



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Abou Bekr Belkaïd

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre et de l'Univers
Département de Biologie

Laboratoire Structure et Activité des Biomolécules Normales et Pathologiques
UEVE INSERM 1204, Evry, France
Laboratoire Produits Naturels : Activités Biologiques et Synthèses, Tlemcen, Algérie

THÈSE EN COTUTELLE

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR EN SCIENCES

Spécialité : Biologie Cellulaire et Moléculaire

Impact d'extraits de plantes du désert Algérien sur le cytosquelette et la division cellulaire

Présentée par

Mme Meryem SARI HASSOUN

Soutenue à Tlemcen, le 27 février 2016 devant le jury composé de :

Mme Hafida MERZOUK	Professeur	Université de Tlemcen	Présidente
Mr Christophe Le CLAINCHE	Chargé de recherche, CNRS	Université de Paris-Sud	Examineur
Mme Nassima MOKHTARI	Professeur	Université de Tlemcen	Examinatrice
Mr Daoudi CHABANE SARI	Professeur	Université de Tlemcen	Directeur de thèse
Mr Patrick A. CURMI	Directeur de Recherche	Université d'Evry	Co-directeur de thèse

REMERCIEMENTS

« La reconnaissance est la mémoire du cœur » Hans Christian Anderson

J'ai eu la chance et le plaisir d'effectuer ce travail de thèse au laboratoire Structure et Activité des Biomolécules Normales et Pathologiques (SABNP, INSERM U1204) à l'Université d'Évry-Val d'Essonne (Évry, France), actuellement sous la direction du Professeur David PASTRE.

Tant de personnes ont rendu possible l'avènement de ce travail de thèse qu'il m'est aujourd'hui difficile de n'en oublier aucune. Je prie donc les lecteurs de bien vouloir m'excuser par avance des oublis éventuels. Au terme de ces années de doctorat, j'éprouve une sincère gratitude envers tous ceux qui ont participé à ce travail et que je tiens ici à remercier.

Je tiens à adresser en premier lieu mes plus chaleureux remerciements à mon directeur de thèse, le Docteur Patrick A. CURMI, Président de l'Université d'Évry Val d'Essonne, de m'avoir offert l'opportunité de rejoindre le laboratoire SABNP INSERM U1204, qui m'a ensuite guidé tout au long de mon activité, en étant toujours disponible et dont la justesse des conseils n'a d'égale que la liberté de les appliquer qu'il m'a toujours laissée, permettant ainsi l'émancipation de mes réflexions. Le côté détendu de nos discussions a permis, en général, à mes idées de se clarifier rapidement. Grâce à sa simplicité et sa modestie qui est tout à son honneur, je n'ai pas eu de mal à lui dévoiler mes ignorances qu'il a toujours su combler avec efficacité. Aussi, je le remercie surtout pour son optimisme et sa « positive attitude » quand tout semblait aller de travers.

J'adresse mes remerciements les plus sincères à mon co-directeur de thèse de l'autre côté de la méditerranée, le Professeur Daoudi CHABANE SARI, Directeur du laboratoire LAPRONA Tlemcen (Algérie), dont les qualités professionnelles et aussi humaines m'ont aidée à aller au bout de ce travail.

Je remercie le Professeur Hafida MERZOUK de me faire l'honneur d'être la présidente du jury et le Professeur Nassima MOKHTARI et le Docteur Christophe Le CLAINCHE d'avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse; je les remercie pour l'intérêt qu'ils ont porté à mon travail et pour leurs commentaires concernant mon manuscrit.

Mes remerciements se tournent aussi vers le Professeur Hafida MERZOUK, Directrice du Laboratoire PPBIONUT Tlemcen (Algérie) et le Professeur BENSALAH, ancien Doyen de

l'Université des Sciences de Tlemcen (Algérie), en effet, grâce à leurs appuis et leurs soutiens, j'ai pu obtenir de réaliser mes travaux de thèse sous la forme d'une cotutelle internationale.

Mes remerciements vont également à l'ensemble des membres du laboratoire SABNP, notamment au Docteur Marie-Jeanne CLEMENT pour les études RMN, à Monsieur Michel CAILLERET pour les purifications par HPLC, aux Docteurs Cyril BAUVAIS et Guillaume BOLLOT pour la modélisation ; Merci à vous pour votre aide et grande disponibilité. Aussi, je tiens à remercier celle qui m'a pris sous son aile en arrivant au laboratoire la première fois, Mme Vandana JOSHI, pour sa disponibilité tout au long de ces années. Je remercie également le Docteur Andrea BURGO pour son aide précieuse à la paillasse. J'ai fortement apprécié nos enrichissantes interactions. Un merci particulier à Mme Lydia LEBOUIL, je garderai de toi des valeurs fortes que sont la franchise, l'honnêteté et un peu (beaucoup) d'esprit rebelle.

Pour leur précieuse collaboration, je remercie le Docteur Nathalie JARROUX pour la spectrométrie de masse et le Docteur Martha Cecilia ROSALES-HERNANDEZ pour les analyses en RPE. Je remercie également le Dr Julia BENSEMHOUN, à qui, j'ai toujours fait appel lorsque j'avais des questions en chimie, pour son appui inconditionnelle et son sens de l'écoute.

La vie d'un thésard ce n'est pas que du travail, c'est aussi quelques pauses astucieusement disséminées dans la journée. Merci à mes colocataires de bureau : Alix, ton choix de musique et tes mots réconfortants quand ça devenait si difficile, Imane, Sanae, Wissem, Samira, Dmitry et Clément pour votre présence.

La préparation d'un docteur commence dès la maternelle, et à cet égard mes parents se sont montrés exemplaires. Je ne peux même pas vraiment les remercier car ce serait bien en dessous de ce que je pense. Merci à vous de m'avoir permis de réaliser de longues études, pour votre soutien et tout l'amour témoigné dans les moments forts, et ce, malgré la distance. Merci à ma sœur jumelle, ma moitié, le Dr. « Globule Rouge » pour nos discussions sur la JAK2. Mon frère, dont le courage et la persévérance me rendent fière de lui. Ma grand-mère, je referme enfin ce livre Mâa !...Ma vie aurait été bien vide sans vous, merci d'avoir toujours cru en moi. Je remercie aussi ma famille parisienne qui a été une bouffée d'oxygène permanente, mon oncle le Dr. Fouad KAHIA TANI pour sa présence sans faille, Fadia et Abdesslam et leur loulou pour leur accueil et leur gentillesse. Merci à tous les membres de ma famille, à mon beau-frère, et à ma belle famille (la liste est trop longue pour tous vous citer !). Enfin, un bravo à mon époux que j'ai si souvent usé avec mes interminables histoires de labo et qui a réussi l'exploit de me supporter au moment le

plus critique de ma thèse. Merci pour ta patience au regard de mes cycles sourires/pleurs et ta disponibilité de cœur. Notre vie commence dès à présent.

TABLES DES MATIERES

LISTE DES FIGURES	5
LISTE DES TABLEAUX	8
LISTE DES PRINCIPALES ABREVIATIONS	9
INTRODUCTION GENERALE	12
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	18
CHAPITRE 1 : LE CYTOSQUELETTE	19
I. Cytosquelette.....	19
II. Microtubules.....	19
III. Cytosquelette d'actine	23
III.1 Généralités	23
III.2 Monomère d'actine.....	26
III.3 Filament d'actine	28
III.4 Polymérisation de l'actine	28
III.5 Le « turnover simple » des filaments d'actine ou « treadmilling »	31
III.6 Régulations	32
III.6.1 Protéines modulant la dynamique des filaments d'actine	34
III.6.2 Architecture des réseaux dynamiques de filaments d'actine	37
III.7 ADF/cofiline	40
III.7.1 Fragmentation par l'ADF/cofiline.....	41
III.7.2 Régulation de l'activité de l'ADF/cofiline.....	44
III.8 Les myosines	49
III.8.1 La myosine non-musculaire de classe II	49
III.9 Phénomène de blebbing.....	53
CHAPITRE 2 : LES CUCURBITACINES : GENERALITES, STRUCTURE ET PROPRIETES	58

I.	Introduction.....	58
II.	Cucurbitacines	61
II.1	Plante <i>Citrillus Colocynthis</i> : Origine et Usages	61
II.2	Cucurbitacines	63
II.2.1	Généralités.....	63
II.2.2	Structure des cucurbitacines.....	64
II.2.3	Propriétés physico-chimiques	65
II.2.4	Biosynthèse des cucurbitacines.....	65
II.2.5	Propriétés des cucurbitacines comme candidats médicaments pour lutter contre le cancer.....	67
II.2.6	Propriétés anti-inflammatoires des cucurbitacines.....	75
II.2.7	Autres activités des cucurbitacines	76
	CONTEXTE DE L'ETUDE	79
	OBJECTIFS DE L'ETUDE	81
	RESULTATS	82
	PREMIERE PARTIE	83
I.	Matériels et Méthodes.....	83
I.1	Récolte des graines de coloquinte	83
I.2	Préparation des extraits aqueux des graines de coloquinte.....	83
I.3	Purification des principes actifs de l'extrait aqueux.....	83
I.4	Identification des molécules d'intérêt par spectroscopie.....	86
I.5	Evaluation de l'activité biologique des fractions	88
I.5.1	Culture cellulaire et entretien.....	88
I.5.2	Traitements cellulaires	89
I.5.3	Evaluation de l'activité des extraits sur la prolifération cellulaire	89
I.5.4	Analyse du cycle cellulaire	90
I.5.5	Marquage par immunofluorescence.....	91
I.5.6	Vidéomicroscopie en phase	91
I.5.7	Analyse par immuno-empreinte (Western Blot).....	92
I.6	Analyses statistiques.....	94
II.	Résultats	95

II.1	Extraction et identification des cucurbitacines	95
II.1.1	Données spectrales des cucurbitacines.....	96
II.1.2	Quantification des cucurbitacines par RMN ¹ H.....	97
II.1.3	Evaluation de l'activité de l'extrait aqueux sur les cellules HeLa	98
II.1.4	Profil HPLC des cucurbitacines séparées (Etape1).....	98
II.1.5	Identification des cucurbitacines (Etape 2)	100
II.1.6	Purification des cucurbitacines (Etape 3 et 4).....	101
II.2	Comparaison de l'activité des cucurbitacines E et I glycosylées et non glycosylées	104
II.2.1	Tests de viabilité cellulaire.....	104
II.2.2	Impact des différentes cucurbitacines sur la morphologie et le cytosquelette d'actine de cellules HeLa.....	107
II.2.3	Analyse du cycle cellulaire	108
II.2.4	Effets des cucurbitacines sur la voie JAK2/STAT3.....	112
III.	Discussion et Conclusion	114
DEUXIEME PARTIE		117
I.	Matériels et Méthodes.....	117
I.1	Produits chimiques utilisés	117
I.2	Culture cellulaire	118
I.3	Préparation des vecteurs codant la β -actine-GFP mutée	118
I.3.1	Construction de plasmide codant pour l'actine portant la mutation C374A et fusionnée avec la GFP (EGFP/ β -actine C374A)	118
I.3.2	Construction des plasmides codant pour l'actine portant la mutation C272A ou C257A et fusionnée avec la EGFP (EGFP-actine C272A) : Mutagenèse dirigée de type QuikChange	119
I.4	Transfection cellulaire	120
I.5	Traitements cellulaires.....	120
I.6	Immunofluorescence	121
I.7	Evaluation du stress oxydant intracellulaire	121
I.7.1	Sonde fluorescente : H2DCF-DA	121
I.8	Mesure du pouvoir antioxydant de la cucurbitacine I	122
I.8.1	Test DPPH	122
I.8.2	Etude par Résonance Paramagnétique Nucléaire (RPE) : réaction de Fenton... ..	124
I.9	Etude de l'interaction Cucurbitacine I/thiols <i>in vitro</i>	126

I.10	Imagerie calcique en microscopie à épifluorescence	126
I.11	Etude de l'interaction cofiline/cucurbitacine I	127
I.11.1	Interaction cofiline/cucurbitacine I par spectroscopie RMN	127
I.11.2	Test de l'activité de la cofiline/LIM Kinase.....	128
I.11.3	Électrophorèse sur gel de polyacrylamide-Phos-Tag™	128
I.11.4	Méthodes d'amarrage moléculaire (<i>docking</i>) de LIMK1, cucurbitacine I et BMS3	129
I.12	RhoA-GTP pull down.....	130
I.13	Analyse par immunoempreinte (Western Blot).....	130
II.	Résultats	132
II.1	Agrégats d'actine sous l'effet de la cucurbitacine I	132
II.2	Cucurbitacine I et stress oxydant.....	136
II.2.1	Effet des antioxydants sur l'agrégation de l'actine induite par la cucurbitacine I	136
II.2.2	Capacité antioxydante de la cucurbitacine I.....	143
II.2.3	Interaction cucurbitacine I et antioxydants à fonction thiol.....	147
II.2.4	Effet de la cucurbitacine I sur l'actine mutée sur ses cystéines de surface	150
II.3	Les seconds messagers intracellulaires : Le calcium (Ca ²⁺).....	154
II.4	Impact de la cucurbitacine I sur les voies de signalisation LIM kinase/cofiline et Rho/Rho kinase/Myosine II.....	158
II.4.1	La cucurbitacine I inhibe la phosphorylation de la cofiline dans les cellules HeLa	158
II.4.2	La cucurbitacine I inhibe la phosphorylation de cofiline par LIMK <i>in vitro</i> ...	160
II.4.3	Les simulations d'amarrage moléculaire de la cucurbitacine I et d'inhibiteurs de LIMK1 suggèrent que la cucurbitacine I est un inhibiteur compétitif de l'ATP	160
II.4.4	Cucurbitacine I et « blebbing »	164
II.4.5	La cucurbitacine I provoque l'agrégation de la myosine IIA.....	167
II.4.6	La cucurbitacine I active RhoA et ROCK.....	171
II.4.7	La cucurbitacine I induit la formation des fibres de stress.....	174
III.	Discussion et conclusion	175
	CONCLUSION ET PERSPECTIVES	181
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	185
	ANNEXES.....	214

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Les trois types filaments composant le cytosquelette d'un neurone.....	20
Figure 2 : Formation et structure des microtubules	21
Figure 3 : Dynamique de polymérisation des microtubules.....	22
Figure 4 : Alignement des séquences protéiques des six isoformes d'actine conventionnelle chez l'homme.	24
Figure 5 : Alignement des séquences protéiques de la forme β -actine humaine (P60709), et de l'actine de levure (P60010).	25
Figure 6 : Structure obtenue par analyse radiocristallographique du monomère d'actine 5C de drosophile.....	27
Figure 7 : Polymérisation in vitro de l'actine.....	29
Figure 8 : Cinétique de polymérisation de l'actine marquée au pyrène.....	30
Figure 9 : Formation, croissance et dépolymérisation des filaments d'actine au front de migration cellulaire	33
Figure 10 : Organisation des filaments d'actine dans une cellule motile.....	39
Figure 11 : Les effets de la cofiline sur l'actine dépendent de sa concentration.....	43
Figure 12 : Cascades de signalisation contrôlant la phosphorylation et la déphosphorylation de l'ADF/cofiline	45
Figure 13 : Représentation schématique du rôle des GTPases Rho, Rac et Cdc42 dans la formation des extensions membranaires.	46
Figure 14 : Régulation de l'activité de la myosine II non-musculaire par phosphorylation des MLCR (20 kDa).	52
Figure 15 : Deux processus ont été proposés à l'origine de la formation des blebs	54
Figure 16 : Schéma simplifié de la régulation de l'activité de la myosine II, et mode d'action de différentes drogues	55
Figure 17 : Effets des drogues sur le blebbing	57
Figure 18 : <i>Citrillus colocynthis</i> (L.) Schrad.....	62
Figure 19 : Structure du squelette de base des cucurbitacines - Cucurbitane triterpénoïque tétracyclique	64
Figure 20 : Schéma représentatif de biosynthèse de cucurbitacines catalysée par les enzymes acétyl estérases et Δ^3 réductases.	66
Figure 21 : Structures chimiques des cucurbitacines les plus étudiées.	69

Figure 22 : Cibles moléculaires potentielles des cucurbitacines	77
Figure 23 : Démarche expérimentale pour la séparation et l'identification de principes actifs issus d'extraits aqueux de graines de coloquinte.	84
Figure 24 : Spectre RMN ¹ H de l'extrait aqueux de <i>C. colocynthis</i> enregistré dans du D ₂ O.	97
Figure 25 : Effet de l'extrait aqueux contenant des cucurbitacines sur la prolifération, la morphologie, et le cytosquelette d'actine de cellules HeLa.	99
Figure 26 : Chromatogramme de séparation par HPLC (C18, gradient eau/méthanol) de l'extrait aqueux de <i>C. colocynthis</i> . Détection à 238 nm.	100
Figure 27 : Spectre RMN ¹ H des fractions (1), (2), (3) et (4) enregistrées dans le D ₂ O.....	101
Figure 28 : Chromatogrammes des fractions (1) et (2) purifiées, à 238 nm, en mode préparatif.	103
Figure 29 : Etude de la viabilité de cellules HeLa en présence de cucurbitacines après 24 et 48 h.....	105
Figure 30 : CI ₅₀ de l'extrait aqueux de <i>C. colocynthis</i> , de sa fraction CuE _g et de sa fraction CuI _g sur la lignée cellulaire HeLa après 48 h.....	106
Figure 31 : Croissance de cellules HeLa en absence ou en présence de différentes formes de cucurbitacines.....	107
Figure 32 : Observation microscopique de cellules HeLa en présence de DMSO (Témoin), ou des cucurbitacines E et I glycosylées (CuE _g , CuI _g) et de leurs aglycones (CuE, CuI).	109
Figure 33 : Vidéomicroscopie en phase de cellules HeLa traitées par la CuI à 50 nM.....	110
Figure 34 : Répartition des cellules HeLa dans les différentes phases du cycle cellulaire en réponse aux cucurbitacines E et I glycosylées (CuE _g , CuI _g) et leur aglycone (CuE, CuI) après 24 ou 48 h.....	111
Figure 35 : Effet des cucurbitacines E et I glycosylées et leur aglycone sur la phosphorylation des protéines JAK2 et STAT3 suite à la stimulation par l'IL-6.....	113
Figure 36 : Spectre d'absorbance de la cucurbitacine I (100 μM, DMSO).....	123
Figure 37 : Principe de l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide-Phos-Tag [™]	128
Figure 38 : L'effet de la cucurbitacine I sur l'agrégation de l'actine est irréversible.	134
Figure 39 : La formation et le positionnement des agrégats d'actine induits par la cucurbitacine I sont indépendants des microtubules.	135
Figure 40 : Les espèces réactives de l'oxygéné (ERO) et leur système de détoxification. ...	139
Figure 41 : Effets d'antioxydants dépourvus de groupes thiols sur les cellules HeLa traitées par la cucurbitacine I.	140

Figure 42 : Détection des ERO dans les cellules HeLa traitées ou non par la cucurbitacine I.	144
Figure 43 : La cucurbitacine I se comporte comme un antioxydant capable de piéger les radicaux $\cdot\text{OH}$	146
Figure 44 : Interaction de la cucurbitacine I avec le β -mercaptoéthanol	148
Figure 45 : Structure tridimensionnelle de la β -actine oxydée (pdb : 2OAN)	151
Figure 46 : Visualisation par microscopie de fluorescence de cellules HeLa transfectées par les plasmides EGFP β -actine sauvage et mutés en absence ou en présence de cucurbitacine I.	153
Figure 47 : L'effet de la cucurbitacine I sur l'agrégation de l'actine dans les neurones corticaux est indépendant des variations du calcium intracellulaire.	157
Figure 48 : Les cucurbitacines I et E inhibent la phosphorylation de la cofiline 1.	159
Figure 49 : Interaction LIMK1/cucurbitacine I.....	163
Figure 50 : Cucurbitacine I et blebbing.....	166
Figure 51 : La myosine IIA s'agrège avec les agrégats d'actine dans les cellules HeLa traitées par la cucurbitacine I.....	169
Figure 52 : Les inhibiteurs de la myosine II préviennent l'agrégation de l'actine induite par la cucurbitacine I dans les cellules HeLa	172
Figure 53 : La cucurbitacine I active la voie RhoA/ROCK par activation de RhoA-GTP ...	173
Figure 54 : La cucurbitacine I induit la formation des fibres de stress	174

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Protéines associées à l'actine régulant sa structure et sa dynamique.	36
Tableau 2 : Relation type-activité des cucurbitacines.	68
Tableau 3 : Comparaison des méthodes analytiques couramment utilisées en métabolomique	87
Tableau 4 : Quantification par RMN ¹ H des quatre fractions obtenues après fractionnement de l'extrait aqueux de C. colocynthis.	101
Tableau 5 : Quantification par RMN ¹ H des trois fractions obtenues après purification.	103
Tableau 6 : Produits chimiques utilisés lors des expérimentations.	117
Tableau 7 : Expérimental (exp) et prédiction (pred) des déplacements chimiques ^a de protons et carbones de Cul avant et après la réaction d'addition thiol-ène avec le β-mercaptoéthanol.	148

LISTE DES PRINCIPALES ABREVIATIONS

- Actine-F** : actine filamenteuse
- Actine-G** : actine globulaire
- ADF** : actin depolymerizing factor
- ADP** : adénosine diphosphate
- ARP 2/3** : actin-related proteins 2 and 3
- ATP** : adénosine triphosphate
- BSA** : sérum albumine bovine
- Cdc42** : cell division control protein 42 homolog
- CI₅₀** : concentration inhibitrice 50
- CPA** : acide cyclopiazonique
- CuE** : cucurbitacine E
- CuE_g** : cucurbitacine E glycosylée
- CuI** : cucurbitacine I
- CuI_g** : cucurbitacine I glycosylée
- CyD** : cytochalasine D
- DAPI** : 4',6-diamidino-2-phénylIndole
- DHB** : 2,5-dihydroxybenzoic acid
- DMSO** : diméthylsulfoxyde
- DNase** : déoxyribonucléase
- DPI** : diphenyleneiodonium chloride
- DPPH[•]** : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl
- DTT** : dithiothreitol
- DTT** : dithiothréitol
- EGFP** : enhanced green fluorescent protein
- Ena/VASP** : Ena/vasodilator stimulated phosphoprotein
- ERO** : espèces réactives de l'oxygène
- GSH** : glutathion réduit

GTP : guanosine triphosphate

H2DCF-DA : dichlorofluoresceine diacetate

HC : huile de coloquinte

HPLC : chromatographie en phase liquide à haute performance

IP : iodure de propidium

JAK2 : janus kinase 2

LIMK : Kinase spécifique des protéines à domaine LIM

MHC : myosin high chain (chaîne lourde de myosine)

MLC : myosin light chain (chaîne légère de myosine non-musculaire II)

MLCE : myosin light chain essentiel (chaîne légère de myosine essentielle, 17 KDa)

MLCK : myosin light chain kinase

MLCR : myosin light chain regulatory (chaîne légère de myosine régulatrice, 20 KDa)

MLRCPase : myosin light chain regulatory phosphatase

MS : spectrométrie de masse

MTT : bromure de 3-(4,5-diMethylThiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium

MYPT1 : myosin II phosphatase target subunit 1

NAC : N-acétylcystéine

NZ : nocodazole

PAK : p21-activated kinase

PBN : α -phényl-N-tertbutylnitron

PIP2 : phosphatidylinositol 4,5 bisphosphate

ppm : partie par million

Rac1 : Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1

Rho : Ras homology protein

RhoGAP : GTPase-activating protein

RhoGEF : GTPase-exchange factor

RMN : résonance magnétique nucléaire

ROCK : Rho-associated kinase

RPE : résonance paramagnétique électronique

siRNA : small interfering RNA

STAT3 : signal transducer and activator of transcription 3

SVF : sérum de veau fœtal

TESK : testicular kinase

Tiron : Sodium 4,5-dihydroxybenzene-1,3-disulfonate

TX : taxol

WASP : Wiskott-Aldrich syndrome protein

WAVE : WASP-family-verprolin homolog

βMet : β-mercaptoéthanol

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

C'est au sein d'une pharmacie familiale, située dans un village de Tlemcen en Algérie qu'est né mon intérêt pour « les maladies », « les plantes » et « les remèdes ». Mon enquête de l'ethnopharmacopée locale sur l'utilisation de médicaments traditionnelles s'appuyant sur l'usage de plantes répondait en partie à mes nombreuses interrogations : Quel raisonnement diagnostique pour quelle thérapeutique ? Comment et pourquoi intervient la plante dans le traitement ? Les dénominations propres à chacune des plantes semblaient être associées à des symptômes, parfois des syndromes, ou encore à des étiologies et formulations précises de remèdes, et des modes d'administration particuliers.

