-R) human breast carcinoma cells, human colon cancer HCT116 cells and human lymphoma U937 cells by inhibiting Cdc25 phosphatases and by inducing G2/M cell cycle arrest [32,33]. Resveratrol (4) (*V. vinifera*) inhibits human MCF7, SW480, HCE7, Seg-1, Bic-1, and HL60 cancer cell proliferation by decreasing expression of cyclin A, cyclin B1, D1 and β -catenin and by arresting cells in S phase [34]. Licochalcone-A (8), a flavonoid isolated from the root of licorice *Glycyrrhiza glabra* L. was reported to impact cell cycle progression as it arrests PC-3 prostate cancer cells in G2/M by suppressing cyclin B1 and cdc2 expression. It also inhibits S780-phosphorylation of retinoblastoma (Rb), decreases expression of transcription factor E2F concurrently with the reduction of cyclin D1 and down-regulation of CDK 4 and 6 expression as well as proliferating cell nuclear antigen (PCNA) [35].

Compounds from non-dietary plants also affect cell cycle machinery. *Arnica montana* contains helenalin (9), a naturally occurring sesquiterpene lactone that inhibits cell proliferation and tumor growth by inducing cell cycle arrest in G2/M of human Jurkat lymphoblastic CD4+ T cells by accumulating cell cycle regulator proteins p21 (WAF/CIP1), p27 (KIP1) and cyclin D2, and decreasing cyclin A and B1 [36]. Parthenolide (10), a sesquiterpene lactone derived from the medicinal herbal feverfew (*Tanacetum parthenium*), inhibits invasive ability of bladder cancer 5637 cells through the induction of cell cycle arrest in G1 phase by modulation of cyclin D1 and phosphorylated CDK2 [37] and by impairing cervix tumor progression by reversing tubulin accumulation in HeLa tumor cells through the inhibition of tubulin carboxypeptidase activity [38].

2.3. Immune system

Tumors cells elaborate several strategies (e.g. low immunogenicity) to evade their detection and destruction by the immune system. Natural killers (NK) cells belong to the main components of the innate immune system responsible for direct tumor cell destruction [39].

Among European medieval plant extracts, *A. sativum* (garlic) possess strong immuno-modulatory properties and can significantly reduce cancer risk by maintaining immune stimulation. Garlic compounds prevent suppression of immune response in transplanted murine bladder tumor MBT2 cells by stimulating proliferation of lymphocytes and macrophage phagocytosis, by inducing the infiltration of macrophages and lymphocytes in transplanted tumors, by inducing splenic hypertrophy, by stimulating release of interleukin-2, tumor necrosis factor (TNF)- α and interferon (IF)- γ and by enhancing natural killer (NK) cell, and lymphokine-activated killer cell activity [40]. Mistletoe extracts from *Viscum album* L. stimulate different functions of the immune system. Extracts stimulate NK cell-mediated cytotoxicity *in vitro* as well as indirectly in a cytokine-like manner. Moreover, clinical application of mistletoe extracts or isolated lectins increase both number and activity of NK cells in peripheral blood in a dose-dependent manner [41,42]. Resveratrol (4) enhances NK cytotoxicity *via* NK cell receptor NKG2D-dependent c-Jun N-terminal kinase (JNK) and extracellular regulated kinase (ERK)-1/2 pathways [43] and affects human immune cell functions by modulating cytokine production of CD4+ and CD8+ T cells [44].

2.4. Replicative immortality and genomic modifications

The indefinite proliferation capacity of cancer cells is also related to their uncontrolled replication potential. Normal cells are

programed to die after a limited number of replications due to loss of telomeric DNA sequences, located at chromosome ends. In cancer cells, telomeres are continuously elongated and maintain their length due to the up-regulated telomerase activity. Telomerases are specialized DNA polymerases that synthesize and add hexameric repeats (TTAGGG) to the end of telomeric DNA. Telomerase reverse transcriptase (hTERT) is the catalytic subunit of the enzymatic telomerase complex, together with the telomerase RNA component (TERC) [45]. Two compounds from flowers affect hTERT (Table 2): Crocin (11), the carotenoid component of the European saffron, *Crocus sativus* [46] as well as silymarin (14) from *Silybum marianum* [47] were shown to decrease telomerase activity in HepG2 hepatic cancer cells and in leukemic cells by down-regulating expression of the catalytic subunit of hTERT. Similarly, helenalin (9), extracted from *A. montana* appears as a potent and selective inhibitor of human telomerase as it can inactivate telomerase directly in a concentration and time dependent manner and decrease expression of hTERT in hematopoietic cancer cells [48].

Replicative immortality is also regulated by epigenetic mechanisms including DNA methylation [49] and histone modifications [50] that affect chromatin structure and function including gene transcription, DNA repair, and DNA replication. DNA methylation is an enzymatic process catalyzed by DNA methyltransferase (DNMT) that regulate DNA hyper- or hypomethylation associated with transcriptional gene silencing and gene activation respectively. Histone acetylation is based on the activity of two enzymes: histone acetyl transferases (HATs) and histones deacetylases (HDACs) that regulate the conformation of chromatin structure to facilitate or hinder the association of DNA repair proteins or transcription factors and co-factors to chromatin. Both enzymatic systems can be considered as interesting targets for natural compounds (Table 2).

A. sativum (garlic)-derived compounds, namely allyl mercaptan and diallyl sulfide (12) were both shown to modulate HDAC activity by inhibiting deacetylase activity and increasing histone hyperacetylation and p21 (waf1/cip1) expression in human Caco-2 and HT29 colon cancer cells *in vitro* and *in vivo* [51]. Resveratrol (4) leads to a decrease of the level of expression and enzymatic activity of histone/protein deacetylase SIRT1 and to a marked increase in K373-acetylated p53 and lysine-acetylated FOXO3a in Hodgkin lymphoma (HL)-derived L-428 cells [52]. This natural compound is also reported to decrease the transcription of DNMT1, 3a, and 3b as well as protein levels of HDAC1 and MeCP2 in breast cancer tissues [53]. The sesquiterpene lactone parthenolide (10) was shown to specifically deplete HDAC1 protein without affecting the class I/II HDACs. HDAC1 depletion occurred through proteasomal degradation and affected transcription [54]. Finally, apigenin (1) (4',5,7-trihydroxyflavone) inhibits class I HDACs (HDAC1 and HDAC3) that results in global histone H3 and H4 acetylation and localized hyperacetylation of histone H3 on the p21/waf1 promoter that leads finally to chromatin remodeling, growth arrest and apoptosis in human PC-3 and 22Rv1 prostate cancer cells *in vitro* and *in vivo* [55].

2.5. Invasion and metastasis

Metastasis and invasion are characteristics of highly malignant cancers with poor clinical outcome. Metastasis is a multi-step event involving proliferation of the primary tumor, detachment of metastatic cancer cells from primary tumor, migration through blood and lymphatic microenvironment, adhesion to the extracellular matrix and invasion of tissue at secondary sites. This signaling cascade is highly related to the epithelial–mesenchymal transition (EMT) process implicating key components namely E-cadherin,

cell–cell adhesion molecules, matrix-metalloproteinases (MMPs) and cytokeratins [56].

The dried flower heads or entire flowers of *Calendula officinalis* commonly called marigold, were originally used by folk medicine healers and in traditional medicine for their anti-inflammatory, anti-bacterial, anti-fungal and anti-viral, antipyretic, anti-oedematous and cicatrizing effects. Biological potential of this plant could be linked to various molecules including coumarins, flavonoids (e.g. quercetin, protocatechuic acid, isoquercetrin), chlorogenic acid, caffeic acid, vanillic acid, triterpenoids, rutin, syringic acid, faradiol, oleanic acid, β -amyrin, β -amyrin acetate and alkaloid narcissin [57]. Flower extracts were reported to inhibit metastasis of B16F-10 melanoma cells in C57BL/6 mice by lowering the ability of cancer cells to enter the blood stream and by inhibiting the expression of MMP-2, MMP-9, prolyl hydroxylase and lysyl oxidase through the activation of tissue inhibitor metalloproteinase TIMP-1 and TIMP-2 proteins, specific inhibitors of MMP hydrolytic activity [58].

Both carnosol (5) [59] and carnosic acid (6) [60], two components of Rosemary, were shown to decrease MMP-9 expression level and to reduce activity of secreted proteases such as urokinase plasminogen activator (uPa) that lead to the inhibition of cell adhesion, migration and invasion of highly metastatic mouse melanoma B16F-10 cells and of HT29, Caco-2 and LoVo colorectal cancer cell lines. Apigenin (1), a flavonoid isolated from *M. chamomilla*, inhibits migration and invasion of human ovarian A2780 and prostate metastatic PC-3M cancer cells through inhibition of focal adhesion kinase (FAK) expression and activation [61]. FAK is a non-receptor protein tyrosine kinase downstream of integrins and growth factor receptors, that plays an important role in migration and invasion of cancer cells. It also leads to formation of exaggerated filopodia that show accumulation of focal adhesion molecules at their tips [62]. *A. sativum* also appears as a potent inhibitor of invasion, motility and metastatic potential of cancer cells as its organosulfur [63] and S-allylmercaptocysteine (13) [64] components were shown to inhibit MMP-2, -7, and -9 expression, to up-regulate cell-adhesion molecule E-cadherin, to induce morphologic EMT changes and to decrease tumor cell intravasation. Similarly, resveratrol (4) is also considered a potent inhibitor of migration and invasion of multiple myeloma (RPMI 8226, U266, and KM3) cell lines by inhibiting constitutive expression of MMP-2 and MMP-9 proteins and by suppressing their gelatinolytic activity [65].

Hyperforin (3), isolated from *H. perforatum*, prevents cancer cell dissemination and metastatic growth as it inhibits constitutive ERK 1/2 activity and reduces MMP-2 and MMP-9 secretion in human HT-1080 human fibrosarcoma and SK-N-BE neuroblastoma. It subsequently inhibits HT-1080 cell chemoinvasion potential and reduces the number of lung metastases [66].

Silybin (14), the major flavonoid of *S. marianum*, reverses EMT and subsequently suppresses invasive property of metastatic prostate cancer cells. This compound up-regulates transcription of cytokeratin-18 and down-regulates vimentin, MMP-2, ZEB1 and SLUG transcription factors, two major EMT regulators [67].

2.6. Angiogenesis

Angiogenesis, the process of formation of new blood vessels from the host vasculature, is essential for tumor supply in oxygen and nutrients but also for the evacuation of metabolic products in order to maintain tumor growth and metastasis. Angiogenic stimuli activate endothelial cells that subsequently undergo phenotypical changes that trigger release of proteases allowing them to degrade the extracellular matrix, migrate, proliferate, avoid apoptosis and finally differentiate into new vessels. This process is mediated by several angiogenic growth factors such as

fibroblast growth factors, angiogenin, and vascular endothelial growth factor (VEGF), a molecular marker of angiogenesis most often up regulated in cancer. Binding of VEGF to VEGFR tyrosine kinases receptors leads to receptor dimerization and phosphorylation that activates a downstream signaling pathway, resulting in up-regulation of genes involved in endothelial cell proliferation, survival, vascular permeability and cell migration signaling pathways [68]. VEGF expression was inhibited by silibinin in MCF-7 breast cancer cells through suppression of the Raf/MEK/ERK pathway [69].

Hyperforin (**3**) from *H. perforatum* was reported to decrease human umbilical vascular endothelial HUVEC cell migration in a dose dependent manner: it abrogates capillary-tube formation and restrains their ability to organize a capillary-like network essential for endothelial cell modulation during angiogenesis [70]. This phloroglucinol also decreases the release of VEGF from leukemic cells obtained from patients with B-cell lymphocytic leukemia (B-CLL) and prevents the formation of microtubules by human bone marrow endothelial cells, evidencing its capacity to inhibit vessel formation [71]. Similarly, carnosol (**5**) and carnosic acid (**6**), two major diterpenes from *R. officinalis* inhibit organization of endothelial cells in a three-dimensional network of tubes (capillary tube formation), the migratory capability of endothelial cells through the extracellular matrix and the capability to degrade the basement membrane and the remodeling of the extracellular matrix, three essential steps of *in vivo* angiogenesis. These two diterpenes also efficiently decrease MMP-2 activity of endothelial cells [72].

Diallylsulfides (**12**), isolated from *A. sativum* also induce antiangiogenic activity as they are able to inhibit endothelial cell proliferation and tumor directed capillary formation through negative regulation of proangiogenic factors such as IL-1 β , IL-6, TNF- α , granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF) and VEGF and the expression of antiangiogenic factors such as IL-2 and TIMP in B16F-10 melanoma cells [73].

2.7. Cell death signaling

Another important feature of cancer cells consists in their ability to escape programmed cell death, usually affecting normal cells to maintain tissue homeostasis. Mechanisms of cell death (mitotic catastrophe, necrosis, autophagy and apoptosis) are highly described in the literature [74,75]. The apoptotic machinery is based on upstream regulators and downstream effectors. This process can be initiated by intracellular stress signals including mitochondrial signal, stress or DNA damage and extracellular death-inducing signals like Fas ligand or Fas receptor. It consists of a cascade of events triggered by a balance between pro-apoptotic (Bax, Bak, Bim, Noxa, PUMA, etc.) and anti-apoptotic (Mcl-1, Bcl-2, Bcl-xL, etc.) proteins belonging to the Bcl-2 family.

Dietary plants, flowers and their bioactive components used in medieval European medicinal traditions have been abundantly studied and defined as potential inducers of cancer cell death by apoptosis (Table 2). Among the large source of bioactive molecules issued from dietary source, *A. sativum* (allicin) induces apoptosis in SGC-7901 gastric cancer cells through activation of both intrinsic mitochondrial and extrinsic Fas/FasL mediated-pathways as it induces cytochrome c release from the mitochondria and increased caspase-3, -8, and -9 activation, with concomitant up-regulation of Bax and Fas expression in tumor cells [76]. Many allicin metabolites (tetrasulfides (**7**), ajoene (**15**), S-allylmercaptocysteine (**13**)) were described as good inducers of cancer cell death. Diallylpolsulfides were shown to induce human colon cancer HCT116 and human lymphoma U937 cell death by apoptosis by counteracting different anti-apoptotic Bcl-2 family members (Bcl-xL, Bad and Bcl-2), by promoting the activation of Bax and Bak,

cytochrome c release into the cytoplasm, Bad dephosphorylation, caspase activation, nuclear fragmentation and phosphatidylserine exposure [33]. Resveratrol (**4**) also down-regulates the expression of the anti-apoptotic proteins Bcl-2, Bcl-xL and X-inhibitor of apoptosis (IAP) protein and up-regulates the expression of Bax pro-apoptotic protein in RPMI 8226, U266, and KM3 myeloma [65]. Apigenin (**1**), isolated from various flavonoid-containing dietary plants, was reported to induce apoptotic cell death in many cancer cell types. In multiple myeloma, this compound down-regulates expression of the anti-apoptotic proteins Mcl-1, Bcl-2, Bcl-xL, XIAP and survivin [77] and in human lung cancer H460 cells it induces apoptosis through caspase- and mitochondria-dependent pathways by down-modulation of the protein expression of Bid, Bcl-2, procaspase-8; up-regulation of protein levels of Bax, caspase-3, AIF, cytochrome c, GRP78 and GADD153; and decreased of the levels of mitochondrial membrane potential [78].

Cell death inducers were also found in flowers such as Rosemary from which, bioactive carnosol (**5**) and carnosic acid (**6**) compounds induce leukemic HL60 and fibrosarcoma HT1080 cell death by apoptosis by inducing DNA fragmentation, by increasing the number of cells in sub-G1 and by activating the cleavage of caspase-3/7 *in vitro* [72]. Carnosol (**5**), also induces apoptotic cell death of acute lymphoblastic leukemia cells subsequently to the loss of nuclear DNA, externalization of cell membrane phosphatidylserine, depolarization of mitochondrial membranes and down-regulation of Bcl-2 expression [79]. *C. sativum* contains crocin (**11**), a pigment that induces gastric adenocarcinoma (AGS) cell death by apoptosis through the increase of sub-G1 population, of Bax/Bcl-2 ratio and the activation of caspases [80].

Licochalcone-A (**8**) and isoliquiritigenin (**16**) isolated from *G. glabra* induce apoptosis in MCF-7, HL-60 and human gastric cancer MGC-803 cell lines by decreasing Bcl-2 expression and modifying the Bcl-2/Bax ratio, by decreasing Ψ_m , by increasing the number of cells in subG1. Eventually, cell shrinkage, chromatin condensation, DNA ladder formation and cleavage of PARP are observed [81,82]. Finally, hyperforin (**3**) from *H. perforatum* activates the intrinsic mitochondria-mediated apoptosis pathway through the loss of Ψ_m and subsequent mitochondrial morphological changes, release of cytochrome c as well as caspases-9 and -3 activation in MT-450 breast carcinoma cells and inhibits the growth of autologous MT-450 breast carcinoma in immunocompetent Wistar rats [83].

2.8. Aberrant metabolism

Due to their elevated proliferative potential, cancer cells need to adjust and re-program their energy metabolism in order to fuel cell growth and division [10].

Helenaalin (**9**) from *A. montana* was shown to inhibit DNA synthesis and DNA polymerase activity in tumor cells. This natural compound blocks protein synthesis and increases the concentration of adenosine 3',5'-monophosphate, interferes with glycolytic and mitochondrial energy processes and inhibits cholesterol synthesis resulting in lower serum cholesterol levels in CF1 male mice bearing Ehrlich ascites tumors [84].

Resveratrol (**4**) induces the expression of phase II enzymes as this compound increases the mRNA level expression of three metabolizing enzymes, two isoforms of UDP-glucuronosyltransferases, UGT1A1 and UGT2B7 and a sulfotransferase, ST1E1 in human hepatoblastoma HepG2 cells [85].

Arctigenin (**17**) from *Arctium lappa* L. appears as a potent inducer of tumor cell death as this compound selectively promotes glucose-starved A549 lung cancer cells to undergo necrosis by inhibiting mitochondrial respiration. Arctigenin blocks cellular energy metabolism in glucose-starved tumor cells by depleting intracellular ATP [86]. Silybin (**14**) from *S. marianum* was also

shown to impact glucose metabolism as it inhibits cellular uptake of glucose in 3T3-L1 adipocyte cell models by directly interacting with glucose transporters (GLUT). [87].

2.9. Tumor-related inflammation

Inflammation is a fundamental protective process that is also considered an essential enabling factor in the pathogenesis of many chronic human diseases, including cancer. Tumor microenvironment is regulated by inflammatory cells and by mediators and effectors of inflammation. Among the panel of molecules involved in cancer-related inflammation, transcription factors such as NF- κ B and signal transducer and activator of transcription (STAT) as well as COX-2 and major inflammatory cytokines such as IL-1 β , IL-6 and IL-23 and TNF- α appear as key endogenous factors [88].

Helienalin (**9**) from *A. montana* was shown to suppress the nuclear translocation of NFATc2, responsible of the transcriptional activation of genes encoding for CD25, IL-2 and IFN- γ in activated human CD4+ T Jurkat cells [36]. Moreover this sesquiterpene lactone abrogates NF- κ B signaling by selectively alkylating the p65 subunit of NF- κ B in both Jurkat [89] and human ovarian A2750 cancer cells [90].

The phenolic diterpene, carnosol (**5**), extracted from *R. officinalis* was also reported to prevent degradation of I κ B- α and subsequently decreases the nuclear translocation of NF- κ B (p65) and c-Jun to inhibit AP-1 and NF- κ B transcriptional activity in a dose dependent manner in B16/F10 melanoma cells [59]. Parthenolide (**10**) from *T. parthenium* also affects NF- κ B and STAT signaling pathway by acting at the transcriptional level and by direct inhibition of associated kinases IKK- β [91].

Hypericin (**2**) exhibits anti-inflammatory properties due to its inhibitory effects on the expression of pro-inflammatory genes like COX-2, IL-6, and inducible nitric-oxide synthase (iNOS) in human epithelial cell lines, alveolar A549/8 and colon DLD-1 cells. This naphthodianthrone also down-regulates the DNA binding activity of the transcription factor STAT-1 α that results from the initial reduction of Janus kinase (JAK)-2 activity leading to the decrease of tyrosine phosphorylation of the STAT-1 α protein. All these events subsequently disrupt gene transcription [92].

3. Clinical use of European medieval plant compounds

It appears that many plants originally used in European medieval traditions contain promising compounds for preclinical anti-cancer research. These plant-derived secondary metabolites efficiently impact all hallmarks and enabling characteristics of cancer including the essential pathways driving tumor growth, invasion, angiogenesis, immune system, inflammation, replicative immortality and cell survival. As for compounds originating from ayurvedic and traditional Chinese medicines, the bioactive structural part of the European compounds from medieval traditions consists mostly of polyphenols, flavonoids, terpenoids, polysulfides and polycyclic quinone that are mainly used *in vitro* in micromolar range of concentration (Table 2). Interestingly, bioactive compounds can be extracted from several plants or flowers growing in Europe (e.g. caffeic acid in both *C. officinalis* and *R. officinalis*; quercetin, chlorogenic acid and isoquercetin are found in both *C. officinalis* and *H. perforatum*; apigenin in both *Matriarca camomilla* and *C. officinalis* and in many other plants and vegetables) (Fig. 1).

To be considered as a good candidate for future clinical investigations, a compound should be active/cytotoxic against multiple types of cancer cells by targeting a large panel of cancer hallmarks in low micromolar range of concentrations with reduced side effects and a good differential toxicity. Moreover, for future

pharmaceutical development, a compound with interesting bioactivities should be efficiently extracted from natural sources or synthesis should be reasonably achievable. Stability of the selected compounds is certainly an issue as many of the naturally occurring compounds do not present the required stability compatible with pharmaceutical use. Accordingly, synthesis of derivatives of natural compounds could provide more stable, druggable molecules. Moreover, bioavailability and absorption of compounds needs to be most often improved. So far only a few compounds could be introduced into clinical trials whereas most remain to be further characterized in preclinical assays.