Par expérimentation et transmission des savoirs, l'homme a sélectionné les plantes alimentaires pour se nourrir, les plantes médicinales pour se soigner, et les plantes toxiques pour s'en servir comme poisons de flèches à la chasse ou à la guerre. Durant le moyen âge, les Arabes diffusèrent la médecine par les plantes en Europe. À partir du XIX^e siècle, l'essor de la chimie de synthèse n'a pas entièrement substitué les médicaments à base d'extraits de plantes qui sont encore largement utilisés de nos jours, aussi bien dans les pays émergents, que dans les pays industrialisés où ils sont surtout employés en automédication. Selon le docteur François Dagognet, Médecin et Philosophe, auteur notamment de " La raison et les remèdes " (1984), « ... *Les forêts fournissent une incalculable variété de sucs, de résines, de gommes, de fruits, d'écorces, de feuilles, de cendres, de racines dont on célèbre encore de nos jours, les influences et les bienfaits. L'arbre avant d'entrer dans les légendes, existe d'abord comme source réelle de vie, comme fontaine de jouvence. Par lui, on peut calmer les fièvres démoniaques, relever les forces, favoriser la sudation, soutenir le cœur, entretenir la santé. La pilocarpine réside dans les feuilles d'une espèce Brésilienne, la cocaïne dans le cocaïer. Ne parlons pas de la caféine, ni de la fameuse théobromine retirée des fèves du cacao. La strychnine vient de la noix du vomiquier qui habite les Indes, le strophanthus des racines d'arbustes africains. On en a extrait l'ouabaine d'un emploi fréquent et on utilise également ses graines pour la synthèse de la cortisone... ».*

Les investigations sur les espèces végétales peuvent être menées en suivant différentes approches ethnobotaniques et pharmacognosiques. L'étude ethnobotanique constitue le point de départ d'un travail de terrain qui consiste à recenser, auprès des tradithérapeutes (tradipraticiens), des herboristes ou des individus vivant au contact des plantes médicinales,

des plantes réputées actives et dont il appartient à la recherche moderne de préciser les propriétés et de valider les usages.

Le mot "Ethnobotanique" est né en 1895 dans les écrits du botaniste, et taxonomiste américain John W. Harshberger (Harshberger, 1896). Il définissait « *ethno-botany* » l'étude des « plantes utilisées par les peuples primitifs et aborigènes », terme succédant à celui « *d'arborigan botany* » proposé par Stephen Powers en 1874 (Powers, 1875). Le terme a été élargi par Robbins, Harrington et Freire-Marreco, en 1916 (Robbins *et al.*, 1916), suggérant que la science de l'ethnobotanique devrait inclure l'enquête et l'évaluation de la connaissance de toutes les phases de la vie entre les sociétés primitives et les effets de l'environnement végétal sur les coutumes de la vie, les croyances et l'histoire de ces peuples indigènes. Vingt-cinq ans plus tard, Jones (Jones, 1941) a proposé une définition plus concise : « L'étude de la relation entre les hommes primitifs et les plantes ». Schultes (Schultes, 1967), l'a étendu pour inclure « les relations entre l'homme et sa végétation ambiante » (Gurib-Fakim, 2006).

Alors qu'il y a de cela quelques dizaines d'années, les études ethnobotaniques pouvaient être assimilées à du charlatanisme, elles font désormais l'objet de recherches de haut niveau reconnues par la communauté scientifique internationale. Sur les 500 000 espèces végétales recensées à la surface du globe, dont seule la moitié est répertoriée par les botanistes, l'Organisation Mondiale de la Santé a identifié 22 000 plantes utilisées par les médecines traditionnelles. Seules 3 000 d'entre elles ont fait l'objet d'évaluations scientifiques (Lehmann H., 2013). L'étude ethnobotanique présente un intérêt incontestable pour la découverte de nouvelles plantes, qui demeurent une source importante de médicaments, soit parce que les composés qu'ils renferment sont de précieux principes actifs, soit parce que les chimistes sont parvenus à modifier la structure de certains de ces principes, afin de les rendre moins toxiques, plus efficaces, ou de leur conférer une meilleure biodisponibilité. L'usage de substances d'origine végétale pour la prévention ou le traitement de diverses affections chez l'homme a cours depuis des millénaires. L'importance de cette pharmacopée est reconnue par l'Organisation Mondiale de la Santé à travers le lancement de sa première stratégie pour la médecine traditionnelle pour 2002-2005, stratégie renouvelée depuis (2014-2023). Le spectre d'utilisation des substances d'origine végétale intéresse un grand nombre de maladies chez l'homme. A titre d'exemple, nous citerons des anticancéreux (podophylline, ellipticine, camptothécine, vinblastine, taxol...), des antipaludéens (quinine, artémisinine...), des médicaments de la goutte (colchicine), des cardio-stimulants (digitaline), psychostimulants (caféine, théophylline), des antalgiques (aspirine, morphine extraite de

l'opium, codéine...), des anesthésiques (alcaloïdes à noyau tropane dont la cocaïne), des paralytiques utilisés pour la chirurgie (curares ...), immunosuppresseurs (cyclosporine...), etc...

On estime ainsi que, à l'heure actuelle, 25% des médicaments prescrits à travers le monde ont une origine végétale et s'appuient sur environ 121 principes actifs (Newman and Cragg, 2012; Sahoo *et al.*, 2010).

Dans les pays émergents, entre 70 et 95% de la population dépendent essentiellement des plantes médicinales traditionnelles pour leurs soins primaires (Ito *et al.*, 2012), en raison de la pauvreté et du manque d'accès à la médecine moderne mais aussi parce que les plantes présentent une réelle efficacité. Pour les tradipraticiens africains, les plantes médicinales sont une source inépuisable pour traiter certaines pathologies, qui souvent, sont mortelles. Ces éléments témoignent du fait que l'utilisation des plantes fait partie intégrante des traditions et que la valorisation médicinale de ces pratiques présente un réel intérêt.

De ces nombreuses plantes médicinales, notre étude s'est portée sur une espèce, *Citrillus colocynthis*, plus connue sous le nom de « coloquinte ». Cette plante de la famille des Cucurbitaceae, originaire des sols arides, pousse spontanément dans la zone méditerranéenne et la zone prédésertique d'Afrique et d'Asie (Hussain *et al.*, 2014). Le choix de cette plante repose sur des enquêtes ethnobotaniques menées dans une région du sud-ouest Algérien par des équipes d'ethnobotanistes du laboratoire de Produits Naturels (LAPRONA) de l'Université Abou Bekr Belkaïd Tlemcen, (Algérie) sur les plantes à activité antidiabétique. Ils ont rapporté son utilisation dans la médecine traditionnelle et dans le traitement du diabète faisant appel à plusieurs modes de préparation (décoction, pulvérisation, macération des graines), contre les hémorroïdes en application locale des graines pulvérisées, l'ictère, la fièvre, l'ascite, et les désordres gastro-intestinaux. Il semblerait aussi que la décoction de coloquinte serait insecticide pour détruire les puces du bétail.

C'est en considérant ses effets, que depuis plusieurs années, le laboratoire LAPRONA travaille sur l'extraction et la purification d'huile à partir des graines de *C. colocynthis*. Cette huile, riche en acides gras, a fait l'objet de plusieurs études phytochimiques et publications montrant son intérêt potentiel pour le traitement du diabète et de l'obésité chez le rat (Benariba *et al.*, 2012; Benariba *et al.*, 2013a; Benariba *et al.*, 2013b; Benariba *et al.*, 2013c; Sebbagh *et al.*, 2009).

C'est dans ce cadre que j'ai débuté mes premiers travaux sur des extraits huileux de *C. colocynthis* produits en Algérie. Alors que j'étudiais les effets de cette huile sur la nutrition animale, une collaboration s'est mise en place entre le laboratoire LAPRONA et le laboratoire Structure et Activité des Biomolécules Normales et Pathologiques (SABNP, UMR 829 puis 1204 INSERM – Université d'Evry, France) pour tenter d'évaluer l'impact de ces extraits huileux et plus particulièrement des métabolites secondaires présents, sur certains aspects de la biologie cellulaire. Cette collaboration m'a ainsi permis de débiter une thèse en cotutelle entre ces deux laboratoires.

Depuis plusieurs années le laboratoire SABNP a orienté ses travaux de recherche sur la compréhension de l'organisation du cytosquelette pour la connaissance fondamentale et la recherche sur le cancer. Le cytosquelette d'actine est un polymère dynamique très impliqué à la fois dans la morphologie cellulaire mais aussi dans les phénomènes d'adhérence et de motilité cellulaire. La perturbation de cette dynamique et des fonctions qui lui sont associées est caractéristique de la transformation tumorale, ce qui fait de l'actine une cible pharmacologique d'intérêt pour lutter contre le cancer. Par conséquent, la recherche des principes actifs potentiels et la compréhension de leur mécanisme d'action, constituent un enjeu passionnant qui pourrait enrichir l'arsenal pharmacologique.

Les premiers tests effectués avec cette huile de coloquinte sur cultures de cellules HeLa (dérivées d'un cancer du col de l'utérus au début des années 1950) réalisés en 2010 par Mme Joshi et le Dr Curmi au laboratoire SABNP ont montré que cette huile bloquait la division cellulaire au stade d'abscission et provoquait une agrégation de l'actine. A partir de ces observations, des recherches bibliographiques sur la composition chimique des graines de coloquinte ont laissé penser que l'activité de cette huile de coloquinte pourrait être liée à la présence de métabolites secondaires à structure triterpénique de type cucurbitacines. Ces substances sont majoritaires chez *C. colocynthis* et dans la famille des cucurbitacées (Hussain *et al.*, 2014). On dénombre 12 cucurbitacines différant par leurs structures et désignées par des lettres de l'alphabet (A – T) (Chen *et al.*, 2005). Cela a conduit les docteurs Curmi et Chabane-Sari ainsi que Mme Joshi à tester directement l'impact de la cucurbitacine I sur ces mêmes cellules HeLa. Les résultats ont montré que l'effet global de l'huile et de la cucurbitacine I semblait être le même.

Dés lors deux directions s'ouvraient pour poursuivre les recherches : 1/ purifier les substances actives de l'huile de coloquinte en se guidant sur les effets cellulaires de différents fractions ; 2/ tenter de comprendre comment ces substances actives agissent sur le cytosquelette d'actine.

Dans le premier chapitre de cette introduction, je m'attacherai à décrire le cytosquelette en général puis le rôle particulier du cytosquelette d'actine sur les différents types d'organisation cellulaire ainsi que les protéines qui régulent ce cytosquelette.

Dans le deuxième chapitre de l'introduction, je présenterai les acteurs de mes travaux : les cucurbitacines, leurs structures, propriétés physicochimiques, ainsi que leurs actions pharmacologiques, et notamment anticancéreuses.

Après avoir énoncé le but du travail ainsi que les stratégies expérimentales mises en œuvre pour le réaliser, je décrirai les résultats obtenus que je discuterai ensuite au regard de la littérature.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE 1

LE CYTOSQUELETTE

I. Cytosquelette

Le cytosquelette est constitué d'un ensemble de réseaux de filaments protéiques interconnectés s'étendant dans l'ensemble du cytoplasme et responsable de fonctions diverses. De la même manière que l'ossature d'un vertébré lui permet de garder sa forme et de se mouvoir, le cytosquelette représente non seulement l'ossature de la cellule, mais participe au maintien de son architecture et à l'organisation de la distribution des composants intracellulaires ainsi qu'au maintien de la polarité cellulaire. Chez les mammifères, le cytosquelette est un système dynamique constitué de trois types de filaments auxquels on attribue des fonctions spécifiques (figure 1). Les filaments intermédiaires apportent une résistance mécanique à la cellule (présents dans les cellules subissant un stress mécanique), les microtubules constituent soit des « rails » pour le transport intracellulaire utilisés pour la localisation des organelles, ou bien forment en mitose le fuseau mitotique nécessaire à la séparation des chromosomes dupliqués. Les filaments d'actine (ou microfilaments) déterminent la forme cellulaire et leur dynamique permet la mobilité cellulaire (Fletcher and Mullins, 2010). Les éléments du cytosquelette jouent ainsi un rôle majeur notamment dans le cycle cellulaire, la structuration de l'espace et la migration des cellules.

II. Microtubules

Le microtubule est un tube creux d'un diamètre externe moyen de 25 nm, composé le plus souvent de 13 protofilaments structurés de manière linéaire et parallèle (figure 2). Il polymérise par addition d'unités hétérodimériques de tubuline α et β qui sont capables de s'auto-associer longitudinalement pour former un protofilament (Valiron *et al.*, 2001). Les protofilaments s'associent ensuite de manière latérale pour former le microtubule. Les sous-unités de tubuline lient soit un nucléotide guanosique, GTP (sous unité α) ou bien GTP ou GDP pour la sous unité β . Les hétérodimères s'additionnent toujours selon un mode « tête à queue » au sein des protofilaments. Le microtubule est donc polarisé, l'extrémité la plus

dynamique (+) expose la sous-unité de tubuline β au solvant, l'extrémité la moins dynamique (-) expose au solvant la sous-unité de tubuline α (Mitchison, 1993). L'addition de nouvelles sous-unités suit une dynamique différente pour chacune des extrémités du microtubule avec une cinétique plus rapide à l'extrémité (+). Cependant, la polymérisation des microtubules ne consiste pas seulement en l'ajout d'hétérodimères de tubuline ; les microtubules subissent un régime d'instabilité dynamique. L'élongation des microtubules est en effet transitoire et consiste en la succession de longues phases de polymérisation continue suivies d'une courte phase de dépolymérisation rapide. La transition entre ces deux phases est dénommée « catastrophe » (figure 3).

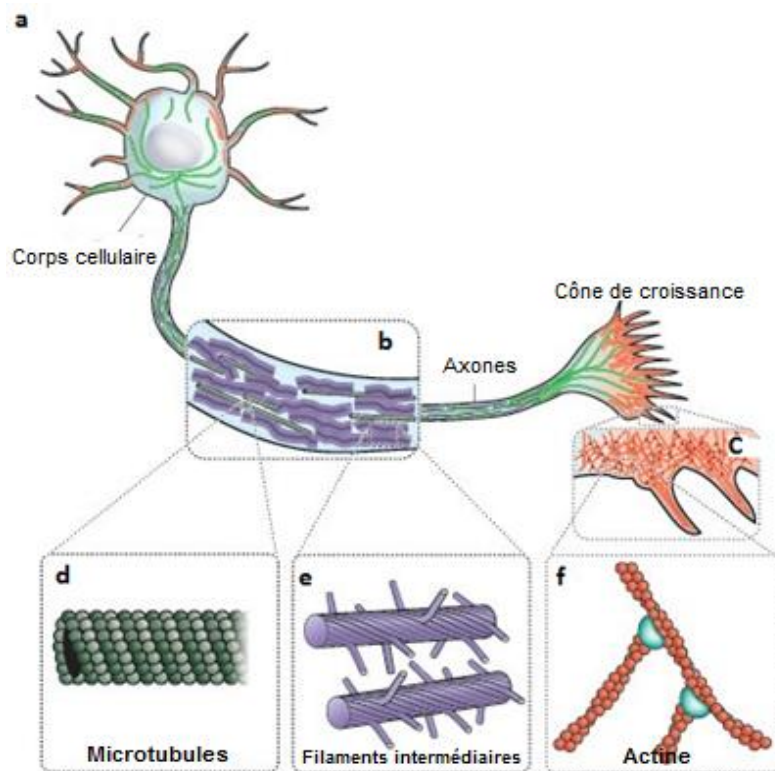


Figure 1 : Les trois types filaments composant le cytosquelette d'un neurone (Fletcher and Mullins, 2010).

Les neurones ont un cytosquelette particulièrement riche. Comme cela est présenté sur la figure 1, on y retrouve principalement : **a** : l'actine au cône de croissance (rouge), les microtubules (vert) et filaments intermédiaires (violet) dans l'axone et les dendrites. **b** : les filaments intermédiaires forment dans l'axone une matrice structurale qui intègre les microtubules, utilisés pour le transport de matériel du corps cellulaire vers les zones synaptiques et réciproquement. **c** : des filaments d'actine dendritiques et des filopodes parallèles dans le cône de croissance. **d** : des microtubules. **e** : des neurofilaments (filaments intermédiaires) ayant des bras polymères flexibles qui repoussent les neurofilaments voisins et déterminent le rayon de l'axone. **f** : à l'échelon moléculaire, les filaments d'actine sont disposés en réseaux. Ces réseaux peuvent avoir de nombreuses architectures, y compris les structures ramifiées représentées ici, dépendant de la présence du complexe Arp2/3 (bleu) comme nous le verrons plus loin.

Les phénomènes de catastrophe sont plus fréquents à l'extrémité (+) des microtubules (Walker *et al.*, 1988). Il régule ainsi la dynamique d'élongation des microtubules (figure 3). Comme nous l'avons vu, les microtubules servent de « rails » empruntés par des moteurs moléculaires au sein de la cellule (kinésines et dynéines, (Hirokawa *et al.*, 1998)). Ces moteurs vont pouvoir délivrer des vésicules et autres organelles aux différents compartiments cellulaires. Par ailleurs, les microtubules permettent la formation du fuseau mitotique nécessaire à la migration et ségrégation des chromosomes lors de la division cellulaire.

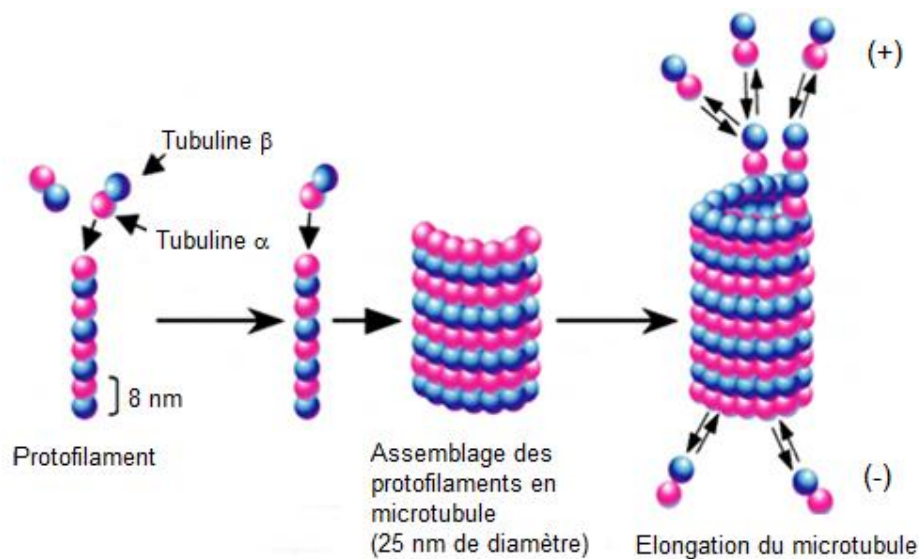


Figure 2 : Formation et structure des microtubules (Valiron *et al.*, 2001).

Les monomères de tubuline α (en rose) et β (en bleu) s'associent pour former des hétérodimères qui s'assemblent à leur tour pour former un protofilament d'environ 8 nm de diamètre. Les protofilaments s'organisent de manière longitudinale pour former un microtubule de 25 nm de diamètre. Par la suite, l'addition de nouveaux hétérodimères permettra l'allongement des microtubules (Valiron *et al.*, 2001).

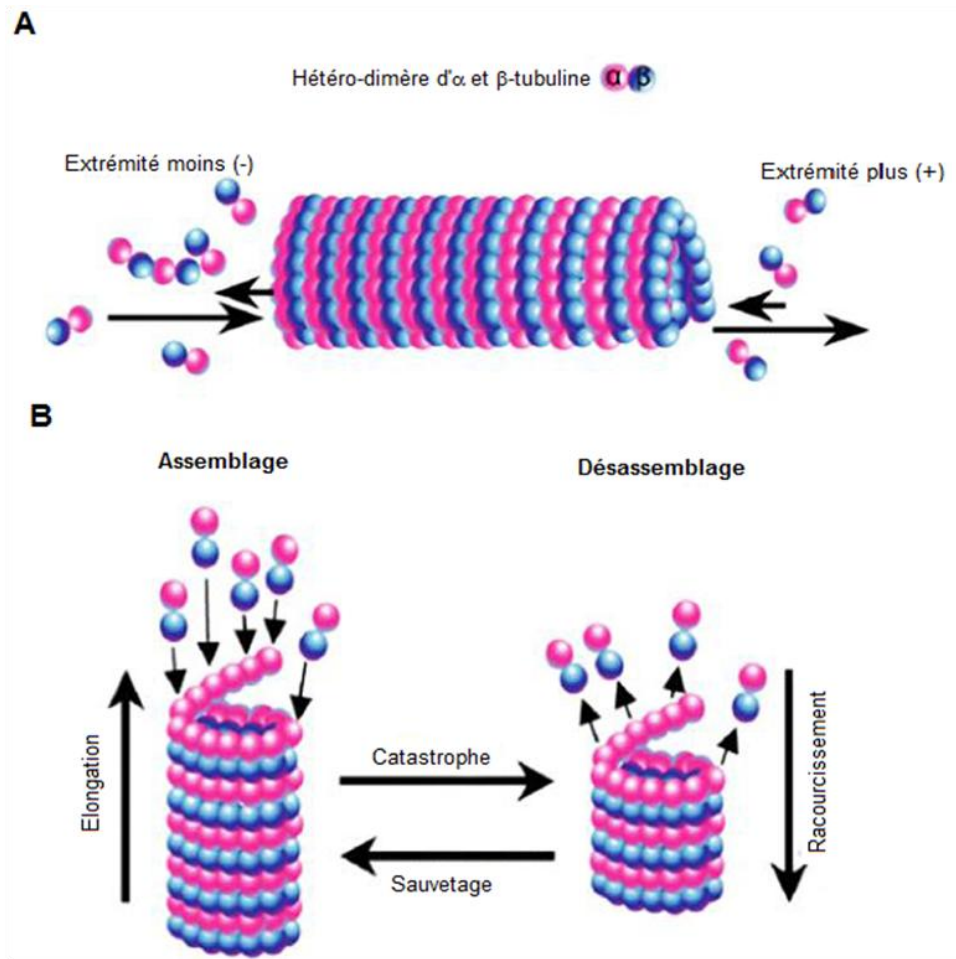


Figure 3 : Dynamique de polymérisation des microtubules (Valiron *et al.*, 2001).

A : Les microtubules sont des polymères polarisés. Ils présentent une extrémité « + » où les phénomènes de croissance et de décroissance sont plus fréquents et une extrémité « - » moins dynamique. **B** : L'instabilité dynamique des microtubules correspond à une oscillation entre des périodes d'élongation qui durent jusqu'à un point critique où peut survenir un événement dit « catastrophe » qui correspond à une bascule à partir de laquelle le microtubule dépolymérise rapidement. Cette dépolymérisation rapide se poursuit puis s'arrête sans que l'on en connaisse précisément les raisons. Le microtubule peut alors s'allonger de nouveau à la suite d'une transition inverse appelée « sauvetage » (Valiron *et al.*, 2001).

III. Cytosquelette d'actine

III.1 Généralités

La majeure partie de mes travaux a été consacrée à l'étude de l'impact d'extraits d'huile de coloquinte et de cucurbitacines sur les filaments d'actine.

L'actine conventionnelle, découverte par Straub et von Szent-Györgyi Nagyrápolt en 1942 (Korn, 1982), est l'une des protéines les plus abondantes dans les cellules eucaryotes, ainsi que dans certains organismes procaryotes telles que les cyanobactéries (Labbe *et al.*, 1996; Usmanova *et al.*, 1998). Plus récemment il a été découvert un grand nombre de protéines apparentées à l'actine, les ARP (actin-related proteins) et les ALP (actin-like proteins) dont nous ne parlerons pas dans les descriptions de séquences qui suivent.

Chez les mammifères, il existe six isoformes d'actine conventionnelle (Engel *et al.*, 1981; Herman, 1993; Vandekerckhove and Weber, 1978). Les trois isoformes d' α -actine sont présentes dans les muscles striés squelettiques, cardiaque et les muscles lisses et participent à la contractilité musculaire ; les isoformes β et γ co-existent dans la plupart des tissus chez les mammifères et structurent le cytosquelette et jouent un rôle majeur dans la motilité cellulaire. Les deux isoformes de γ -actine sont rencontrées dans le muscle lisse intestinal (ACTG2) ou en tant que composant du cytosquelette (ACTG1) notamment comme élément des fibres de stress. Les six isoformes d'actine conventionnelle sont très conservées chez l'homme, les différences entre ces isoformes sont essentiellement localisées à l'extrémité NH₂-terminale de la protéine comme le montre l'alignement des séquences d'actine conventionnelle humaine présenté sur la figure 4 ci-dessous.

```

P63267 MCEET-TALVCDNGSGLCKAGFAGDDAPRAVFPFIVGRPRHQGVVMGMGQKDSYVGDEA 59
P62736 MCEEDSTALVCDNGSGLCKAGFAGDDAPRAVFPFIVGRPRHQGVVMGMGQKDSYVGDEA 60
P68133 MCDEETTALVCDNGSGLVKAGFAGDDAPRAVFPFIVGRPRHQGVVMGMGQKDSYVGDEA 60
P68032 MCDDEETTALVCDNGSGLVKAGFAGDDAPRAVFPFIVGRPRHQGVVMGMGQKDSYVGDEA 60
P60709 --MDDIAALVVDNGSGMCKAGFAGDDAPRAVFPFIVGRPRHQGVVMGMGQKDSYVGDEA 58
P63261 --MEEIAALVIDNGSGMCKAGFAGDDAPRAVFPFIVGRPRHQGVVMGMGQKDSYVGDEA 58
      : : ** * : *****: *****: *****: *****: *****:
      : : ** * : *****: *****: *****: *****: *****:

P63267 QSKRGILTLYPIEHGIITNWDDMEKIWHHSFYNELRVAPPEHPTLLTEAPLNPKANREK 119
P62736 QSKRGILTLYPIEHGIITNWDDMEKIWHHSFYNELRVAPPEHPTLLTEAPLNPKANREK 120
P68133 QSKRGILTLYPIEHGIITNWDDMEKIWHHTFYNELRVAPPEHPTLLTEAPLNPKANREK 120
P68032 QSKRGILTLYPIEHGIITNWDDMEKIWHHTFYNELRVAPPEHPTLLTEAPLNPKANREK 120
P60709 QSKRGILTLYPIEHGIVTNWDDMEKIWHHTFYNELRVAPPEHPVLLTEAPLNPKANREK 118
P63261 QSKRGILTLYPIEHGIVTNWDDMEKIWHHTFYNELRVAPPEHPVLLTEAPLNPKANREK 118
      *****: *****: *****: *****: *****:

P63267 MTQIMFETFNVPAMYVAIQAVLSLYASGRTTGIVLDSGDGVTHNVPIYEGYALPHAIMRL 179
P62736 MTQIMFETFNVPAMYVAIQAVLSLYASGRTTGIVLDSGDGVTHNVPIYEGYALPHAIMRL 180
P68133 MTQIMFETFNVPAMYVAIQAVLSLYASGRTTGIVLDSGDGVTHNVPIYEGYALPHAIMRL 180
P68032 MTQIMFETFNVPAMYVAIQAVLSLYASGRTTGIVLDSGDGVTHNVPIYEGYALPHAIMRL 180
P60709 MTQIMFETFNTPAMYVAIQAVLSLYASGRTTGIVMDSGDGVTHTVPIYEGYALPHAILRL 178
P63261 MTQIMFETFNTPAMYVAIQAVLSLYASGRTTGIVMDSGDGVTHTVPIYEGYALPHAILRL 178
      *****: *****: *****: *****: *****:

P63267 DLAGRDLTDYLMKILTERGYSFVTTAEREIVRDIKEKLCYVALDFENEMATAASSSLEK 239
P62736 DLAGRDLTDYLMKILTERGYSFVTTAEREIVRDIKEKLCYVALDFENEMATAASSSLEK 240
P68133 DLAGRDLTDYLMKILTERGYSFVTTAEREIVRDIKEKLCYVALDFENEMATAASSSLEK 240
P68032 DLAGRDLTDYLMKILTERGYSFVTTAEREIVRDIKEKLCYVALDFENEMATAASSSLEK 240
P60709 DLAGRDLTDYLMKILTERGYSFVTTAEREIVRDIKEKLCYVALDFEQEMATAASSSLEK 238
P63261 DLAGRDLTDYLMKILTERGYSFVTTAEREIVRDIKEKLCYVALDFEQEMATAASSSLEK 238
      *****: *****: *****: *****: *****:

P63267 SYELPDGQVITIGNERFRCPETLFQPSFIGMESAGIHETTYNSIMKCDIDIRKDLYANNV 299
P62736 SYELPDGQVITIGNERFRCPETLFQPSFIGMESAGIHETTYNSIMKCDIDIRKDLYANNV 300
P68133 SYELPDGQVITIGNERFRCPETLFQPSFIGMESAGIHETTYNSIMKCDIDIRKDLYANNV 300
P68032 SYELPDGQVITIGNERFRCPETLFQPSFIGMESAGIHETTYNSIMKCDIDIRKDLYANNV 300
P60709 SYELPDGQVITIGNERFRCPALFQPSFLGMESCGIHETTFNSIMKCDVDIRKDLYANTV 298
P63261 SYELPDGQVITIGNERFRCPALFQPSFLGMESCGIHETTFNSIMKCDVDIRKDLYANTV 298
      *****: *****: *****: *****: *****:

P63267 LSGGTTMYPGIADRMQKEITALAPSTMKIKI IAPPERKYSVWIGGSILASLSTFQQMWIS 359
P62736 LSGGTTMYPGIADRMQKEITALAPSTMKIKI IAPPERKYSVWIGGSILASLSTFQQMWIS 360
P68133 MSGGTTMYPGIADRMQKEITALAPSTMKIKI IAPPERKYSVWIGGSILASLSTFQQMWIT 360
P68032 LSGGTTMYPGIADRMQKEITALAPSTMKIKI IAPPERKYSVWIGGSILASLSTFQQMWIS 360
P60709 LSGGTTMYPGIADRMQKEITALAPSTMKIKI IAPPERKYSVWIGGSILASLSTFQQMWIS 358
P63261 LSGGTTMYPGIADRMQKEITALAPSTMKIKI IAPPERKYSVWIGGSILASLSTFQQMWIS 358
      : *****: *****: *****: *****: *****:

P63267 KPEYDEAGPSIVHRKCF 376
P62736 KQEYDEAGPSIVHRKCF 377
P68133 KQEYDEAGPSIVHRKCF 377
P68032 KQEYDEAGPSIVHRKCF 377
P60709 KQEYDESGPSIVHRKCF 375
P63261 KQEYDESGPSIVHRKCF 375
      * * * * * : *****

```

Figure 4 : Aligement des séquences protéiques des six isoformes d'actine conventionnelle chez l'homme.

Les références Uniprot sont les suivantes : P63267, γ -actine-2 muscle lisse entérique ; P62736, α -actine-2 muscle lisse aortique ; P68133, α -actine-1 muscle squelettique ; P68032, α -actine muscle cardiaque ; P60709, β -actine ; P63261, γ -actine-1 cytoplasmique. « * » acides aminés identiques, « : ou . » acides aminés homologues ou similaires.

III.2 Monomère d'actine

Chez l'homme, l'actine conventionnelle est une protéine de 43 kDa constituée de 375 à 377 acides aminés selon les isoformes, parmi lesquelles se trouvent au maximum sept résidus cystéine dont deux varient selon l'isoforme considérée (comme cela est montré sur l'alignement en figure 4) (Kabsch *et al.*, 1990), ce qui rend cette protéine, sensible à l'augmentation du statut oxydant des cellules. L'oxydation de l'actine peut ainsi se produire au niveau des résidus cystéine exposés, en particulier, les cystéines situées aux positions 272 et 374 (Lassing *et al.*, 2007).

La structure atomique 3D de l'actine a été résolue pour la première fois en 1990 par diffraction des rayons X sur un cristal de complexe entre l' α -actine de muscle squelettique et la DNase I (l'actine a une très forte affinité pour la DNase I sans que l'on en comprenne aujourd'hui les conséquences). Les cristaux ainsi obtenus permettaient une résolution de 2,8 Å (Kabsch *et al.*, 1990). Depuis une série de cristaux de complexes de β -actine avec de la profiline (Schutt *et al.*, 1993), ou de la gelsoline ont permis d'affiner la résolution de la structure de l'actine. Au début des années 2000 une première structure de l' α -actine-1 sous forme ADP et non complexée à une protéine partenaire a été résolue à 1,54 Å (Otterbein *et al.*, 2001). Afin d'empêcher la polymérisation de l'actine, celle-ci a été liée de façon covalente sur le résidu cystéine 374 à la sonde fluorescente tetramethylrhodamine-5-maleimide. Récemment, Rould *et al.* réussirent à cristalliser une forme non polymérisable de l'actine 5C de drosophile (mutée sur les résidus de surface du sous domaine 4 (A204E/P243K)). Cette actine présente 98,7 % d'identité avec la γ -actine-1 cytoplasmique humaine sous formes ADP et ATP et les auteurs purent ainsi proposer des changements conformationnels entre ces deux formes (Rould *et al.*, 2006). Les résultats montrent des différences significatives entre les deux états, limités à la région du site actif et la « sensor loop » (résidus 71–73 de l'actine, (Graceffa and Dominguez, 2003; Rould *et al.*, 2006)). En effet, le site actif clivé reste fermé dans les deux états. Des changements structurels mineurs se propagent à partir du site actif vers le sous-domaine 2, mais se dissipent avant d'atteindre la boucle de liaison DNase I dite « D-loop » (résidus 40–51 de l'actine), qui reste désordonnée à la fois en présence d'ADP ou d'ATP (Rould *et al.*, 2006). Ce résultat contraste avec les anciennes structures de monomère d'actine, qui montrent la formation d'une hélice α à l'extrémité distale de la boucle D dans la forme liée à l'ADP mais pas dans la forme liée à l'ATP (Otterbein *et al.*, 2001).

L'actine apparait composée de deux domaines de taille sensiblement identique mais initialement décrits comme « petit » et « grand » domaine. Chacun de ces domaines est divisé en deux sous-domaines, le « petit » en sous-domaine 1 et 2 et le « grand » en sous-domaine 3 et 4. Entre les petit et grand domaines se trouve une cavité contenant le nucléotide (ATP ou ADP) associé à un cation divalent (Mg^{2+} ou Ca^{2+}) (Carlier, 1991a; Kabsch *et al.*, 1990; Page *et al.*, 1998) (figure 6). Le sous-domaine 1 contient les deux extrémités NH₂- et COOH-terminale de la protéine. La très haute affinité de l'ATP s'explique par la disposition très compacte des résidus qu'il contacte (provenant des 4 sous-unités de l'actine). Dans la structure « ATP » publiée par Rould *et al.* (Rould *et al.*, 2006), l'ion de Ca^{2+} interagit avec les phosphates β - et γ - de l'ATP et aussi avec les résidus D154, Q137 et D11. Les résidus N-terminaux de 14 à 16, connus également pour interagir avec la myosine (Sutoh, 1982), sont à proximité immédiate du phosphate γ - de l'ATP.

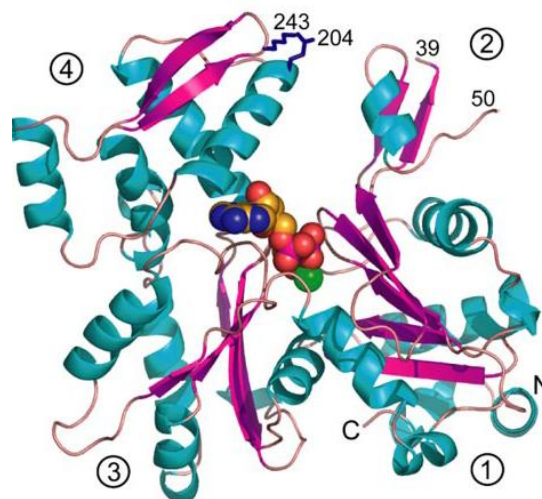


Figure 6 : Structure obtenue par analyse radiocristallographique du monomère d'actine 5C de drosophile (Rould *et al.*, 2006).

Rould *et al* ont réussi à stabiliser le monomère d'actine en présence d'ATP, en procédant à deux mutations sur les résidus de surface du sous domaine 4 A204E/P243K, et en remplaçant le Mg^{2+} par Ca^{2+} , puisque l'hydrolyse de l'ATP est ralentie de façon extrême ce qui a permis aux auteurs de saisir la conformation de la forme « ATP ». Les sous-domaines 1 et 3 correspondent à l'extrémité barbée et les sous-unités 2 et 4 à l'extrémité pointue. Dans une cavité, entre les deux sous domaines 2 et 4, l'actine fixe un nucléotide et un cation divalent (Ca^{2+} ou Mg^{2+}). Sur cette structure sont indiqués les deux acides aminés du domaine 4 (A204E et P243K), qui modifiés rendent l'actine incapable de polymériser. Les résidus 40-51 constituant la boucle de liaison de la DNase I ne sont pas ordonnés (ni d'ailleurs dans la conformation « ADP »). Les hélices sont représentées en bleu, les feuillets en rose, l'ion calcium en vert et pour le nucléotide, le carbone en jaune, l'azote en bleu et l'oxygène en rouge (Rould *et al.*, 2006).

III.3 Filament d'actine

Dans les conditions physiologiques, on considère que le monomère d'actine est lié à une molécule d'ATP et au cation divalent Mg^{2+} . D'une part l'affinité de liaison de l'actine est supérieure pour le nucléotide ATP, et d'autre part, la concentration cellulaire en Mg^{2+} est bien supérieure à la concentration en Ca^{2+} . C'est sous cette forme que l'actine va majoritairement polymériser. Les molécules d'actine-G ont la capacité de s'assembler pour former un filament en double-hélice d'un diamètre d'environ 7 à 9 nm. Les filaments d'actine comme les microtubules sont polarisés car toutes les molécules d'actine globulaire « pointent » dans la même direction, vers une extrémité moins (-) où la polymérisation de l'actine est plus lente, l'autre extrémité plus (+) est celle où la polymérisation de l'actine est la plus rapide. On distingue alors respectivement l'extrémité barbée (extrémité plus) de l'extrémité pointue (extrémité moins) (Moore *et al.*, 1970; Pollard, 1986). L'actine n'existe pas de manière figée sous la forme globulaire ou sous la forme filamenteuse mais est en permanence en équilibre entre ces deux états.

III.4 Polymérisation de l'actine

Le processus de polymérisation de l'actine *in vitro* se déroule en trois étapes (Carlier, 1991b). Lors de la première étape dite étape d'activation, les monomères d'actine-G lient les cations divalent et l'ATP, provoquant leur changement conformationnel. Les complexes actines-G-ATP alors formés sont appelés complexes activés. S'ensuit l'étape de nucléation qui est une étape lente où deux complexes interagissent d'abord par des liaisons faibles puis s'ajoute un troisième complexe stabilisant le groupe. Ce trimère, ou « noyau de polymérisation », est la structure minimale nécessaire à la future élongation du filament. Enfin, lors de l'étape d'élongation, la polymérisation se poursuit par l'addition d'actine-G activée aux extrémités du noyau de polymérisation (figure 7A). Le monomère d'actine-G activé hydrolyse son ATP lors de son incorporation dans le filament.

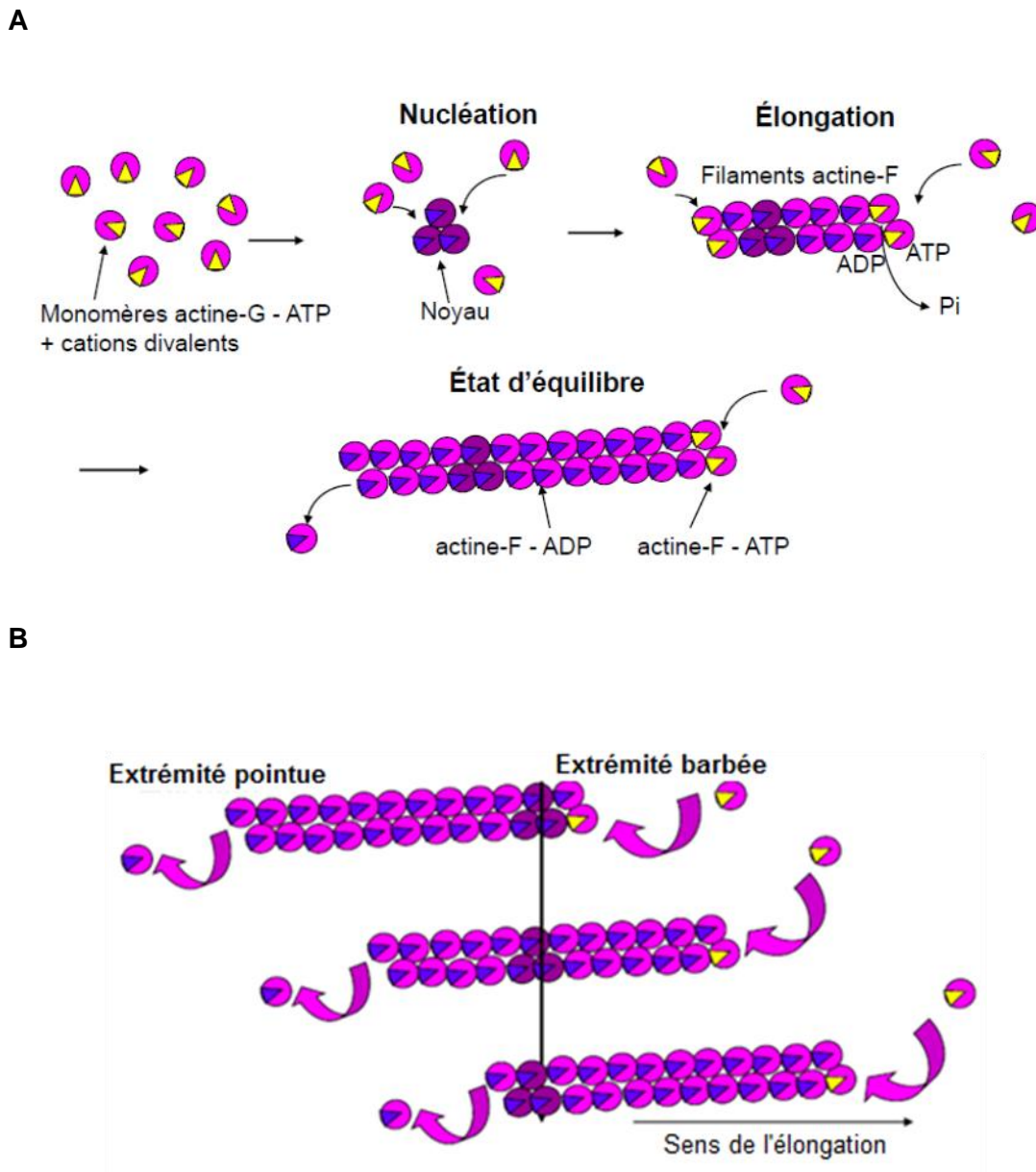


Figure 7 : Polymérisation *in vitro* de l'actine.

A : La molécule d'actine-G se lie à l'ATP et aux cations divalents pour son incorporation dans le filament. Au cours de la nucléation, il y a assemblage d'un noyau de trois monomères d'actine qui formeront la structure de départ nécessaire à l'élongation d'un nouveau filament. Le filament atteint ensuite un équilibre entre polymérisation et dépolymérisation (état d'équilibre ou stationnaire). **B** : Les monomères d'actine sont perdus à l'extrémité pointue mais d'autres ajoutés au niveau de l'extrémité barbée, ce qui induit un mouvement global du filament, selon le principe du tapis roulant (ou treadmilling). Après incorporation dans le filament d'actine, on observe une hydrolyse de l'ATP, on retrouve ainsi les complexes ATP-actine au bout barbée (jaune), et les complexes ADP-actine au bout pointu (bleu).

Les cinétiques de polymérisation de l'actine sont généralement étudiées en spectrofluorimétrie grâce à un marquage de l'actine sur sa cystéine 374 à l'aide d'une sonde fluorescente, le (1 N-(1-pyrene)iodoacetamide) (Cooper *et al.*, 1983; Kouyama and Mihashi, 1981; Lin and Dowben, 1982) (figure 8). Le pyrène est peu exposé quand l'actine est sous sa forme monomérique, et au cours de la réaction de polymérisation, l'actine subit un changement de conformation qui expose cette sonde fluorescente. La réaction de polymérisation peut donc être suivie quantitativement en mesurant le signal de fluorescence du pyrène au cours du temps. Cette augmentation de fluorescence est directement proportionnelle à la concentration d'actine incorporée dans le polymère au cours de la réaction d'assemblage.

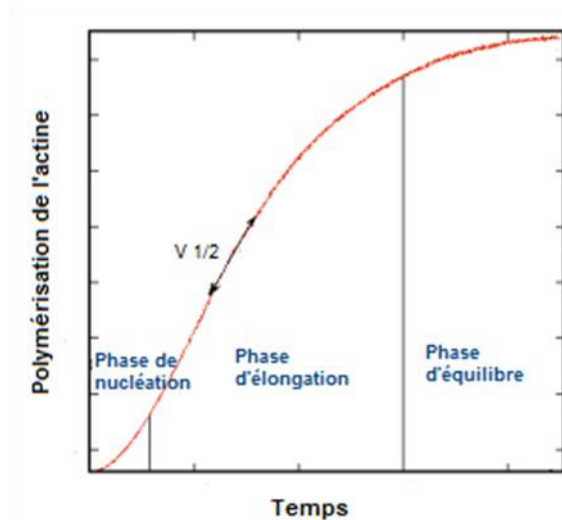


Figure 8 : Cinétique de polymérisation de l'actine marquée au pyrène (Lodish *et al.*, 2000).

La réaction chimique se décompose en 3 phases. La phase de nucléation, avec une polymérisation lente, correspond à la période pendant laquelle se forment de nombreux noyaux stables d'actine. La présence d'un nombre suffisant de noyaux pouvant s'allonger entraîne une phase de polymérisation rapide appelée phase d'élongation. Enfin, la réaction atteint une phase d'équilibre stationnaire dès lorsque le réservoir d'actine monomérique est consommé.

III.5 Le « turnover simple » des filaments d'actine ou « treadmilling »

La polymérisation et la dépolymérisation des filaments d'actine ne se produisent pas de façon équivalente à chaque extrémité du filament. En effet, les deux extrémités des filaments d'actine présentent des concentrations minimales nécessaires à l'assemblage en actine-F différentes. Cette concentration minimale est appelée « concentration critique ». Lorsque le niveau de monomères se situe entre ces 2 concentrations critiques, le désassemblage à l'extrémité pointue est compensé par la polymérisation à l'extrémité barbée. Ainsi, le filament d'actine est en équilibre dynamique c'est-à-dire un état où la dissociation à l'extrémité pointue est compensée par l'ajout de monomères à l'extrémité barbue. Grâce à cet équilibre dynamique (ou état stationnaire), la longueur du filament d'actine demeure constante alors que les monomères d'actine formant la actine-F subissent un déplacement apparent d'une extrémité à l'autre au sein du polymère : c'est le processus de « tapis-roulant » (ou treadmilling), schématisé dans la figure 7B.

Les complexes actine-G-ATP se lient préférentiellement au bout barbé des filaments d'actine et dès leur incorporation dans le filament, la molécule d'ATP est hydrolysée, libérant un phosphate inorganique (Pi) dans le milieu. En conséquence, les filaments d'actine sont asymétriques car composés de 3 zones selon leur enrichissement en complexe nucléotide-actine : ATP-actine à l'extrémité barbée, ADP+Pi-actine (forme transitoire) ou ADP-actine qui s'accumule à l'extrémité pointue avant d'être dissociée du filament (figure 7A).

Comment les cellules initient et terminent la croissance des nouveaux filaments ? Et quelles sont les protéines régulatrices ? Les filaments d'actine ne se forment pas spontanément, car *in vivo* de nombreuses protéines associées à l'actine régulent la polymérisation et l'organisation des filaments d'actine. La figure 9 illustre un modèle simplifié de la dynamique de formation et de désassemblage des réseaux branchés de filaments d'actine (Pollard and Borisy, 2003). Ce modèle, dit de nucléation dendritique, propose un rôle pour chaque protéine dans un cycle où l'actine est successivement polymérisée pour former les réseaux branchés, puis dépolymérisée et recyclée pour reformer le réservoir d'actine monomérique.

Ce mécanisme commence par l'association des monomères ATP-actine avec une petite protéine appelée profiline. Cette dernière lie l'extrémité barbée d'un monomère d'actine, permettant au complexe actine-profiline de former un réservoir de monomères pour la cellule. La profiline inhibe également la nucléation spontanée des filaments d'actine. Toutes les

cellules eucaryotes semblent exprimer cette protéine. Les nouveaux filaments se forment lorsque les voies de signalisation activent les protéines de la famille WASp/Scar (Wiskott-Aldrich Syndrome protein/Suppressor of cyclic AMP receptor). Ces derniers, actifs stimulent alors le complexe Arp2/3 (Actin related protein 2/3), facteur de nucléation de l'actine qui crée de nouvelles extrémités barbées à partir du flanc de filaments préexistants, à proximité de la membrane. L'élongation rapide de ces extrémités permet au cytosquelette de repousser la membrane. Toutefois, la croissance des filaments d'actine est transitoire puisque des protéines de coiffe bloquent leur élongation. En effet, les sous-unités d'actine de ce réseau ramifié hydrolysent rapidement leur nucléotide ATP, mais dissocient lentement le phosphate inorganique. La dissociation de ce phosphate permet la fixation sur les filaments d'ADF/cofiline (Actin Depolymerizing Factor) qui désassemble le réseau par fragmentations successives puis dépolymérisation des petits filaments-ADP. Enfin, la profiline est le facteur d'échange nucléotidique de l'actine, qui catalyse l'échange du nucléotide ADP pour le nucléotide ATP, ce qui permet le recyclage des monomères d'actine, prêts pour un autre cycle d'assemblage à une nouvelle extrémité barbée (Pantaloni and Carlier, 1993a; Pollard and Borisy, 2003).