Among the bioactive compounds from European medieval plants cited above, resveratrol, garlic compounds and hypericin are under clinical evaluation (<http://www.clinicaltrials.gov>). Clinical studies in course on resveratrol aim to evaluate its effect on colon cancer compared to healthy patients, whereas those on garlic compounds focus on its bioavailability in humans evaluating its benefits in chemoprevention but also in combination with classical chemotherapy (e.g. docetaxel in locally advanced or metastatic breast cancer patients). Hypericin was described in a Phase II clinical trial as a sensitizer. Hypericin-mediated photodynamic therapy leads to improvement of skin lesions in a majority of treated patients with cutaneous T-cell lymphoma [93]. Moreover, due to its excellent fluorescence properties, hypericin is a good tool for diagnosis of malignant gliomas as it colors differentially normal and tumor tissue [94]. Hypericin offers thus new therapeutic possibilities depending on the applied wavelength of irradiation, it guides diagnosis and can mediate tumor eradication by photodynamic therapy. Based on the already published findings, structure-activity relationship will allow to improve anticancer potential of other known molecules and to investigate mechanisms of action to push them toward preclinical and clinical studies.

Acknowledgements

MHT is supported by Télévie grants (Fonds National de la Recherche Scientifique, Belgium). FG is a recipient of the European Community's Seventh Framework Programme (FP7/2007–2013) under grant agreement 215009 RedCat. Research at the Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire du Cancer (LBMCC) is financially supported by "Recherche Cancer et Sang" foundation, by «Recherches Scientifiques Luxembourg» asbl, by «Een Häerz fir Kriibskrank Kanner» association, the Action Lions "Vaincre le Cancer" Luxembourg, The Fonds National de la Recherche Luxembourg, Télévie Luxembourg and the Foundation for Scientific Cooperation between Germany and Luxemburg for additional support. Further support was received from the European Union (Interreg IVa project "Corena"). MD is supported by the National Research Foundation (NRF) by the MEST of Korea for Tumor Microenvironment Global Core Research Center (GCRC) grant [grant number 2012-0001184]; by the Seoul National University Research grant and by the Research Settlement Fund for the new faculty of SNU.

References

- [1] Riddle JM. History as a tool in identifying new old drugs. *Adv Exp Med Biol* 2002;505:89–94.
- [2] De Vos P. European materia medica in historical texts: longevity of a tradition and implications for future use. *J Ethnopharmacol* 2010;132:28–47.
- [3] Karpozilos A, Pavlidis N. The treatment of cancer in Greek antiquity. *Eur J Cancer* 2004;40:2033–40.
- [4] Mann J. Natural products in cancer chemotherapy: past, present and future. *Nat Rev Cancer* 2002;2:143–8.
- [5] Teiten MH, Eifes S, Dicato M, Diederich M. Curcumin—the paradigm of a multi-target natural compound with applications in cancer prevention and treatment. *Toxins (Basel)* 2010;2:128–62.
- [6] Orlikova B, Diederich M. Power from the garden: plant compounds as inhibitors of the hallmarks of cancer. *Curr Med Chem* 2012;19:2061–87.

- [7] Sawadogo WR, Schumacher M, Teiten MH, Dicato M, Diederich M. Traditional West African pharmacopeia, plants and derived compounds for cancer therapy. *Biochem Pharmacol* 2012;84:1225–40.
- [8] Watkins F, Pendry B, Corcoran O, Sanchez-Medina A. Anglo-Saxon pharmacopoeia revisited: a potential treasure in drug discovery. *Drug Discov Today* 2011;16:1069–75.
- [9] Liolios CC, Graikou K, Skaltsa E, Chinou I. Dittany of Crete: a botanical and ethnopharmacological review. *J Ethnopharmacol* 2010;131:229–41.
- [10] Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011;144:646–74.
- [11] Yarden Y, Ullrich A. Growth factor receptor tyrosine kinases. *Annu Rev Biochem* 1988;57:443–78.
- [12] Mitsudomi T, Yatabe Y. Epidermal growth factor receptor in relation to tumor development: EGFR gene and cancer. *FEBS J* 2010;277:301–8.
- [13] McKay DL, Blumberg JB. A review of the bioactivity and potential health benefits of chamomile tea (*Matricaria recutita* L.). *Phytother Res* 2006;20:519–30.
- [14] Yin F, Giuliano AE, Van Herle AJ. Signal pathways involved in apigenin inhibition of growth and induction of apoptosis of human anaplastic thyroid cancer cells (ARO). *Anticancer Res* 1999;19:4297–303.
- [15] Masuelli L, Marzocchella L, Quaranta A, Palumbo C, Pompa G, Izzi V, et al. Apigenin induces apoptosis and impairs head and neck carcinomas EGFR/Erbb2 signaling. *Front Biosci* 2011;16:1060–8.
- [16] Klemow KM, Bartlow A, Crawford J, Kocher N, Shah J, Ritsick M. Medical attributes of St. John's Wort (*Hypericum perforatum*). In: Benzie IFF, Wachtel-Galor S, editors. *Herbal medicine: biomolecular and clinical aspects*. Boca Raton (FL): CRC Press; 2011 (Chapter 11).
- [17] Tatsis EC, Boeren S, Exarchou V, Trognan AN, Vervoort J, Gerothanassis IP. Identification of the major constituents of *Hypericum perforatum* by LC/SPE/NMR and/or LC/MS. *Phytochemistry* 2007;68:383–93.
- [18] Hostanska K, Reichling J, Bommer S, Weber M, Saller R. Hyperforin a constituent of St John's wort (*Hypericum perforatum* L.) extract induces apoptosis by triggering activation of caspases and with hypericin synergistically exerts cytotoxicity towards human malignant cell lines. *Eur J Pharm Biopharm* 2003;56:121–32.
- [19] Agostinis P, Vantighem A, Merlevede W, de Witte PA. Hypericin in cancer treatment: more light on the way. *Int J Biochem Cell Biol* 2002;34:221–41.
- [20] Koval J, Mikes J, Jendzelovský R, Kello M, Solar P, Fedorocko P. Degradation of HER2 receptor through hypericin-mediated photodynamic therapy. *Photochem Photobiol* 2010;86:200–5.
- [21] Solar P, Ferenc P, Koval J, Mikes J, Solarova Z, Hrcakova G, et al. Photoactivated hypericin induces downregulation of HER2 gene expression. *Radiat Res* 2010.
- [22] Provinciali M, Re F, Donnini A, Orlando F, Bartozzi B, Di Stasio G, et al. Effect of resveratrol on the development of spontaneous mammary tumors in HER-2/neu transgenic mice. *Int J Cancer* 2005;115:36–45.
- [23] Tang FY, Chiang EP, Sun YC. Resveratrol inhibits heregulin-beta1-mediated matrix metalloproteinase-9 expression and cell invasion in human breast cancer cells. *J Nutr Biochem* 2008;19:287–94.
- [24] Canavese M, Santo L, Raje N. Cyclin dependent kinases in cancer: potential for therapeutic intervention. *Cancer Biol Ther* 2012;13:451–7.
- [25] Boutros R, Lobjos V, Ducommun B. CD25 phosphatases in cancer cells: key players? Good targets. *Nat Rev Cancer* 2007;7:495–507.
- [26] Senorans FJ, Ibanez E, Cavero S, Tabera J, Reglero G. Liquid chromatographic-mass spectrometric analysis of supercritical-fluid extracts of rosemary plants. *J Chromatogr A* 2000;870:491–9.
- [27] Visanji JM, Thompson DG, Padfield PJ. Induction of G2/M phase cell cycle arrest by carnosol and carnosic acid is associated with alteration of cyclin A and cyclin B1 levels. *Cancer Lett* 2006;237:130–6.
- [28] Rivlin RS. Historical perspective on the use of garlic. *J Nutr* 2001;131:951S–4S.
- [29] Cerella C, Dicato M, Jacob C, Diederich M. Chemical properties and mechanisms determining the anti-cancer action of garlic-derived organic sulfur compounds. *Anticancer Agents Med Chem* 2011;11:267–71.
- [30] Hirsch K, Danilenko M, Giat J, Miron T, Rabinkov A, Wilchek M, et al. Effect of purified allicin, the major ingredient of freshly crushed garlic, on cancer cell proliferation. *Nutr Cancer* 2000;38:245–54.
- [31] Kelkel M, Cerella C, Mack F, Schneider T, Jacob C, Schumacher M, et al. ROS-independent JNK activation and multisite phosphorylation of Bcl-2 link diallyl tetrasulfide-induced mitotic arrest to apoptosis. *Carcinogenesis* 2012;33:2162–71.
- [32] Viry E, Anwar A, Kirsch G, Jacob C, Diederich M, Bagrel D. Antiproliferative effect of natural tetrasulfides in human breast cancer cells is mediated through the inhibition of the cell division cycle 25 phosphatases. *Int J Oncol* 2011;38:1103–11.
- [33] Cerella C, Scherer C, Cristofanon S, Henry E, Anwar A, Busch C, et al. Cell cycle arrest in early mitosis and induction of caspase-dependent apoptosis in U937 cells by diallyltetrasulfide (Al₂S₄). *Apoptosis* 2009;14:641–54.
- [34] Joe AK, Liu H, Suzui M, Vural ME, Xiao D, Weinstein IB. Resveratrol induces growth inhibition, S-phase arrest, apoptosis, and changes in biomarker expression in several human cancer cell lines. *Clin Cancer Res* 2002;8:893–903.
- [35] Fu Y, Hsieh TC, Guo J, Kunicki J, Lee MY, Darzynkiewicz Z, et al. Licochalcone-A, a novel flavonoid isolated from licorice root (*Glycyrrhiza glabra*), causes G2 and late-G1 arrests in androgen-independent PC-3 prostate cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;322:263–70.
- [36] Berges C, Fuchs D, Opelz G, Daniel V, Naujokat C. Helenalin suppresses essential immune functions of activated CD4+ T cells by multiple mechanisms. *Mol Immunol* 2009;46:2892–901.
- [37] Cheng G, Xie L. Parthenolide induces apoptosis and cell cycle arrest of human 5637 bladder cancer cells in vitro. *Molecules* 2011;16:6758–68.
- [38] Fonrose X, Ausseil F, Soleilhac E, Masson V, David B, Pouny I, et al. Parthenolide inhibits tubulin carboxypeptidase activity. *Cancer Res* 2007;67:3371–8.
- [39] Kim R, Emi M, Tanabe K. Cancer immunoevasion from immune surveillance to immune escape. *Immunology* 2007;121:1–14.
- [40] Lamm DL, Riggs DR. Enhanced immunocompetence by garlic: role in bladder cancer and other malignancies. *J Nutr* 2001;131:1067S–70S.
- [41] Schink M. Mistletoe therapy for human cancer: the role of the natural killer cells. *Anticancer Drugs* 1997;8(Suppl 1):S47–S51.
- [42] Braedel-Ruoff S. Immunomodulatory effects of *Viscum album* extracts on natural killer cells: review of clinical trials. *Forsch Komplementmed* 2010;17:63–73.
- [43] Lu CC, Chen JK. Resveratrol enhances perforin expression and NK cell cytotoxicity through NKG2D-dependent pathways. *J Cell Physiol* 2010;223:343–51.
- [44] Falchetti R, Fuggetta MP, Lanzilli G, Tricarico M, Ravagnan G. Effects of resveratrol on human immune cell function. *Life Sci* 2001;70:81–96.
- [45] Daniel M, Peek GW, Tollefsbol TO. Regulation of the human catalytic subunit of telomerase (hTERT). *Gene* 2012;498:135–46.
- [46] Noureini SK, Wink M. Antiproliferative effects of crocin in HepG2 cells by telomerase inhibition and hTERT down-regulation. *Asian Pac J Cancer Prev* 2012;13:2305–9.
- [47] Faezizadeh Z, Mesbah-Namin SA, Allameh A. The effect of silymarin on telomerase activity in the human leukemia cell line K562. *Planta Med* 2012;78:899–902.
- [48] Huang PR, Yeh YM, Wang TC. Potent inhibition of human telomerase by helenalin. *Cancer Lett* 2005;227:169–74.
- [49] Kulis M, Esteller M. DNA methylation and cancer. *Adv Genet* 2010;70:27–56.
- [50] Sawan C, Herceg Z. Histone modifications and cancer. *Adv Genet* 2010;70:57–85.
- [51] Nian H, Delage B, Pinto JT, Dashwood RH. Allyl mercaptan, a garlic-derived organosulfur compound, inhibits histone deacetylase and enhances Sp3 binding on the P21WAF1 promoter. *Carcinogenesis* 2008;29:1816–24.
- [52] Frazzi R, Valli R, Tamagnini I, Casali B, Latruffe N, Merli F. Resveratrol-mediated apoptosis of hodgkin lymphoma cells involves SIRT1 inhibition and FOXO3a hyperacetylation. *Int J Cancer* 2013;132:1013–21.
- [53] Mirza S, Sharma G, Parshad R, Gupta SD, Pandya P, Ralhan R. Expression of DNA methyltransferases in breast cancer patients and to analyze the effect of natural compounds on DNA methyltransferases and associated proteins. *J Breast Cancer* 2013;16:23–31.
- [54] Gopal YN, Arora TS, Van Dyke MW. Parthenolide specifically depletes histone deacetylase 1 protein and induces cell death through ataxia telangiectasia mutated. *Chem Biol* 2007;14:813–23.
- [55] Pandey M, Kaur P, Shukla S, Abbas A, Fu P, Gupta S. Plant flavone apigenin inhibits HDAC and remodels chromatin to induce growth arrest and apoptosis in human prostate cancer cells: in vitro and in vivo study. *Mol Carcinog* 2012;51:952–62.
- [56] Mierke CT. Physical break-down of the classical view on cancer cell invasion and metastasis. *Eur J Cell Biol* 2013;92:89–104.
- [57] Matysik G, Wojciak-Kosior M, Paduch R. The influence of *Calendula officinalis* flos extracts on cell cultures, and the chromatographic analysis of extracts. *J Pharm Biomed Anal* 2005;38:285–92.
- [58] Preethi KC, Siveen KS, Kuttan R. Inhibition of metastasis of B16F-10 melanoma cells in C57BL/6 mice by an extract of *Calendula officinalis* L. flowers. *Asian Pac J Cancer Prev* 2010;11:1773–9.
- [59] Huang SC, Ho CT, Lin-Shiau SY, Lin JK. Carnosol inhibits the invasion of B16/F10 mouse melanoma cells by suppressing metalloproteinase-9 through down-regulating nuclear factor-kappa B and c-Jun. *Biochem Pharmacol* 2005;69:221–32.
- [60] Barni MV, Carlini MJ, Cafferata EG, Puricelli L, Moreno S. Carnosic acid inhibits the proliferation and migration capacity of human colorectal cancer cells. *Oncol Rep* 2012;27:1041–8.
- [61] Hu XW, Meng D, Fang J. Apigenin inhibited migration and invasion of human ovarian cancer A2780 cells through focal adhesion kinase. *Carcinogenesis* 2008;29:2369–76.
- [62] Franzen CA, Amargo E, Todorovic V, Desai BV, Huda S, Mirzoeva S, et al. The chemopreventive bioflavonoid apigenin inhibits prostate cancer cell motility through the focal adhesion kinase/Src signaling mechanism. *Cancer Prev Res (Phila)* 2009;2:830–41.
- [63] Lai KC, Hsu SC, Kuo CL, Yang JS, Ma CY, Lu HF, et al. Diallyl sulfide, diallyl disulfide, and diallyl trisulfide inhibit migration and invasion in human colon cancer colo 205 cells through the inhibition of matrix metalloproteinase-2, -7, and -9 expressions. *Environ Toxicol* 2011.
- [64] Chu Q, Ling MT, Feng H, Cheung HW, Tsao SW, Wang X, et al. A novel anticancer effect of garlic derivatives: inhibition of cancer cell invasion through restoration of E-cadherin expression. *Carcinogenesis* 2006;27:2180–9.
- [65] Sun CY, Hu Y, Guo T, Wang HF, Zhang XP, He WJ, et al. Resveratrol as a novel agent for treatment of multiple myeloma with matrix metalloproteinase inhibitory activity. *Acta Pharmacol Sin* 2006;27:1447–52.
- [66] Dona M, Dell'Aica I, Pezzato E, Sartor L, Calabrese F, Della Barbera M, et al. Hyperforin inhibits cancer invasion and metastasis. *Cancer Res* 2004;64:6225–32.
- [67] Wu K, Zeng J, Li L, Fan J, Zhang D, Xue Y, et al. Silibinin reverses epithelial-to-mesenchymal transition in metastatic prostate cancer cells by targeting transcription factors. *Oncol Rep* 2010;23:1545–52.

- [68] Carmeliet P, Jain RK. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature* 2011;473:298–307.
- [69] Kim S, Choi JH, Lim HI, Lee SK, Kim WW, Kim JS, et al. Silibinin prevents TPA-induced MMP-9 expression and VEGF secretion by inactivation of the Raf/MEK/ERK pathway in MCF-7 human breast cancer cells. *Phytomedicine* 2009;16:573–80.
- [70] Martinez-Poveda B, Quesada AR, F Medina M.A.. Hyperforin, a bio-active compound of St. John's Wort, is a new inhibitor of angiogenesis targeting several key steps of the process. *Int J Cancer* 2005;117:775–80.
- [71] Quiney C, Billard C, Mirshahi P, Fourneron JD, Kolb JP. Hyperforin inhibits MMP-9 secretion by B-CLL cells and microtubule formation by endothelial cells. *Leukemia* 2006;20:583–9.
- [72] Lopez-Jimenez A, Garcia-Caballero M, Medina MA, Quesada AR. Anti-angiogenic properties of carnosol and carnosic acid, two major dietary compounds from rosemary. *Eur J Nutr* 2013;52:85–95.
- [73] Thejass P, Kuttan G. Antiangiogenic activity of Diallyl Sulfide (DAS). *Int Immunopharmacol* 2007;7:295–305.
- [74] Ouyang L, Shi Z, Zhao S, Wang FT, Zhou TT, Liu B, et al. Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. *Cell Prolif* 2012;45:487–98.
- [75] Jain MV, Paczulla AM, Klonisch T, Dimgba FN, Rao SB, Roberg K, et al. Interconnections between apoptotic, autophagic and necrotic pathways: implications for cancer therapy development. *J Cell Mol Med* 2013;17:12–29.
- [76] Zhang W, Ha M, Gong Y, Xu Y, Dong N, Yuan Y. Allicin induces apoptosis in gastric cancer cells through activation of both extrinsic and intrinsic pathways. *Oncol Rep* 2010;24:1585–92.
- [77] Zhao M, Ma J, Zhu HY, Zhang XH, Du ZY, Xu YJ, et al. Apigenin inhibits proliferation and induces apoptosis in human multiple myeloma cells through targeting the trinity of CK2, Cdc37 and Hsp90. *Mol Cancer* 2011;10:104.
- [78] Lu HF, Chie YJ, Yang MS, Lu KW, Fu JJ, Yang JS, et al. Apigenin induces apoptosis in human lung cancer H460 cells through caspase- and mitochondria-dependent pathways. *Hum Exp Toxicol* 2011;30:1053–61.
- [79] Dorrie J, Sapala K, Zunino SJ. Carnosol-induced apoptosis and downregulation of Bcl-2 in B-lineage leukemia cells. *Cancer Lett* 2001;170:33–9.
- [80] Hoshyar R, Bathaie SZ, Sadeghizadeh M. Crocin triggers the apoptosis through increasing the Bax/Bcl-2 ratio and caspase activation in human gastric adenocarcinoma, AGS, cells. *DNA Cell Biol* 2013;32:50–7.
- [81] Rafi MM, Vastano BC, Zhu N, Ho CT, Ghai G, Rosen RT, et al. Novel polyphenol molecule isolated from licorice root (*Glycyrrhiza glabra*) induces apoptosis, G2/M cell cycle arrest, and Bcl-2 phosphorylation in tumor cell lines. *J Agric Food Chem* 2002;50:677–84.
- [82] Ma J, Fu NY, Pang DB, Wu WY, Xu AL. Apoptosis induced by isoliquiritigenin in human gastric cancer MGC-803 cells. *Planta Med* 2001;67:754–7.
- [83] Schempp CM, Kirkin V, Simon-Haarhaus B, Kersten A, Kiss J, Termeer CC, et al. Inhibition of tumour cell growth by hyperforin, a novel anticancer drug from St. John's wort that acts by induction of apoptosis. *Oncogene* 2002;21:1242–50.
- [84] Lee KH, Hall IH, Mar EC, Starnes CO, ElGebaly SA, Waddell TG, et al. Sesquiterpene antitumor agents: inhibitors of cellular metabolism. *Science* 1977;196:533–6.
- [85] Lancon A, Hanet N, Jannin B, Delmas D, Heydel JM, Lizard G, et al. Resveratrol in human hepatoma HepG2 cells: metabolism and inducibility of detoxifying enzymes. *Drug Metab Dispos* 2007;35:699–703.
- [86] Gu Y, Qi C, Sun X, Ma X, Zhang H, Hu L, et al. Arctigenin preferentially induces tumor cell death under glucose deprivation by inhibiting cellular energy metabolism. *Biochem Pharmacol* 2012;84:468–76.
- [87] Zhan T, Digel M, Kuch EM, Stremmel W, Fullekrug J. Silybin and dehydrosilybin decrease glucose uptake by inhibiting GLUT proteins. *J Cell Biochem* 2011;112:849–59.
- [88] Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* 2010;140:883–99.
- [89] Lyss G, Knorre A, Schmidt TJ, Pahl HL, Merfort I. The anti-inflammatory sesquiterpene lactone helenalin inhibits the transcription factor NF-kappaB by directly targeting p65. *J Biol Chem* 1998;273:33508–16.
- [90] Lim CB, Fu PY, Ky N, Zhu HS, Feng X, Li J, et al. NF-kappaB p65 repression by the sesquiterpene lactone, Helenalin, contributes to the induction of autophagy cell death. *BMC Complement Altern Med* 2012;12:93.
- [91] Kwok BH, Koh B, Ndubuisi MI, Elofsson M, Crews CM. The anti-inflammatory natural product parthenolide from the medicinal herb Feverfew directly binds to and inhibits I kappa B kinase. *Chem Biol* 2001;8:759–66.
- [92] Tedeschi E, Menegazzi M, Margotto D, Suzuki H, Forstermann U, Kleinert H. Anti-inflammatory actions of St. John's wort: inhibition of human inducible nitric-oxide synthase expression by down-regulating signal transducer and activator of transcription-1alpha (STAT-1alpha) activation. *J Pharmacol Exp Ther* 2003;307:254–61.
- [93] Rook AH, Wood GS, Duvic M, Vonderheid EC, Tobia A, Cabana B. A phase II placebo-controlled study of photodynamic therapy with topical hypericin and visible light irradiation in the treatment of cutaneous T-cell lymphoma and psoriasis. *J Am Acad Dermatol* 2010;63:984–90.
- [94] Ritz R, Daniels R, Noell S, Feigl GC, Schmidt V, Bornemann A, et al. Hypericin for visualization of high grade gliomas: first clinical experience. *Eur J Surg Oncol* 2012;38:352–60.