III.6 Régulations

Dans la cellule, les filaments adoptent différentes architectures ce qui leur permet d'assurer un ensemble de fonctions : on peut trouver des réseaux denses essentiellement branchés, des faisceaux de filaments parallèles ou antiparallèles. La diversité d'organisation des filaments d'actine laisse entrevoir l'existence d'une grande variété de molécules régulant sa dynamique. La cellule possède en effet de nombreux moyens pour réguler et organiser les filaments en fonction de ses besoins.

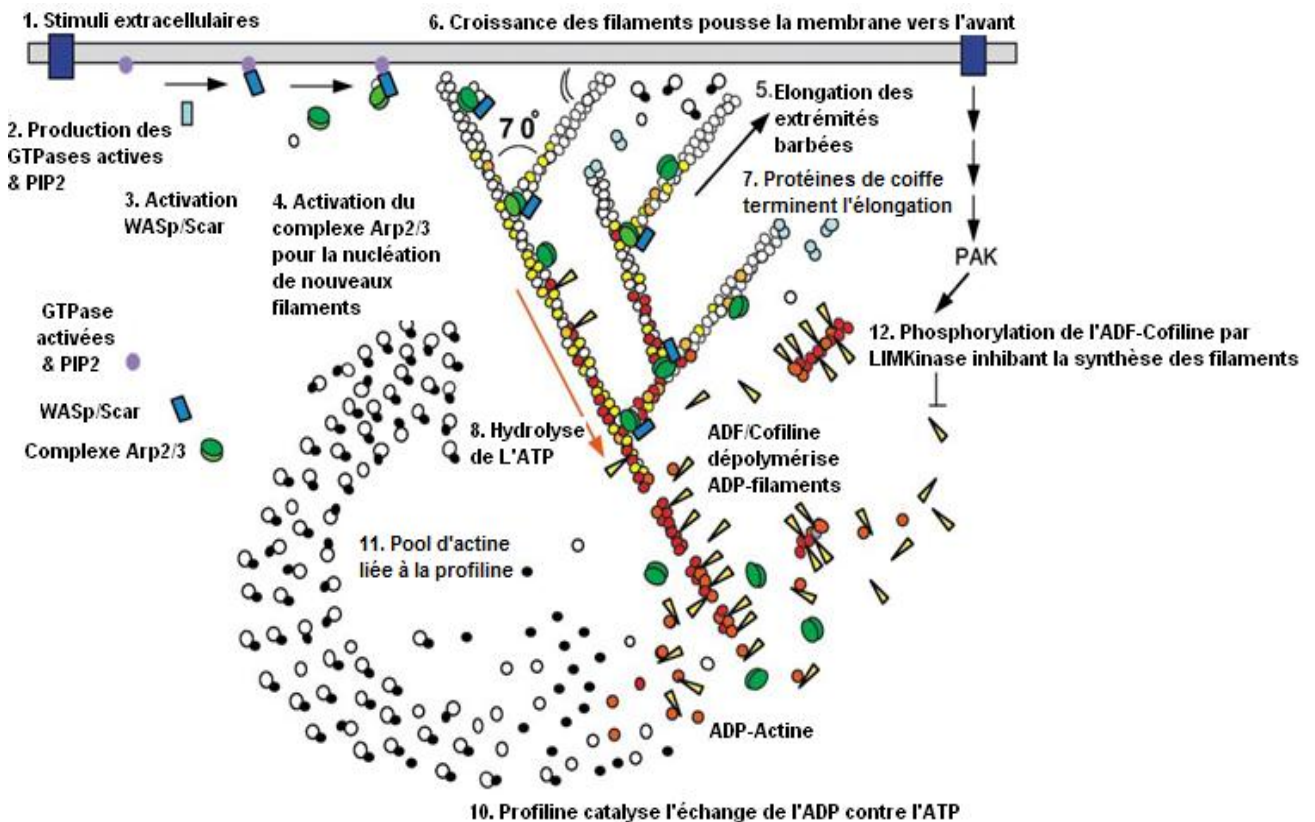


Figure 9 : Formation, croissance et dépolymérisation des filaments d'actine au front de migration cellulaire (Pollard and Borisy, 2003).

(1) Activation de récepteurs par des signaux extracellulaires. (2) L'activation des voies de transduction aboutit à l'activation des GTPases de la famille Rho Kinase ainsi que du PIP2 qui en retour (3) activent les protéines WASp/Scar. (4) La liaison des protéines WASP/Scar au complexe Arp2/3 permet d'activer la nucléation de l'actine par branchement à partir d'un filament existant (5). (6) Croissance rapide des filaments qui repoussent la membrane. (7) Les protéines de coiffe arrêtent la polymérisation de l'actine. (8) Hydrolyse de l'ATP lié à chaque sous-unité de l'actine (sous-unités blanches deviennent jaunes) suivie par une dissociation du phosphate (sous-unités rouges). (9) L'ADF/Cofiline induit la dissociation du phosphate et de ce fait la dépolymérisation de l'actine. (10) La profiline catalyse l'échange ADP/ATP des monomères d'actine. (11) Le pool d'actine-ATP liée à la profiline peut ainsi être utilisé pour la polymérisation de l'actine. (12) Les GTPases activent également PAK et LIM Kinases qui phosphorylent l'ADF/Cofiline et inhibent la synthèse des filaments.

III.6.1 Protéines modulant la dynamique des filaments d'actine

Différents mécanismes de régulation contrôlent le rapport actine F / G. En effet, la longueur, la stabilité, la géométrie ou le nombre de filaments d'une cellule sont régulés par des protéines qui interfèrent avec les filaments eux-mêmes ou bien avec les monomères libres (Fletcher and Mullins, 2010). On citera ci-dessous quelques protéines de ce type et leurs fonctions (tableau 1) :

A. Des **protéines de séquestration** s'attachent aux monomères d'actine et les empêchent de polymériser. La **profiline**, une protéine qui se lie aux monomères d'actine avec une plus grande affinité de fixation pour les monomères ATP que ADP (Pollard *et al.*, 2000; Vinson *et al.*, 1998). En l'absence d'extrémités barbées libres (bloquées par les protéines de coiffe), la profiline séquestre les monomères d'actine au sein d'un large réservoir profiline-actine, qui ne participe pas à l'élongation des extrémités pointues libres, inhibant d'une part, la nucléation spontanée de nouveaux filaments d'actine et d'autre part, favorisant la directionnalité de la polymérisation, de l'extrémité barbée vers l'extrémité pointue (Tobacman and Korn, 1982). Mais, lorsque des extrémités barbées sont libres, la profiline permet la polymérisation de l'actine en catalysant l'échange de l'ADP en ATP dans le monomère (Pantaloni and Carlier, 1993a; Pollard and Borisy, 2003).

Il existe *in vivo* d'autres protéines qui lient le monomère d'actine. La protéine **thymosine β 4**, séquestre les monomères d'actine-ADP et bloque l'échange du nucléotide ADP en ATP. Ainsi, ces deux protéines peuvent réguler la quantité d'actine monomérique disponible pour la polymérisation (Pantaloni and Carlier, 1993b).

B. La croissance des filaments est régulée par des **protéines de coiffe** « capping proteins » qui ont un rôle important dans la régulation de la concentration d'actine monomérique. Ces protéines se fixent à l'extrémité barbée du filament, et inhibent ainsi son élongation. (Schafer *et al.*, 1996).

C. La **nucléation** de nouveaux filaments est initiée par le **complexe Arp 2/3** qui est le nucléateur le plus connu et intervient en particulier dans le réseau branché (lamellipode). Le complexe Arp 2/3 se lie au niveau des extrémités pointue de l'actine et peut y induire une nucléation (Kelleher *et al.*, 1995). Récemment, les travaux de Blanchoin *et al.* ont montré que ce complexe permet la formation de branches qui s'attachent au côté d'un filament d'actine

préexistant avec un angle de 70° , ce qui a conduit à nommer ce procédé « nucléation dendritique » (Blanchoin *et al.*, 2000a). Le filament croit alors par le bout barbé, jusqu'à ce qu'une protéine de coiffe le recouvre. Donc, le complexe Arp 2/3 permet à la fois la nucléation, et est un point de réticulation d'un réseau. Notons que les protéines WASP et WAVE sont des régulateurs de la polymérisation médiée par Arp 2/3 (Nakanishi *et al.*, 2007). Les **formines** représentent une autre classe de protéines nucléatrices (Woychik *et al.*, 1990), impliquées dans la formation des filopodes (Pellegrin and Mellor, 2005; Schirenbeck *et al.*, 2005). Ces dernières nucléent les filaments d'actine à partir de monomères puis en favorisent l'élongation, tout en restant attachée de manière processive à leur extrémité barbée. En effet, les formines sont caractérisées par la présence de deux domaines conservés : formin homology 1 (FH1) contenant le site de liaison au complexe profiline - actine permettant une élongation à l'extrémité barbée et formin homology 2 (FH2) permettant la fixation à l'extrémité barbée du filament d'actine (Kovar *et al.*, 2003; Pring *et al.*, 2003; Pruyne *et al.*, 2002; Sagot *et al.*, 2002) .

D. Les filaments sont assemblés en faisceaux ou en réseaux grâce aux **protéines de réticulation** qui lient plusieurs filaments. Une propriété pour identifier chaque protéine de réticulation est la distance par laquelle elle relie les filaments d'actine. Les distances de réticulation varient de ~ 10 nm pour la **fimbrine**, qui maintient très proches les deux filaments de même polarité auxquels elle s'attache, de ~ 40 nm pour l' **α -actinine**, qui forme des liaisons entre les filaments parallèles, mais de façon plus lâche et de ~ 160 nm pour la **filamine**, qui a deux sites d'attachement à l'actine très espacés dans la protéine (Blanchoin *et al.*, 2014).

E. Les **protéines de fragmentation** « severing protein », telles que l'**ADF/cofiline** et la **gelsoline** sont impliquées dans la fragmentation des filaments d'actine. La gelsoline est activée par le calcium et par le PIP2, et peut à la fois sectionner les filaments et coiffer leur extrémité barbée (Sun *et al.*, 1999).

L'ADF/cofiline est très abondante dans les cellules eucaryotes. Cette protéine se fixe spécifiquement sur les portions anciennement polymérisées des filaments, et entraîne leur fragmentation. Les fragments générés vont ensuite dépolymériser, puis l'actine monomérique libérée sera éventuellement régénérée pour devenir à nouveau polymérisable. Le mécanisme de fragmentation par l'ADF/cofiline sera présenté en détail au paragraphe III.7.

Tableau 1 : Protéines associées à l'actine régulant sa structure et sa dynamique.

<i>Protéines</i>	<i>Rôles dans l'environnement cellulaire</i>	<i>Fonctions</i>
Arp 2/3	Nucléation	Associé à l'extrémité pointue des monomères Génération de filaments d'actine branchés
Formines		Associées à l'extrémité barbée pour la nucléation et l'élongation Génération de filaments d'actine parallèles (non branchés)
WASP	Facteur de nucléation	Associés à la membrane : recrutement et activation des nucléateurs
Profiline	Séquestration	Liaison à l'actine-G et polymérisation de l'actine à l'extrémité barbée du filament
Thymosine β4		Séquestration de l'actine-G et inhibe la polymérisation
Protéines de coiffe	Coiffe	Coiffé de l'extrémité barbée
ADF/cofiline	Fragmentation	Dépolymérisation des filaments d'actine au niveau de l'extrémité pointue et génération de nouvelles extrémités barbées
Gelsoline	Fragmentation/Coiffe	Liaison aux extrémités barbées pour empêcher la polymérisation
Fascin α-actinine Fimbrine Filamine	Réticulation	Formation de faisceaux d'actine (actine non branchée)
Myosine	Moteur moléculaire	Contractilité du réseau d'actine-F

L'étude détaillée de la régulation de l'ADF/cofiline est développée au paragraphe III.7. Mais avant cela, nous allons présenter l'architecture des réseaux dynamiques de filaments d'actine, siège de l'action du cortège protéique décrit plus haut.

III.6.2 Architecture des réseaux dynamiques de filaments d'actine

Les filaments d'actine procurent aux cellules animales la capacité de changer de forme pour s'adapter à leur environnement, de se mouvoir dans des espaces réduits, de se diviser, ou de permettre l'endo et l'exocytose. Le mécanisme de ces changements de forme repose sur différents types d'organisation : des réseaux branchés de filaments interconnectés c'est le réseau lamellipodial, ou des faisceaux de filaments parallèles (filopodes), les fibres de stress, localisées dans le sens du mouvement des cellules en migration et dans les régions latérales de la cellule (figure 10) (Blanchoin *et al.*, 2014).

Les lamellipodes sont constitués d'un réseau d'actine branchée et forment des extensions de la membrane plasmique à « l'avant » de la cellule impliqués dans la migration des cellules (Figure 10, iv). Ce maillage de filaments d'actine est réalisé grâce au complexe nucléateur Arp 2/3. En effet, Svitkina et Borisy ont visualisé et localisé le complexe Arp2/3 aux points de branchement du réseau (Svitkina and Borisy, 1999). Ce complexe activé par les protéines de la famille WASP va s'associer à l'extrémité pointue d'un monomère d'actine puis à un filament déjà formé, avec un angle de 70°. Un nouveau polymère d'actine est ainsi constitué, et va s'allonger grâce à des facteurs favorisant la polymérisation telle que la profiline. Des protéines de coiffe occupent les extrémités barbées de ces filaments d'actine et empêchent leur polymérisation, tandis que d'autres comme l'ADF/cofiline vont déstabiliser l'actine associée à l'ADP afin de générer de nouvelles extrémités barbées. La structure de l'actine dans le lamellipode est donc le résultat de la balance entre les phénomènes de branchement/croissance/coiffe et de débranchement/dépolymérisation des filaments d'actine.

Contrairement aux lamellipodes qui sont des structures larges, les filopodes sont fins et formés par un faisceau parallèle et serré d'actine. Ils sont également présents au bord « avant » de la cellule. En plus, de leur rôle dans la migration cellulaire, les filopodes sont de véritables explorateurs de l'environnement extracellulaire, initient des contacts cellulaires, et transmettent des signaux de cellule à cellule (figure 10, v) (Blanchoin *et al.*, 2014).

Une fine couche d'actine, appelée cortex, est ancrée à la membrane plasmique par l'intermédiaire des protéines ERM (Ezrine, Radixine, Myosine) et est contractile via l'activité de la myosine. Ce cortex est indispensable au maintien de la forme des cellules (figure 10, i).

Le reste de la cellule contient un réseau de filaments d'actine non ramifiés contenant la myosine ce qui leur confère des propriétés contractiles (Blanchoin *et al.*, 2014). Ces myosines

sont à même de se déplacer sur les filaments d'actine et de les faire glisser les uns par rapport aux autres. Cette opération contracte le réseau d'actine-F et produit une tension donnant leur nom à ces structures : fibres de stress et on cite 2 types de fibres : ventrales (figure 10, ii), qui s'étendent parallèlement au sens du mouvement, reliant des sites d'adhésion focale, et des arcs transverses (figure 10, iii), qui sont organisés de façon parallèle à l'avant de la cellule. Ils s'assemblent à partir de filaments d'actine préexistants par recyclage à « l'arrière » de la cellule et obtention d'une population de filaments, ainsi produisant des fibres de stress contractiles. Il est intéressant de noter que les structures d'actine ne sont pas statiques mais transitent d'un état à un autre. Ces fibres s'adaptent aux forces de tensions exercées sur la cellule, lui permettant de résister à la déformation (Blanchoin *et al.*, 2014).

L'assemblage des fibres de stress est régulé par des cascades de signalisation par la GTPase RhoA. D'une part la forme RhoA GTP active ROCK (Rho associated kinase) qui catalyse la formation des fibres par l'augmentation de la contractilité par l'activité ATPase de la myosine non musculaire (Pellegrin and Mellor, 2007). ROCK active également la voie LIM kinase qui augmente la stabilité des fibres de stress par inhibition de la dépolymérisation des filaments via l'inactivation indirecte d'ADF/cofiline. Cette cascade de signalisation sera discutée en détail dans les paragraphes I.3 et I.4.

Ces structures de filaments d'actine sont extrêmement dynamiques et se remodelent rapidement sous l'effet de différents stimuli. Le défi majeur pour les cellules est de réaliser un assemblage rapide et massif du réseau d'actine tout en conservant un réservoir suffisant afin de compléter le système en monomères d'actine. Les cellules disposent d'une protéine clé pour assurer un désassemblage accéléré des structures anciennement polymérisées, l'ADF/cofiline. Comment est régulée l'activité de cette protéine *in vivo* ?

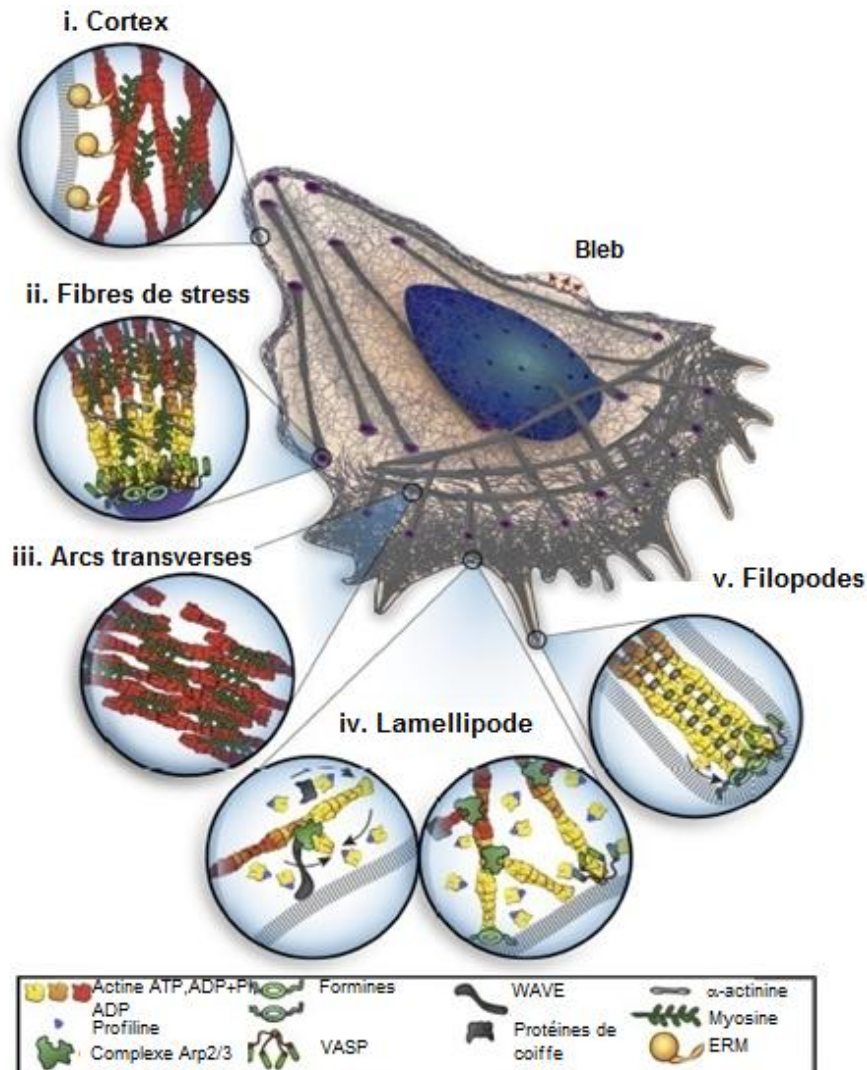


Figure 10 : Organisation des filaments d'actine dans une cellule motile (Blanchoin *et al.*, 2014).

Les cellules « mobiles » ont des organisations distinctes d'actine dans différents endroits de la cellule pour des fonctions précises. **i** : Le cortex d'actine est ancré à la membrane plasmique par l'intermédiaire des protéines ERM (Ezrine, Radixine, Myosine) et est contractile via l'activité de la myosine. **ii** : Une des catégories de faisceaux contractiles, les fibres de stress, qui couvrent le corps cellulaire, et sont généralement orientées parallèlement à la direction du mouvement. Ils sont attachés aux points d'adhésion focaux et impliquent un ensemble de facteurs de régulation intracellulaires, parmi lesquels les formines, α -actinines et la myosine. **iii** : Les arcs transversaux sont des formations antiparallèles de filaments d'actine situés à l'arrière du lamellipode. Ils sont contractiles par l'activité de la myosine. **iv**, Le lamellipode, constitué d'un réseau d'actine ramifié. L'initiation de la ramification de ce réseau dendritique se fait par l'intermédiaire du complexe Arp 2/3 qui permet la formation de branches qui s'attachent au côté d'un filament d'actine déjà existant (amorce). Le complexe Arp 2/3 est activé via les membres de la famille de protéines WAVE. Le réseau s'allonge par l'addition du complexe profiline/actine (flèches noires) aux extrémités barbées des filaments d'actine en étroit contact avec la membrane plasmique. Les protéines Ena/ VASP, les formines et les protéines de coiffe contrôlent l'allongement des filaments en modulant la dynamique des extrémités barbées. **v**, Les filopodes, sont formés par un faisceau de filaments d'actine parallèles et serrés. Une protrusion membranaire, peut se former lors de la rupture transitoire du cortex et due à une pression interne de la cellule : le « bleb » (flèches marron) (Blanchoin *et al.*, 2014).

III.7 ADF/cofiline

La famille des protéines ADF/cofiline comprend l'ADF (Facteur de Dépolymérisation de l'Actine), la cofiline, l'actophorine, la dépacline et la destrine, protéines qui sont impliquées dans le désassemblage des filaments d'actine (Bamburg, 1999). Ces protéines de faible poids moléculaire (15 – 20 kDa), sont présentes chez tous les eucaryotes. Chez les vertébrés, on retrouve la cofiline 1 (Cfl1, cofiline non-musculaire, n-cofiline), la cofiline 2 (Cfl2, cofiline musculaire, m-cofiline) (Ono *et al.*, 1994) et l'ADF (Van *et al.*, 2008; Vartiainen *et al.*, 2002). Dans la cellule, elles sont localisées en particulier dans les régions où la polymérisation et la dépolymérisation des filaments sont importants comme le front des cellules mobiles (Miyoshi *et al.*, 2006; Svitkina and Borisy, 1999).

L'ADF/cofiline peut lier l'actine sous sa forme monomérique ou sous sa forme filamenteuse avec une stœchiométrie d'une molécule d'ADF/cofiline par sous-unité d'actine (Carlier *et al.*, 1997). Cependant, l'état du nucléotide lié au monomère d'actine influence l'affinité de fixation de l'ADF/cofiline. En effet, cette affinité est supérieure en présence de monomères associé à l'ADP plutôt que de l'ATP (Blanchoin and Pollard, 1998; Blanchoin and Pollard, 1999; Carlier *et al.*, 1997). Sur le monomère d'actine-ADP, la fixation de l'ADF/cofiline inhibe l'échange du nucléotide ADP par une molécule d'ATP (Blanchoin and Pollard, 1998). Après dépolymérisation, l'échange du nucléotide ADP en ATP se fait par la fixation de la profiline qui provoque la libération de l'ADF/cofiline (Blanchoin and Pollard, 1998; Kamal *et al.*, 2007). *In vitro*, les expériences de Suarez *et al.* ont montré que la fixation de l'ADF/cofiline s'effectue au voisinage de l'extrémité pointue des filaments, en accord avec l'amarrage préférentiel aux sous unités ADP du filament présentes majoritairement à cette extrémité.

Par ailleurs, des études de simulation de dynamique moléculaire ont permis de proposer des hypothèses sur les zones d'interactions entre l'ADF/cofiline et le monomère d'actine. Mais la nature et la localisation de ces zones d'interaction restent controversées. D'après Wriggers *et al.* l'ADF/cofiline se lierait aux sous-domaines 1 et 3 de l'actine monomérique (Wriggers *et al.*, 1998), alors que, d'après Kamal *et al.*, cette protéine se fixerait aux sous-domaines 1 et 2 du monomère (Kamal *et al.*, 2007). La résolution récente de la structure du complexe du monomère d'actine avec un domaine d'homologie ADF-H consolide la première hypothèse (Paavilainen *et al.*, 2008). Pour les deux modèles, la fixation

de l'ADF/cofiline change la conformation de l'actine monomérique en fermant sa poche nucléotidique, inhibant ainsi la libération du nucléotide lié.

III.7.1 Fragmentation par l'ADF/cofiline

La description du mécanisme moléculaire du désassemblage des filaments d'actine induit par l'ADF/cofiline a été le sujet de longs débats. Deux hypothèses ont été formulées pour expliquer ce comportement : la fragmentation (Maciver *et al.*, 1991) ou l'accélération de la dépolymérisation au niveau de l'extrémité pointue des filaments d'actine (Carlier *et al.*, 1997).

En 1997 Carlier *et al.* ont proposé que l'ADF/cofiline ne participe pas à la fragmentation des filaments d'actine en s'appuyant sur les résultats d'expériences de dépolymérisation des filaments d'actine à partir des extrémités pointues induite par l'addition de la thymosine β 4, en présence ou en absence d'ADF/cofiline, alors que les extrémités barbées sont bloquées par CapG. Les auteurs montrent que, dans ces conditions expérimentales, la vitesse de dépolymérisation des filaments d'actine par leurs extrémités pointues est inchangée en présence de concentrations saturantes d'ADF/cofiline dans le milieu. Ils tirent alors la conclusion que l'ADF/cofiline n'est pas un facteur de fragmentation des filaments d'actine (Carlier *et al.*, 1997). En effet, si tel était le cas, la fragmentation par l'ADF/cofiline aurait généré de nouvelles extrémités barbées libres, qui auraient à leur tour conduit à l'augmentation de la vitesse de dépolymérisation induite par la thymosine β 4 (Carlier *et al.*, 1997).

Depuis diverses études, contredisent cette hypothèse et rendent compte du mécanisme de fragmentation par l'ADF/cofiline et non d'une perte progressive de sous-unités d'actine (Andrianantoandro and Pollard, 2006; Pavlov *et al.*, 2007). La fragmentation découle directement de la fixation de l'ADF/cofiline qui modifie localement les propriétés mécaniques du filament d'actine (McCullough *et al.*, 2008), ce qui se traduit par un clivage du filament (Andrianantoandro and Pollard, 2006; Blanchoin and Pollard, 1999; Pavlov *et al.*, 2007). La longueur de persistance (qui permet de caractériser la rigidité) d'un filament d'actine nu est de 10 μ m. Cette valeur diminue d'un facteur 5 pour un filament d'actine saturé en ADF/cofiline (McCullough *et al.*, 2008). Cela indique que le filament décoré en ADF/cofiline va être plus souple et se déformer sous l'action de forces moins importantes qu'un filament nu (McCullough *et al.*, 2008). En effet, une fois insérée dans le filament d'actine, l'ADF/cofiline induit une torsion ou « twist » au sein de cette structure qui déstabilise les contacts entre les

sous-unités, et cela est à l'origine de l'augmentation de la flexibilité du filament (McGough *et al.*, 1997). Chaque coupure du filament d'actine par l'ADF/cofiline permet la création d'une nouvelle extrémité pointue, et double ainsi l'efficacité de désassemblage d'un filament d'actine. Ce changement engendre simultanément la création d'une nouvelle extrémité barbée qui doit être immédiatement bloquée par une protéine de coiffe pour empêcher la repolymérisation.

Par ailleurs, l'activité de l'ADF/cofiline est fortement dépendante de sa concentration. Son efficacité de fragmentation a pu être mesurée expérimentalement et il apparaît que cette protéine fragmente de façon optimale à des concentrations faibles (quelques dizaines de nM) (Andrianantoandro and Pollard, 2006; Pavlov *et al.*, 2007). A forte concentration, l'ADF/cofiline cesserait de fragmenter pour au contraire avoir un effet de nucléateur de l'actine monomérique et de stabilisation des filaments formés (Andrianantoandro and Pollard, 2006; Bobkov *et al.*, 2006). Toutefois, cette activité nucléatrice est sujette à controverse car une autre hypothèse indique que ce nombre élevé de filaments serait dû à la fragmentation par l'ADF/cofiline des filaments d'actine assemblés spontanément dans le milieu. Ces derniers, ainsi générés constitueront autant de nouveaux petits filaments d'actine capables de s'allonger en présence de monomères libres (figure 11).

En plus de son rôle dans le désassemblage des filaments d'actine, l'ADF/cofiline régule l'activité de la myosine II en contrôlant l'association des myosines aux filaments d'actine (Wiggan *et al.*, 2012). Le complexe actomyosine II ainsi formé, génère la contraction cellulaire nécessaire à de nombreux processus comme la morphologie, la migration, et la division dans les cellules non musculaires (Bray and White, 1988; Clark *et al.*, 2007). Les travaux de Wiggan *et al.* ont montré que la déplétion de l'ADF/cofiline dans les cellules d'adénocarcinome cervical humain HeLa provoquée une augmentation du complexe d'actomyosine II corticale, et s'accompagne d'une augmentation de la tension corticale, aboutissant à la formation de blebs membranaires. Ces effets sont très marqués lorsque l'on déplete à la fois l'ADF et la cofiline par rapport à la déplétion isolée de chaque isoforme, suggérant que ces deux dernières agissent de manière redondante pour contrôler l'organisation du cytosquelette. Ils démontrent également que l'ADF/cofiline inhiberait directement la liaison des myosines II aux filaments d'actine, ce qui est cohérent avec les résultats obtenus dans les cellules (Wiggan *et al.*, 2012).

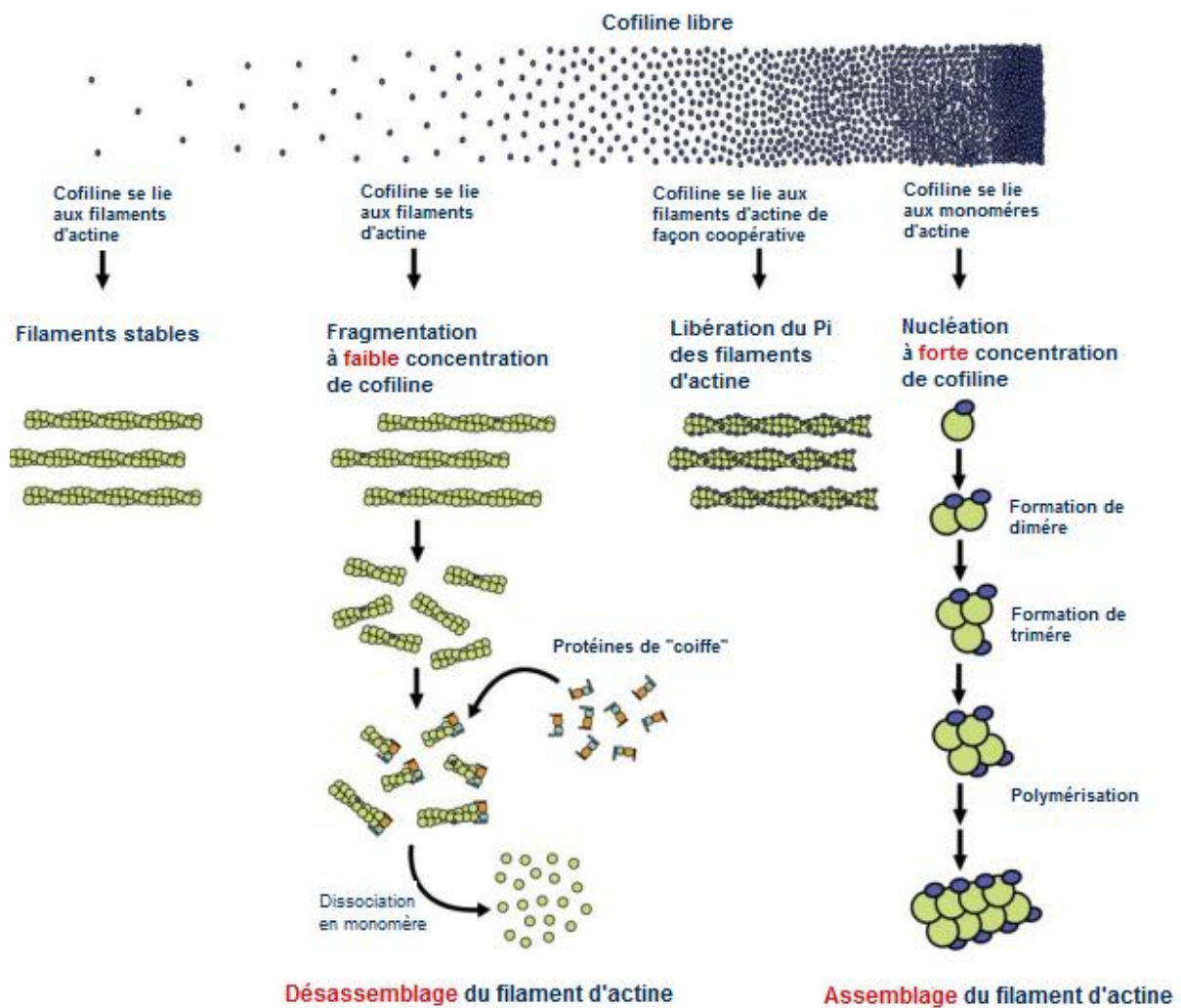


Figure 11 : Les effets de la cofiline sur l'actine dépendent de sa concentration (Andrianantoandro and Pollard, 2006).

À très faible concentration, la cofiline (ovales bleus) ne se lie pas aux filaments d'actine (vert). À faible concentration de cofiline, cette protéine se lie et coupe les filaments d'actine. Le coiffage des extrémités barbées favorise la dissociation des monomères d'actine (cercles verts) à partir des extrémités pointues, conduisant au désassemblage du filament. Des concentrations plus élevées de cofiline se lient de façon coopérative aux filaments d'actine et provoquent la libération du phosphate inorganique (Pi), mais ne les coupent pas. À concentration très élevée de cofiline, sa liaison aux monomères d'actine stimule la nucléation, favorisant l'assemblage des filaments d'actine.

III.7.2 Régulation de l'activité de l'ADF/cofiline

Plusieurs mécanismes ont été identifiés pour réguler l'activité de l'ADF/cofiline, y compris son inactivation par phosphorylation (Moriyama *et al.*, 1996), son interaction avec les phosphatidylinositol 4,5- bisphosphate (PI(4,5)P2) (Van *et al.*, 2008), les effets du pH (Carlier *et al.*, 1997) et la synergie ou les interactions compétitives de l'ADF/cofiline avec d'autres ABPs (Actin Binding Proteins) (Van *et al.*, 2008).

III.7.2.1 *Inactivation/activation médiée par phosphorylation / déphosphorylation de l'ADF/cofiline*

L'activité de l'ADF/cofiline est négativement régulée par phosphorylation de la serine 3 (Blanchoin *et al.*, 2000b; Morgan *et al.*, 1993; Moriyama *et al.*, 1996). Cette phosphorylation ne modifie pas la conformation de la protéine mais inhibe sa fixation à l'actine monomérique et fibrillaire (Blanchoin *et al.*, 2000b). *In vivo*, la substitution la serine 3 de la cofiline par un acide aspartique ou glutamique (S3D/E) ou par une alanine (S3A) ont été utilisés afin d'imiter la phospho ADF/cofiline inactive et l'ADF/cofiline active, respectivement (Moriyama *et al.*, 1996; Van *et al.*, 2008). Les kinases responsables de l'inactivation de l'ADF/cofiline appartiennent aux familles des Lin-11, Isl1 et Mec-3 kinases (LIMK 1 et LIMK 2) (Arber *et al.*, 1998; Edwards and Gill, 1999) et Testicular kinases (TESK 1 et TESK 2) (Toshima *et al.*, 2001a; Toshima *et al.*, 2001b). De son côté, la déphosphorylation de la sérine 3 s'effectue par l'intermédiaire de phosphatases appartenant aux familles des slingshots (Niwa *et al.*, 2002; Ohta *et al.*, 2003) ou des phosphatases chronophines (Gohla *et al.*, 2005).

La figure 12 illustre les principales voies de signalisation qui régulent les activités kinases et phosphatases ciblant l'ADF/cofiline (Van *et al.*, 2008). Au niveau de la membrane cellulaire, les intégrines et les récepteurs tyrosines kinases (RTKs) sont activés par des signaux extracellulaires, il s'ensuit une cascade réactionnelle qui aboutit à l'activation des kinases (LIMK et TESK) qui à leur tour inactivent l'ADF/cofiline. Les kinases LIMK1 et LIMK2 sont elles mêmes phosphorylées par les Rho kinases (ROCK1 et ROCK2), effecteurs de RhoA sur les résidus thréonine (Amano *et al.*, 2001; Ohashi *et al.*, 2000; Sumi *et al.*, 2001a), de même que les kinases PAK1 (Edwards *et al.*, 1999), PAK4 (Dan *et al.*, 2001), PAK2 (Misra *et al.*, 2005) et MRCKs (myotonic dystrophy kinase-related Cdc42-binding kinase) (Sumi *et al.*, 2001b) effecteurs de Rac1 et de Cdc42 qui activent les formes de LIMK indiquées (figure 12).

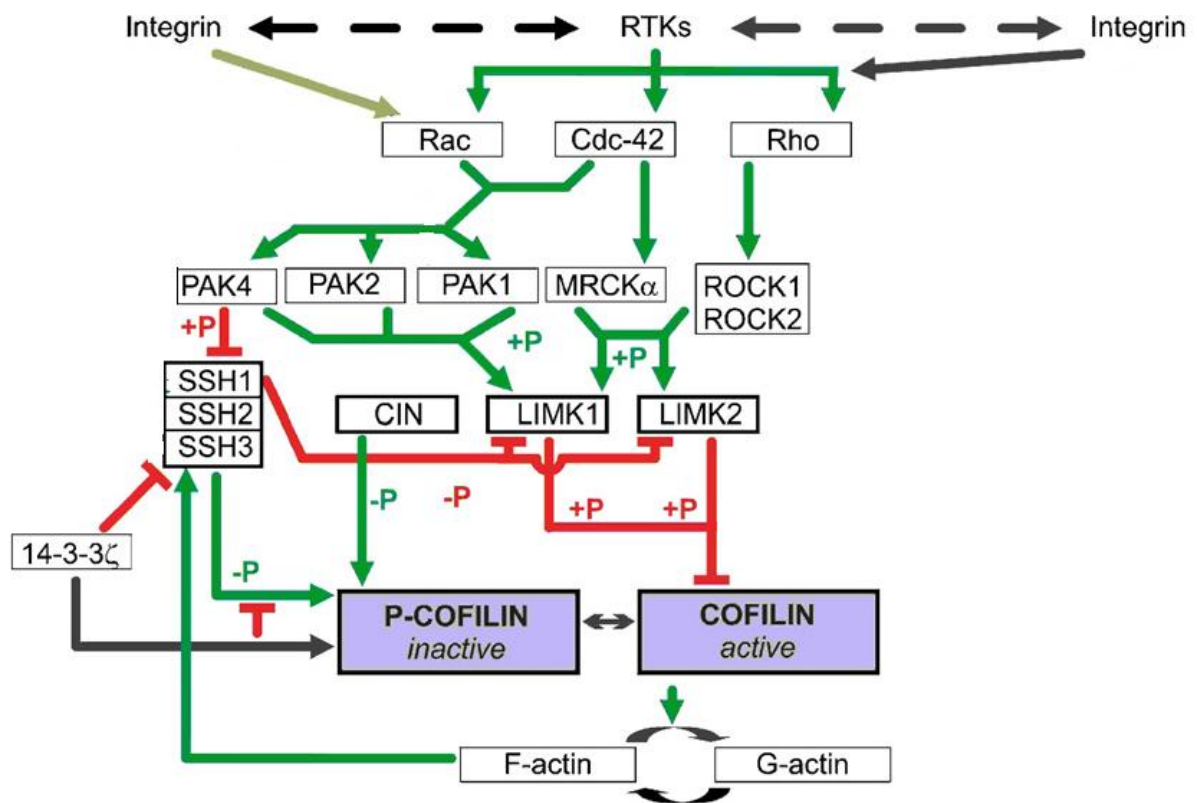


Figure 12 : Cascades de signalisation contrôlant la phosphorylation et la déphosphorylation de l'ADF/cofiline (Van *et al.*, 2008).

Aperçu schématique des kinases et phosphatases ciblant l'ADF/cofiline et leurs régulateurs connus. L'ADF/cofiline phosphorylée ne peut plus se lier aux filaments d'actine et de ce fait est inactive. Les Rho GTPases ont un rôle important dans le contrôle de l'activité des kinases et des phosphatases. Les lignes rouges, vertes (claires ou foncées) et noires (ou les flèches) pointent une inhibition, une activation et une interaction sans effet (ou inconnu) sur l'activité, respectivement; + P signifie une réaction de phosphorylation et - P, une déphosphorylation. Les flèches hachurées indiquent la liaison aux intégrines (récepteurs d'adhésion cellulaire) des récepteurs RTK (récepteurs à activité tyrosine kinase) montrant le dialogue entre ces systèmes de récepteurs.

L'organisation du réseau d'actine en mailles ou en fibres est contrôlée par de petites protéines régulatrices de la famille Rho GTPase. Les plus connues sont Rho (RhoA), Rac (Rac1) et Cdc42. Ces protéines ont été largement étudiées et se sont révélées avoir des rôles pivots majeurs dans de nombreux processus cellulaires comme la motilité, la prolifération, la morphologie et l'apoptose (Riento and Ridley, 2003).

Brièvement, l'activation de Rho induit l'activation du complexe d'actomyosine via les kinases ROCK comme on le verra plus loin, augmente de ce fait la contraction cellulaire et favorise l'assemblage des fibres de stress et des adhésions focales (Ridley et Hall, 1992).

Par ailleurs, l'activation de la sérine/thréonine kinase PAK, un effecteur commun à Rac1 et Cdc42, induit la formation de lamellipodes et de filopodes respectivement (Manser *et al.*, 1994; Sells, 1999) (figure 13). Il a été montré que PAK s'opposait aux effets de ROCK au niveau de la contraction des fibres d'actomyosine puisque cette dernière phosphoryle et inactive la MLCK. Ceci a pour conséquence une diminution de la phosphorylation de la MLCR qui s'accompagne d'une réduction de l'assemblage et de la contraction des filaments d'actomyosine (Sanders *et al.*, 1999).

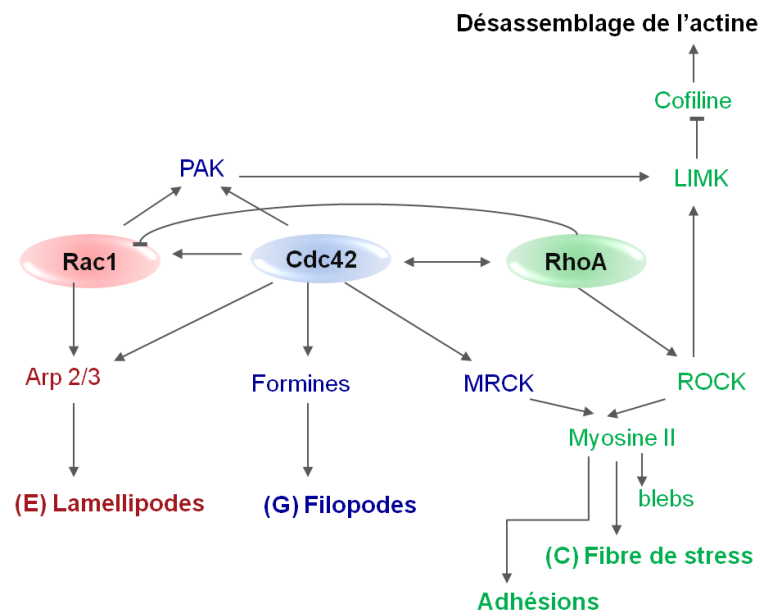


Figure 13 : Représentation schématique du rôle des GTPases Rho, Rac et Cdc42 dans la formation des extensions membranaires.

Cdc42, cell division control protein 42; LIMK, LIM (Lin11, Isl1 and Mec3) kinase; MyoII, myosin II;; MRCK, myotonic dystrophy kinase-related Cdc42-binding kinase; PAK, p21-activated kinase. Les flèches signifient “→”: voie d'activation, et “—|” : voie d'inhibition.

Les mécanismes qui contrôlent le cytosquelette d'actine, la forme et la motilité cellulaires peuvent être détournés notamment en pathologie comme cela est observé dans des cellules tumorales invasives. De nombreuses études ont montré que les LIM kinases jouent un rôle central dans l'invasion des tissus par les cellules tumorales et la formation des métastases (Scott and Olson, 2007).

Il a été proposé que l'équilibre entre la cofiline phosphorylée et non phosphorylée est un élément déterminant du potentiel métastatique des cellules tumorales. LIMK1 s'est avérée surexprimée dans les cellules de mélanome (Okamoto *et al.*, 2005), les tumeurs du cancer du sein (Bagheri-Yarmand *et al.*, 2006) et dans les tumeurs de la prostate où il a été également observé une augmentation de la phosphorylation de la cofiline (Davila *et al.*, 2003). Cependant, il a également été rapporté que la surexpression du domaine kinase de LIMK1 (Zebda *et al.*, 2000) ou, le knock-down de cofiline par l'utilisation de siRNAs (Hotulainen *et al.*, 2005) réduit la motilité cellulaire. Ces résultats suggèrent que la perturbation de l'équilibre entre cofiline phosphorylée et non phosphorylée en inhibant par exemple l'activité de LIMK, se traduirait par une réduction des propriétés invasive et métastatique des cellules cancéreuses. A l'appui de cette proposition, il a été rapporté qu'en interférant avec la fonction de LIMK par inactivation de LIMK1 dans les cellules à capacité métastatique de cancer de la prostate (Davila *et al.*, 2003), ou par la surexpression d'une forme dominante négative de LIMK1 dans des cellules de cancer du sein à capacité métastatique (Yoshioka *et al.*, 2003) ou par le knock-down de LIMK2 dans les cellules issues de fibrosarcome (Suyama *et al.*, 2004), on inhibait la motilité, la prolifération et / ou la formation de métastases. Ces données sont cohérentes avec l'hypothèse que l'inhibition de LIMK réduirait efficacement le potentiel métastatique de différents cancers (Scott and Olson, 2007).

III.7.2.2 *Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate PI(4,5)P2 et influence du pH*

Depuis leur découverte, les protéines de la famille d'ADF/cofiline ont été reconnues comme ayant la capacité d'interagir avec les polyphosphoinositides *in vitro* (Yonezawa *et al.*, 1990). De façon intéressante, l'interaction de l'ADF/cofiline avec le phospholipide membranaire PI(4,5)P2, inhibe sa capacité à lier l'actine. Cette inhibition est due à une compétition entre ces deux cibles car les sites de liaison de la actine-F et du PI(4,5)P2 se chevauchent sur la cofiline (Van *et al.*, 2000). La libération de l'ADF/cofiline de la membrane peut alors se faire soit par activation de la phospholipase $\gamma 1$ qui réduit la concentration en

PI(4,5)P2 séquestrant l'ADF/cofiline (van *et al.*, 2007), soit par une augmentation du pH cytoplasmique qui diminue l'affinité du PI(4,5)P2 pour l'ADF/cofiline (Frantz *et al.*, 2008).

Indépendamment de son interaction avec le PI(4,5)P2, les variations du pH intracellulaire peuvent aussi moduler directement l'activité de l'ADF/cofiline (Van *et al.*, 2008). En effet, il a été montré que des changements de pH dans le domaine de la physiologie (6,8 à 7,4) modifient la capacité de fragmentation de l'ADF /cofiline *in vitro* (Hawkins *et al.*, 1993).

III.7.2.3 Modulation de l'activité de l'ADF/Cofiline par d'autres protéines interagissant avec l'actine

L'activité de l'ADF/cofiline est régulée par de nombreuses protéines interagissant avec l'actine. Ces protéines jouent un rôle critique dans la régulation de l'actine, mais les conséquences de leur activation ou de leur inhibition restent difficiles à analyser. L'ADF/cofiline par exemple ne peut fragmenter les filaments d'actine protégés par les tropomyosines (Bernstein and Bamburg, 1982). Ces dernières sont des protéines de haut poids moléculaire qui se fixent sur plusieurs sous-unités le long d'un filament d'actine et ayant un fort effet de stabilisation. Les tropomyosines peuvent également empêcher la ramification des filaments d'actine par le complexe Arp 2/3 (DesMarais *et al.*, 2002). Cependant, la fimbrine est une protéine qui dissocie la liaison des tropomyosines sur les filaments d'actine, permettant à l'ADF/cofiline de fragmenter les filaments d'actine (Skau and Kovar, 2010). La balance entre la tropomyosine et la fimbrine est différente selon la localisation cellulaire et c'est donc un paramètre de régulation de l'activité de l'ADF/cofiline (Skau and Kovar, 2010).

Pour conclure, les protéines de liaison à l'actine modulent l'activité d'assemblage et de désassemblage des filaments d'actine et contribuent à la régulation du cytosquelette d'actine. Cette régulation est particulièrement importante lors de la migration cellulaire. De plus, il faut ajouter un type particulier de protéines de liaison à l'actine qui joue un rôle important dans la modulation du cytosquelette d'actine, il s'agit des moteurs moléculaires de la famille des myosines.

III.8 Les myosines

Les myosines représentent une grande famille de moteurs moléculaires exprimés dans tous les organismes eucaryotes, et présents dans les cellules musculaires striées, cellules musculaires lisses et dans les cellules non-musculaires. Au sein d'une cellule trois fonctions principales dépendent essentiellement de l'action des myosines :

- (i) en tant que moteur de la contraction ;
- (ii) en tant que transporteur de particule ou "cargo" moléculaire ;
- (iii) en tant qu'attache entre le cytosquelette d'actine et la membrane pour former le cortex d'actine (Reymann, 2011).