Venus flytrap (*Dionaea muscipula* Solander ex Ellis) contains powerful compounds that prevent and cure cancer

François Gaascht¹, Mario Dicato¹ and Marc Diederich^{2*}

¹ Laboratory for Molecular and Cellular Biology of Cancer (LBMCC), Hôpital Kirchberg, Luxembourg, Luxembourg

² Department of Pharmacy, College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul, South Korea

Edited by:

Zigang Dong, University of Minnesota, USA

Reviewed by:

Arturo Sala, Brunel University, UK
UCL Institute of Child Health, UK
David Engelberg, The Hebrew University of Jerusalem, Israel

*Correspondence:

Marc Diederich, Department of Pharmacy, College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742, South Korea
e-mail: marcdiederich@snu.ac.kr

Chemoprevention uses natural or synthetic molecules without toxic effects to prevent and/or block emergence and development of diseases including cancer. Many of these natural molecules modulate mitogenic signals involved in cell survival, apoptosis, cell cycle regulation, angiogenesis, or on processes involved in the development of metastases occur naturally, especially in fruits and vegetables but also in non-comestible plants. Carnivorous plants including the Venus flytrap (*Dionaea muscipula* Solander ex Ellis) are much less investigated, but appear to contain a wealth of potent bioactive secondary metabolites. Aim of this review is to give insight into molecular mechanisms triggered by compounds isolated from these interesting plants with either therapeutic or chemopreventive potential.

Keywords: chemoprevention, therapy, natural compound, *Dionaea*

INTRODUCTION

Natural products derived from plants, animals, and microorganisms have traditionally been the main source of active medicinal compounds without a deep understanding of their mechanism of action. Emergence of resistance in different already known pathologies (cancer, bacterial infections) (1, 2), but also the emergence of other, yet incurable diseases (Alzheimer's disease, Parkinson's disease, AIDS . . .) (3), call for the discovery of novel therapeutic compounds and the improvement of efficiency of already known molecules (4, 5).

The term "secondary metabolites" refers to molecules, which are not directly involved in essential processes like development, growth, and reproduction compared to the primary metabolism. Synthesized by all living kingdoms (Archae, Bacteria, Protistae, Plantae, Fungi, and Animalia), these non-essential metabolites are different depending on the species and are classified according to their method of synthesis. Structurally highly diversified and complex and present in very small quantities, secondary metabolites account for often less than 1% of the total mass of organic carbon in the organism. Their level of synthesis can also depend on the physiological and the developmental stage of the organism but also environmental factors like the soil, climate, or weather. Synthesis of secondary metabolites can be induced after stimulation by stressors from diverse origins. Originally isolated from plants, recent researches have shown that some secondary metabolites are synthesized by symbiotic organisms like bacteria and not by the host organisms themselves and that other have symbiotic origins. The role of secondary metabolites is to ensure the survival of the organism in its environment. Some allow organisms to protect themselves against predators or herbivores, insects, pathogens but also to kill preys like snake and arthropod venoms or against other organisms for access to resources (light, water, and nutrients). Other metabolites can help to resist environmental

stress (drought, nutrient deficiencies), attract pollinating insects (by color and odor), or to ensure symbiosis with other organisms. To date, more than 200,000 different secondary metabolites have been discovered and described. Some have been diverted from their original use by human and are now used in commercial preparations such as dyes, drugs, or insecticides (6–12).

"NON-FOOD" PLANTS ARE ALSO AN ATTRACTIVE SOURCE OF MOLECULES WITH POTENTIAL CHEMOPREVENTIVE INTEREST

Various chemopreventive and therapeutic compounds have been isolated from food plants. We can notably mention, flavonoids (carrots) including chalcones, isothiocyanates (cabbage), lycopene (tomatoes), indoles, organosulfides (garlic), and polyphenols (curcumin) (13–19).

Many compounds can also be found in food preparations made with fruits or vegetables like resveratrol from red wine (20–22) or catechins and procyanidins and polyphenols from cocoa (23, 24) or quercetin and kaempferol from honey (25).

However, many "non-food" plants from all around the World are also attractive sources for molecules with potential chemopreventive interests (26–29).

The underwater world is also rich in bioactive molecules with chemopreventive and anti-tumor potential. Among these secondary metabolites discovered in animal, fungi, micro-organism, or marine plants we can mention, for example heteronemin and hemiasterlin (sponges), kahalalide F. (sea slug), naphthopyrones (echinoderm), didemnin B (tunicate), and amphidinolides (algae) (12, 18, 30–34).

THE VENUS FLYTRAP (*DIONAEA MUSCIPULA SOLANDER EX ELLIS*)

Different populations used carnivorous plants for hundreds of years in traditional medicine all around the World. In Europe

and North America, butterworts (*Pinguicula vulgaris*, *Pinguicula alpina*) were used for the treatment of wounds. Decoctions of butterworts and sundew (*Drosera rotundifolia*) were administered for their expectorant and antitussive properties to people with respiratory diseases like pertussis, bronchitis, and asthma but also to treat stomach pain and tuberculosis. Magic properties of sundews were also used for their aphrodisiac effects and their ability to promote delivery. Today this type of plant is used by the modern pharmaceutical industry in the preparation of syrups to treat coughs. The fresh juice secreted by the leaves of sundew is used for local application on warts or bunions (35–38).

In North America, roots and leaves of the purple pitcher plant *Sarracenia purpurea* were used by the endogenous population for its diuretic and laxative properties and also to treat fever, cough, and diabetes. The plant was also used to treat other infectious diseases like scarlet fever, smallpox, and measles. Plant decoctions were also prescribed to pregnant women to ease labor, to prevent sickness after childbirth and to treat absence of menstrual cycle (35–37, 39, 40).

In South-East Asia and in India, natives from local tribes used the pitcher plant *Nepenthes khasiana* as medical plant. They used juice of young flowers and of unopened pitchers or crushed pitcher powder to treat stomach pain and eye troubles (pain, cataract, night blindness), urinary troubles but also skin diseases. Preparations were also given to malaria, leprosy, and cholera patients (41–46).

The Venus flytrap (*D. muscipula* Solander ex Ellis), the only species of the genus *Dionaea*, is a carnivorous plant that grows in marshy areas of North and South Carolina states of the United States (Figure 1). To survive in these environments that are poor in nutrients, it has developed active traps to catch small prey (insects, spiders) that serve as an additional source of nutrients. The plant catches its prey with nectar produced by glands localized at the inner side of the trap and exposing an UV pattern. When the animal touches a sensitive trigger hair, a movement of ions is generated, producing an osmotic gradient that changes the size and shape of specialized cells of the trap that result in trap closure (47–49). Once the trap closes on the prey, other glands, also localized at the inner part of the trap, secrete a digestive acid liquid containing a number of enzymes (proteases, nucleases, phosphatases, and amylases) for digestion of the prey (50). Nutrients are released and then reabsorbed by the plant through both digestive glands and by endocytosis (51–53).

SECONDARY METABOLITES OF *DIONAEA MUSCIPULA*

Dionaea muscipula was also the subject of modern biomedical research. The analysis of the various different secondary metabolites (naphthoquinones, flavonoids, phenolic acids) isolated from the plant and identified (Table 1; Figure 2) revealed that they possess different interesting therapeutic properties (54–58).

NAPHTHOQUINONES

These pigment molecules are widespread in plants, lichens, fungi, and microorganisms and these molecules derive from the phenol synthesis pathway. In plants, they act as bactericide, insecticide, fungicide, and allelopathic agents (substances that promote or impede the growth of surrounding organisms) (70, 135, 136).

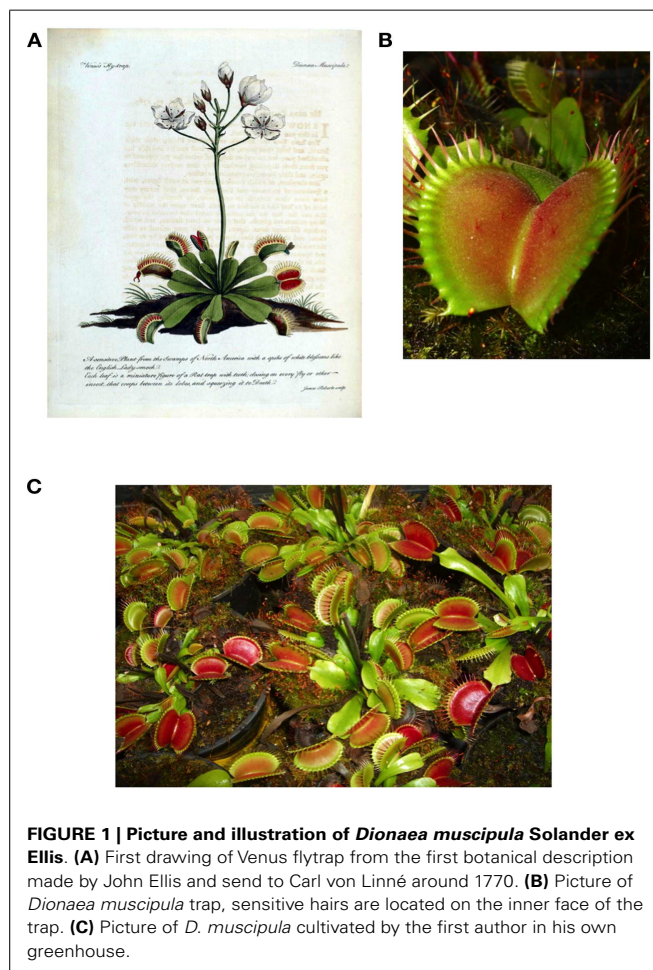


FIGURE 1 | Picture and illustration of *Dionaea muscipula* Solander ex Ellis. **(A)** First drawing of Venus flytrap from the first botanical description made by John Ellis and sent to Carl von Linné around 1770. **(B)** Picture of *Dionaea muscipula* trap, sensitive hairs are located on the inner face of the trap. **(C)** Picture of *D. muscipula* cultivated by the first author in his own greenhouse.

Plumbagin

Plumbagin (Figure 2) is a yellow naphthoquinone with anti-bacterial, anti-fungal, anti-inflammatory, and anti-cancer properties. This molecule gets its name from the plant in which it was discovered, *Plumbago zeylanica* (59) but is very common and is present in others plants like *Limonium axillare* or walnut trees (*Juglans* sp.) (60–63) but also in other carnivorous plants like *N. khasiana*, *Nepenthes gracilis*, or *Drosera binata* (64, 137, 138). The roots of *P. zeylanica* were already used for centuries in Indian traditional medicine for their cardiotoxic, neuroprotective, and hepatoprotective properties (139). In the Venus flytrap, plumbagin provides a protective role against predators and parasites (58).

Capable to generate reactive oxygen species (ROS) and to induce DNA cleavage, plumbagin inhibits topoisomerase II in HL-60 cells (65). It also has a cytotoxic effect on A549 cells and is described as being able to disrupt the microtubular network by interacting directly with tubulin (66). This particular naphthoquinone is known to be an inhibitor of the activated NF- κ B (Nuclear Factor kappa B) signaling pathway induced by carcinogens, inflammatory stimuli and TNF- α (Tumor Necrosis Factor alpha). It blocks the expression of anti-apoptotic genes

Table 1 | Listing of molecules present in *Dionaea muscipula* Solander ex Ellis.

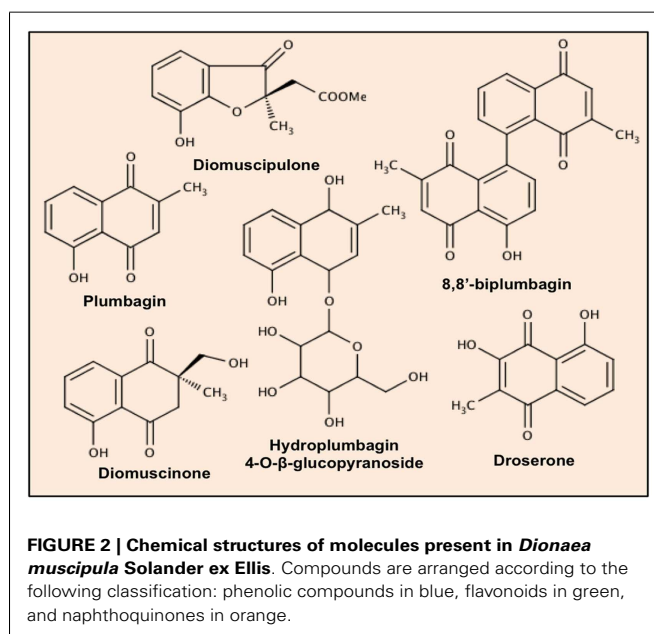
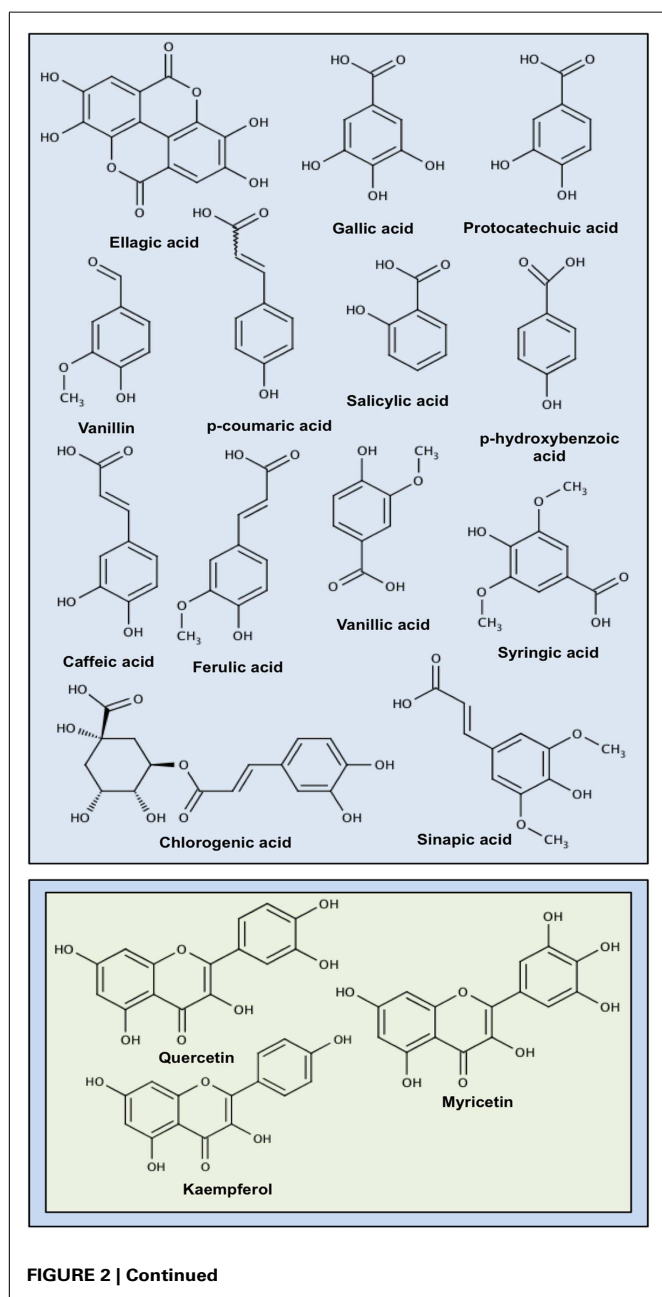
Chemical class	Compound	Source other than <i>Dionaea muscipula</i>	Biological properties	Reference
Naphthoquinones	Plumbagin	<i>Drosera</i> sp., <i>Juglans</i> sp., <i>Limonium axillare</i> , <i>Nepenthes gracilis</i> , <i>Nepenthes khasiana</i> , <i>Plumbago zeylanica</i>	Anti-bacterial, anti-fungal, anti-parasitical agent, ROS generator, apoptotic agent, cell cycle blocker, Akt, NF-κB pathway inhibitor, Akt, JNK and p38 pathway activator, angiogenesis inhibitor, microtubule inhibitor	Hsieh et al. (59), Bashir et al. (60), Binder et al. (61), Hedin et al. (62), Raj et al. (63), Aung et al. (64), Kawiak et al. (65), Acharya et al. (66), Hsu et al. (67), Sandur et al. (68), Li et al. (69)
	8,8'-biplumbagin (maritinone)	<i>Diospyros maritima</i> , <i>Plumbago zeylanica</i>	Anti-microbial agent, cytotoxic agent	Pakulski and Budzianowski (57), Gu et al. (70), Lin et al. (71), Whitson et al. (72)
	3-chloroplumbagin	<i>Drosophyllum lusitanicum</i> , <i>Plumbago zeylanica</i>	n.d.	Kreher et al. (14), Budzianowski et al. (73), Bringmann et al. (74), Sidhu and Sankaram (75)
	Droserone	<i>Drosera peltata</i> , <i>Nepenthes</i> sp., <i>Triphyophyllum peltatum</i>	n.d.	Kreher et al. (14), Raj et al. (63), Likhitwitayavuid et al. (76), Li et al. (69)
	Diomuscione	<i>Diospyros wallichii</i>	n.d.	Miyoshi et al. (77), Salae et al. (78)
	Diomuscipulone	n.d.	n.d.	Miyoshi et al. (77)
	Hydroplumbagin	<i>Drosophyllum lusitanicum</i>	n.d.	Kreher et al. (14), Budzianowski et al. (73)
	4-O-β-glucopyranoside			
Phenolic acids	Ellagic acid,	<i>Drosera peltata</i> , <i>Juglans nigra</i> , <i>Punica granatum</i> , <i>Terminalia chebula</i> (fruit), Berries, <i>Vitis rotundifolia</i>	Apoptotic agent, MAPK, PI3/Akt, NF-κB pathway inhibitor, angiogenesis inhibitor, ABC transporter inhibitor	Pakulski and Budzianowski (57), Aguilera-Carbo et al. (79), Cardona et al. (80), Huang et al. (81), Pellati et al. (82), Eddekaoui et al. (83), Malik et al. (84), Li et al. (69), Tan et al. (85)
	3-O-methyl ellagic acid,			
	3,3-di-O-methyl ellagic acid,			
	3,3-di-O-methyl ellagic acid			
	4-O-glucoside,			
	3,3-di-O-methyl ellagic acid			
	4,4'-di-O-glucoside,			
1-O-galloyl-β-glucose				
	Gallic acid	<i>Terminalia chebula</i> , <i>Citrus aurantium</i> , <i>Rhodomyrtus tomentosa</i> , <i>Rubus niveus</i> , <i>Vitis</i> sp., Carrot	Apoptotic agent, Anti-inflammatory agent, cell cycle blocker, kinase inhibitor	Kovacik et al. (54), Pellati et al. (82), Karimi et al. (86), Lai et al. (87), Sultana et al. (88), Verma et al. (89), Weidner (90) (#120), Chandramohan Reddy et al. (91), León-González et al. (92)
	Vanillin	Small fruit seeds, potato, <i>Ficus microcarpa</i> , <i>Vanilla planifolia</i>	Growth inhibitor, apoptotic agent, matrix metalloproteinase inhibitor, P13/Akt, NF-κB pathway inhibitor, angiogenesis inhibitor	Kovacik et al. (54), Ao et al. (93), Cottle and Kolattukudy (94), Lirdprapamongkol et al. (95), Lirdprapamongkol et al. (96), Lirdprapamongkol et al. (97), Shahidi and Perera (98)
	Vanillic acid	Brown rice, small fruit seeds	Cytotoxic agent	Kovacik et al. (54), Hudson et al. (99), Shahidi and Perera (98)

(Continued)