Les myosines sont composées de chaînes lourdes associées à des chaînes légères. Les chaînes lourdes portent l'activité ATPasique et le site de liaison aux filaments d'actine alors que les chaînes légères sont impliquées dans la régulation de l'activité et dans la stabilisation des chaînes lourdes (Spudich, 2001). Il existe deux types de myosines, les « conventionnelles » de classe II, auxquelles sont attribuées l'essentiel des forces contractiles dans les cellules non-musculaires (Bray, 2001) et les autres classes de myosines « non-conventionnelles », dont les fonctions sont encore mal connues (Sellers, 2000).

III.8.1 La myosine non-musculaire de classe II

III.8.1.1 *Fonction et Structure*

La myosine non musculaire de type II associée aux filaments d'actine, est impliquée dans plusieurs processus intracellulaires qui sont dépendants de la contraction cellulaire non musculaire et du transport intracellulaire, comme la motilité cellulaire, la cytokinèse et la motilité des organelles (Robinson and Spudich, 2000; Warrick and Spudich, 1987).

Du point de vue structural, la myosine non-musculaire de classe II est un hexamère composé d'une paire de chaînes lourdes MHC (myosin II heavy chain ~200 KDa) (Warrick *et al.*, 1986) et de deux paires de chaînes légères MLC (myosin II light chain), une essentielle (MLCE ~17) et l'autre régulatrice (MLCR ~20) (Chisholm *et al.*, 1988; Tafuri *et al.*, 1989). Les MLCE sont impliquées dans la stabilisation de la structure tridimensionnelle des chaînes lourdes et les MLCR sont impliquées dans la régulation de l'activité des chaînes lourdes (Sellers, 1991).

C'est au niveau des MLCR qu'ont lieu les phosphorylations qui induisent l'interaction des MHC avec les filaments d'actine. En fait, la liaison des MLCR aux chaînes lourdes inhibe

en continu l'interaction myosine-actine et c'est la phosphorylation des MLCR qui lève l'inhibition et déclenche la contraction (Sellers, 1991).

Les chaînes lourdes (MHC) sont composées en N-terminal, d'une tête globulaire qui contient le domaine de liaison aux filaments d'actine et le domaine catalytique ATPasique. Le domaine ATPasique est régulé par les MLCR et est activé par la liaison aux filaments d'actine. Sa fonction est de transformer l'énergie issue de l'hydrolyse de l'ATP en énergie motrice.

III.8.1.2 Régulation de l'activité de la myosine II par les MLCR

La phosphorylation de MLCR est essentielle à l'activité de la myosine II et donc à tous les processus cellulaires dépendants de la contraction non-musculaire, comme la cytokinèse, la motilité et l'apoptose (Matsumura *et al.*, 2001). Comme pour beaucoup de protéines phosphorylées, l'activité des MLCR dépend d'un équilibre entre l'activité des phosphatases et celle des kinases.

- *La kinase MLCK* (Ca^{2+} -calmodulin-dependent MLC kinase) : est une sérine/thréonine kinase dont l'activité est régulée par le complexe calcium/calmoduline et qui phosphoryle la MLCR en sérine 19 (Pearson *et al.*, 1984) et thréonine 18 (Ikebe *et al.*, 1986).
- *Les kinases ROCK* (Rho associated kinase) : il a été montré que la Rho GTPase contrôle l'activité du complexe d'actomyosine et induit la formation des fibres de stress et en contrôlant la formation des contacts focaux (Ridley and Hall, 1992). Parmi les effecteurs de Rho, on trouve des sérine/thréonine kinases effectrices, les ROCK (Ishizaki *et al.*, 1996; Matsui *et al.*, 1996).
- *La phosphatase des MLCR* (MYPT1) est la seule phosphatase connue jusqu'à ce jour, pour déphosphoryler les MLCR (Hartshorne *et al.*, 1998) et donc diminue l'interaction de la myosine II avec les filaments d'actine. Elle est phosphorylée et inactivée par les kinases ROCK (Ito *et al.*, 2004).
- D'autres kinases peuvent phosphoryler les MLCR mais sur des sites différents des sites sérine 19 et thréonine 18.

III.8.1.3 Régulation des chaînes lourdes (MHC)

L'activité de la myosine non-musculaire II est contrôlée aussi par la phosphorylation des chaînes lourdes (Moussavi *et al.*, 1993). On l'a vu précédemment, la phosphorylation des

MLCR induit la fixation de la myosine aux filaments d'actine. La phosphorylation des MHC jouent un rôle tout aussi important puisque leur phosphorylation contrôle la dynamique d'association entre les molécules de myosine II entre elles (Redowicz, 2001; Tan *et al.*, 1992). La structure secondaire des MHC permet la dimérisation des MHC, mais permet aussi l'interaction entre plusieurs hexamères de myosine II antiparallèles formant des filaments de myosine II bipolaires fonctionnels pour générer les forces de traction. L'état de phosphorylation des MHC régule l'assemblage de la myosine II en filaments bipolaires. L'activité ATPasique des MHC est augmentée lorsque les MHC sont déphosphorylées, à l'inverse, la phosphorylation inhibe l'assemblage des filaments de myosine II (Tan *et al.*, 1992). Les kinases impliquées dans la phosphorylation des chaînes lourdes ne seront pas détaillées.

En résumé, le complexe actomyosine est formé par l'association de la myosine II avec les filaments d'actine et l'activité de la myosine II est donc contrôlée par un équilibre minutieux entre les différentes kinases et phosphatases et ces différents facteurs protéiques.

Dans les cellules non musculaires, la myosine de type II s'associe le long des filaments d'actine et forme le complexe actomyosine qui est impliqué dans tous les processus cellulaires qui nécessitent la génération d'une force motrice ou de traction comme la locomotion cellulaire (Lauffenburger et Horwitz, 1996), la cytocinèse mais aussi les changements de morphologie cellulaire que peut subir une cellule en réponse à différents stimuli. L'endocytose, l'exocytose et le transport intracellulaire des vésicules sont assurés par les microtubules et par le complexe actomyosine. Et enfin le complexe actomyosine est impliqué dans la contraction cellulaire et le blebbing.

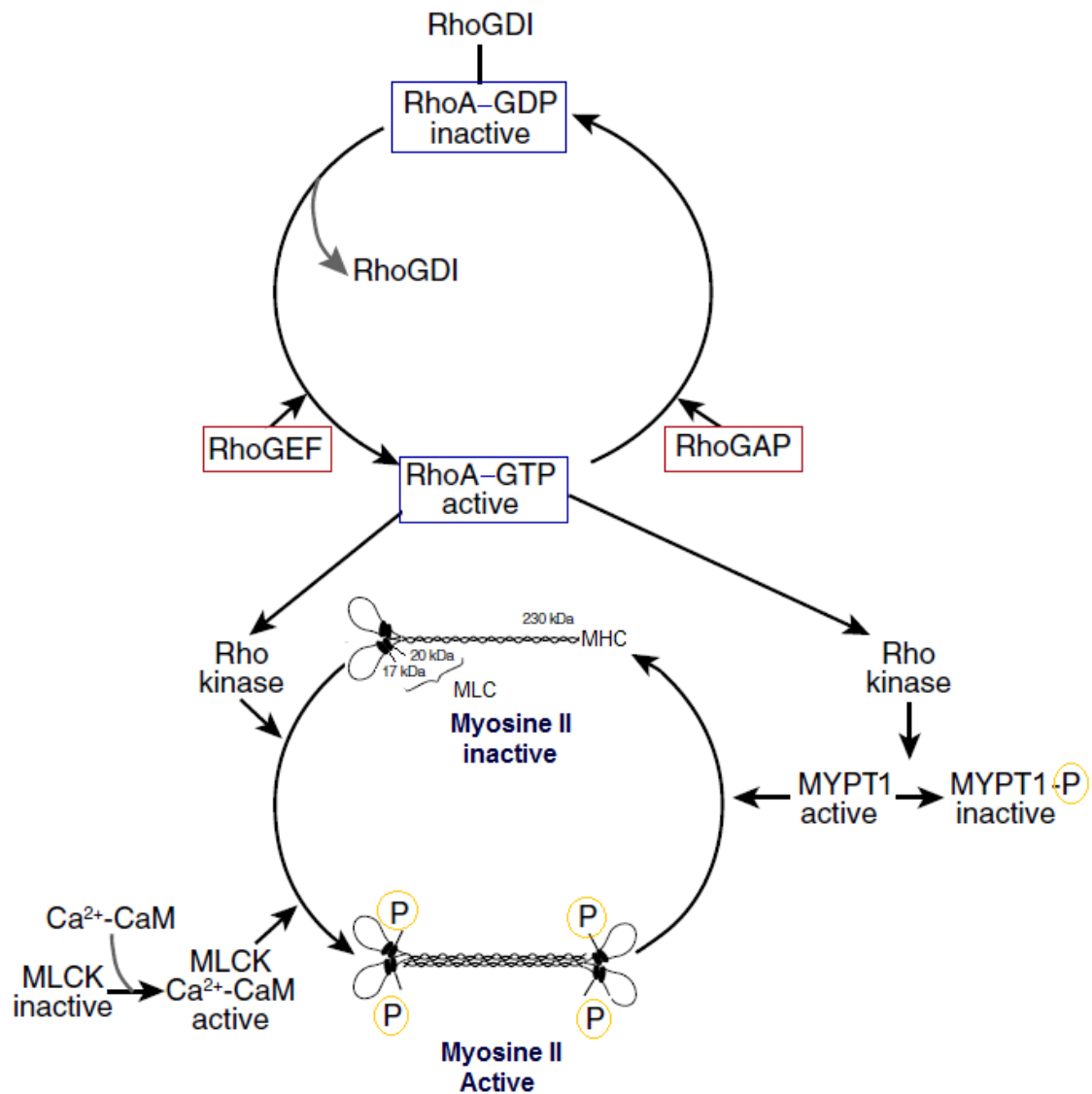


Figure 14 : Régulation de l'activité de la myosine II non-musculaire par phosphorylation des MLCR (20 kDa). Figure modifiée à partir de (Conti and Adelstein, 2008).

MHC : myosin II heavy chain, MLC : myosin II light chain, MLCK : myosin light chain kinase, Ca^{2+} -CaM : Ca^{2+} -calmodulin, Rho kinase : Rho associated kinase, MYPT1 : myosin II phosphatase Target subunit 1.

III.9 Phénomène de blebbing

Traditionnellement considéré comme un signe d'apoptose, les blebs ont été également observés dans d'autres circonstances, comme la migration cellulaire (Langridge and Kay, 2006; Yoshida and Soldati, 2006), ou bien aux pôles des cellules en division, à partir de la fin de l'anaphase et jusqu'à la fin de la cytokinèse (Boucrot and Kirchhausen, 2007; Cunningham, 1995; Laster and Mackenzie, Jr., 1996), ou encore en réponse aux stress biochimiques tel qu'une forte concentration intracellulaire d'ions calcium : celle-ci active des protéinases intracellulaires qui, en provoquant des dommages au niveau du cytosquelette, induisent un blebbing membranaire (Babiyuchuk *et al.*, 2011; Hagmann *et al.*, 1999). La protrusion en forme de blebs cellulaires a également été identifiée comme une stratégie possible chez les cellules cancéreuses, d'adopter un comportement migratoire spécifique aux cellules métastatiques (Lammermann and Sixt, 2009; Mishima *et al.*, 2010; Sahai and Marshall, 2003).

Le « bleb » est défini comme une protrusion de la membrane cytoplasmique, de forme approximativement sphérique ou hémisphérique (Charras and Paluch, 2008; Fackler and Grosse, 2008). Le mécanisme de formation des blebs semble résulter d'un détachement local d'une région de la membrane qui s'étire, à la manière d'une hernie, sous l'effet de la pression intracellulaire (figure 15). Le phénomène initiateur est une rupture d'adhésion entre la membrane plasmique et le cortex d'actine, et/ou la dépolymérisation locale de l'actine corticale (Keller and Eggli, 1998). Après une phase d'expansion, le bleb atteint sa taille maximale d'un diamètre de l'ordre de 2 à 5 μm (Charras *et al.*, 2008). L'actine est rapidement repolymérisée, (probablement via des mécanismes similaires à la polymérisation lors du renouvellement de l'actine corticale), et reforme un cortex sous la membrane grâce à l'accrochage des protéines de liaison de la famille des ERM (Ezrine / Radixine / Moesine), qui se contractent et conduisent à la disparition du bleb par réintégration de membrane herniaire dans la cellule. Cette phase de rétraction est due à l'activité locale de Rho/ROCK qui induit la contraction du cortex d'actine qui réapparaît dans les blebs matures (marquage de l'actine corticale : (Charras *et al.*, 2005; Cunningham, 1995)) et permet le recrutement de la myosine II (Charras *et al.*, 2005). Le temps d'expansion d'un bleb est très rapide, environ 30 secondes alors qu'il se contracte plus lentement, environ 2 minutes (Charras and Paluch, 2008; Charras *et al.*, 2008).

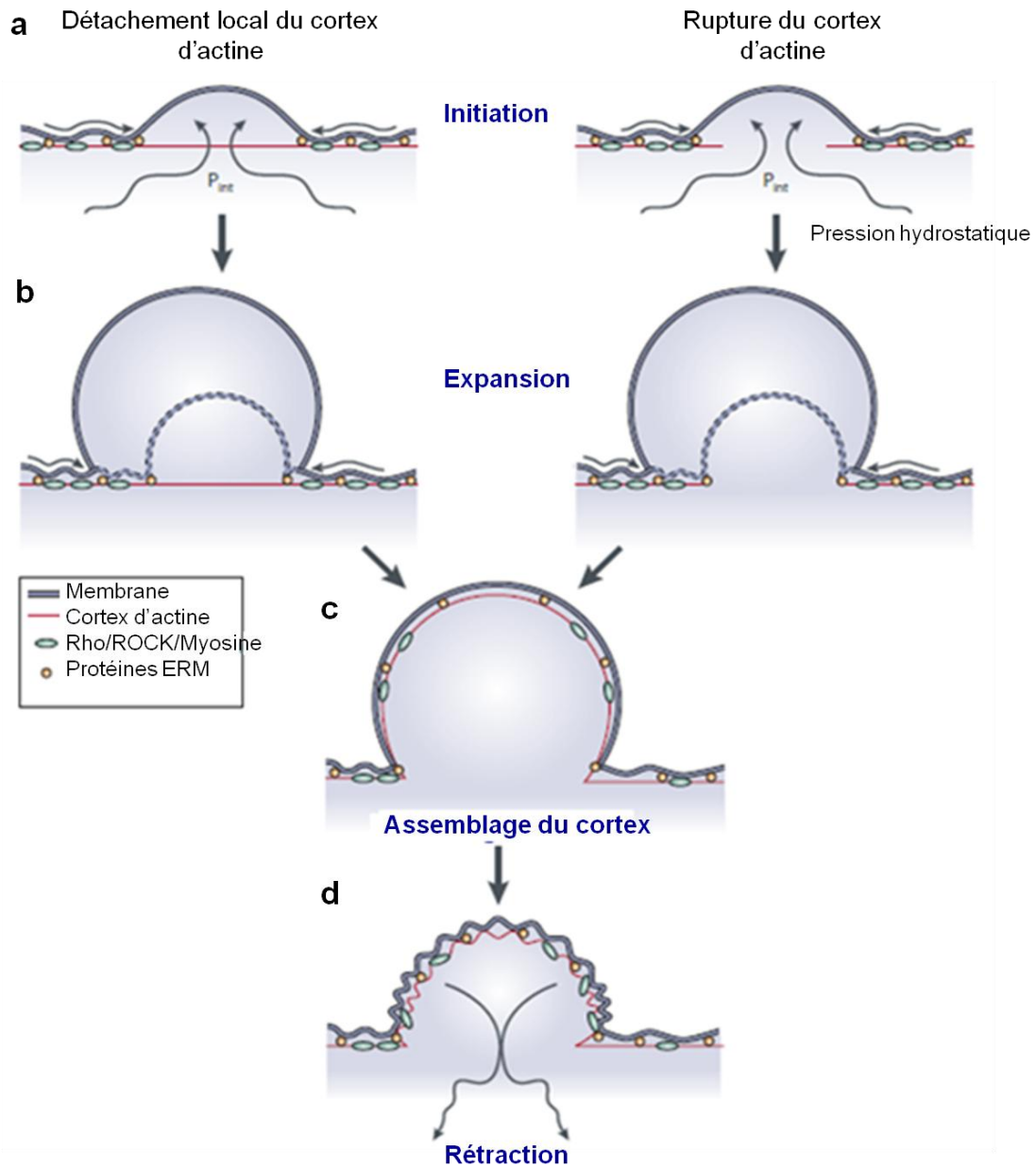


Figure 15 : Deux processus ont été proposés à l'origine de la formation des blebs (Charras and Paluch, 2008)

La formation des blebs peut résulter de la dissociation locale de l'adhésion entre le cortex d'actine et la membrane ou de la rupture locale du cortex d'actine. Le cycle de vie d'un bleb est divisé en quatre phases : (a) initiation, (b) expansion, (c) assemblage du cortex et (d) rétraction

En résumé, la formation des blebs dépend essentiellement du cortex d'actomyosine et de sa liaison avec la membrane ; cela a été souligné par l'effet d'agents, qui conduisent à une suractivation des myosines et favorisent la formation de blebs. En effet, ces derniers sont observés lorsqu'on agit sur une des protéines de régulation de la myosine II : RhoA (en ajoutant l'acide lisophosphatidique, LPA, un activateur de Rho), ou sur la MLCK, myosin light chain kinase (en ajoutant de la calyculine A qui augmente la phosphorylation de la chaîne légère de la myosine II, ce qui lui permet de lier l'actine) (Hagmann *et al.*, 1999).

A contrario, les blebs disparaissent d'une cellule traitée avec des drogues inhibitrices de la myosine II comme la blebbistatine, qui bloque l'attachement des myosines aux filaments d'actine (Kovacs *et al.*, 2004) ou le Y27632 (Ishizaki *et al.*, 2000), inhibiteur de ROCK, activatrice de myosine II (Charras *et al.*, 2005) (figure 16). En conclusion, les traitements qui augmentent l'activité des myosines favorisent la formation des blebs.

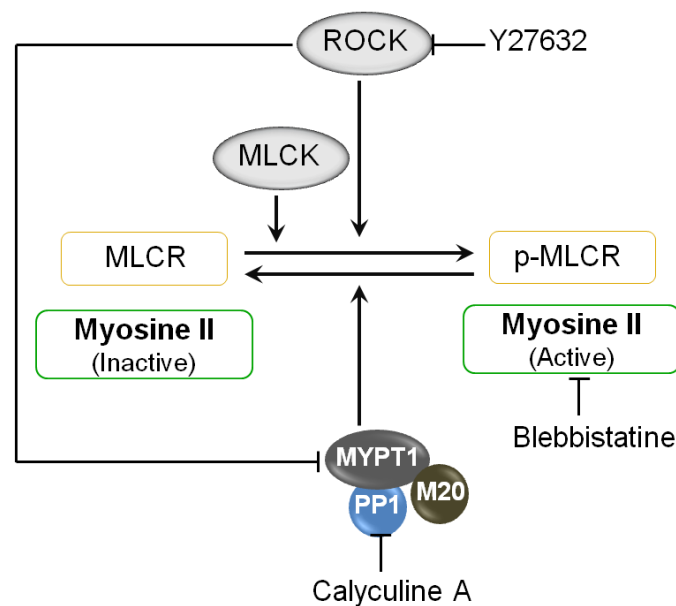


Figure 16 : Schéma simplifié de la régulation de l'activité de la myosine II, et mode d'action de différentes drogues. Figure modifiée à partir de (Fabian *et al.*, 2007)

Pour que la myosine II soit active, la chaîne légère régulatrice (MLCR) doit être phosphorylée par la MLCK (myosin light chain kinase) ou par la ROCK (Rho associated kinase). La déphosphorylation de la MLCR se fait par la phosphatase de la chaîne légère de la myosine qui est un hétérotrimère composé d'une sous-unité de liaison aux MLCR (M20), d'une sous-unité catalytique appelée protein phosphatase (PP1) et une petite sous-unité MYPT1 (myosin phosphatase targeting subunit 1) (Ito *et al.*, 2004). Divers inhibiteurs interfèrent avec l'activité de la myosine II : ROCK est inhibée par le Y27632, la phosphatase de la chaîne légère de la myosine est inhibée par la calyculine A et la myosine II est inhibée directement par la blebbistatine (la blebbistatine inhibe l'activité ATPasique des chaînes lourdes de myosine II MHC).

Les blebs sont des protrusions transitoires et ont donc préférentiellement été étudiés dans des lignées cellulaires qui les génèrent de façon régulière, comme les cellules tumorales déficientes en filamine A (protéine de liaison qui joue un rôle dans l'adhésion membrane/cortex) (Cunningham, 1995), ou les cellules du carcinosarcome « Walker », qui sont non adhérentes et flottent dans le milieu de culture (Keller and Egli, 1998).

Charras *et al.* (Charras *et al.*, 2005) ont ainsi testé l'impact local de différentes drogues sur des cellules de mélanome déficientes en filamine A : l'application locale de molécules qui bloquent les forces contractiles comme la blebbistatine ou le 3-4-pyridylindole inhibent la formation de blebs uniquement dans la zone traitée. Les auteurs considèrent alors deux explications possibles :

- (i) soit la contraction induit localement la formation de blebs, alors que la pression hydrostatique est constante dans la cellule ;
- (ii) soit la pression causée par contraction agit au niveau local pour former les blebs, et la pression ne s'équilibre pas globalement dans la cellule.

Or, l'application locale de drogues dépolymérisant l'actine (comme la cytochalasine D ou la latrunculine B), dans un premier temps provoque une augmentation générale de la dimension des blebs, puis dans un second temps le blebbing cesse dans la zone traitée (les blebs existants n'étant plus rétractés) tandis que le blebbing continue dans les zones non traitées mais à une fréquence moindre. Les auteurs considèrent ainsi que leurs expériences s'accordent mieux avec la seconde hypothèse, et proposent un modèle décrivant le cytoplasme comme un milieu poro-élastique, dans lequel la pression hydrostatique ne s'équilibre que sur des échelles de temps d'une dizaine de secondes ainsi, la contraction du cortex d'actomyosine pourrait causer une augmentation locale de la pression hydrostatique, laquelle donnerait lieu, dans une région où la membrane serait faiblement attachée au cytosquelette, à la formation d'un bleb.

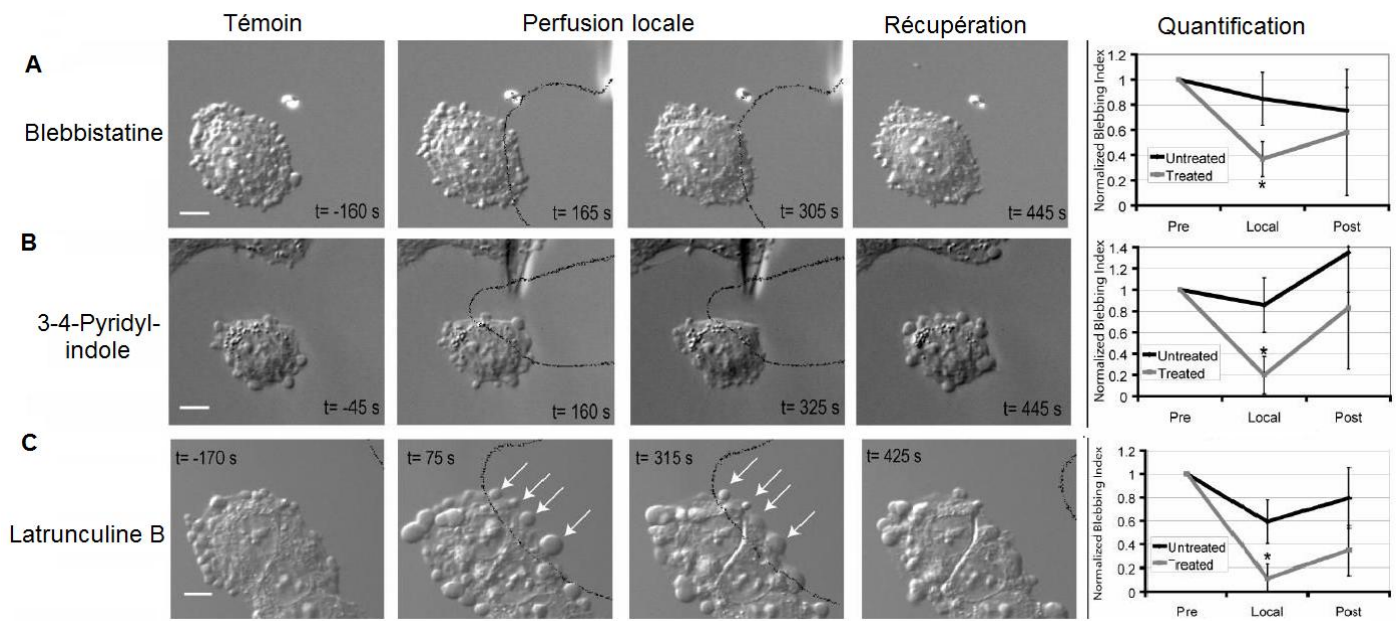


Figure 17 : Effets des drogues sur le blebbing (Charras *et al.*, 2005)

Dans tous les cas, avant l'application du traitement, les cellules de mélanome déficientes en filamine A forment des blebs abondamment à leur périphérie. Les lignes noires délimitent la zone d'application des drogues à l'aide de la micropipette. Sur chaque image, le texte en encadré indique la durée relative de l'application locale du traitement. Les indices de blebbing normalisés montrent l'évolution dans le temps du blebbing dans la région exposée à l'inhibiteur et dans la région libre. Les astérisques indiquent les modifications importantes de l'indice de blebbing après le traitement local par rapport à l'indice de blebbing initial.