Table 1 | Continued

Chemical class	Compound	Source other than <i>Dionaea muscipula</i>	Biological properties	Reference
	Protocatechuic acid	<i>Alpinia oxyphylla</i> , <i>Hibiscus sabdariffa</i> , <i>Rhizoma homalomena</i> , <i>Spatholobus suberectus</i>	Apoptotic agent, NF-κB pathway inhibitor, Matrix metalloproteinase inhibitor	Kovacik et al. (54), Chen et al. (100), Lin et al. (101), Qing et al. (102), Tang et al. (103), Lin et al. (104), Anter et al. (105)
	Caffeic acid	<i>Vitis</i> sp., <i>Bellis perennis</i> , coffee beans, <i>Punica granatum</i> , <i>Hyssopus officinalis</i>	ROS generator, apoptotic agent, Anti-inflammatory agent, NF-κB pathway inhibitor, Cell cycle blocker	Kovacik et al. (54), Weidner et al. (90), Scognamiglio et al. (106), Rajendra Prasad et al. (107), Moon et al. (108), Jaganathan (109)
	Chlorogenic acid	Coffee beans, <i>Prunus domestica</i> , <i>Lonicera japonica</i>	Genotoxic agent, ROS generator, apoptotic agent	Kovacik et al. (54), Bouayed et al. (110), Moores et al. (111), Zhang et al. (112), YANG et al. (113)
	Ferulic acid	Brown rice, small fruit seeds, pineapple, <i>Vitis</i> sp.	Anti-oxidant agent	Kovacik et al. (54), Weidner et al. (90), Hudson et al. (99), Shahidi and Perera (98), Graf (114)
	Salicylic acid	<i>Salix</i> sp.	Anti-metabolism agent, anti-inflammatory agent, apoptotic agent	Kovacik et al. (54), Hayat et al. (115), Zitta et al. (116), Spitz et al. (117)
	Syringic acid	<i>Tamarix aucheriana</i> , white sorghum	Cell cycle blocker, apoptotic agent, angiogenesis inhibitor, NF-κB pathway inhibitor, Proteasome inhibitor	Kovacik et al. (54), Affy Ael et al. (118), Abaza et al. (119)
	<i>p</i> -hydroxybenzoic acid	White sorghum, carrot	n.d.	Kovacik et al. (54), Affy Ael et al. (118), León-González et al. (92)
	Sinapic acid	Brown rice, small fruit seeds	Proliferation inhibitor, ABC transporter inhibitor	Kovacik et al. (54), Kampa et al. (120), Hudson et al. (99), Shahidi and Perera (98)
	<i>p</i> -coumaric acid	Brown rice, small fruit seeds, white sorghum	Proliferation inhibitory	Kovacik et al. (54), Hudson et al. (99), Shahidi and Perera (98), Tan et al. (85)
Flavonoids	Quercetin, Quercetin 3- <i>O</i> -glucoside, Quercetin 3- <i>O</i> -4''- <i>O</i> -galloyl(glucoside), Quercetin 3- <i>O</i> -galactoside, Quercetin 3- <i>O</i> -4''- <i>O</i> -galloyl galactoside	<i>Drosera peltata</i> , <i>Ginkgo biloba</i> , <i>Nepenthes gracilis</i> , <i>Sarracenia purpurea</i> ,	ROS generator, Cell cycle blocker, NF-κB, Wnt pathway inhibitor, Apoptotic agent, kinase inhibitor	Aung et al. (64), Muhammad et al. (121), Park et al. (122), Shan et al. (123), Vidya Priyadarsini et al. (124), Bishayee et al. (125), Kang et al. (126), Li et al. (69), Pakulski and Budzianowski (127)
	Myricetin	<i>Chamaecyparis obtusa</i> , <i>Jatropha curcas</i> , Berries	Genotoxic agent, Cell cycle blocker, Apoptotic agent, Akt pathway inhibitor, Matrix metalloproteinase inhibitor	Hakkinen et al. (128), Oskoueian et al. (129), Zwolak et al. (130), Sun et al. (131)
	Kaempferol, kaempferol 3- <i>O</i> -galactoside, kaempferol 3- <i>O</i> -glucoside	<i>Drosera peltata</i> , <i>Ginkgo biloba</i> , <i>Gynura medica</i> , <i>Nepenthes gracilis</i> , <i>Pteridium aquilinum</i>	Apoptotic agent, angiogenesis inhibitor, topoisomerase inhibitor, proteasome inhibitor	Aung et al. (64), Calderon-Montano et al. (132), Kang et al. (126), Luo et al. (133), Luo et al. (134), Li et al. (69), Pakulski and Budzianowski (127)

n.d., non-defined.



including Bcl-2, Bcl-xL, and surviving and genes regulating cell proliferation (cyclin D1) and angiogenesis like Matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) or Vascular endothelial growth factor (VEGF). It thus leads to cell cycle arrest at the G2/M phase transition and an increase of the TNF-induced apoptosis (67, 68). Described as an Akt pathway inhibitor, it also blocks the activity of GSK-3 β (Glycogensynthase kinase 3 beta) protein kinase in human breast cancer cell lines MCF-7 and MDA-MB-231 (140). In human melanoma A375.S2 cells, it induces cell cycle

arrest in G2/M, which leads to apoptosis. The mechanistic analysis showed that plumbagin activates JNK (c-jun-N-terminal kinase) and ERK (Extracellular signal-regulated protein kinase) 1/2 but had no effect on p38 (141). In H460 lung cancer cells, plumbagin increases the expression of p53 and p21, which leads to cell cycle arrest in G2/M and triggers death by apoptosis. In addition, the authors showed that naphthoquinone activates both JNK and p38 but at the same time inhibits the activity of Akt (142). However in another study, plumbagin has been shown to activate both Akt and ERK 1/2 in healthy pre-adipocyte 3T3-L1 mouse cells (143). *In vivo* experiments performed on mice have shown that plumbagin inhibits the growth of tumors and the number of metastasis by an inhibition of the expression of several markers like MMP-9, 2, and VEGF in ovarian and prostate-cancer cells (144, 145). Due to its structure, plumbagin is also known as a ROS generator. In MCF-7 cells, increased ROS accompanies a decrease of cell viability. Analysis of the mechanism triggered by ROS suggests that plumbagin inhibits 1, 4-phosphatidylinositol 5-kinase (PI5K) expression. In K562 cells, naphthoquinone up-regulates the membrane level of death receptors (DRs) DR4 and DR5, which results in a higher sensitivity to TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) and a reduction of cell viability. Results obtained by molecular docking showed that plumbagin docks into the receptor ligand site of Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand (TRAIL)-DR 5 complex that contributes to explain triggering of apoptosis *via* the extrinsic pathway (146–149). Plumbagin is also known to act as an inhibitor of multidrug resistance-linked ATP-binding cassette drug transporter ABCG2, a protein responsible for the drug efflux in cancer cells (150). *Ex vivo* and *in vitro* experiments showed that plumbagin inhibits microtubule polymerization by direct binding to tubulin at the colchicine binding site (66). Pharmacokinetic studies have shown that plumbagin has an oral

bioavailability of about 40% in conscious freely moving rat models and that plumbagin is detected in a micromolar range 1 h after administration (151).

Plumbagin derivatives

Some others plumbagin derived molecules have also been isolated from *D. muscipula* by several groups. A plumbagin-dimer, 8,8'-biplumbagin also called maritinone (**Figure 2**) have also been isolated from the carnivorous plant (57) but also from other plants like *P. zeylanica* or Malaysian persimmon (*Diospyros maritima*) (71, 72). Tested for its potent anti-tumoral effect on KB, LNCaP, Lu1, K562, Raji, Jurkat, Vero, Calu-1, HeLa, and Wish cancer cell lines, maritinone has shown strong effects on the proliferation of these cells (70, 71). Identified in other plants than *D. muscipula* like Malaysian persimmon (*Diospyros maritima*) and carnivorous plants *Nepenthes* sp., and *Drosophyllum lusitanicum* (73, 76, 137, 152) and isolated by Kreher et al. droserone (**Figure 2**), 3-chloroplumbagin (**Figure 2**), and hydroplumbagin 4-O- β -glucopyranoside (**Figure 2**) (14) have not yet been studied for their biological effects. Miyoshi et al. reported the isolation of two other naphthoquinones, diomuscione (**Figure 2**), and diomuscipulone (**Figure 2**) together with plumbagin from roots of Venus flytrap (77). Recently, diomuscione has been isolated from *Diospyros wallichii* (78) but none of these three compounds have been tested to elucidate their biological effects out of the plant.

PHENOLIC ACIDS

The term “phenolic” or “polyphenol” is chemically defined as a molecule, which possesses at least one aromatic ring (phenol) or several (polyphenol) hydroxyl substituents. They have many roles in plants like UV sunscreens, messengers, pigments, plant growth factors and protection against fungi, bacteria, insects, and nematodes (153).

Ellagic acid

Ellagic acid (**Figure 2**) is a polyphenolic molecule synthesized by Venus flytrap and many other plants such as pomegranate (*Punica granatum*), *Terminalia chebula* fruit (yellow myrobalan), berry fruits (blueberry, blackberry, and strawberry), *Vitis rotundifolia* (Muscadine grapevine), or black walnut (*Juglans nigra*) (57, 79–82).

By their astringent taste, ellagic acid, and other tannins play a role in plant defense against herbivores and pests as digestibility-reducing compounds (154, 155) but also as anti-bacterial agent (156, 157).

It is a chemopreventive agent that reduces cell proliferation, inhibits NF- κ B by interfering with the binding of this transcription factor to DNA. The compound triggers apoptosis of pancreatic cancer cells by cytochrome *c* release and activation of caspase-3 (83). Ellagic acid decreases human prostate carcinoma PC3 cells cell growth and viability in a dose-dependent manner and triggers apoptosis. Authors observed poly(ADP-ribose) polymerase (PARP)-1 cleavage, decrease of anti-apoptotic Bcl-2 protein and increase of pro-apoptotic Bax protein and activation of caspase-3, 6, 8, and 9. Pre-treatment with pan-caspase inhibitor (Z-VAD-FMK) has confirmed the caspase-dependent apoptosis induced by ellagic acid (84). *In vivo* experiments performed on

rat models with inducible colon cancer have shown that ellagic acid reduces expression of NF- κ B, COX-2 (Cyclooxygenase-2), iNOS (inducible nitric oxide synthase), TNF- α , and IL-6 (158). Using human breast cancer MDA-MB-231 cells and human umbilical vein endothelial cells (HUVEC), Wang et al. have shown that ellagic acid inhibits proliferation, migration, and endothelial cell tube formation. Inhibiting VEGFR-2 tyrosine kinase activity and the downstream signaling pathways including MAPK (Mitogen-activated protein kinase) and PI3K (Phosphatidylinositol 3-kinases)/Akt, ellagic acid decreases MDA-MB-231 breast cancer xenograft growth and p-VEGFR-2 expression. Further *in silico* molecular docking simulations showed that ellagic acid could bind within the ATP-binding region of the VEGFR-2 kinase unit (159).

Gallic acid

Gallic acid (**Figure 2**) has been isolated from bitter orange tree flowers (*Citrus aurantium*), *Marrubium persicum*, yellow myrobalan fruit (*T. chebula*), *Acalypha australis*, *Pleurotus* sp., *Vitis* sp. seeds, rose myrtle (*Rhodomyrtus tomentosa*), Mysore raspberry (*Rubus niveus*), white sorghum, or carrot (82, 86–88, 90, 118, 160–162).

This tannin that can be released by the aerial parts of the plant is a nematicide but possesses also anti-bacterial and anti-fungal properties (88, 163, 164).

Described in many papers as an anti-cancer agent that can affect many cellular targets (89), gallic acid induces cell cycle arrest in G0/G1 in human leukemia K562 cells by down-regulating cyclin D and E levels. Gallic acid induces cell death by apoptosis in K562 leading to PARP-1 cleavage, cytochrome *c* release, and caspase activation. Expression of COX-2, a molecule involved in cancer-related inflammation and progression, is also reduced by gallic acid treatment. Furthermore, this phenolic acid inhibits BCR/ABL tyrosine kinase and NF- κ B pathway activity (91). Moreover, this vegetable tannin blocks Akt/small GTPase and NF- κ B pathway activity in human gastric carcinoma AGS cell line and inhibits cellular migration *via* the expression of RhoB. Results have been confirmed in nude mice models where gallic acid treatment leads to decreased development of metastasis (165). *In vivo* experiments using a mouse prostate TRAMP model fed with gallic acid showed inhibition of prostate-cancer growth and progression. Western-blot analysis performed on mice prostate tissues revealed decreased cdc2, Cdk2, Cdk4, and Cdk6 expression as well as a reduction of the proteins cyclin B1 and E (166). Two human osteosarcoma cell lines U-2OS and MNNG/HOS treated with gallic acid allowed demonstrating inhibition of cell proliferation and induction of apoptotic cell death. Results show that gallic acid increases p38 and ERK 1/2 activation and decreases of JNK. Moreover, pre-treatment with a p38 inhibitor prevents gallic acid-induced growth inhibition but not ERK 1/2 and JNK inhibitors that promotes proliferation. Inhibition of tumor growth is confirmed by *in vivo* experiments in a dose-dependent manner in nude BALB/c mice. Immunohistochemistry shows a decrease of PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) and CD31 expression in MNNG/HOS tumor tissues (167). Pharmacokinetic studies have shown that gallic acid is rapidly absorbed by the organism, metabolized in different forms after 2 h, and are detected at a micromolar range in plasma, a

concentration lower than the concentration used for several biological studies. A study conducted on black tea drinkers showed that after 3 h, the organism eliminates nine different metabolized forms of gallic acid *via* the urinary tract (168, 169).

Vanillin

Vanillin (**Figure 2**) is probably one of the most famous flavor molecules and the most used widely used by food, chemical and perfume industries. Isolated in 1858 by Gobley as the main flavor constituent of vanilla (*Vanilla planifolia*), but also present in other plants (potatoes, *Ficus microcarpa*) (83, 93, 94), vanillin is today mainly synthesized or produced by chemical or biotechnological methods using fungi or bacteria (170–173). In addition to being a flavor molecule, vanillin exerts anti-fungal, and anti-bacterial properties (174, 175).

At non-toxic concentrations, vanillin inhibits growth of mammary adenocarcinoma cell line 4T1 but also decreases MMP-9 activity and thus reduces cell migration and invasion. *In vivo* experiments performed on 4T1 mammary adenocarcinoma cells injected in BALB/c mice have shown that vanillin strongly reduces the number of lung metastasis colonies. Similar experiments performed with vanillic acid were not conclusive (95). Further experiments performed by the same group have shown that vanillin pre-treatment of HeLa cells blocks TRAIL – induced phosphorylation of subunit p65 and transcriptional activity of NF- κ B pathway and stimulates TRAIL-induced cell death through the extrinsic apoptosis pathway (96). Vanillin also inhibits cell migration of human lung cancer cells induced by hepatocyte growth factor (HGF). It prevents Akt phosphorylation but has no effect on Met and ERK phosphorylation and inhibits phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K). Chick chorioallantoic membrane assays showed that vanillin inhibits also angiogenesis (97). Vanillin induces apoptosis in HT-29 human colorectal cancer cell line and NIH/3T3 normal cell lines with a concentration of 400 and 1000 μ g/mL, respectively. Flow cytometry analysis showed that a low concentration of vanillin induce cell cycle arrest in G0/G1 phase whereas a high concentration stops cells in G2/M phase (176). Pharmacokinetic studies on rat models demonstrated that vanillin has a relatively good bioavailability (7.6%). Others studies have revealed that 24 h after ingestion, vanillin is mainly metabolized as glucuronide and sulfate conjugates and that after 48 h, 94% of the initial dose of vanillin is found under different forms, including vanillin itself (7%) (177, 178).

Protocatechuic acid

Described by many articles as therapeutic molecules active against several diseases, protocatechuic acid (**Figure 2**) was identified in plants like True roselle (*Hibiscus sabdariffa*), *Rhizoma homalomenae*, *Spatholobus suberectus*, and *Alpinia oxyphylla* (100–103, 179).

Protocatechuic acid inhibits AGS (human stomach adenocarcinoma) cell migration and proliferation at non-toxic concentrations. It can also inhibit the NF- κ B pathway and both MMP-2 expression and activity by modulating RhoB/protein kinase C ϵ (PKC ϵ) and Ras/Akt cascade pathways. Using *in vivo* mice models (B16/F10 melanoma cells), anti-metastasis proliferation of protocatechuic acid has been confirmed (104). Phenolic acid induces cell death of HepG2 hepatocellular carcinoma cells and

stimulates c-Jun N-terminal kinase (JNK) and p38. Further experiments have shown that pre-treatment of HepG2 with *N*-acetyl-L-cysteine (NAC) blocks the cytotoxic effect of protocatechuic acid (180). Protocatechuic acid doesn't exert genotoxic effects toward *Drosophila melanogaster* wing spot assay. However it shows antigenotoxic effects against hydrogen peroxide inhibits tumoricidal activity and moreover triggers cell death by apoptosis in HL-60 leukemia cells (105).

Caffeic acid

Present in *Vitis* sp. seeds, pomegranate (*P. granatum*), coffee beans, honey, common daisy (*Bellis perennis*), and hyssop (*Hyssopus officinalis*), caffeic acid (**Figure 2**) is a secondary metabolite that exerts anti-bacterial and anti-fungal properties (90, 106, 181, 182).

Caffeic acid is a ROS generator inducing oxidative DNA damage and alters mitochondrial membrane potential in HT-1080 human fibrosarcoma cells. It stimulates lipid peroxidation and decreases activities of enzymatic anti-oxidants superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), as well as glutathione peroxidase (GPx), and glutathione (GSH) levels. Observations by fluorescence microscopy showed that caffeic acid induces cell death by apoptosis (107). This molecule is known to act as an inhibitor of DNA methylation due to its ability to inhibit human DNA methyltransferase 1 (DNMT1) and to partially inhibit retinoic acid receptor (RAR) β promoter in MCF-7 and MAD-MB-231 cells (183). Caffeic acid is an anti-inflammatory agent by decreasing expression of IL-8 and NF- κ B pathway activity by triggering TNF- α -induced I κ B degradation that lead to a reduction of NF- κ B target genes expression which are regularly involved into carcinogenesis (108). Caffeic acid decreases HCT 15 colon cancer cells in a time dependent manner. It induces cell cycle arrest that leads to accumulation of cells in sub-G1. Inducing also ROS production and reduction of the mitochondrial membrane potential, flow cytometry analysis confirmed cell death by apoptosis (109). Among several small phenolic acids tested for their anti-proliferative effect on T47D human breast cancer cells, caffeic acid exerts is most potent. Further experiments showed that all compounds induce apoptosis *via* the Fas/FasL pathway and that caffeic acid is able to inhibit aryl hydrocarbon receptor-induced *CYP1A1* gene expression (120). However it is important to underline that chlorogenic acid (**Figure 2**), a caffeic acid analog and a Venus flytrap secondary metabolite, can be hydrolyzed to caffeic acid in the intestine and can be well absorbed by intestinal cells. *In vitro* and *in vivo* studies showed that in Caco-2 cells, caffeic acid exerts stronger anti-oxidant properties compared to chlorogenic acid. This differential efficiency can be explained by the fact that caffeic acid uptake is superior to chlorogenic acid uptake. Caffeic acid is a molecule known to be metabolized by intestinal bacteria, however studies have shown that caffeic acid can be detected in rat blood 6 h after ingestion together with different other metabolites. Another study demonstrated that 95% of caffeic acid is absorbed and that 11% of the ingested caffeic acid was excreted in urine (182, 184–187).

Chlorogenic acid

Chlorogenic acid (**Figure 2**) has been isolated from a huge diversity of plants like prune (*Prunus domestica*), japanese honeysuckle

(*Lonicera japonica*), apple, plum, *Eucommia ulmodies*, and coffee beans (110–112, 188–190).

In plants, chlorogenic acid is a secondary metabolite involved in plant defense against pests, herbivores, fungi, or virus (191–194).

Human adenocarcinoma Caco-2 cells treated with chlorogenic acid present a reduced proliferation rate and light microscopy observation reveals an abnormal morphology compared to untreated cells (195). Chlorogenic acid induces apoptosis by inducing ROS generation and reduces the mitochondrial membrane potential in U937 human leukemia cells. Further results obtained by Western-Blot show that chlorogenic acid promotes caspase-3 activity and expression of caspase-3, 7, 8, and 9 in U937 cells (113). Chlorogenic acid can induce DNA damage in both normal lung MRC5 fibroblasts and A549 lung cancer cells and increases the levels of topoisomerase I- and topoisomerase II-DNA complexes in cells although cancer cells were the most sensitive to chlorogenic acid treatment (196). This compound also acts as an anti-oxidant reducing free radical DNA damages like DNA-single strand breaks (110, 197).

Chlorogenic acid has a very low bioavailability but is always present in the small intestine. It can only be detected in rat plasma with other metabolites in trace amounts 6 h after absorption. Another study has given the same result, chlorogenic acid has a rate of absorption of 33% and is detected only in trace amounts in rat urine. Studies showed that chlorogenic acid is not well absorbed by the organism compared to structurally related caffeic acid. Caffeic acid metabolism produces caffeic and ferulic acid, two other secondary metabolites of *D. muscipula* (184–186).

Ferulic acid

Ferulic acid (**Figure 2**) has been identified mainly in seeds like *Vitis* sp. seeds brown rice, but also wheat flour, pineapple, creosote bush (*Larrea divaricata*). Ferulic acid is an allelopathic agent that acts as seed germination inhibitor (98, 99, 90, 198–202, 222).

Ferulic acid pre-treatment protects against γ -radiation-induced DNA damage in hepatocytes and significantly increases anti-oxidant enzymes, GSH, vitamins A, E, and C (203). *In vivo* studies have shown that mammary carcinogenesis induced in Sprague–Dawley rats fed with ferulic acid prevent tumor development in 80% of animals even if the exact protection mechanism remains unclear (204). Further animal experimentations on induced skin carcinogenesis mice model highlighted that oral ferulic acid administration completely prevented skin tumor formation but that topical application does not (205). Ferulic acid delayed cell cycle progression of Caco-2 colon cancer cells. cDNA microarrays showed that ferulic acid up-regulates centrosome assembly genes, such as *RABGAPI* and *CEP2* and S phase checkpoint protein *SMC1L1* (206). Moreover, ferulic acid acts as an anti-oxidant that can reduce DNA strand breaks induced by γ -irradiation in peripheral blood leukocytes and bone marrow cells of mice. It promotes mice survival up to 6 Gy of γ -radiation (114, 207). Ferulic acid is absorbed by the intestine and can be detected in the blood of rat and human patients. Further studies showed that ferulic acid can be absorbed very quickly all along the gastrointestinal tract, can be detected in plasma already after 10 min and less than 1% of ingested ferulic acid can be found in rat feces. It can be metabolized under different forms including glucuronides,

sulfates, and sulfoglucuronides conjugated forms, formed in the liver by different phase II enzymes reduce bioavailability (202, 208).

Salicylic acid

Already used by the Greeks and the Egyptians to treat aches and pains, this compound was initially isolated from willow tree bark by Buchner (**Figure 2**) in 1898. The isolated active principle was named from the Latin word “*Salix*” which means willow tree. Salicylic acid has been identified as the main metabolite of acetyl-salicylic acid, the active principle of aspirin. Salicylic acid is a phytohormone that plays important roles in plant immune system, thermogenesis (heat production), root nodule formation but also more essential process like metabolism, flowering, and seed germination. Due to its important role, salicylic acid is found in almost all plants (115, 209–213).

Salicylic acid has no effect on CaCo-2 (colon carcinoma cells) proliferation under normoxic conditions but increases caspase-3/7 activities and increases phosphorylation of ERK 1/2 under hypoxic conditions: salicylic acid increases caspase-3/7 activities but also decreases cell proliferation but has no effect on ERK 1/2 phosphorylation (116). *In vitro* assays have shown that salicylic acid reversibly inhibits 6-phosphofructo-1-kinase, an enzyme responsible for the glycolysis. It dissociates the quaternary structure of the enzyme into inactive dimers. Tested on MCF-7 cells, salicylic acid inhibits 6-phosphofructo-1-kinase that leads to a decreased cellular glucose consumption and viability (117). Anacardic acid, a derivative of salicylic acid and an inhibitor of histone acetyltransferase, is an anti-inflammatory compound like its precursor. It blocks the NF- κ B pathway by abrogation of phosphorylation and degradation of I κ B α and by inhibiting acetylation and nuclear translocation of its p65 subunit. Inhibition of the NF- κ B pathway leads to down-regulation of target genes involved in cell proliferation (cyclin D1, COX-2), survival (Bcl-2, Bcl-xL), and invasion (MMP-9) (213, 214). Several clinical trials analyzed the effect of salicylic acid on colorectal cancer patients. Results show that a dose of 75 mg of aspirin per day during several years reduces colorectal cancer incidence and mortality (215).

FLAVONOIDS

Flavonoids are secondary metabolites of the polyphenol family with a backbone composed of 15 carbon atoms organized into a common phenyl benzopyrone structure (C6-C3-C6). This group of molecules is divided into several sub-groups according to their chemical formulations including flavonols (quercetin, myricetin, and kaempferol), flavones, flavanones, flavanols, anthocyanins, dihydroflavonols, isoflavones, and chalcones. Their roles within plants are very diverse. Some have a protective role against UV, but also toward parasites, pathogens (insecticides, fungicides, vermifuges) and herbivores. Other molecules act as signal molecules or help the plant to survive under stress conditions (drought period, nutrient-poor environment) (216).

Quercetin

Quercetin (**Figure 2**) is a molecule with anti-bacterial properties present in bitter orange tree flowers (*Citrus aurantium*), *Epilebium* species, *Nepenthes gracilis*, *Leucaena leucocephala*, *S. purpurea*,

caper (*Capparis spinosa*), and chili peppers (*Capsicum* sp.) (64, 86, 121, 217–221). In plants, quercetin acts as a host defense molecule and a growth stimulatory agent, it is a nematode repellent, an anti-microbial agent, a root nodules inducer, an allelopathic agent, and a hyphal branching attractor for symbiotic fungus (223).

Concerning its biological properties as anti-cancer agent, quercetin has been the object of many studies (224). For example, this flavonol has been described as an anti-proliferative agent by inducing cell cycle arrest in G2/M and as an apoptotic agent due to its ability to inhibit the transcriptional activity of the Wingless pathway (Wnt) by reducing the amount of transcriptional co-activator β -catenin in the nucleus in SW480 colon cancer cells and by reducing the level of cyclin B1 and surviving (122, 123). *In vitro* experiments have shown that a concentration of 2 μ M of quercetin is sufficient to decrease 80% of the activity of 16 kinases, which are mostly involved in the control of mitotic processes (225). This secondary metabolite is also responsible for the induction of cell death by apoptosis of hepatocellular carcinoma cells after activation of caspases 3 and 9 (226). Quercetin used in combination with 5-fluorouracil (5-FU) on EC9706 and Eca109 esophageal cancer cells increased the cytotoxic effect and the percentage of apoptotic cells compared to quercetin or 5-iFU alone. These combined effects were explained by a decrease of p-I κ B α expression induced by quercetin treatment (227). Quercetin is also known to induce cell cycle arrest in G2/M and to induce cell death in human HeLa cervical cancer cells by mitochondrial apoptosis through a p53-dependent mechanism. These results also showed that quercetin can inhibit the NF- κ B pathway by modulating the expression of NF- κ B p50 and p65, IKK β , p-I κ B, and ubiquitin. Other results obtained by Western-blot have shown an increase of pro-apoptotic Bcl-2 family proteins (Bax, Bak, and Bad), an up-regulation of Apaf-1 and cytoplasmic cytochrome *c* and a down-regulation of anti-apoptotic Bcl-2 family proteins (Bcl-2, Mcl-1) (124). Moreover Spagnuolo and collaborators demonstrated in addition, in U937 cells, a down-regulation of Mcl-1 by quercetin acting directly or indirectly on its mRNA stability and protein degradation (228). A study performed on HeLa cells showed that quercetin has the ability to interact with DNA and to generate ROS. This flavonol triggers a cell arrest in G2/M, followed by mitochondrial membrane depolarization, externalization of phosphatidyl-serine, release of cytochrome *c* into the cytoplasm, decrease of Akt and Bcl-2 expression and cell death by apoptosis (125). A large Swedish population-based case-control study has shown that quercetin uptake decreases the risk to develop gastric adenocarcinoma. This protective effect was very strong for female smokers (229). Quercetin has been tested in several clinical trials on cancer patients. It has been tested in a chemoprevention purpose on 130 colon cancer patients treated with quercetin, rutin, or with sulindac (NCT00003365). Phase I clinical trials have shown that quercetin inhibits protein tyrosine phosphorylation in patient lymphocytes, is able to decrease CA-125 (Carbohydrate antigen 125) level in patients with ovarian cancer refractory to cisplatin and serum alpha-fetoprotein (AFP) levels in hepatocellular carcinoma patients (230). Quercetin is also actually undergoing clinical trials with genistein to evaluate their effects on prostate-specific antigen level on prostate-cancer patients (NCT01538316). Pharmacokinetic analysis performed on humans and rats have shown

that quercetin has a very low bioavailability. In human, after an ingestion of about 87 mg of quercetin, average plasma concentration is 344 nM after 3 h. Results have also shown that quercetin is no longer present in the aglycone, free form but is metabolized, and can only be detected as conjugated derivatives like quercetin glucuronides or quercetin 3-*O*-sulfate. However after further analysis Manach et al. showed that these quercetin derivatives maintain anti-oxidant activity although their effect were reduced to half of the quercetin (231–233). Sesink et al. showed that breast cancer resistance ABCG2 and the multidrug resistance-associated protein 2 (Mrp2), two ATP-binding cassette (ABC) transporters involved in drug cancer resistance are able to pump both quercetin aglycone and quercetin conjugated derivatives out of the cells and thus explain the low bioavailability of quercetin (234).

Myricetin

Myricetin (Figure 2) is a quercetin analog present in many plants as for example *Limonium axillare*, *Jatropha curcas*, Japanese cypress (*Chamaecyparis obtusa*), *Leucaena leucocephala*, and many berries (60, 128, 129, 218, 235). In plants, myricetin acts as a host defense molecule, is released by roots and acts as a nematode repellent and an inducer of root nodules in several cases (223).

This is a flavonol that exerts anti-bacterial (217) and anti-cancer properties which is able to inhibit mutagenesis induced by carcinogens such as benzo(a)pyrene (236). Myricetin is able to induce apoptosis of pancreatic cancer cells *via* the activation of caspase-3 and 9 (130). It induces apoptosis of human bladder carcinoma cell line T-24 with activation of caspase-3 after DNA cleavage and cell cycle arrest in G2/M phase by a down-regulation of cyclin B1 and cdc2. It inhibits the phosphorylation of Akt but increases the phosphorylation of p38 and decreases MMP-9 expression. *In vivo* experiments have shown a growth inhibition of T-24 xenografts on mice models (131). Myricetin is also able to induce apoptosis in HL-60 (human promyelocytic leukemia cells) through an ROS-independent cell death pathway (237). *In vitro* experiments have shown an inhibition of mammalian DNA polymerases and human DNA topoisomerase II by myricetin. Further experiments have revealed that it also inhibits proliferation of HCT-116 human colon carcinoma cells and trigger apoptosis after a cell cycle arrest in G2/M cell cycle transition (238). Recent studies have shown that a non-toxic dose of myricetin decreases PI3 kinase activity in pancreatic cancers cells MIA PaCa-2, Panc-1, or S2-013 and triggers cell death by apoptosis. *In vivo* experiments performed on mice have shown a regression of tumor growth and a decrease of metastasis (239). In rat models, myricetin is able to inhibit cytochrome P450 (CYP) activity in liver or intestine and thus to increase bioavailability of tamoxifen, a drug used to treat breast cancer. Similar results were observed for doxorubicin (240, 241).

Kaempferol

Kaempferol (Figure 2) is a flavonol identified in many plants like *Nepenthes gracilis*, chili peppers, *Gynura medica*, Bracken (*Pteridium aquilinum*), *Ginkgo biloba* (64, 126, 132, 219, 242, 243).

Involved into plant defense, kaempferol has been described as a nematode repellent, nematode egg hatching inhibitor, and allelopathic agent (223).

From a therapeutic point of view, anti-cancer properties of kaempferol have been underlined by many papers (132, 244). A concentration of 40 μ M of kaempferol is sufficient to inhibit proliferation of oral cancer cell lines (SCC-1483, SCC-25, and SCC-QLL1). Analysis has shown PARP-cleavage and caspases-3-dependent apoptosis (126). Kaempferol inhibits ovarian cancer cells and induces cell death by apoptosis in a dose-dependent manner. Luo et al. observed caspase-3 and 7 cleavage that was abrogated by caspase 9 inhibitor that confirmed the extrinsic caspase-dependent cell death mechanism. Western-Blot analysis showed an up-regulation of pro-apoptotic proteins Bax and Bad and a down-regulation of anti-apoptotic protein Bcl-xL (133). The same team analyzed effects of kaempferol on VEGF expression in ovarian cancer cells. Results show that this flavonol inhibits time-dependently VEGF secretion and angiogenesis. It also down-regulates phospho-ERK concomitant with c-myc and NF- κ B expression through ERK signaling pathway (134). They also developed different kaempferol nanoparticles and have tested their efficiency on cancerous and normal ovarian cells. PEO [poly(ethylene oxide)], PPO [poly(propylene oxide)], PEO poly(ethylene oxide) decreases both ovarian cancer and healthy cell viability. On the opposite (PLGA) [Poly(DL-lactic acid-co-glycolic acid)] exerts selective cytotoxic effect on cancer cells only. However, all kaempferol nanoparticle formulations were able to reduce cancer cell viability better than kaempferol alone (245). Pharmacokinetic *in vivo* studies performed on human and rats have revealed that kaempferol is mainly absorbed in the small intestine and is metabolized to glucuronide and sulfo-conjugated forms in the liver. Results have shown that kaempferol has a very poor bioavailability (2%) and that after ingestion of several mg of kaempferol, it is only detected at nanomolar levels in plasma and it should be emphasized that most *in vitro* studies were conducted at micromolar concentrations (132, 231, 246). It has also been showed that kaempferol can be converted into its analog, quercetin (Figure 2) by the enzyme CYP1A1 in rats (247). Although cancer cells are able to eliminate compounds like quercetin, it has been shown by Sesink et al. that kaempferol blocks Bcrp-mediated quercetin efflux by competitive inhibition (234, 248). Based on this discovery, it has been shown that kaempferol enhances the effect of

cisplatin in ovarian cancer cells and of etoposide in rat models (249, 250).

CONCLUSION

This review has presented the different known chemopreventive and therapeutic agents isolated from *D. muscipula*. At the present time, more than 15 compounds (Figure 2) have been isolated from *D. muscipula*, mostly flavonoids, and phenolic compounds. Most of these secondary metabolites are also present in other plants and up to now, only one *D. muscipula*-specific molecule with therapeutic potential has been isolated from Venus flytrap, diomuscipulone (Figure 2). But this naphthoquinone has not yet been tested for its biological properties like several others compounds as diomuscipulone, droserone, 3-chloroplumbagin, and hydroplumbagin 4-*O*- β -glucopyranoside or *p*-coumaric acid (Figure 2) which are also present in other plants. Many of these anti-cancer compounds present in *D. muscipula* have been described as NF- κ B pathway modulators like plumbagin, ellagic acid, or salicylic acid. The reason is that the NF- κ B pathway is an interesting anti-cancer drug target due to its involvement into the development and the progression of many cancers (251–253). However it's important to keep in mind that the NF- κ B pathway is not responsible for all types of cancer and that there are many other pathways and phenomena involved in cancer development and progression that can be the targets for drugs of natural origins (18, 19, 28, 251, 254, 255).

Currently only several compounds like quercetin, salicylic acid, and kaempferol have moved to pharmacokinetic studies and clinical trials (Table 2). All results have shown that these compounds have a very poor bioavailability that can be explained by several reasons. Plant secondary metabolites are often recognized as xenobiotics by the organism and are rapidly detoxified by gut flora or enzymes and eliminated from the organism. Intestinal bacteria are known to metabolize drugs before their absorption by the organism. Some drugs can be directly metabolized by the organism or can be conjugated and transformed into an inactive molecule before reaching their target. However several studies have shown that it is possible that this defense mechanism can lead to the conversion of an inactive molecule into another one

Table 2 | Clinical trials involving natural compounds present in *Dionaea muscipula* Solander ex Ellis.

Chemical class	Compound	Trial name	Disease	Status	Identifier
Phenolic acids	Ellagic acid	Dietary intervention in follicular lymphoma	Follicular lymphoma	Unknown	NCT00455416
	Caffeic acid	FLAX FX, A research study of the effects of flaxseed lignans on colon health	Colon cancer	Recruiting	NCT01619020
	Ferulic acid	FLAX FX, A research study of the effects of flaxseed lignans on colon health	Colon cancer	Recruiting	NCT01619020
Flavonoid	Quercetin	Prostate-cancer prevention trial with quercetin and genistein (QUERGEN)	Prostate cancer	Recruiting	NCT01538316
		Sulindac and Plant compounds in preventing colon cancer	Colon cancer	Terminated	NCT00003365

The table was generated by using data available from the website <http://clinicaltrials.gov>

like kaempferol into quercetin. Moreover, it is known that cancer cells use drug resistance mechanisms like ABC transporter efflux pumps to down-regulate intracellular drug levels. It is very important to take these mechanisms into consideration to understand and develop cancer drugs of natural origins but also all other kinds of drugs. New secondary metabolites generated by the organism during drug metabolism by bacteria, the organism itself, or cancer cells should be identified and taken into consideration. It is also very important to underline that due to the low bioavailability of several of these compounds, they are only present in nanomolar concentration in plasma while in many studies, a concentration in milli or micromolar is used to treat cells in *in vitro* conditions and to obtain an effect. However, it has been shown that co-treatment of two natural molecules like quercetin and kaempferol and a chemotherapeutic drug like cisplatin or etoposide is more efficient than a single treatment thanks to the ability of the natural compound to block ABC transporters. Low bioavailability and incompletely absorbed compounds are ineffective against metastatic and invasive cancers.

One of the most promising anti-cancer compounds is probably plumbagin. It has been shown that plumbagin induces cell death, affects many hallmarks of cancer, interacts directly with cancer targets like tubulin, inhibits ABC transporters, is well absorbed by the organism and can be present in the organism at a micromolar concentration. We have to underline that plumbagin is used for centuries in traditional medicines and is present in many plants that can explain that plumbagin is more studied than other Venus flytrap compounds.

Most natural compounds isolated from *D. muscipula* like plumbagin, quercetin, myricetin, ellagic acid, or vanillin have multiple effects and act as anti-cancer drugs with multiple targets on different types of cancers. However, as in many cases, direct drug targets are often unknown and there are several reasons that can explain this situation. Plant secondary metabolites are usually small molecules compared to their protein targets and analytical methods have only been developed recently and this step is usually

the most challenging, expensive and the most time consuming in the drug development process. On one hand, the development of new methods, techniques, and devices like high-throughput screening but also of new biological discoveries (new organism, interspecies interactions) will lead to new molecule discovery in already known organisms but also in new species (256–260). On the other hand, discovery of new anti-cancer drug targets, new visions, and new approaches of cancer development by biological experiments as for example identification of immediate drug direct protein and nucleic acid targets by *Drug Affinity Responsive Target Stability* (DARTS) or chemical proteomics (261–263) but also by computational data analysis like molecular docking (264–266) and grouping together all these data in databases like STITCH (Search Tool for Interactions of Chemicals) (267) will also allow investigation of new cancer treatments. Moreover, development and screening of known and new derivatives from Venus flytrap but also from other plants will improve specificity and efficiency of these promising therapeutic compounds (255, 268–272).

Data presented here show that Nature can be considered an impressive medicinal cabinet that remains to be entirely discovered, improved and used by researchers to hit the right targets.

ACKNOWLEDGMENTS

François Gaascht was supported by a fellowship from the European Union (ITN “RedCat” 215009, Interreg IVa project “Corena”). Research at LBMCC is financially supported by the Fondation de Recherche Cancer et Sang, the Recherches Scientifiques Luxembourg association, the Een Haerz fir kribbskrank Kanner association, the Action Lions Vaincre le Cancer association, the European Union (ITN “RedCat” 215009, interreg Iva project “Corena”), and the Télévie Luxembourg. MDie is supported by the National Research Foundation (NRF) by the MEST of Korea for Tumor Microenvironment Global Core Research Center (GCRC) grant [grant number 2012-0001184]; by the Seoul National University Research grant and by the Research Settlement Fund for the new faculty of SNU.

REFERENCES

1. Baguley BC. Multiple drug resistance mechanisms in cancer. *Mol Biotechnol* (2010) **46**: 308–16. doi:10.1007/s12033-010-9321-2
2. Liu FS. Mechanisms of chemotherapeutic drug resistance in cancer therapy – a quick review. *Taiwan J Obstet Gynecol* (2009) **48**:239–44. doi:10.1016/S1028-4559(09)60296-5
3. Morens DM, Fauci AS. Emerging infectious diseases in 2012: 20 years after the institute of medicine report. *MBio* (2012) **3**. doi:10.1128/mBio.00494-12
4. Cragg GM, Newman DJ. Natural products: a continuing source of novel drug leads. *Biochim Biophys Acta* (2013). **1830**:3670–95. doi:10.1016/j.bbagen.2013.02.008
5. Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *J Nat Prod* (2012) **75**:311–35. doi:10.1021/np200906s
6. Bourgaud F, Gravot A, Milesi S, Gontier E. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Sci* (2001) **161**:839–51. doi:10.1016/S0168-9452(01)00490-3
7. Craik DJ. Host-defense activities of cyclotides. *Toxins* (2012) **4**:139–56. doi:10.3390/toxins4020139
8. Hartmann T. From waste products to ecochemicals: fifty years research of plant secondary metabolism. *Phytochemistry* (2007) **68**:2831–46. doi:10.1016/j.phytochem.2007.09.017
9. Heinen TE, da Veiga AB. Arthropod venoms and cancer. *Toxicon* (2011) **57**:497–511. doi:10.1016/j.toxicon.2011.01.002
10. Jain D, Kumar S. Snake venom: a potent anticancer agent. *Asian Pac J Cancer Prev* (2012) **13**:4855–60. doi:10.7314/APJCP.2012.13.10.4855
11. Namdeo A. (2007). Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: a review. *Phcog Rev* (2007) **1**:69–79.
12. Schmidt EW, Donia MS, McIntosh JA, Fricke WF, Ravel J. Origin and variation of tunicate secondary metabolites. *J Nat Prod* (2012) **75**:295–304. doi:10.1021/np200665k
13. Amin AR, Kucuk O, Khuri FR, Shin DM. Perspectives for cancer prevention with natural compounds. *J Clin Oncol* (2009) **27**: 2712–25. doi:10.1200/JCO.2008.20.6235
14. Kreher B, Neszmélyi A, Wagner H. Naphthoquinones from *Dionaea muscipula*. *Phytochemistry* (1990) **29**:605–6. doi:10.1016/0031-9422(90)85125-Y
15. Gaascht F, Teiten MH, Schumacher M, Dicato M, Diederich M. Approche végétale dans le traitement des leucémies. *Corresp Onco-Hématol* (2010) **V**: 102–8.
16. Gullett NP, Ruhul Amin AR, Bayraktar S, Pezzuto JM, Shin DM, Khuri FR, et al. Cancer prevention with natural compounds. *Semin Oncol* (2010) **37**:258–81. doi:10.1053/j.seminoncol.2010.06.014
17. Surh YJ. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nat Rev Cancer* (2003) **3**:768–80. doi:10.1038/nrc1189
18. Schumacher M, Kelkel M, Dicato M, Diederich M. Gold from the sea: marine compounds as inhibitors of the hallmarks of cancer. *Biotechnol Adv* (2011) **29**:531–47. doi:10.1016/j.biotechadv.2011.02.002