A, inhibition locale de la myosine II ATPase par perfusion locale de blebbistatine 100 μ M.

B, inhibition locale de ROCK par le 3- 4-pyridylindole.

C, Perfusion locale de latrunculine B qui a un double effet. Quand elle est appliquée localement, la taille des blebs augmente à l'échelle globale (t = 75 secondes) et la dynamique des blebs cessent dans la zone traitée (t = 75 secondes, t = 315 secondes). Ailleurs, l'expansion et la rétraction continuent. Barre d'échelle : 10 μ m.

CHAPITRE 2

LES CUCURBITACINES : GENERALITES, STRUCTURE ET PROPRIETES

I. Introduction

Nous venons de voir comment le cytosquelette est impliqué dans un certain nombre de fonctions et de phénomènes physiologiques parmi lesquels le maintien de la morphologie, la migration, ou la prolifération cellulaire. A l'inverse, la dérégulation et le dysfonctionnement de la structure ou de la dynamique du cytosquelette sont souvent à l'origine de processus qui peuvent favoriser l'oncogenèse, notamment par une activité altérée du cytosquelette. En conséquence, l'identification de nouvelles molécules ayant pour cible le cytosquelette représente un enjeu majeur tant sur le plan fondamental que dans le cadre de recherches de molécules potentiellement thérapeutiques.

Les plantes sont une source considérable de métabolites secondaires, qui présentent une grande diversité chimique et une grande variété d'actions biologiques. Il est estimé que moins de 15% des plantes supérieures ont été étudiées pour la présence de composés bioactifs (Bailly, 2009) et 60% des anticancéreux utilisés à l'heure actuelle ont pour origine un produit naturel. C'est pourquoi chercher de nouvelles molécules médicamenteuses dans le milieu naturel ouvre de nombreuses perspectives. C'est ainsi que des agents antimitotiques qui ciblent la formation du fuseau mitotique microtubulaire ont été découverts à partir de sources naturelles et ont été classés en fonction de leurs sites de liaison au niveau de la tubuline: les composés se fixant dans le domaine des taxanes, des vinca-alcaloïdes, ou des colchinoïdes (colchicine). Dans tous les cas, la mitose ne se déroule pas normalement, avec un ralentissement de la prolifération cellulaire.

Le paclitaxel (Taxol[®], taxanes), par exemple, est un anticancéreux fréquemment utilisé en chimiothérapie dont le mode d'action est de stabiliser les microtubules et ainsi de limiter la division anarchique des cellules cancéreuses. L'origine de la découverte remonte à 1962, où une activité cytotoxique sur des cellules leucémiques a été remarquée à partir d'extraits

d'écorce du *Taxus brevifolia*, l'if du pacifique. Cinq ans plus tard, les chercheurs Wall et Wani en isolèrent le principe actif, et ce n'est qu'en 1971 qu'ils publièrent la structure du Taxol, diterpène polyoxygéné tétracyclique, comportant également une chaîne latérale amide (Wani *et al.*, 1971). Depuis 1990, le Taxol[®] est commercialisé et a été approuvé pour le traitement du cancer du sein, du poumon et de l'ovaire, et son commerce représente un chiffre d'affaire de plus d'un milliard de dollars par an.

De la même façon, l'épothilone (antifongique de la classe des macrolides (Reichenbach and Hofle, 1993)) synthétisé par une myxobactérie *Sorangium cellulosum* a été découvert en 1995. Cette substance naturelle présente une activité antimétabolique *in vitro* sur les lignées cellulaires résistantes aux taxanes (Bollag *et al.*, 1995). Plus de 300 analogues de l'épothilone furent donc synthétisés conduisant à l'ixabepilone (Ixempra[®]). Ayant le même mécanisme d'action que les taxanes, mais sans présenter de phénomènes de résistance, l'ixabepilone a reçu, fin de l'année 2007, l'approbation de la FDA (l'agence américaine du médicament) pour le traitement de cancer du sein métastatique ou localement avancé (Bailly, 2009).

Les alcaloïdes de Vinca issus de *Catharanthus roseus* (pervenue de Madagascar) ont été les premiers agents antimétaboliques, qui empêchent la formation des microtubules. Après extraction et purification, la vinblastine (Velbé[®]) et la vincristine (Onconvin[®]) ont été identifiées comme les substances actives de la pervenue. Différentes synthèses d'analogues ont été effectuées et ont abouti à l'obtention d'autres composés, la vinflunine (Javlor[®]), la vindésine (Eldisine[®]) et la vinorelbine (Navelbine[®]), au profil pharmacologique amélioré. La Navelbine[®] est actuellement le médicament le plus employé de cette catégorie et est indiquée principalement dans le traitement du cancer du sein et du poumon.

D'autres agents s'opposant à la polymérisation des microtubules : c'est le cas de la colchicine, alcaloïde tricyclique, extrait de *Colchicum autumnale*. Ce composé cause d'importants effets indésirables aux doses antimétaboliques. Il est employé, soit en biologie pour effectuer des caryotypes car en inhibant la polymérisation des microtubules, la colchicine bloque la mitose en métaphase, phase à laquelle les chromosomes sont apparents. En thérapeutique humaine, son rôle se limite au traitement de la goutte (surtout les crises aiguës), la fièvre méditerranéenne familiale, la polychondrite chronique atrophiante en première intention ainsi qu'en deuxième intention dans la péricardite aiguë après échec de l'aspirine.

Le cytosquelette d'actine est également la cible de plusieurs molécules d'origine naturelles. Par exemple les toxines du groupe des pecténotoxines, qui sont des polyesters de lactone présentes chez des algues du genre *Dinophysis*, induisent le coiffage des filaments d'actine et la séquestration des monomères d'actine (Espina and Rubiolo, 2008).

Les cytotoxines latrunculines A et B, isolées d'une éponge *Latrunculia magnifica*, sont de puissants inhibiteurs de la formation des filaments d'actine (Spector *et al.*, 1983; Yarmola *et al.*, 2000). Les latrunculines séquestrent l'actine monomérique, en mimant des protéines telles que les β thymosines. Ces molécules inhibent la polymérisation des monomères d'actine, et induisent la dépolymérisation de l'actine filamenteuse (Coue *et al.*, 1987; Spector *et al.*, 1999; Yarmola *et al.*, 2000), et forment des complexes ternaires avec la profiline ou la β thymosine, *in vitro* (Hertzog *et al.*, 2002). Se sont des toxines connues pour interagir avec le site ATP de l'actine monomérique (Allingham *et al.*, 2006; Yarmola *et al.*, 2000).

Différentes classes de produits naturels ciblent l'extrémité barbée du filament à la place du site de liaison de l'ATP (Silvestre and Tosti, 2010). Les plus connus, les cytochalasines, des toxines fongiques extraites de *Helminthosporium dermatioideum*. Ces molécules bloquent la polymérisation d'actine en se fixant sur l'extrémité barbée, avec comme conséquence, une dépolymérisation des filaments d'actine (MacLean-Fletcher and Pollard, 1980).

Le swinholide A, macrolide isolé de l'éponge marine *Theonella swinhoei* (Allingham *et al.*, 2006; Kobayashi *et al.*, 1990), le mycalolide B (Hori *et al.*, 1993; Saito *et al.*, 1994), extrait de l'éponge marine *Mycale sp.*, induisent une dépolymérisation des filaments d'actine, probablement en raison de la séquestration des dimères d'actine au cours de la phase de nucléation préalable à la croissance du filament.

Le jasplakinolide extrait de l'éponge marine *Jaspis johnstoni*, est à la fois un fongicide et un antiprolifératif. Ce peptide induit la polymérisation de l'actine, et augmente le taux de nucléation en s'intercalant tous les trois monomères d'actine (Bubb *et al.*, 1994; Bubb *et al.*, 2000). Cette molécule se lie aux filaments d'actine en compétition avec la phalloïdine, mais malgré cette affinité similaire pour les filaments d'actine, le jasplakinolide semble stabiliser les filaments plus efficacement. Il est capable de pénétrer dans les cellules, ce qui représente ainsi un outil extrêmement utile pour étudier les processus dépendants de l'actine dans les cellules (Silvestre and Tosti, 2010).

La narciclasine, un alcaloïde extrait de plantes du genre *Narcissus* (Ceriotti, 1967) désorganise le cytosquelette d'actine de manière RhoA-dépendante (Lefranc *et al.*, 2009). Les auteurs ont montré que l'utilisation de la coenzyme C3, un inhibiteur de la RhoA GTPase, bloque l'effet de la narciclasine le cytosquelette d'actine (Lefranc *et al.*, 2009). Tout comme la narciclasine, la lycorine premier alcaloïde à avoir été extrait des plantes de la famille des Amaryllidaceae en 1877 (Kornienko and Evidente, 2008) désorganise le cytosquelette d'actine, ce qui résulte en une diminution de la prolifération et de la migration cellulaire (Lamoral-Theys *et al.*, 2009). Le *National Cancer Institute* (NCI, Bethesda, USA) a réalisé un nombre important d'études précliniques avec la narciclasine, mais les résultats décevants ont conduit à l'arrêt du développement de cette molécule vers la clinique. En effet, alors que des bénéfices ont été observés dans certains modèles de cancer, l'effet, au mieux modeste, s'accompagnait d'une toxicité sévère (Van *et al.*, 2013).

Les structures chimiques de quelques molécules citées au-dessus sont présentées en annexe 2.

II. Cucurbitacines

II.1 Plante *Citrillus Colocynthis*: Origine et Usages

La famille des Cucurbitaceae est l'une des plus diverses parmi les plantes alimentaires (Hussain *et al.*, 2014), comportant les courges, les citrouilles, les melons, les concombres, les pastèques... Les plantes de cette famille sont généralement tolérantes à la sécheresse, mais sensibles au gel.

Notre étude s'est portée sur l'espèce *Citrillus colocynthis*, connue pour ses vertus dans la médecine traditionnelle. Elle porte plusieurs noms vernaculaires : Coloquinte en français, Colocynth et Bitter Apple en anglais (Hussain *et al.*, 2014). Originaires des sols arides, cette plante est répandue dans le Sahara, la région méditerranéenne, le désert d'Arabie, le Pakistan, et l'Inde (Al-Ghaithi *et al.*, 2004; Hussain *et al.*, 2014; Marzouk *et al.*, 2011). Le fruit a été introduit par les Arabes au moyen âge en Espagne et à Chypre (Abdel-Hassan *et al.*, 2000; Bellakhdar *et al.*, 1991). Sur le plan botanique, cette espèce se distingue par son fruit sphérique, d'une couleur verte tachetée ou marbrée qui devient jaune à maturité ; la pulpe blanchâtre contient de très nombreuses graines brunes et qui sont extrêmement amères (figure 18). Elle se situe à la transition entre les espèces alimentaires et les espèces toxiques. Une

consommation de ces fruits amers peut entraîner des intoxications graves, voir des décès chez les ovins et bovins (Metcalf *et al.*, 1980).



Figure 18 : *Citrillus colocynthis* (L.) Schrad

Citrillus colocynthis a une riche histoire comme plante médicinale et comme source d'huile précieuse. Les différentes parties de cette espèce sont utilisées en médecine traditionnelle en fonction de leur mode de préparation (décoction, pulvérisation, macération des graines), contre les hémorroïdes en application locale des graines pulvérisées, l'ictère, l'ascite, le rhumatisme, les aménorrhées, et les désordres gastro-intestinaux (dysenteries, constipation) (Hussain *et al.*, 2014; Parveen *et al.*, 2007). Plusieurs études ethnobotaniques et pharmacologiques ont rapporté l'utilisation de cette plante pour le traitement du diabète (Abdel-Hassan *et al.*, 2000; Benariba *et al.*, 2013c; Huseini *et al.*, 2009; Jouad *et al.*, 2001; Nmila *et al.*, 2000; Tahraoui *et al.*, 2007; Ziyat *et al.*, 1997). Actuellement, « Colocynthis[®] », un médicament homéopathique élaboré à partir des extraits de coloquinte a été mis sur le marché par les laboratoires pharmaceutiques (Boiron, Waleda,...) et indiqué dans les coliques hépatiques ou néphrétiques du nourrisson. Pour ces préparations, la pulpe du fruit desséché est utilisée pour en extraire un « principe actif ».

Sur le plan phytochimique, le fruit de coloquinte renferme plusieurs métabolites : des flavonoïdes, des tanins, des saponosides, des alcaloïdes, et des cucurbitacines (Benariba *et al.*, 2013b; Darwish-Sayed *et al.*, 1974; Konopa *et al.*, 1974; Nayab *et al.*, 2006; Seger *et al.*, 2005). Ces dernières sont très abondantes dans cette espèce. Plusieurs études ont montré que l'huile extraite des graines de cette plante contiendrait des acides gras saturés comme les acides myristique, palmitique et stéarique, mais aussi, des acides gras insaturés essentiellement l'acide linoléique et l'acide oléique (Nehdi *et al.*, 2013; Sebbagh *et al.*, 2009).

II.2 Cucurbitacines

II.2.1 Généralités

Les Cucurbitaceae sont reconnues comme la source principale des cucurbitacines. Ces composés et leurs dérivés se trouvent également sous forme glycosylée ou non glycosylée (aglycane) dans plusieurs autres familles végétales : Brassicaceae, Scrophulariaceae, Begoniaceae, Cruciferae, Elaeocarpaceae, Datisceae, Desfontainiaceae, Polemoniaceae, Primulaceae, Rubiaceae, Scrofulariaceae, Sterculiaceae, Rosaceae et Thymelaeaceae. Aussi, elles ont été découvertes dans des champignons et des mollusques marins (Chen *et al.*, 2005; Fujimoto *et al.*, 1987).

Ces substances ont été isolées pour la première fois en 1831 à partir d'une espèce végétale *Ecballium elaterium* (L.) (Concombre d'âne) de la famille des Cucurbitaceae par le Docteur Achille Richard, médecin et botaniste Français. Depuis lors, plusieurs cucurbitacines et plus d'une centaine de leurs dérivés ont été identifiés (Chen *et al.*, 2012). Généralement, ces substances sont réparties dans tous les organes de la plante mais sont particulièrement localisées dans les racines fraîches, les graines et le suc des fruits. A l'exception des dérivés glycosidiques des cucurbitacines, ces substances présentent un goût très amer (Hussain *et al.*, 2014), ce qui constitue pour la plante, un moyen de défense efficace contre plusieurs herbivores (Metcalf *et al.*, 1980).

Les cucurbitacines sont des substances très toxiques et ce potentiel a été découvert pour la première fois en 1932, puis, leurs activités biologiques ont été reconnues dans les années 1960 (Chen *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2012; Gry *et al.*, 2006). En effet, de nombreuses études ont révélé un large éventail de propriétés biologiques exercées par ces substances, comme des activités anti-tumorales, anti-inflammatoires, anti-hépatotoxiques, antivirales et insecticides capables d'antagoniser les hormones stéroïdiennes des insectes (Almeida *et al.*,

1989; Chen *et al.*, 2005; Dinan *et al.*, 1997b; Escandell *et al.*, 2007a; Jayaprakasam *et al.*, 2003; Peters *et al.*, 2003; Recio *et al.*, 2004; Ren and Hong, 1986; Siqueira, Jr. *et al.*, 2007). Nous reviendrons sur ces activités plus en détails dans les paragraphes suivants.

II.2.2 Structure des cucurbitacines

Appartenant aux groupes des triterpénoïdes tétracycliques en C30 ou C32, les cucurbitacines comportent de 7 à 9 atomes d'oxygène et peuvent posséder plusieurs groupes méthyles et souvent un groupe acétyle. Leur structure de base comporte le squelette cucurbitane tétracyclique : le 19- (10→9β)-abeo-10α-lanost-5-ène aussi connu sous le nom de 9β-méthyl-19-norlanosta-5-ène (figure 19). Les cucurbitacines diffèrent des stéroïdes par la présence d'un groupement méthyle en C9 au lieu de C10 (Chen *et al.*, 2012).

Les cucurbitacines sont réparties en douze catégories selon leurs caractéristiques structurales et nommées dans un ordre alphabétique de A à T, la dernière dans l'alphabet, étant attribué à la dernière catégorie isolée (Chen *et al.*, 2005; Gry *et al.*, 2006).

Toutes les cucurbitacines identifiées à ce jour possèdent une double liaison entre C5 et C6. Elles diffèrent entre elles par la présence d'une double liaison en C1 et/ou C23, un groupement hydroxyle en C2, C3, C9, C16, C20, C4 et/ou C25, une fonction cétone (C=O) en C2, C3, C11 et/ou C22 et par l'acétylation du groupe fonctionnel hydroxyle en C26. En plus, les cucurbitacines glycosylées présentent un résidu glycosydique (D-glucose ou L-rhamnose) au niveau C2 ou C3 (Abbas *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2005; Greige-Gerges *et al.*, 2007a; Greige-Gerges *et al.*, 2007b; Gry *et al.*, 2006; Saade *et al.*, 2009).

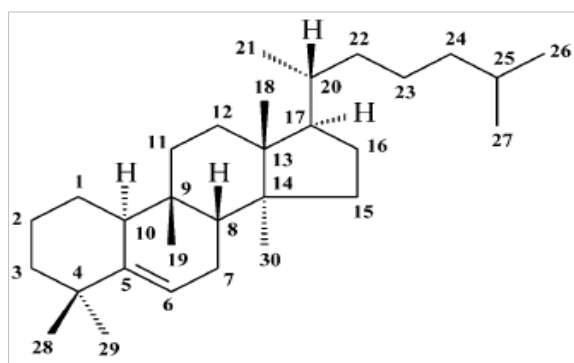


Figure 19 : Structure du squelette de base des cucurbitacines - Cucurbitane triterpénoïque tétracyclique (Chen *et al.*, 2012).

II.2.3 Propriétés physico-chimiques

À température ambiante, les cucurbitacines sont généralement des substances cristallines. Ces dernières sont, pour la plupart, solubles dans le chloroforme, le benzène, l'acétate d'éthyle, le méthanol et l'éthanol, mais à l'exception des dérivés β -D glucosides des cucurbitacines, elles sont très peu solubles dans l'eau. Ces composés ont généralement des maxima d'absorption dans la région ultraviolette entre 228 et 238 nm. Les positions chimiquement réactives des cucurbitacines sont les nombreux groupes cétones *et* alcools présents (Gry *et al.*, 2006).

II.2.4 Biosynthèse des cucurbitacines

Dans les plantes, les cucurbitacines sont synthétisées à partir du squalène-2,3-époxyde. Des travaux ont montré que de la présence d'une enzyme, la cucurbitadiénol synthétase dans les Cucurbitaceae est capable de convertir directement la squalène-2,3-époxyde en cucurbita-5,24-diènol (Balliano *et al.*, 1983; Shibuya *et al.*, 2004).

Les premières cucurbitacines synthétisés dans les plantes sont les cucurbitacines E et B qui possèdent une fonction acétyle en C25. Les autres cucurbitacines sont produites à travers diverses réactions : hydrogénation catalysée par la cucurbitacine Δ 23-réductase, désacétylation catalysée par les acétylestérases, hydroxylation, déshydrogénation et isomérisation (Dirr *et al.*, 1986; Gry *et al.*, 2006; Schabort *et al.*, 1968; Schabort and Potgieter, 1968). Ces réactions conduisent à des espèces différentes de cucurbitacines qui diffèrent l'une de l'autre par leur hydroxylation en C2, 3, 19, 24, la présence d'une double liaison entre C1 et C2, ou entre C23 et C24, l'acétylation du groupe hydroxy en C25 et la présence d'une fonction cétone en C3 (Chen *et al.*, 2005) (figure 20).

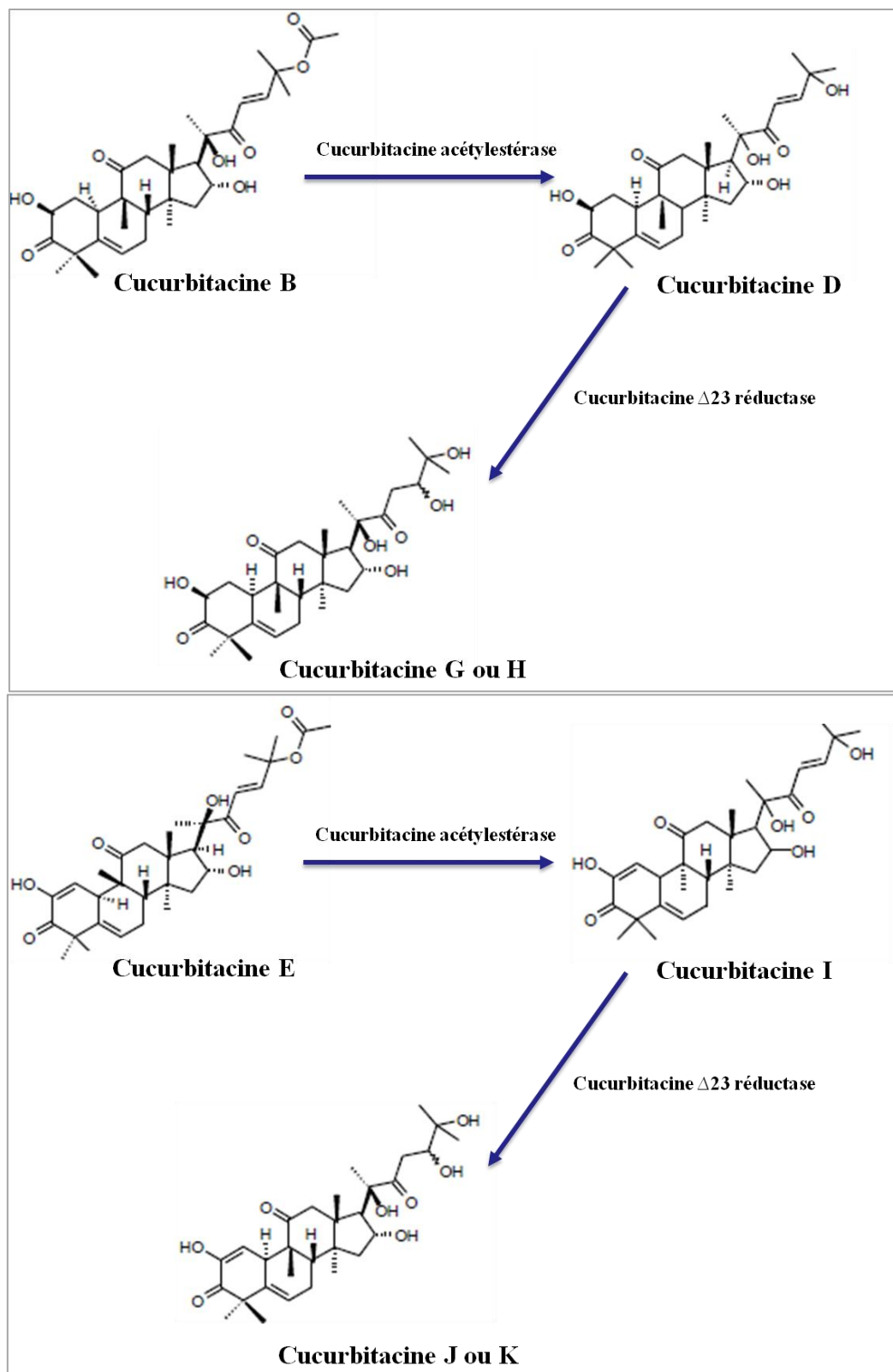


Figure 20 : Schéma représentatif de biosynthèse de cucurbitacines catalysée par les enzymes acétyl estérases et $\Delta 23$ réductases (Gry *et al.*, 2006).

II.2.5 Propriétés des cucurbitacines comme candidats médicaments pour lutter contre le cancer

II.2.5.1 *Prolifération cellulaire*

L'effet antiprolifératif, la principale activité biologique des cucurbitacines, a été découvert il ya plus de 50 ans avec les cucurbitacines D et E (elatericine A et B, respectivement) (Chen *et al.*, 2012). En effet, ces dernières ont été identifiées pour inhiber la prolifération des cellules cancéreuses *in vitro* et chez les souris *in vivo* (Gallily *et al.*, 1962; Gitter *et al.*, 1961; Shohat *et al.*, 1962). La plupart des médicaments de chimiothérapie actuellement prescrits agissent en inhibant la prolifération des cellules cancéreuses. Les cucurbitacines ont également cet effet sur de nombreuses lignées de cellules cancéreuses de manière dose-dépendante (Chen *et al.*, 2012).