19. Teiten MH, Gaascht F, Dicato M, Diederich M. Targeting the wingless signaling pathway with natural compounds as chemopreventive or chemotherapeutic agents. *Curr Pharm Biotechnol* (2012) **13**:245–54. doi:10.2174/138920112798868593
20. Kelkel M, Jacob C, Dicato M, Diederich M. Potential of the dietary antioxidants resveratrol and curcumin in prevention and treatment of hematologic malignancies. *Molecules* (2010) **15**:7035–74. doi:10.3390/molecules15107035
21. Bishayee A, Politis T, Darvesh AS. Resveratrol in the chemoprevention and treatment of hepatocellular carcinoma. *Cancer Treat Rev* (2010) **36**:43–53. doi:10.1016/j.ctrv.2009.10.002
22. Kraft TE, Parisotto D, Schempp C, Efferth T. Fighting cancer with red wine? Molecular mechanisms of resveratrol. *Crit Rev Food Sci Nutr* (2009) **49**:782–99. doi:10.1080/10408390802248627
23. Martin MA, Goya L, Ramos S. Potential for preventive effects of cocoa and cocoa polyphenols in cancer. *Food Chem Toxicol* (2013) **56**:336–51. doi:10.1016/j.fct.2013.02.020
24. Maskarinec G. Cancer protective properties of cocoa: a review of the epidemiologic evidence. *Nutr Cancer* (2009) **61**:573–9. doi:10.1080/01635580902825662
25. Khalil MI, Sulaiman SA. The potential role of honey and its polyphenols in preventing heart diseases: a review. *Afri J Tradit Complement Altern Med* (2010) **7**:315–21.
26. Sawadogo WR, Schumacher M, Teiten MH, Dicato M, Diederich M. Traditional West African pharmacopeia, plants and derived compounds for cancer therapy. *Biochem Pharmacol* (2012) **84**:1225–40. doi:10.1016/j.bcp.2012.07.021
27. Nobili S, Lippi D, Witort E, Donnini M, Bausi L, Mini E, et al. Natural compounds for cancer treatment and prevention. *Pharmacol Res* (2009) **59**:365–78. doi:10.1016/j.phrs.2009.01.017
28. Orlikova B, Diederich M. Power from the garden: plant compounds as inhibitors of the hallmarks of cancer. *Curr Med Chem* (2012) **19**:2061–87. doi:10.2174/092986712800228998
29. Efferth T, Li PC, Konkimalla VS, Kaina B. From traditional Chinese medicine to rational cancer therapy. *Trends Mol Med* (2007) **13**:353–61. doi:10.1016/j.molmed.2007.07.001
30. Folmer F, Jaspars M, Dicato M, Diederich M. Marine natural products as targeted modulators of the transcription factor NF-kappaB. *Biochem Pharmacol* (2008) **75**:603–17. doi:10.1016/j.bcp.2007.07.044
31. Senevirathne M, Kim SK. Utilization of seafood processing by-products: medicinal applications. *Adv Food Nutr Res* (2012) **65**:495–512. doi:10.1016/B978-0-12-416003-3.00032-9
32. Zhou ZF, Guo YW. Bioactive natural products from Chinese marine flora and fauna. *Acta Pharmacol Sin* (2012) **33**:1159–69. doi:10.1038/aps.2012.110
33. Mayer AM, Gustafson KR. Marine pharmacology in 2005–2006: antitumour and cytotoxic compounds. *Eur J Cancer* (2008) **44**:2357–87. doi:10.1016/j.ejca.2008.07.001
34. Molinski TF, Dalisay DS, Lievens SL, Saludes JP. Drug development from marine natural products. *Nat Rev Drug Discov* (2009) **8**:69–85. doi:10.1038/nrd2487
35. Ellingwood F, Lloyd JU. *American Materia Medica, Therapeutics and Pharmacognosy: Developing the Latest Acquired Knowledge of Drugs, and Especially of the Direct Action of Single Drugs Upon Exact Conditions of Disease, with Especial Reference to the Therapeutics of the Plant Drugs of the Americas*. Chicago: Ellingwood's therapist (1919). 542 p.
36. Lloyd J, Felter H. *King's American Dispensatory*. 18th ed. Sandy, OR: Eclectic Medical Publications (1898).
37. Moerman DE. *Native American Ethnobotany Database*. Portland: Timber Press, Inc (1998). 927 p.
38. Remington JP. *The Dispensatory of the United States of America*. Philadelphia: Lippincott (1918). 2010 p.
39. Muhammad A, Guerrero-Analco JA, Martineau LC, Musallam L, Madiraju P, Nachar A, et al. Antidiabetic compounds from *Sarracenia purpurea* used traditionally by the Eeyou Istchee Cree First Nation. *J Nat Prod* (2012) **75**:1284–8. doi:10.1021/np3001317
40. Renshaw CJ. Treatment of smallpox by *Sarracenia Purpurea*. *BMJ* (1863) **1**:127–127. doi:10.1136/bmj.1.109.127
41. Behera KK, Sahoo S, Mohapatra PC. Medicinal plant resources for bioprospecting and drug development in tribal rich district of Orissa, India. *Ethnobot Leaflet* (2007) **11**:106–12.
42. Kayang H, Kharbuli B, Myrboh B, Syiem D. Medicinal plants of Khasi hills of Meghalaya, India. In: Bernath ENJ, Craker LE, Gardner ZE, editors. *III WOCMAP Congress on Medicinal and Aromatic Plants-Volume 1: Bioprospecting and Ethnopharmacology*. Chiang Mai: Acta Horticulturae (2003). p. 75–80.
43. Kumar S. *The Medicinal Plants of North-East India*. Jodhpur: Scientific Publishers (2002). 212 p.
44. Prasad MNV, Jeeva S. Coal mining and its leachate are potential threats to *Nepenthes khasiana* Hook. f. (*Nepenthaceae*) that preys on insects—an endemic plant in North Eastern India. *Biol Div Con* (2009) **2**:29–33.
45. Shin KS, Lee S, Cha BJ. Suppression of phytopathogenic fungi by hexane extract of *Nepenthes ventricosa* x *maxima* leaf. *Fitoterapia* (2007) **78**:585–6. doi:10.1016/j.fitote.2007.03.020
46. Singh J, Mudgal V. Studies on habitat conditions of a few plants species of medicinal values of Nokrek Biosphere Reserve, Meghalaya. *J Non-Timber For Products* (1999) **6**:4.
47. Volkov AG, Murphy VA, Clemmons JI, Curley MJ, Markin VS. Energetics and forces of the *Dionaea muscipula* trap closing. *J Plant Physiol* (2012) **169**:55–64. doi:10.1016/j.jplph.2011.08.003
48. Volkov AG, Harris SL 2nd, Vilfranc CL, Murphy VA, Wooten JD, Paulic H, et al. Venus flytrap biomechanics: forces in the *Dionaea muscipula* trap. *J Plant Physiol* (2013) **170**:25–32. doi:10.1016/j.jplph.2012.08.009
49. Volkov AG, Adesina T, Markin VS, Jovanov E. Kinetics and mechanism of *Dionaea muscipula* trap closing. *Plant Physiol* (2008) **146**:694–702. doi:10.1104/pp.107.108241
50. Schulze WX, Sanggaard KW, Kreuzer I, Knudsen AD, Bemm F, Thogersen IB, et al. The protein composition of the digestive fluid from the venus flytrap sheds light on prey digestion mechanisms. *Mol Cell Proteomics* (2012) **11**:1306–19. doi:10.1074/mcp.M112.021006
51. Adlansnig W, Koller-Peroutka M, Bauer S, Koshkin E, Lendl T, Lichtscheidl IK. Endocytotic uptake of nutrients in carnivorous plants. *Plant J* (2012) **71**:303–13. doi:10.1111/j.1365-313X.2012.04997.x
52. Krol E, Plachno BJ, Adamec L, Stolarz M, Dziubinska H, Trebacz K. Quite a few reasons for calling carnivores 'the most wonderful plants in the world.' *Ann Bot (Lond)* (2012) **109**:47–64. doi:10.1093/aob/mcr249
53. Scala J, Iott K, Schwab DW, Semersky FE. Digestive secretion of *Dionaea muscipula* (Venus's Fly-trap). *Plant Physiol* (1969) **44**:367–71. doi:10.1104/pp.44.3.367
54. Kovacik J, Klejduš B, Repcakova K. Phenolic metabolites in carnivorous plants: inter-specific comparison and physiological studies. *Plant Physiol Biochem* (2012) **52**:21–7. doi:10.1016/j.plaphy.2011.11.007
55. Krollicka A, Szpitter A, Gilgenast E, Romanik G, Kaminski M, Lojkowska E. Induction of naphthoquinone and flavonoid production in *Dionaea muscipula* and *Drosera capensis*. *Plant Med* (2006) **72**:137.
56. Nagata T, Ebizuka Y. *Medicinal and Aromatic Plants XII*. Dordrecht: Springer (2002). 348 p.
57. Pakulski G, Budzianowski J. Ellagic acid derivatives and naphthoquinones from *Dionaea muscipula* from *in vitro* cultures. *Phytochemistry* (1996) **41**:775–8. doi:10.1016/0031-9422(96)89675-0
58. Tokunaga T, Takada N, Ueda M. Mechanism of antifeedant activity of plumbagin, a compound concerning the chemical defense in carnivorous plant. *Tetrahedron Lett* (2004) **45**:7115–9. doi:10.1016/j.tetlet.2004.07.094
59. Hsieh Y-J, Lin L-C, Tsai T-H. Determination and identification of plumbagin from the roots of *Plumbago zeylanica* L. by liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* (2005) **1083**:141–5. doi:10.1016/j.chroma.2005.06.030
60. Bashir A, Abdalla A, Wasfi I, Hassan E, Amiri M, Crabb T. Flavonoids of *Limonium axillare*. *Pharm Biol* (1994) **32**:366–72. doi:10.3109/13880209409083017
61. Binder RG, Benson ME, Flath RA. Eight 1, 4-naphthoquinones from *Juglans*. *Phytochemistry* (1989) **28**:2799–801. doi:10.1016/S0031-9422(00)98092-0
62. Hedin PA, Collum DH, Langhans VE, Graves CH. Distribution of juglone and related compounds in pecan and their effect on *Fusicladium effusum*. *J Agric*

- Food Chem* (1980) **28**:340–2. doi:10.1021/jf60228a026
63. Raj G, Kurup R, Hussain AA, Baby S. Distribution of naphthoquinones, plumbagin, droserone, and 5-O-methyl droserone in chitin-induced and uninduced *Nepenthes khasiana*: molecular events in prey capture. *J Exp Bot* (2011) **62**:5429–36. doi:10.1093/jxb/err219
 64. Aung HH, Chia LS, Goh NK, Chia TF, Ahmed AA, Pare PW, et al. Phenolic constituents from the leaves of the carnivorous plant *Nepenthes gracilis*. *Fitoterapia* (2002) **73**:445–7. doi:10.1016/S0367-326X(02)00113-2
 65. Kawiak A, Piosik J, Stasiłojc G, Gwizdek-Wisniewska A, Marczak L, Stobiecki M, et al. Induction of apoptosis by plumbagin through reactive oxygen species-mediated inhibition of topoisomerase II. *Toxicol Appl Pharmacol* (2007) **223**:267–76. doi:10.1016/j.taap.2007.05.018
 66. Acharya BR, Bhattacharyya B, Chakrabarti G. The natural naphthoquinone plumbagin exhibits antiproliferative activity and disrupts the microtubule network through tubulin binding. *Biochemistry* (2008) **47**:7838–45. doi:10.1021/bi800730q
 67. Hsu YL, Cho CY, Kuo PL, Huang YT, Lin CC. Plumbagin (5-hydroxy-2-methyl-1,4-naphthoquinone) induces apoptosis and cell cycle arrest in A549 cells through p53 accumulation via c-Jun NH2-terminal kinase-mediated phosphorylation at serine 15 in vitro and in vivo. *J Pharmacol Exp Ther* (2006) **318**:484–94. doi:10.1124/jpet.105.098863
 68. Sandur SK, Ichikawa H, Sethi G, Ahn KS, Aggarwal BB. Plumbagin (5-hydroxy-2-methyl-1,4-naphthoquinone) suppresses NF-kappaB activation and NF-kappaB-regulated gene products through modulation of p65 and Ikbpp kinase activation, leading to potentiation of apoptosis induced by cytokine and chemotherapeutic agents. *J Biol Chem* (2006) **281**:17023–33.
 69. Li L, Huang J, Xu X, Zhang Y, Cheng K, Yu P. Study on chemical constituents of *Drosera peltata* var. *multiseptata*. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* (2012) **37**:222–5.
 70. Gu JQ, Graf TN, Lee D, Chai HB, Mi Q, Kardono LB, et al. Cytotoxic and antimicrobial constituents of the bark of *Diospyros maritima* collected in two geographical locations in Indonesia. *J Nat Prod* (2004) **67**:1156–61. doi:10.1021/np040027m
 71. Lin LC, Yang LL, Chou CJ. Cytotoxic naphthoquinones and plumbagic acid glucosides from *Plumbago zeylanica*. *Phytochemistry* (2003) **62**:619–22. doi:10.1016/S0031-9422(02)00519-8
 72. Whitson EL, Sun H, Thomas CL, Henrich CJ, Sayers TJ, McMahon JB, et al. Synergistic TRAIL sensitizers from *Barleria alluaudii* and *Diospyros maritima*. *J Nat Prod* (2012) **75**:394–9. doi:10.1021/np200805z
 73. Budzianowski J, Budzianowska A, Kromer K. Naphthalene glucoside and other phenolics from the shoot and callus cultures of *Drosophyllum lusitanicum*. *Phytochemistry* (2002) **61**:421–5. doi:10.1016/S0031-9422(02)00258-3
 74. Bringmann G, Rischer H, Wohlfarth M, Schlauer J, Assi LA. Droserone from cell cultures of *Triphyophyllum peltatum* (Dioncophyllaceae) and its biosynthetic origin. *Phytochemistry* (2000) **53**:339–43. doi:10.1016/S0031-9422(99)00543-9
 75. Sidhu G, Sankaram A. A new biplumbagin and 3-chloroplumbagin from *Plumbago zeylanica*. *Tetrahedron Lett* (1971) **12**:2385–8. doi:10.1016/S0040-4039(01)96870-4
 76. Likhitwitayawuid K, Kaewamatawong R, Ruangrunsi N, Krungkrai J. Antimalarial naphthoquinones from *Nepenthes thorelii*. *Planta Med* (1998) **64**:237–41. doi:10.1055/s-2006-957417
 77. Miyoshi E, Shizuri Y, Yamamura S. Isolation and structures of diomuscipinone and diomuscipulone from *Dionaea muscipula*. *Phytochemistry* (1984) **23**:2385–7. doi:10.1016/S0031-9422(00)80563-4
 78. Salae A-W, Karalai C, Ponglamanont C, Kanjana-Opas A, Yuenyongsawad S. Naphthalene derivatives from *Diospyros wallichii*. *Can J Chem* (2010) **88**:922–7. doi:10.1139/V10-084
 79. Aguilera-Carbo A, Augur C, Prado-Barragan L, Aguilar C, Favela-Torres E. Extraction and analysis of ellagic acid from novel complex sources. *Chem Papers* (2008) **62**:440–4. doi:10.2478/s11696-008-0042-y
 80. Cardona JA, Lee JH, Talcott ST. Color and polyphenolic stability in extracts produced from muscadine grape (*Vitis rotundifolia*) pomace. *J Agric Food Chem* (2009) **57**:8421–5. doi:10.1021/jf901840t
 81. Huang WY, Zhang HC, Liu WX, Li CY. Survey of antioxidant capacity and phenolic composition of blueberry, blackberry, and strawberry in Nanjing. *J Zhejiang Univ Sci B* (2012) **13**:94–102. doi:10.1631/jzus.B1100137
 82. Pellati F, Bruni R, Righi D, Grandini A, Tognolini M, Pio Prencipe F, et al. Metabolite profiling of polyphenols in a *Terminalia chebula* Retzius ayurvedic decoction and evaluation of its chemopreventive activity. *J Ethnopharmacol* (2013) **147**:277–85. doi:10.1016/j.jep.2013.02.025
 83. Edderkaoui M, Odinokova I, Ohno I, Gukovsky I, Go VL, Pandolfi SJ, et al. Ellagic acid induces apoptosis through inhibition of nuclear factor kappa B in pancreatic cancer cells. *World J Gastroenterol* (2008) **14**:3672–80. doi:10.3748/wjg.14.3672
 84. Malik A, Afaq S, Shahid M, Akhtar K, Assiri A. Influence of ellagic acid on prostate cancer cell proliferation: a caspase-dependent pathway. *Asian Pac J Trop Med* (2011) **4**:550–5. doi:10.1016/S1995-7645(11)60144-2
 85. Tan KW, Li Y, Paxton JW, Birch NP, Scheepers A. Identification of novel dietary phytochemicals inhibiting the efflux transporter breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2). *Food Chem* (2013) **138**:2267–74. doi:10.1016/j.foodchem.2012.12.021
 86. Karimi E, Oskoueian E, Hendra R, Oskoueian A, Jaafar HZ. Phenolic compounds characterization and biological activities of *Citrus aurantium* bloom. *Molecules* (2012) **17**:1203–18. doi:10.3390/molecules17021203
 87. Lai TN, Herent MF, Quetin-Leclercq J, Nguyen TB, Rogez H, Larondelle Y, et al. Piceatanol, a potent bioactive stilbene, as major phenolic component in *Rhodomyrtus tomentosa*. *Food Chem* (2013) **138**:1421–30. doi:10.1016/j.foodchem.2012.10.125
 88. Sultana N, Akhter M, Khatoun Z. Nematocidal natural products from the aerial parts of *Rubus niveus*. *Nat Prod Res* (2010) **24**:407–15. doi:10.1080/14786410802696429
 89. Verma S, Singh A, Mishra A. Gallic acid: molecular rival of cancer. *Environ Toxicol Pharmacol* (2013) **35**:473–85. doi:10.1016/j.etap.2013.02.011
 90. Weidner S, Rybarczyk A, Karamac M, Krol A, Mostek A, Grebosz J, et al. Differences in the phenolic composition and antioxidant properties between *Vitis coignetiae* and *Vitis vinifera* seeds extracts. *Molecules* (2013) **18**:3410–26. doi:10.3390/molecules18033410
 91. Chandramohan Reddy T, Bharat Reddy D, Aparna A, Arunasree KM, Gupta G, Achari C, et al. Anti-leukemic effects of gallic acid on human leukemia K562 cells: downregulation of COX-2, inhibition of BCR/ABL kinase and NF-kappaB inactivation. *Toxicol In vitro* (2012) **26**:396–405. doi:10.1016/j.tiv.2011.12.018
 92. León-González AJ, Truchado P, Tomás-Barberán FA, López-Lázaro M, Barradas MCD, Martín-Cordero C. Phenolic acids, flavonols and anthocyanins in *Corema album* (L.) D. Don berries. *J Food Compos Anal* (2013) **29**:58–63. doi:10.1016/j.jfca.2012.10.003
 93. Ao C, Li A, Elzaawely AA, Xuan TD, Tawata S. Evaluation of antioxidant and antibacterial activities of *Ficus microcarpa* L. fl. extract. *Food Control* (2008) **19**:940–8. doi:10.1016/j.foodcont.2007.09.007
 94. Cottle W, Kolattukudy PE. Biosynthesis, deposition, and partial characterization of potato suberin phenolics. *Plant Physiol* (1982) **69**:393–9. doi:10.1104/pp.69.2.393
 95. Lirdprapamongkol K, Sakurai H, Kawasaki N, Choo MK, Saitoh Y, Aozuka Y, et al. Vanillin suppresses in vitro invasion and in vivo metastasis of mouse breast cancer cells. *Eur J Pharm Sci* (2005) **25**:57–65. doi:10.1016/j.ejps.2005.01.015
 96. Lirdprapamongkol K, Sakurai H, Suzuki S, Koizumi K, Prangsaengtong O, Viriyaraj A, et al. Vanillin enhances TRAIL-induced apoptosis in cancer cells through inhibition of NF-kappaB activation. *In vivo* (2010) **24**:501–6.
 97. Lirdprapamongkol K, Kramb JP, Suthiphongchai T, Surarit R, Srisomsap C, Dannhardt G, et al. Vanillin suppresses metastatic potential of human cancer cells through PI3K inhibition and decreases angiogenesis in vivo. *J Agric Food Chem* (2009) **57**:3055–63. doi:10.1021/jf803366f
 98. Shahidi F, Perera N. Oil and phytochemicals from small fruit seeds. In: Chi-Tang Ho CM, Shahidi F, Contis ET, editors. *Nutrition, Functional and Sensory Properties of*

- Foods*. Cambridge: RSC Publishing (2013). p. 224–30.
99. Hudson EA, Dinh PA, Kokubun T, Simmonds MS, Gescher A. Characterization of potentially chemopreventive phenols in extracts of brown rice that inhibit the growth of human breast and colon cancer cells. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* (2000) **9**:1163–70.
 100. Chen FF, Wang GY, Shi YP. Molecularly imprinted polymer microspheres for solid-phase extraction of protocatechuic acid in *Rhizoma homalomenae*. *J Sep Sci* (2011) **34**:2602–10. doi:10.1002/jssc.201100463
 101. Lin HH, Chen JH, Wang CJ. Chemopreventive properties and molecular mechanisms of the bioactive compounds in *Hibiscus sabdariffa* Linne. *Curr Med Chem* (2011) **18**:1245–54. doi:10.2174/092986711795029663
 102. Qing ZJ, Yong W, Hui LY, Yong LW, Long LH, Ao DJ, et al. Two new natural products from the fruits of *Alpinia oxyphylla* with inhibitory effects on nitric oxide production in lipopolysaccharide-activated RAW264.7 macrophage cells. *Arch Pharm Res* (2012) **35**:2143–6. doi:10.1007/s12272-012-1211-7
 103. Tang RN, Qu XB, Guan SH, Xu PP, Shi YY, Guo DA. Chemical constituents of *Spatholobus suberectus*. *Chin J Nat Med* (2012) **10**:32–5. doi:10.3724/SP.J.1009.2012.00032
 104. Lin HH, Chen JH, Chou FP, Wang CJ. Protocatechuic acid inhibits cancer cell metastasis involving the down-regulation of Ras/Akt/NF- κ B pathway and MMP-2 production by targeting RhoB activation. *Br J Pharmacol* (2011) **162**:237–54. doi:10.1111/j.1476-5381.2010.01022.x
 105. Anter J, Romero-Jimenez M, Fernandez-Bedmar Z, Villatoro-Pulido M, Analla M, Alonso-Moraga A, et al. Antigenotoxicity, cytotoxicity, and apoptosis induction by apigenin, bisabolol, and protocatechuic acid. *J Med Food* (2011) **14**:276–83. doi:10.1089/jmf.2010.0139
 106. Scognamiglio M, Esposito A, D'Abrosca B, Pacifico S, Fiumano V, Tsafantakis N, et al. Isolation, distribution and allelopathic effect of caffeic acid derivatives from *Bellis perennis* L. *Biochem Syst Ecol* (2012) **43**:108–13. doi:10.1016/j.bse.2012.02.025
 107. Rajendra Prasad N, Karthikeyan A, Karthikeyan S, Reddy BV. Inhibitory effect of caffeic acid on cancer cell proliferation by oxidative mechanism in human HT-1080 fibrosarcoma cell line. *Mol Cell Biochem* (2011) **349**:11–9. doi:10.1007/s11010-010-0655-7
 108. Moon MK, Lee YJ, Kim JS, Kang DG, Lee HS. Effect of caffeic acid on tumor necrosis factor- α -induced vascular inflammation in human umbilical vein endothelial cells. *Biol Pharm Bull* (2009) **32**:1371–7. doi:10.1248/bpb.32.1371
 109. Jaganathan SK. Growth inhibition by caffeic acid, one of the phenolic constituents of honey, in HCT 15 colon cancer cells. *Scientific-WorldJournal* (2012) **2012**:372345. doi:10.1100/2012/372345
 110. Bouayed J, Rammal H, Dicko A, Younos C, Soulimani R. Chlorogenic acid, a polyphenol from *Prunus domestica* (Mirabelle), with coupled anxiolytic and antioxidant effects. *J Neurol Sci* (2007) **262**:77–84. doi:10.1016/j.jns.2007.06.028
 111. Moores R, McDermott DL, Wood T. Determination of chlorogenic acid in coffee. *Anal Chem* (1948) **20**:620–4. doi:10.1021/ac60019a007
 112. Zhang B, Yang R, Liu C-Z. Microwave-assisted extraction of chlorogenic acid from flower buds of *Lonicera japonica* Thunb. *Sep Purif Technol* (2008) **62**:480–3. doi:10.1016/j.seppur.2008.02.013
 113. Yang J-S, Liu C-W, Ma Y-S, Weng S-W, Tang N-Y, Wu S-H, et al. Chlorogenic acid induces apoptotic cell death in U937 leukemia cells through caspase- and mitochondria-dependent pathways. *In vivo* (2012) **26**:971–8.
 114. Graf E. Antioxidant potential of ferulic acid. *Free Radic Biol Med* (1992) **13**:435–48. doi:10.1016/0891-5849(92)90184-1
 115. Hayat S, Ali B, Ahmad A. Salicylic acid: biosynthesis, metabolism and physiological role in plants. In: Hayat S, Ahmad A, editors. *Salicylic Acid: A Plant Hormone*. Dordrecht: Springer (2007). p. 1–14.
 116. Zitta K, Meybohm P, Bein B, Huang Y, Heinrich C, Scholz J, et al. Salicylic acid induces apoptosis in colon carcinoma cells grown in vitro: influence of oxygen and salicylic acid concentration. *Exp Cell Res* (2012) **318**:828–34. doi:10.1016/j.yexcr.2012.02.002
 117. Spitz GA, Furtado CM, Solapenna M, Zancan P. Acetylsalicylic acid and salicylic acid decrease tumor cell viability and glucose metabolism modulating 6-phosphofructo-1-kinase structure and activity. *Biochem Pharmacol* (2009) **77**:46–53. doi:10.1016/j.bcp.2008.09.020
 118. Afify Ael M, El-Beltagi HS, El-Salam SM, Omran AA. Biochemical changes in phenols, flavonoids, tannins, vitamin E, beta-carotene and antioxidant activity during soaking of three white sorghum varieties. *Asian Pac J Trop Biomed* (2012) **2**:203–9. doi:10.1016/S2221-1691(12)60042-2
 119. Abaza MS, Al-Attayah R, Bhardwaj R, Abbadi G, Koyippally M, Afzal M. Syringic acid from *Tamarix aucheriana* possesses antimitogenic and chemo-sensitizing activities in human colorectal cancer cells. *Pharm Biol* (2013). doi:10.3109/13880209.2013.781194. [Epub ahead of print].
 120. Kampa M, Alexaki VI, Notas G, Nifli AP, Nistikaki A, Hatzoglou A, et al. Antiproliferative and apoptotic effects of selective phenolic acids on T47D human breast cancer cells: potential mechanisms of action. *Breast Cancer Res* (2004) **6**:R63–74. doi:10.1186/bcr752
 121. Muhammad A, Haddad PS, Durst T, Arnason JT. Phytochemical constituents of *Sarracenia purpurea* L. (pitcher plant). *Phytochemistry* (2013). doi:10.1016/j.phytochem.2013.05.015. [Epub ahead of print].
 122. Park CH, Chang JY, Hahm ER, Park S, Kim HK, Yang CH. Quercetin, a potent inhibitor against beta-catenin/Tcf signaling in SW480 colon cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* (2005) **328**:227–34. doi:10.1016/j.bbrc.2004.12.151
 123. Shan BE, Wang MX, Li RQ. Quercetin inhibit human SW480 colon cancer growth in association with inhibition of cyclin D1 and survivin expression through Wnt/beta-catenin signaling pathway. *Cancer Invest* (2009) **27**:604–12. doi:10.1080/07357900802337191
 124. Vidya Priyadarsini R, Senthil Murugan R, Maitreyi S, Ramalingam K, Karunakaran D, Nagini S. The flavonoid quercetin induces cell cycle arrest and mitochondria-mediated apoptosis in human cervical cancer (HeLa) cells through p53 induction and NF- κ B inhibition. *Eur J Pharmacol* (2010) **649**:84–91. doi:10.1016/j.ejphar.2010.09.020
 125. Bishayee K, Ghosh S, Mukherjee A, Sadhukhan R, Mondal J, Khuda-Bukhsh AR. Quercetin induces cytochrome-c release and ROS accumulation to promote apoptosis and arrest the cell cycle in G2/M, in cervical carcinoma: signal cascade and drug-DNA interaction. *Cell Prolif* (2013) **46**:153–63. doi:10.1111/cpr.12017
 126. Kang JW, Kim JH, Song K, Kim SH, Yoon JH, Kim KS. Kaempferol and quercetin, components of *Ginkgo biloba* extract (Egb 761), induce caspase-3-dependent apoptosis in oral cavity cancer cells. *Phytother Res* (2010) **24**(Suppl 1):S77–82. doi:10.1002/ptr.2913
 127. Pakulski G, Budzianowski J. Quercetin and kaempferol glycosides of *Dionaea muscipula* from in vitro cultures. *Planta Med* (1996) **62**:95–6. doi:10.1055/s-2006-957824
 128. Hakkinen SH, Karenlampi SO I, Heinonen M, Mykkanen HM, Torronen AR. Content of the flavonols quercetin, myricetin, and kaempferol in 25 edible berries. *J Agric Food Chem* (1999) **47**:2274–9. doi:10.1021/jf9811065
 129. Oskoueian E, Abdullah N, Ahmad S, Saad WZ, Omar AR, Ho YW. Bioactive compounds and biological activities of *Jatropha curcas* L. kernel meal extract. *Int J Mol Sci* (2011) **12**:5955–70. doi:10.3390/ijms12095955
 130. Zwolak P, Borja-Cacho D, Phillips P, Dudeja V, Dawra RK, Talukdar R, et al. Myricetin a novel natural antineoplastic agent decreases progression of human pancreatic cancer via inhibition of Akt kinase and Erk pathways. *J Surg Res* (2008) **144**:200–200. doi:10.1016/j.jss.2007.12.063
 131. Sun F, Zheng XY, Ye J, Wu TT, Wang J, Chen W. Potential anticancer activity of myricetin in human T24 bladder cancer cells both in vitro and in vivo. *Nutr Cancer* (2012) **64**:599–606. doi:10.1080/01635581.2012.665564
 132. Calderon-Montano JM, Burgos-Moron E, Perez-Guerrero C, Lopez-Lazaro M. A review on the dietary flavonoid kaempferol. *Mini Rev Med Chem* (2011) **11**:298–344. doi:10.2174/138955711795305335
 133. Luo H, Rankin GO, Li Z, Depriest L, Chen YC. Kaempferol induces apoptosis in ovarian cancer cells through activating p53 in the intrinsic pathway. *Food Chem* (2011) **128**:513–9. doi:10.1016/j.foodchem.2011.03.073
 134. Luo H, Rankin GO, Juliano N, Jiang BH, Chen YC. Kaempferol inhibits VEGF expression and in vitro angiogenesis through a novel ERK-NF κ B-cMyccp21 pathway. *Food Chem*

- (2012) **130**:321–8. doi:10.1016/j.foodchem.2011.07.045
135. Babula P, Adam V, Kizek R, Sladký Z, Havel L. Naphthoquinones as allelochemical triggers of programmed cell death. *Environ Exp Bot* (2009) **65**:330–7. doi:10.1016/j.envexpbot.2008.11.007
 136. Babula P, Mikelova R, Adam V, Kizek R, Havel L, Sladký Z. Using of liquid chromatography coupled with diode array detector for determination of naphthoquinones in plants and for investigation of influence of pH of cultivation medium on content of plumbagin in *Dionaea muscipula*. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* (2006) **842**:28–35. doi:10.1016/j.jchromb.2006.05.009
 137. Eilenberg H, Pnini-Cohen S, Rahamim Y, Sionov E, Segal E, Carmeli S, et al. Induced production of antifungal naphthoquinones in the pitchers of the carnivorous plant *Nepenthes khasiana*. *J Exp Bot* (2010) **61**:911–22. doi:10.1093/jxb/erp359
 138. Marczak L, Kawiak A, Lojkowska E, Stobiecki M. Secondary metabolites in in vitro cultured plants of the genus *Drosera*. *Phytochem Anal* (2005) **16**:143–9. doi:10.1002/pca.833
 139. Tilak JC, Adhikari S, Devasagayam TP. Antioxidant properties of *Plumbago zeylanica*, an Indian medicinal plant and its active ingredient, plumbagin. *Redox Rep* (2004) **9**:219–27. doi:10.1179/135100004225005976
 140. Kuo PL, Hsu YL, Cho CY. Plumbagin induces G2-M arrest and autophagy by inhibiting the AKT/mammalian target of rapamycin pathway in breast cancer cells. *Mol Cancer Ther* (2006) **5**:3209–21. doi:10.1158/1535-7163.MCT-06-0478
 141. Wang CC, Chiang YM, Sung SC, Hsu YL, Chang JK, Kuo PL. Plumbagin induces cell cycle arrest and apoptosis through reactive oxygen species/c-Jun N-terminal kinase pathways in human melanoma A375.S2 cells. *Cancer Lett* (2008) **259**:82–98. doi:10.1016/j.canlet.2007.10.005
 142. Gomathinayagam R, Sowmyalakshmi S, Mardhatillah F, Kumar R, Akbarsha MA, Damodaran C. Anticancer mechanism of plumbagin, a natural compound, on non-small cell lung cancer cells. *Anticancer Res* (2008) **28**:785–92.
 143. Yang SJ, Chang SC, Wen HC, Chen CY, Liao JF, Chang CH. Plumbagin activates ERK1/2 and Akt via superoxide, Src and PI3-kinase in 3T3-L1 cells. *Eur J Pharmacol* (2010) **638**:21–8. doi:10.1016/j.ejphar.2010.04.016
 144. Hafeez BB, Zhong W, Fischer JW, Mustafa A, Shi X, Meske L, et al. Plumbagin, a medicinal plant (*Plumbago zeylanica*)-derived 1,4-naphthoquinone, inhibits growth and metastasis of human prostate cancer PC-3M-luciferase cells in an orthotopic xenograft mouse model. *Mol Oncol* (2013). 7:428–39. doi:10.1016/j.molonc.2012.12.001
 145. Sinha S, Pal K, Elkhanany A, Dutta S, Cao Y, Mondal G, et al. Plumbagin inhibits tumorigenesis and angiogenesis of ovarian cancer cells in vivo. *Int J Cancer* (2013) **132**:1201–12. doi:10.1002/ijc.27724
 146. Thasni KA, Raheeshkumar T, Rojini G, Sivakumar KC, Nair RS, Srinivas G, et al. Structure activity relationship of plumbagin in BRCA1 related cancer cells. *Mol Carcinog* (2013) **52**:392–403. doi:10.1002/mc.21877
 147. Lee JH, Yeon JH, Kim H, Roh W, Chae J, Park HO, et al. The natural anticancer agent plumbagin induces potent cytotoxicity in MCF-7 human breast cancer cells by inhibiting a PI-5 kinase for ROS generation. *PLoS ONE* (2012) **7**:e45023. doi:10.1371/journal.pone.0045023
 148. Padhye S, Dandawate P, Yusufi M, Ahmad A, Sarkar FH. Perspectives on medicinal properties of plumbagin and its analogs. *Med Res Rev* (2012) **32**:1131–58. doi:10.1002/med.20235
 149. Sun J, McKallip RJ. Plumbagin treatment leads to apoptosis in human K562 leukemia cells through increased ROS and elevated TRAIL receptor expression. *Leuk Res* (2011) **35**:1402–8. doi:10.1016/j.leukres.2011.06.018
 150. Shukla S, Wu CP, Nandigama K, Ambudkar SV. The naphthoquinones, vitamin K3 and its structural analogue plumbagin, are substrates of the multidrug resistance linked ATP binding cassette drug transporter ABCG2. *Mol Cancer Ther* (2007) **6**:3279–86. doi:10.1158/1535-7163.MCT-07-0564
 151. Hsieh YJ, Lin LC, Tsai TH. Measurement and pharmacokinetic study of plumbagin in a conscious freely moving rat using liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* (2006) **844**:1–5. doi:10.1016/j.jchromb.2006.06.024
 152. Higa M, Ogihara K, Yogi S. Bioactive naphthoquinone derivatives from *Diospyros maritima* Blume. *Chem Pharm Bull* (1998) **46**:1189–93. doi:10.1248/cpb.46.1189
 153. Lattanzio V, Lattanzio VM, Cardinali A. Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects. *Phytochemistry* (2006) **66**:1:23–67.
 154. Muller-Scharer H, Schaffner U, Steinger T. Evolution in invasive plants: implications for biological control. *Trends Ecol Evol* (2004) **19**:417–22.
 155. Wang Y, Siemann E, Wheeler GS, Zhu L, Gu X, Ding J. Genetic variation in anti-herbivore chemical defences in an invasive plant. *J Ecol* (2012) **100**:894–904. doi:10.1111/j.1365-2745.2012.01980.x
 156. Hancock V, Dahl M, Vejborg RM, Klemm P. Dietary plant components ellagic acid and tannic acid inhibit *Escherichia coli* biofilm formation. *J Med Microbiol* (2010) **59**:496–8. doi:10.1099/jmm.0.013680-0
 157. Quave CL, Estevez-Carmona M, Compadre CM, Hobby G, Hendrickson H, Beenken KE, et al. Ellagic acid derivatives from *Rubus ulmifolius* inhibit *Staphylococcus aureus* biofilm formation and improve response to antibiotics. *PLoS ONE* (2012) **7**:e28737. doi:10.1371/journal.pone.0028737
 158. Umeshalma S, Sudhandiran G. Differential inhibitory effects of the polyphenol ellagic acid on inflammatory mediators NF-kappaB, iNOS, COX-2, TNF-alpha, and IL-6 in 1,2-dimethylhydrazine-induced rat colon carcinogenesis. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* (2010) **107**:650–5. doi:10.1111/j.1742-7843.2010.00565.x
 159. Wang N, Wang ZY, Mo SL, Loo TY, Wang DM, Luo HB, et al. Ellagic acid, a phenolic compound, exerts anti-angiogenesis effects via VEGFR-2 signaling pathway in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* (2012) **134**:943–55. doi:10.1007/s10549-012-1977-9
 160. Atri N, Sharma SK, Joshi R, Gulati A, Gulati A. Nutritional and nutraceutical composition of five wild culinary-medicinal species of genus pleurotus (higher basidiomycetes) from northwest India. *Int J Med Mushrooms* (2013) **15**:49–56. doi:10.1615/IntJMedMushr.v15.i1.60
 161. Hamedeyazdan S, Fathiazad F, Sharifi S, Nazemiyeh H. Antiproliferative activity of *Marrubium persicum* extract in the MCF-7 human breast cancer cell line. *Asian Pac J Cancer Prev* (2012) **13**:5843–8. doi:10.7314/APJCP.2012.13.11.5843
 162. Xiao S, Zhang LF, Zhang X, Li SM, Xue FQ. Tracing antibacterial compounds from *Acalypha australis* Linn. by spectrum-effect relationships and semi-preparative high-performance liquid chromatography. *J Sep Sci* (2013) **36**:1667–76. doi:10.1002/jssc.201201202
 163. Chanwithesuk A, Teerawutgulrag A, Kilburn JD, Rakariyatham N. Antimicrobial gallic acid from *Caesalpinia mimosoides* Lamk. *Food Chem* (2007) **100**:1044–8. doi:10.1016/j.foodchem.2005.11.008
 164. Nguyen DM, Seo DJ, Lee HB I, Kim S, Kim KY, Park RD, et al. Antifungal activity of gallic acid purified from *Terminalia nigrovenulosa* bark against *Fusarium solani*. *Microb Pathog* (2013) **56**:8–15. doi:10.1016/j.micpath.2013.01.001
 165. Ho HH, Chang CS, Ho WC, Liao SY, Lin WL, Wang CJ. Gallic acid inhibits gastric cancer cells metastasis and invasive growth via increased expression of RhoB, downregulation of AKT/small GTPase signals and inhibition of NF-kappaB activity. *Toxicol Appl Pharmacol* (2013) **266**:76–85. doi:10.1016/j.taap.2012.10.019
 166. Raina K, Rajamanickam S, Deep G, Singh M, Agarwal R, Agarwal C. Chemopreventive effects of oral gallic acid feeding on tumor growth and progression in TRAMP mice. *Mol Cancer Ther* (2008) **7**:1258–67. doi:10.1158/1535-7163.MCT-07-2220
 167. Liang CZ, Zhang X, Li H, Tao YQ, Tao LJ, Yang ZR, et al. Gallic acid induces the apoptosis of human osteosarcoma cells in vitro and in vivo via the regulation of mitogen-activated protein kinase pathways. *Cancer Biother Radiopharm* (2012) **27**:701–10. doi:10.1089/cbr.2012.1245
 168. Hodgson JM, Morton LW, Puddey IB, Beilin LJ, Croft KD. Gallic acid metabolites are markers of black tea intake in humans. *J Agric Food Chem* (2000) **48**:2276–80. doi:10.1021/jf000089s
 169. Shahrzad S, Aoyagi K, Winter A, Koyama A, Bitsch I.

- Pharmacokinetics of gallic acid and its relative bioavailability from tea in healthy humans. *J Nutr* (2001) **131**:1207–10.
170. Kaur B, Chakraborty D. Biotechnological and molecular approaches for vanillin production: a review. *Appl Biochem Biotechnol* (2013) **169**:1353–72. doi:10.1007/s12010-012-0066-1
171. Lesage-Meessen L, Lomascolo A, Bonnin E, Thibault JF, Buleon A, Roller M, et al. A biotechnological process involving filamentous fungi to produce natural crystalline vanillin from maize bran. *Appl Biochem Biotechnol* (2002) **10**(2–103):141–53. doi:10.1385/ABAB:102-103:1-6:141
172. Walton NJ, Narbad A, Faulds C, Williamson G. Novel approaches to the biosynthesis of vanillin. *Curr Opin Biotechnol* (2000) **11**:490–6. doi:10.1016/S0958-1669(00)00125-7
173. Walton NJ, Mayer MJ, Narbad A. Vanillin. *Phytochemistry* (2003) **63**:505–15. doi:10.1016/S0031-9422(03)00149-3
174. Boonchird C, Flegel TW. In vitro antifungal activity of eugenol and vanillin against *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans*. *Can J Microbiol* (1982) **28**:1235–41. doi:10.1139/m82-184
175. Yemis GP, Pagotto F, Bach S, Delaquais P. Effect of vanillin, ethyl vanillin, and vanillic acid on the growth and heat resistance of *Cronobacter* species. *J Food Prot* (2011) **74**:2062–9. doi:10.4315/0362-028X.JFP-11-230
176. Ho K, Yazan LS, Ismail N, Ismail M. Apoptosis and cell cycle arrest of human colorectal cancer cell line HT-29 induced by vanillin. *Cancer Epidemiol* (2009) **33**:155–60. doi:10.1016/j.canep.2009.06.003
177. Beaudry F, Ross A, Lema PP, Vachon P. Pharmacokinetics of vanillin and its effects on mechanical hypersensitivity in a rat model of neuropathic pain. *Phytother Res* (2010) **24**:525–30. doi:10.1002/ptr.2975
178. Strand LP, Scheline RR. The metabolism of vanillin and isovanillin in the rat. *Xenobiotica* (1975) **5**:49–63. doi:10.3109/00498257509056093
179. Tanaka T, Tanaka T, Tanaka M. Potential cancer chemopreventive activity of protocatechuic acid. *J Exp Clin Med* (2011) **3**:27–33.
180. Yip EC, Chan AS, Pang H, Tam YK, Wong YH. Protocatechuic acid induces cell death in HepG2 hepatocellular carcinoma cells through a c-Jun N-terminal kinase-dependent mechanism. *Cell Biol Toxicol* (2006) **22**:293–302. doi:10.1007/s10565-006-0082-4
181. Aziz NH, Farag SE, Mousa LA, Abo-Zaid MA. Comparative antibacterial and antifungal effects of some phenolic compounds. *Microbios* (1998) **93**:43–54.
182. Sato Y, Itagaki S, Kurokawa T, Ogura J, Kobayashi M, Hirano T, et al. *In vitro* and *in vivo* antioxidant properties of chlorogenic acid and caffeic acid. *Int J Pharm* (2011) **403**:136–8. doi:10.1016/j.ijpharm.2010.09.035
183. Lee WJ, Zhu BT. Inhibition of DNA methylation by caffeic acid and chlorogenic acid, two common catechol-containing coffee polyphenols. *Carcinogenesis* (2006) **27**:269–77. doi:10.1093/carcin/bgi206
184. Azuma K, Ippoushi K, Nakayama M, Ito H, Higashio H, Terao J. Absorption of chlorogenic acid and caffeic acid in rats after oral administration. *J Agric Food Chem* (2000) **48**:5496–500. doi:10.1021/jf000483q
185. Gonthier MP, Verny MA, Besson C, Remy C, Scalbert A. Chlorogenic acid bioavailability largely depends on its metabolism by the gut microflora in rats. *J Nutr* (2003) **133**:1853–9.
186. Olthof MR, Hollman PC, Katan MB. Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans. *J Nutr* (2001) **131**:66–71.
187. Peppercorn MA, Goldman P. Caffeic acid metabolism by bacteria of the human gastrointestinal tract. *J Bacteriol* (1971) **108**:996–1000.
188. Hulme AC. The isolation of chlorogenic acid from the apple fruit. *Biochem J* (1953) **53**:337–40.
189. Li H, Chen B, Yao S. Application of ultrasonic technique for extracting chlorogenic acid from *Eucommia ulmoides* Oliv. (*E. ulmoides*). *Ultrason Sonochem* (2005) **12**:295–300. doi:10.1016/j.ultsonch.2004.01.033
190. Stacewicz-Sapuntzakis M, Bowen PE, Hussain EA, Damayanti-Wood BI, Farnsworth NR. Chemical composition and potential health effects of prunes: a functional food? *Crit Rev Food Sci Nutr* (2001) **41**:251–86. doi:10.1080/20014091091814
191. Friend J, Reynolds S, Aveyard MA. Phenylalanine ammonia lyase, chlorogenic acid and lignin in potato tuber tissue inoculated with *Phytophthora infestans*. *Physiol Plant Pathol* (1973) **3**:495–507. doi:10.1016/0048-4059(73)90060-X
192. Hoover K, Alaniz SA, Yee JL, Rocke DM, Hammock BD, Duffey SS. Dietary protein and chlorogenic acid effect on baculoviral disease of noctuid (*Lepidoptera: Noctuidae*) larvae. *Environ Entomol* (1998) **27**:1264–72.
193. Ikonen A, Tahvanainen J, Roininen H. Chlorogenic acid as an antiherbivore defence of willows against leaf beetles. *Entomol Exp Appl* (2001) **99**:47–54. doi:10.1046/j.1570-7458.2001.00800.x
194. Leiss KA, Maltese F, Choi YH, Verpoorte R, Klinkhamer PG. Identification of chlorogenic acid as a resistance factor for thrips in chrysanthemum. *Plant Physiol* (2009) **150**:1567–75. doi:10.1104/pp.109.138131
195. Thurow T, Lee S-O. Effect of chlorogenic acid and neochlorogenic acid on human colon cancer cells. *Disc J* (2012) **13**:86–93.
196. Burgos-Moron E, Calderon-Montano JM, Orta ML, Pastor N, Perez-Guerrero C, Austin C, et al. The coffee constituent chlorogenic acid induces cellular DNA damage and formation of topoisomerase I- and II-DNA complexes in cells. *J Agric Food Chem* (2012). doi:10.1021/jf300999e
197. Rathod MA, Patel D, Das A, Tipparaju SR, Shinde SS, Anderson RF. Inhibition of radical-induced DNA strand breaks by water-soluble constituents of coffee; phenolics and caffeine metabolites. *Free Radic Res* (2013) **47**:480–7. doi:10.3109/10715762.2013.788167
198. Li ZH, Wang Q, Ruan X, Pan CD, Jiang DA. Phenolics and plant allelopathy. *Molecules* (2010) **15**:8933–52. doi:10.3390/molecules15128933
199. Palacio L, Cantero JJ, Cusido RM, Goleniowski ME. Phenolic compound production in relation to differentiation in cell and tissue cultures of *Larrea divaricata* (Cav.). *Plant Sci* (2012) **19**(3–194):1–7. doi:10.1016/j.plantsci.2012.05.007
200. Rasmussen JA, Einhellig FA. Synergistic inhibitory effects of p-coumaric and ferulic acids on germination and growth of grain sorghum. *J Chem Ecol* (1977) **3**:197–205. doi:10.1007/BF00994146
201. Smith BG, Harris PJ. Ferulic acid is esterified to glucuronoarabinoxylans in pineapple cell walls. *Phytochemistry* (2001) **56**:513–9. doi:10.1016/S0031-9422(00)00401-5
202. Zhao Z, Moghadasian MH. Chemistry, natural sources, dietary intake and pharmacokinetic properties of ferulic acid: a review. *Food Chem* (2008) **109**:691–702. doi:10.1016/j.foodchem.2008.02.039
203. Srinivasan M, Sudheer AR, Pillai KR, Kumar PR, Sudhakaran PR, Menon VP. Influence of ferulic acid on gamma-radiation induced DNA damage, lipid peroxidation and antioxidant status in primary culture of isolated rat hepatocytes. *Toxicology* (2006) **228**:249–58. doi:10.1016/j.tox.2006.09.004
204. Baskaran N, Manoharan S, Balakrishnan S, Pugalendhi P. Chemopreventive potential of ferulic acid in 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced mammary carcinogenesis in Sprague-Dawley rats. *Eur J Pharmacol* (2010) **637**:22–9. doi:10.1016/j.ejphar.2010.03.054
205. Alias LM, Manoharan S, Vellaichamy L, Balakrishnan S, Ramachandran CR. Protective effect of ferulic acid on 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced skin carcinogenesis in Swiss albino mice. *Exp Toxicol Pathol* (2009) **61**:205–14. doi:10.1016/j.etp.2008.09.001
206. Janicke B, Hegardt C, Krogh M, Onning G, Akesson B, Cirenajwis HM, et al. The antiproliferative effect of dietary fiber phenolic compounds ferulic acid and p-coumaric acid on the cell cycle of Caco-2 cells. *Nutr Cancer* (2011) **63**:611–22. doi:10.1080/01635581.2011.538486
207. Maurya DK, Devasagayam TP. Ferulic acid inhibits gamma radiation-induced DNA strand breaks and enhances the survival of mice. *Cancer Biother Radiopharm* (2013) **28**:51–7. doi:10.1089/cbr.2012.1263
208. Li W, Guo J, Tang Y, Wang H, Huang M, Qian D, et al. Pharmacokinetic comparison of ferulic acid in normal and blood deficiency rats after oral administration of *Angelica sinensis*, *Ligusticum chuanxiong* and their combination. *Int J Mol Sci* (2012) **13**:3583–97. doi:10.3390/ijms13033583
209. An C, Mou Z. Salicylic acid and its function in plant immunity. *J Integr Plant Biol* (2011) **53**:412–28. doi:10.1111/j.1744-7909.2011.01043.x

210. Durner J, Shah J, Klessig DF. Salicylic acid and disease resistance in plants. *Trends Plant Sci* (1997) 2:266–74. doi:10.1016/S1360-1385(97)86349-2
211. Fuster V, Sweeney JM. Aspirin: a historical and contemporary therapeutic overview. *Circulation* (2011) 123:768–78. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.110.963843
212. Raskin I. Role of salicylic acid in plants. *Annu Rev Plant Biol* (1992) 43:439–63. doi:10.1146/annurev.pp.43.060192.002255
213. Vlot AC, Dempsey DA, Klessig DF. Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annu Rev Phytopathol* (2009) 47:177–206. doi:10.1146/annurev.phyto.050908.135202
214. Sung B, Pandey MK, Ahn KS, Yi T, Chaturvedi MM, Liu M, et al. Anacardic acid (6-nonadecyl salicylic acid), an inhibitor of histone acetyltransferase, suppresses expression of nuclear factor-kappaB-regulated gene products involved in cell survival, proliferation, invasion, and inflammation through inhibition of the inhibitory subunit of nuclear factor-kappaB/alpha kinase, leading to potentiation of apoptosis. *Blood* (2008) 111:4880–91.
215. Rothwell PM, Wilson M, Elwin CE, Norrving B, Algra A, Warlow CP, et al. Long-term effect of aspirin on colorectal cancer incidence and mortality: 20-year follow-up of five randomised trials. *Lancet* (2010) 376:1741–50. doi:10.1016/S0140-6736(10)61543-7
216. Treutter D. Significance of flavonoids in plant resistance: a review. *Environ Chem Lett* (2006) 4:147–57. doi:10.1007/s10311-006-0068-8
217. Krolicka A, Szpitter A, Gilgenast E, Romanik G, Kaminski M, Lojkowska E. Stimulation of antibacterial naphthoquinones and flavonoids accumulation in carnivorous plants grown in vitro by addition of elicitors. *Enzyme Microb Technol* (2008) 42:216–21. doi:10.1016/j.enzmictec.2007.09.011
218. Lowry JB, Cook N, Wilson RD. Flavonol glycoside distribution in cultivars and hybrids of *Leucaena leucocephala*. *J Sci Food Agric* (1984) 35:401–7. doi:10.1002/jsfa.2740350407
219. Meckelmann SW, Riegel DW, Van Zonneveld MJ, Rios L, Pena F, Ugas R, et al. Compositional characterization of native Peruvian chili peppers (*Capsicum* spp.). *J Agric Food Chem* (2013) 61:2530–37. doi:10.1021/jf304986q
220. Stolarczyk M, Piwowarski JP, Granica S, Stefanska J, Naruszewicz M, Kiss AK. Extracts from *Epilobium* sp. herbs, their components and gut microbiota metabolites of *Epilobium Ellagitannins*, *Urolithins*, inhibit hormone-dependent prostate cancer cells-(LNCaP) proliferation and PSA secretion. *Phytother Res* (2013). doi:10.1002/ptr.4941. [Epub ahead of print].
221. Tlili N, Elfalleh W, Saadaoui E, Khaldi A, Triki S, Nasri N. The caper (*Capparis* L.): ethnopharmacology, phytochemical and pharmacological properties. *Fitoterapia* (2011) 82:93–101. doi:10.1016/j.fitote.2010.09.006
222. Lv J, Yu L, Lu Y, Niu Y, Liu L, Costa J, et al. Phytochemical compositions, and antioxidant properties, and antiproliferative activities of wheat flour. *Food Chem* (2012) 135(2):325–31. doi:10.1016/j.foodchem.2012.04.141
223. Weston LA, Mathesius U. Flavonoids: their structure, biosynthesis and role in the rhizosphere, including allelopathy. *J Chem Ecol* (2013) 39:283–97. doi:10.1007/s10886-013-0248-5
224. Murakami A, Ashida H, Terao J. Multitargeted cancer prevention by quercetin. *Cancer Lett* (2008) 269:315–25. doi:10.1016/j.canlet.2008.03.046
225. Boly R, Gras T, Lamkani T, Guisou P, Sertheyn D, Kiss R, et al. Quercetin inhibits a large panel of kinases implicated in cancer cell biology. *Int J Oncol* (2011) 38:833–42. doi:10.3892/ijo.2010.890
226. Granado-Serrano AB, Martin MA, Bravo L, Goya L, Ramos S. Quercetin induces apoptosis via caspase activation, regulation of Bcl-2, and inhibition of PI-3-kinase/Akt and ERK pathways in a human hepatoma cell line (HepG2). *J Nutr* (2006) 136:2715–21.
227. Chuang-Xin L, Wen-Yu W, Yao C, Xiao-Yan L, Yun Z. Quercetin enhances the effects of 5-fluorouracil-mediated growth inhibition and apoptosis of esophageal cancer cells by inhibiting NF-kappaB. *Oncol Lett* (2012) 4:775–8.
228. Spagnuolo C, Cerella C, Russo M, Chateauvieux S, Diederich M, Russo GL. Quercetin downregulates Mcl-1 by acting on mRNA stability and protein degradation. *Br J Cancer* (2011) 105:221–30. doi:10.1038/bjc.2011.229
229. Ekstrom AM, Serafini M, Nyren O, Wolk A, Bosetti C, Bellocchio R. Dietary quercetin intake and risk of gastric cancer: results from a population-based study in Sweden. *Ann Oncol* (2011) 22:438–43. doi:10.1093/annonc/mdq390
230. Ferry DR, Smith A, Malkhandi J, Fyfe DW, deTakats PG, Anderson D, et al. Phase I clinical trial of the flavonoid quercetin: pharmacokinetics and evidence for in vivo tyrosine kinase inhibition. *Clin Cancer Res* (1996) 2:659–68.
231. Barve A, Chen C, Hebbar V, Desiderio J, Saw CL, Kong AN. Metabolism, oral bioavailability and pharmacokinetics of chemopreventive kaempferol in rats. *BioPharm Drug Dispos* (2009) 30:356–65. doi:10.1002/bdd.677
232. Manach C, Morand C, Crespy V, Demigne C, Texier O, Regeat F, et al. Quercetin is recovered in human plasma as conjugated derivatives which retain antioxidant properties. *FEBS Lett* (1998) 426:331–6. doi:10.1016/S0014-5793(98)00367-6
233. Manach C, Morand C, Texier O, Favier ML, Agullo G, Demigne C, et al. Quercetin metabolites in plasma of rats fed diets containing rutin or quercetin. *J Nutr* (1995) 125:1911–22.
234. Sesink AL I, Arts C, de Boer VC, Breedveld P, Schellens JH, Hollman PC, et al. Breast cancer resistance protein (Bcrp1/Abcg2) limits net intestinal uptake of quercetin in rats by facilitating apical efflux of glucuronides. *Mol Pharmacol* (2005) 67:1999–2006. doi:10.1124/mol.104.009753
235. Tian M, Bi W, Row KH. Simultaneous extraction and separation of flavonols and flavones from *Chamaecyparis obtusa* by multi-phase extraction using an ionic liquid-modified microsphere polymer. *Phytochem Anal* (2012) 23:576–81. doi:10.1002/pca.2357
236. Huang MT, Wood AW, Newmark HL, Sayer JM, Yagi H, Jerina DM, et al. Inhibition of the mutagenicity of bay-region diol-epoxides of polycyclic aromatic hydrocarbons by phenolic plant flavonoids. *Carcinogenesis* (1983) 4:1631–7. doi:10.1093/carcin/4.12.1631
237. Morales P, Haza AI. Selective apoptotic effects of piceatannol and myricetin in human cancer cells. *J Appl Toxicol* (2012) 32:986–93. doi:10.1002/jat.1725
238. Shiomi K, Kuriyama I, Yoshida H, Mizushima Y. Inhibitory effects of myricetin on mammalian DNA polymerase, topoisomerase and human cancer cell proliferation. *Food Chem* (2013) 139:910–8. doi:10.1016/j.foodchem.2013.01.009
239. Phillips PA, Sangwan V, Borja-Cacho D, Dudeja V, Vickers SM, Saluja AK. Myricetin induces pancreatic cancer cell death via the induction of apoptosis and inhibition of the phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) signaling pathway. *Cancer Lett* (2011) 308:181–8. doi:10.1016/j.canlet
240. Choi SJ, Shin SC, Choi JS. Effects of myricetin on the bioavailability of doxorubicin for oral drug delivery in rats: possible role of CYP3A4 and P-glycoprotein inhibition by myricetin. *Arch Pharm Res* (2011) 34:309–15. doi:10.1007/s12272-011-0217-x
241. Li C, Lim SC, Kim J, Choi JS. Effects of myricetin, an anticancer compound, on the bioavailability and pharmacokinetics of tamoxifen and its main metabolite, 4-hydroxytamoxifen, in rats. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* (2011) 36:175–82. doi:10.1007/s13318-011-0036-y
242. Chen ND, Chen NF, Chen CW, Zhang L. Separation and structure elucidation of a new homoflavanol derivative from *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn. *Nat Prod Res* (2013). doi:10.1080/14786419.2012.761618. [Epub ahead of print].
243. Tan C, Wang Q, Luo C, Chen S, Li Q, Li P. Yeast & #945;-glucosidase inhibitory phenolic compounds isolated from *Gynura medica* leaf. *Int J Mol Sci* (2013) 14:2551–8. doi:10.3390/ijms14022551
244. Chen AY, Chen YC. A review of the dietary flavonoid, kaempferol on human health and cancer chemoprevention. *Food Chem* (2013) 138:2099–107. doi:10.1016/j.foodchem.2012.11.139
245. Luo H, Jiang B, Li B, Li Z, Jiang BH, Chen YC. Kaempferol nanoparticles achieve strong and selective inhibition of ovarian cancer cell viability. *Int J Nanomedicine* (2012) 7:3951–9. doi:10.2147/IJN.S33670
246. Li G, Zeng X, Xie Y, Cai Z, Moore JC, Yuan X, et al. Pharmacokinetic properties of isorhamnetin, kaempferol and quercetin after oral gavage of total flavones of *Hippophae rhamnoides* L. in rats using a UPLC-MS method. *Fitoterapia*

- (2012) **83**:182–91. doi:10.1016/j.fitote.2011.10.012
247. Silva ID, Rodrigues AS, Gaspar J, Maia R, Laires A, Rueff J. Involvement of rat cytochrome IA1 in the biotransformation of kaempferol to quercetin: relevance to the genotoxicity of kaempferol. *Mutagenesis* (1997) **12**:383–90. doi:10.1093/mutage/12.5.383
248. An G, Gallegos J, Morris ME. The bioflavonoid kaempferol is an Abcg2 substrate and inhibits Abcg2-mediated quercetin efflux. *Drug Metab Dispos* (2011) **39**:426–32. doi:10.1124/dmd.110.035212
249. Li C, Li X, Choi JS. Enhanced bioavailability of etoposide after oral or intravenous administration of etoposide with kaempferol in rats. *Arch Pharm Res* (2009) **32**:133–8. doi:10.1007/s12272-009-1127-z
250. Luo H, Daddysman MK, Rankin GO, Jiang BH, Chen YC. Kaempferol enhances cisplatin's effect on ovarian cancer cells through promoting apoptosis caused by down regulation of cMyc. *Cancer Cell Int* (2010) **10**:16. doi:10.1186/1475-2867-10-16
251. Baud V, Karin M. Is NF-kappaB a good target for cancer therapy? Hopes and pitfalls. *Nat Rev Drug Discov* (2009) **8**:33–40. doi:10.1038/nrd2781
252. DiDonato JA, Mercurio F, Karin M. NF-kappaB and the link between inflammation and cancer. *Immunol Rev* (2012) **246**:379–400. doi:10.1111/j.1600-065X.2012.01099.x
253. Dolcet X, Llobet D, Pallares J, Matias-Guiu X. NF-kB in development and progression of human cancer. *Virchows Arch* (2005) **446**:475–82. doi:10.1007/s00428-005-1264-9
254. Delhalle S, Duvoix A, Schnekenburger M, Morceau F, Dicato M, Diederich M. An introduction to the molecular mechanisms of apoptosis. *Ann N Y Acad Sci* (2003) **1010**:1–8. doi:10.1196/annals.1299.001
255. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* (2011) **144**:646–74. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013
256. Gray AI, Igoli JO, Edrada-Ebel R. Natural products isolation in modern drug discovery programs. In: *Natural Products Isolation*. Dordrecht: Springer (2012). p. 515–34.
257. Li JW, Vederas JC. Drug discovery and natural products: end of an era or an endless frontier? *Science* (2009) **325**:161–5. doi:10.1126/science.1168243
258. Mora C, Tittensor DP, Adl S, Simpson AG, Worm B. How many species are there on Earth and in the ocean? *PLoS Biol* (2011) **9**:e1001127. doi:10.1371/journal.pbio.1001127
259. Quinn RJ. Basics and principles for building natural product-based libraries for HTS. *Chem Genomics* (2012):87.
260. Zerikly M, Challis GL. Strategies for the discovery of new natural products by genome mining. *Chembiochem* (2009) **10**:625–33. doi:10.1002/cbic.200800389
261. Lomenick B, Olsen RW, Huang J. Identification of direct protein targets of small molecules. *ACS Chem Biol* (2011) **6**:34–46. doi:10.1021/cb100294v
262. Rix U, Superti-Furga G. Target profiling of small molecules by chemical proteomics. *Nat Chem Biol* (2009) **5**:616–24. doi:10.1038/nchembio.216
263. Roti G, Stegmaier K. Genetic and proteomic approaches to identify cancer drug targets. *Br J Cancer* (2012) **106**:254–61. doi:10.1038/bjc.2011.543
264. Chen L, Morrow JK, Tran HT, Phatak SS, Du-Cuny L, Zhang S. From laptop to benchtop to bedside: structure-based drug design on protein targets. *Curr Pharm Des* (2012) **18**:1217–39. doi:10.2174/138161212799436386
265. Mihan M. What in silico molecular docking can do for the 'bench-working biologists'. *J Biosci* (2012) **37**:1089–95. doi:10.1007/s12038-012-9273-8
266. Ou-Yang SS, Lu JY, Kong XQ, Liang ZJ, Luo C, Jiang H. Computational drug discovery. *Acta Pharmacol Sin* (2012) **33**:1131–40. doi:10.1038/aps
267. Kuhn M, Szklarczyk D, Franceschini A, von Mering C, Jensen LJ, Bork P. STITCH 3: zooming in on protein-chemical interactions. *Nucleic Acids Res* (2012) **40**:D876–80. doi:10.1093/nar/gkr1011
268. Beutler JA. Natural Products as Tools for Discovering New Cancer Targets. In: *Natural Products and Cancer Drug Discovery*. Dordrecht: Springer (2013). p. 213–37.
269. Chiaradonna F, Moresco RM, Airoidi C, Gaglio D, Palorini R, Nicotra F, et al. From cancer metabolism to new biomarkers and drug targets. *Biotechnol Adv* (2012) **30**:30–51. doi:10.1016/j.biotechadv.2011.07.006
270. Folger O, Jerby L, Frezza C, Gottlieb E, Ruppin E, Shlomi T. Predicting selective drug targets in cancer through metabolic networks. *Mol Syst Biol* (2011) **7**:501. doi:10.1038/msb.2011.35
271. Overington JP, Al-Lazikani B, Hopkins AL. How many drug targets are there? *Nat Rev Drug Discov* (2006) **5**:993–6. doi:10.1038/nrd2199
272. Patel MN, Halling-Brown MD, Tym JE, Workman P, Al-Lazikani B. Objective assessment of cancer genes for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* (2013) **12**:35–50. doi:10.1038/nrd3913

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Received: 02 April 2013; paper pending published: 30 April 2013; accepted: 24 July 2013; published online: 20 August 2013.

Citation: Gaascht F, Dicato M and Diederich M (2013) *Venus flytrap (Dionaea muscipula Solander ex Ellis) contains powerful compounds that prevent and cure cancer*. *Front. Oncol.* **3**:202. doi:10.3389/fonc.2013.00202

This article was submitted to *Cancer Molecular Targets and Therapeutics*, a section of the journal *Frontiers in Oncology*. Copyright © 2013 Gaascht, Dicato and Diederich. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.