Les cucurbitacines A, B, D, E, I, R (figure 21) ont des effets cytotoxiques sur plusieurs lignées de cellules cancéreuses avec une concentration inhibitrice médiane (CI₅₀) en dessous de 1 µM (Chen *et al.*, 2012). La cucurbitacine B, par exemple, est cytotoxique à une CI₅₀ de 7 nM sur la leucémie aigüe de type lymphoblastique (Haritunians *et al.*, 2008). Duncan *et al.* ont déterminé que la cucurbitacine E inhibe la prolifération de plus de cinquante types cellulaires de carcinome (y compris la leucémie, le cancer du poumon, cancer du côlon, les tumeurs du système nerveux central, le cancer de l'ovaire, le cancer du rein, et le mélanome) après 48 heures d'exposition avec une gamme de CI₅₀ comprise entre 13 et 295 nM (Duncan *et al.*, 1996). Les cucurbitacines F, O, P, Q et leurs dérivés sont connues pour avoir des activités plus faibles que les autres cucurbitacines (Chen *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2010). En comparant différentes cucurbitacines, Duncan *et al.* ont montré que leur effet antiprolifératif sur des cellules de carcinome prostatique PC3, suit une relation structure-activité et est étroitement lié à leur capacité à perturber le réseau des filaments d'actine (tableau 2) (Duncan *et al.*, 1996). L'hydroxylation du C25 des cucurbitacines I et D et du C3 de la cucurbitacine Q, réduisent mais n'éliminent pas leurs activités antiprolifératives, alors que, la présence d'un groupement hydroxyle en C23 observé sur les cucurbitacines K et P et la réduction de la double liaison en C22 suppriment totalement leurs activités antiprolifératives et en parallèle leurs effets sur les filaments d'actine (tableau 2). Par contre, la présence du groupement acétoxy en C25 des cucurbitacines B et E rend leur effet cytotoxique envers les lignées cellulaires leucémiques beaucoup plus important que celui de la cucurbitacine I qui possède un groupe hydroxyle sur cette position (Nakashima *et al.*, 2010). De plus, les dérivés des

cucurbitacines d'une même catégorie ne présentent pas les mêmes activités. Par exemple, la cucurbitacine D, a une toxicité significative contre plusieurs lignées de cellules cancéreuses tandis que son dérivé le 2-O-glucoside n'a pas démontré une activité antiproliférative sur ces mêmes lignées (Frei *et al.*, 1998).

Au niveau cellulaire, les cucurbitacines entraînent des altérations drastiques de la morphologie comme l'apparition de protrusions sous-membranaires ou « blebbing » après quelques minutes d'exposition, suivi d'un arrondissement de la cellule. Certains des changements morphologiques pourraient être expliqués par l'altération du cytosquelette d'actine (Lee *et al.*, 2010). De nombreuses études ont montré que les cucurbitacines induisent une agrégation de l'actine dans différentes lignées cellulaires de cancer humain (Boykin *et al.*, 2011; Duncan *et al.*, 1996; Duncan and Duncan, 1997; Haritunians *et al.*, 2008; Kausar *et al.*, 2013; Knecht *et al.*, 2010; Wakimoto *et al.*, 2008; Yin *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2013a). Mais, contrairement aux alcaloïdes de la pervenche et les taxanes, ces substances n'affectent pas le réseau de microtubules (Duncan *et al.*, 1996; Haritunians *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2010).

Tableau 2 : Relation type-activité des cucurbitacines (Duncan *et al.*, 1996).

Cucurbitacines	Prolifération des cellules de carcinome prostatique PC3 CI ₅₀ (nM)	Perturbation des filaments d'actine (nM)
Cucurbitacine E	50	20
Cucurbitacine B	35	18
Cucurbitacine I	223	55
Cucurbitacine D	367	100
Cucurbitacine Q	455	100
Cucurbitacine K	> 1000	> 1000
Cucurbitacine P	> 1000	> 1000

La CI₅₀ est la concentration responsable d'une diminution de 50% de la prolifération cellulaire. Les CI₅₀ apportées ici concernent des cellules de carcinome prostatique PC3 après 24 heures d'exposition à différentes cucurbitacines. La perturbation des filaments d'actine se réfère à la concentration des cucurbitacines, pour la quelle le réseau des filaments a été modifié de manière détectable après 24 h d'exposition (Duncan *et al.*, 1996).

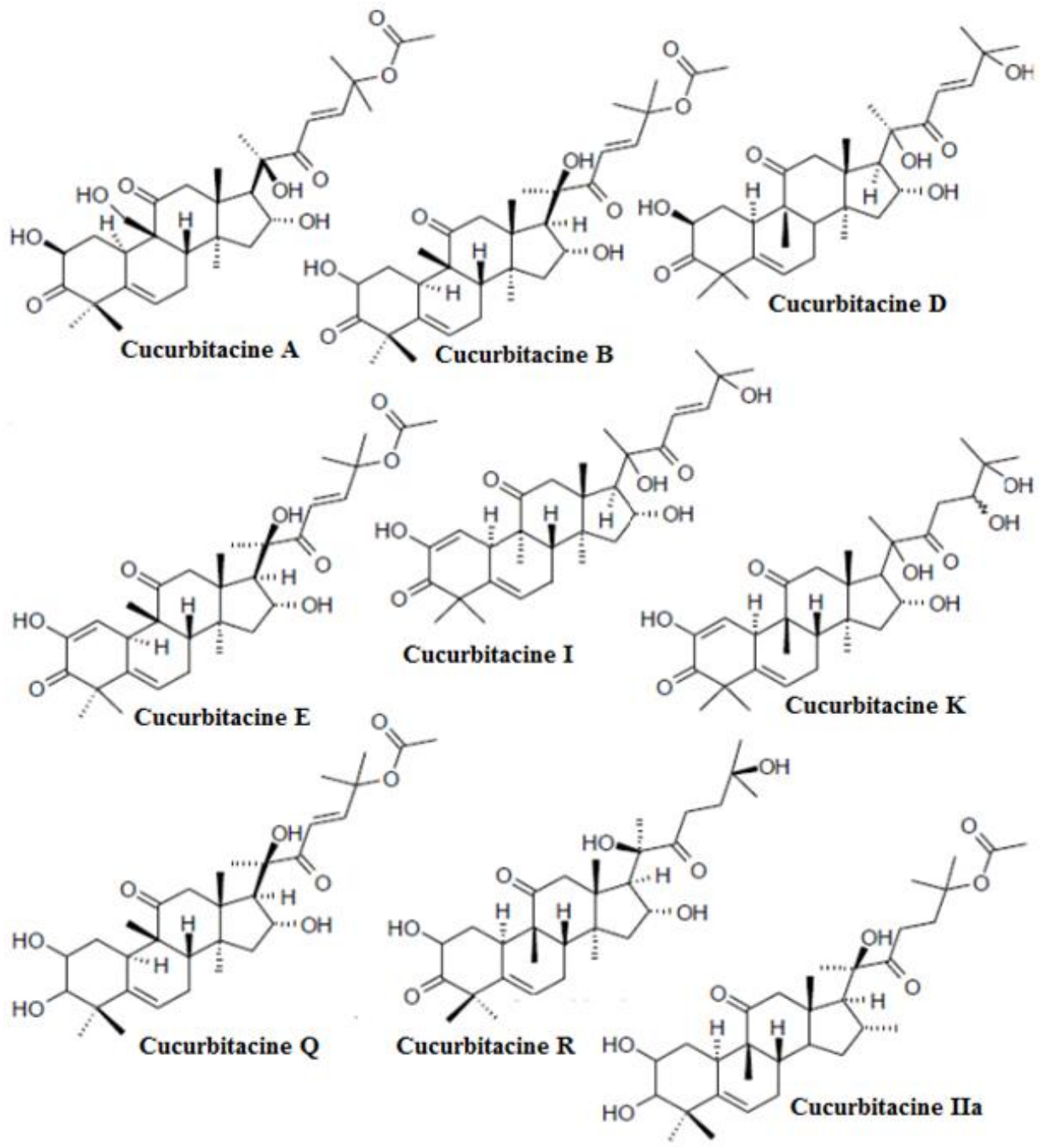


Figure 21 : Structures chimiques des cucurbitacines les plus étudiées.

II.2.5.2 Cycle cellulaire et apoptose

La multinucléation est un autre changement morphologique observé dans les cellules après une longue durée d'exposition aux cucurbitacines, ce qui laisse supposer l'existence de défaut de cytokinèse, mais pas de la caryocinèse. Ceci peut être lié à l'altération du cytosquelette d'actine qui est impliqué dans la cytokinèse, alors que les microtubules sont impliqués dans le processus de caryocinèse (Duncan *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 2010). Sur ces observations, de nombreuses études ont montré que les cucurbitacines (B, I, E) induisent un arrêt du cycle cellulaire, avec un contenu en ADN de type 4N G2/M (phase de croissance, de préparation à la mitose et de division cellulaire) (Chan *et al.*, 2010; Guo *et al.*, 2014a; Hsu *et al.*, 2014; Lan *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2008a; Liu *et al.*, 2008b; Shi *et al.*, 2006; Tannin-Spitz *et al.*, 2007a; Tannin-Spitz *et al.*, 2007b; Thoennissen *et al.*, 2009; Yin *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2013a), mais aussi en phase S (phase de réplication de l'ADN) des cellules leucémiques HL-60 et U937 et de carcinome hépatocellulaire humain CHC (Chan *et al.*, 2010; Haritunians *et al.*, 2008).

Cependant, Tannin-Spitz *et al.* ont montré que le mélange des cucurbitacines B et E glycosylées (1:1, 20 μ M) induisent un arrêt du cycle cellulaire avec un contenu en ADN de type 4N G2/M par la réduction du niveau d'expression des protéines p34^{cdc2} et cycline B1 dont l'accumulation est essentielle dans la transition de cette phase du cycle cellulaire (Tannin-Spitz *et al.*, 2007b). De même pour les formes non glycosylées telles que les cucurbitacines B et I, qui induisent un arrêt du cycle cellulaire avec un contenu en ADN de type 4N G2/M et l'apoptose des cellules cancéreuses du pancréas et du colon, respectivement, en inhibant les cyclines A et B1 (Kim *et al.*, 2014a; Thoennissen *et al.*, 2009). D'autres études ont pointé l'augmentation intracellulaire des espèces réactive de l'oxygène (ERO) des cellules traitées par la cucurbitacine B, à l'origine de l'arrêt du cycle cellulaire. En effet, Yasuda *et al.* ont constaté que cette molécule, à de très faible concentration (nM) agit par une voie ERO-dépendante via un mécanisme inconnu (Yasuda *et al.*, 2010). Récemment, Guo *et al.* ont montré que cette molécule provoque une lésion de l'ADN médiée par l'augmentation intracellulaire des ERO, conduisant à l'activation de la protéine ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated qui répare les cassures double-brins dans l'ADN) et de ses substrats, qui activent la branche de protéines p53 - 14-3-3- δ qui vont ensuite induire l'arrêt du cycle cellulaire avec un contenu en ADN de type 4N G2/M (Guo *et al.*, 2014a). La cucurbitacine E, quand à elle, induit l'arrêt du cycle des cellules du gliome malin via la régulation positive de GADD45 γ (Growth arrest and DNA-damage-inducible) en aval de la protéine p53 et l'inhibition du

complexe cycline B1 /cdc2 (Hsu *et al.*, 2014). Par ailleurs, d'après les travaux de Chan *et al.* l'arrêt en phase S du cycle cellulaire peut être dû à la réduction des niveaux d'expression de la cycline D1/Cdk1 (Chan *et al.*, 2010). Ce dérèglement du cycle cellulaire induit par les cucurbitacines est accompagné d'une apoptose médiée par l'activation des protéines p53 et p21¹, l'inhibition des protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-xL, et s'ensuit une activation en cascade des caspases (Liu *et al.*, 2008a; Thoennissen *et al.*, 2009; Yasuda *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2010).

II.2.5.3 Mécanisme d'action

Par quel mécanisme moléculaire les cucurbitacines exercent-elles leur effet ? Est-ce que les différentes structures partagent le même mécanisme d'action ? De très nombreuses études entreprises ces dernières années tentent d'élucider le mécanisme d'action des cucurbitacines sur la prolifération et le cytosquelette d'actine mais les résultats restent controversés.

II.2.5.3.1 Impact des cucurbitacines sur la signalisation cellulaire

Différentes voies de signalisation oncogénique sont impliquées dans la prolifération des cellules cancéreuses et leur survie semblent impactées par les cucurbitacines. Après les travaux de Blaskovich *et al.* qui ont initialement identifié la cucurbitacine I (JSI-124) inhibant les voies JAK2² et STAT3³ (Blaskovich *et al.*, 2003), plusieurs d'autres études sont venues confirmer que cette molécule inhibait la phosphorylation de ces deux protéines dans diverses lignées cancéreuses (Banerjee *et al.*, 2010; Graness *et al.*, 2006; Shi *et al.*, 2006; Su *et al.*, 2008; van Kester *et al.*, 2008; Yuan *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2012). Récemment, une étude a révélé de façon inattendue, que la cucurbitacine I inhibe la motilité des cellules du cancer du

¹ La protéine p53 est un facteur de transcription dont le rôle est de contrôler l'intégrité du génome avant la réplication de l'ADN. p53 induit l'expression de p21, inhibiteur du cycle cellulaire, mais aussi des gènes proapoptotiques comme Bax et DR5. L'arrêt dans le cycle permet la réparation de l'ADN et la répression de p53. Lorsque les dommages causés à l'ADN sont trop importants, l'activation prolongée de p53 induit l'accumulation des protéines proapoptotiques et déclenche la mort cellulaire (Slee *et al.*, 2004).

² La Janus kinase 2 (JAK2) est une protéine de type tyrosine kinase impliquée dans plusieurs voies de signalisation responsables principalement de la survie et de la prolifération cellulaire. Elle phosphoryle une variété de protéines intracellulaires sur leurs résidus tyrosine. Cette phosphorylation vient attirer d'autres molécules de signalisation (ex. STATs) pour les phosphoryler à leur tour. Ces substrats sont des facteurs de transcription. Ils migreront jusqu'au noyau et moduleront l'expression des gènes cibles. Ces cascades de phosphorylation entraînent ultimement : la prolifération cellulaire (par la voie des MAP3-Ks), l'inhibition de l'apoptose (par la voie des PI3-Ks/AKT) et la croissance cellulaire (par la voie des STAT1 et STAT5).

³ Les protéines STATs (Signal transducers and activators of transcription) sont identifiées comme étant des régulateurs importants de plusieurs fonctions physiologiques telles que la réponse immunitaire, l'inflammation, la prolifération, la différenciation, la survie cellulaire et l'apoptose. Elles possèdent l'unique capacité de transduire des signaux extracellulaires de cytokines (ex. IL-6, interférons ou facteurs de croissance comme platelet-derived growth factor et epidermal growth factor) et de réguler directement la transcription.

sein indépendamment de la voie JAK2/STAT3, mais impliquerait plutôt la rupture de l'équilibre entre RhoA et Rac1 et plus précisément, en inhibant Rac1 via l'activation de RhoA (Lopez-Haber and Kazanietz, 2013). Selon ces auteurs, la cucurbitacine I générerait des ERO intracellulaires qui vont agir directement sur l'activation de RhoA.

La cucurbitacine A agit en inhibant la voie JAK2 mais pas la voie STAT3, alors que la cucurbitacine Q agit, en inhibant l'activation de la voie STAT3 mais pas celle de la voie JAK2. Par contre, les cucurbitacines B et E agissent en inhibant ces deux voies (Liu *et al.*, 2008b; Sun *et al.*, 2005; Thoennissen *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2009), alors que, la cucurbitacine IIa n'inhibe ni la voie JAK2 ni la voie STAT3 (Boykin *et al.*, 2011). Du point de vue chimique, Sun *et al.* ont conclu que les cucurbitacines (pour des concentrations de l'ordre du micromolaire), inhibent ces deux voies en fonction de leur structure (Sun *et al.*, 2005). En effet, l'ajout d'un groupement hydroxyle au niveau C11 sur la cucurbitacine A ne lui permet pas d'inhiber la voie STAT3, alors que la conversion de la fonction cétone en hydroxyle en C3 chez les cucurbitacines Q et IIa la rend incapable d'inhiber l'activation de la voie JAK2. Les cucurbitacines B et E ne possédant pas un groupe hydroxyle en C11 et ayant un groupe hydroxyle en C3 sont capables d'inhiber l'activation des deux voies JAK2 et STAT3. Inopinément, Tannin-Spitz *et al.* ont trouvé une augmentation de la phosphorylation de STAT3 dans des cellules de cancer du sein, traitées par un mélange de cucurbitacines E et B glycosylées (1:1, 20 μ M), ainsi, qu'une diminution de leur prolifération. Or, l'activation constitutive de STAT3 a été observée dans de nombreuses cellules cancéreuses, et elle se traduit généralement par un effet anti-apoptotique et favorisant la prolifération cellulaire (Yu and Jove, 2004). Les auteurs expliquent partiellement leurs résultats contradictoires, en s'appuyant d'une part, sur le fait que l'altération du réseau d'actine inhibe la phosphorylation de PKB⁴ ce qui entraîne l'inhibition de l'expression de la survivine, une protéine appartenant à la famille d'inhibiteur de l'apoptose (Liang *et al.*, 2003), et d'autre part sur le fait que, l'activation de STAT3 peut conduire à l'induction de la p21WAF1⁵ et, par conséquent, inhibe la prolifération cellulaire lors de l'activation de STAT3 par les cucurbitacines glycosylées (Tannin-Spitz *et al.*, 2007a). Toutefois, il a été montré que la cucurbitacine B et son dérivé, le 23,24-dihydrocucurbitacine B peuvent inhiber la croissance des cellules cancéreuses, induire

⁴ PKB : protéine kinase B, plus connu sous le terme Akt1 est une kinase impliquée dans la survie cellulaire, en inhibant l'apoptose. De ce fait, elle est considérée comme un facteur essentiel à l'apparition de nombreux types de cancer.

⁵ Le gène codant pour la protéine WAF1, appelée également p21, est régulé au niveau transcriptionnel par la protéine p53. La surexpression de WAF1 inhibe la croissance cellulaire, probablement par l'inhibition de l'activité des complexes cycline/CDK.

un arrêt du cycle cellulaire et leur apoptose sans affecter l'activité de la protéine STAT3, ce qui peut suggérer un autre mécanisme d'action de ces molécules (Chan *et al.*, 2010; Yasuda *et al.*, 2010).

II.2.5.3.2 Effets des cucurbitacines sur le cytosquelette d'actine

Les cucurbitacines induisent une altération du cytosquelette d'actine, et cet effet semble directement corrélé à leur activité antiproliférative (Chen *et al.*, 2012). Est ce que les cucurbitacines interagissent directement avec l'actine ou indirectement par l'intermédiaire des protéines de liaison d'actine ?

En utilisant de l'actine purifiée et marquée au pyrène, *in vitro*, il a été proposé que la cucurbitacine E inhibe directement la dépolymérisation de l'actine, de façon dose dépendante, sans affecter la polymérisation (Momma *et al.*, 2008; Sorensen *et al.*, 2012). D'après Sorensen *et al.* la cucurbitacine E se distinguerait des autres inhibiteurs comme le jasplakinolide sur l'inhibition de la dépolymérisation de l'actine. En effet, ce dernier inhibe immédiatement la dépolymérisation (et fortement à un ratio 1:1), tandis que, la cucurbitacine E, n'affecterait pas la dépolymérisation de l'actine pendant les deux premières minutes (où une dépolymérisation initiale se produit), suivie par une inhibition de la dépolymérisation. Aussi, il semblerait que la cucurbitacine E inhibe la dépolymérisation de l'actine à des concentrations sous-stœchiométriques (ratio 1:6). Ces observations peuvent suggérer un modèle où la cucurbitacine E se lie à un sous-ensemble de filaments d'actine ou une région spécifique au sein du filament (Sorensen *et al.*, 2012). Ces auteurs proposent également que la cucurbitacine E se lie directement à l'actine. Ainsi, ils ont observé la formation d'une liaison covalente entre la cucurbitacine E et la cystéine 257 de l'actine, *in vitro* (ratio 1:100), en utilisant la spectrométrie de masse. Cette liaison covalente cucurbitacine-actine serait responsable du caractère irréversible des effets de la cucurbitacine E sur les cellules HeLa (Sorensen *et al.*, 2012).

Toutefois, ces faits ne permettent pas d'avoir une vision claire des actions spectaculaires des cucurbitacines sur le cytosquelette d'actine dans la cellule. A la différence des cellules de mammifères, les travaux de Knecht *et al.* ont montré que la cucurbitacine I (1,2 μ M) n'inhibe pas la migration cellulaire de l'amibe *Dictyostelium discoideum*, ni sa morphologie ou son cytosquelette d'actine. En revanche, sous l'effet du jasplakinolide, une molécule qui se lie directement aux filaments d'actine et inhibe leur dépolymérisation sur l'extrémité pointue, des agrégats d'actine se forment chez *Dictyostelium* (Lazaro-Diequez *et*

al., 2008; Lee *et al.*, 1998). *Dictyostelium* est souvent utilisé en tant que modèle pour les « organismes supérieurs », car ce microorganisme contient de nombreuses protéines orthologues des protéines de mammifères. Le fait que cette amibe ne soit pas affectée par la cucurbitacine I, laisse penser que la cible de la cucurbitacine I ne possède pas un homologue proche de *Dictyostelium*. Cela suggère cependant que la cucurbitacine I ne stabilise pas directement l'actine puisque cette protéine est hautement conservée entre le *Dictyostelium* et les cellules de mammifère.

Dans le but de confirmer cette hypothèse, les auteurs ont comparé les effets de la cucurbitacine I et du jasplakinolide sur la dépolymérisation des filaments d'actine *in vitro*. Alors que le jasplakinolide stabilise directement les filaments d'actine *in vitro*, la cucurbitacine I n'agit que faiblement, et seulement à des concentrations élevées sur la dépolymérisation de l'actine marquée au pyrène (aux concentrations nanomolaires qui inhibent la migration des cellules de mélanome B16-F1, la cucurbitacine I n'a aucun effet sur le désassemblage des filaments d'actine *in vitro*) (Knecht *et al.*, 2010). En sachant que l'activité de cucurbitacine I dans les cellules est de plusieurs ordres de grandeur supérieure à cette faible activité *in vitro*, il est plus probable que la cucurbitacine I cible d'autres protéines qui sont impliquées dans la signalisation et la régulation de la dépolymérisation de l'actine. Deux protéines candidates qui jouent un rôle dans la dépolymérisation de l'actine sont la cofiline et la gelsoline, mais, après analyse par spectrométrie de masse de la cofiline ou de la gelsoline purifiées et traitées par la cucurbitacine I, aucune des protéines n'a vu sa masse changée, ce qui laisse penser que le composé ne se lie pas de manière covalente à ces protéines (Knecht *et al.*, 2010).

Pourtant Nakashima *et al.* ont identifié la cofiline comme une cible de la cucurbitacine E dans les lysats cellulaires, en synthétisant la cucurbitacine E biotinylée, et ont montré également, que les cucurbitacines E et I bloquent la phosphorylation de la cofiline de façon dose dépendante (Nakashima *et al.*, 2010). Récemment, Gabrielsen *et al.* ont rapporté que les cucurbitacines interagissent avec les groupements thiols des protéines cibles, comme par exemple la cofiline (Gabrielsen *et al.*, 2013). En plus, la cucurbitacine B a été rapportée former des adduits avec les thiols du N-acétylcystéine (NAC), ou bien les deux sont en concurrence avec les thiols cellulaires ciblés par la cucurbitacine B, conduisant ainsi, à la perte subséquente des effets biologiques de cette molécule (Kausar *et al.*, 2013).

II.2.6 Propriétés anti-inflammatoires des cucurbitacines

De nombreuses études *in vitro* ont montré que les cucurbitacines sont des substances anti-inflammatoires qui inhibent la migration des cellules vers le site de l'inflammation, ainsi que, la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires. En effet, l'administration d'extraits dichlorométhaniques isolés de la racine de *Wilbrandia ebracteata* (Cucurbitaceae) contenant plusieurs types de cucurbitacines inhibe significativement les contractions abdominales chez la souris et l'arthrite chez le rat, qui sont induits par le zymosane, utilisé expérimentalement pour déclencher des réactions inflammatoires (Peters *et al.*, 2003). *In vivo*, l'administration intrapéritonéale du 23,24 dihydrocucurbitacine B réduit le développement de l'œdème de la patte chez la souris, induit par le carragénine. *In vitro*, ce triterpénoïde diminue le taux de la prostaglandine E2 (PGE2) en inhibant sélectivement la cyclo-oxygénase-2 (COX-2), une enzyme pro-inflammatoire (Siqueira, Jr. *et al.*, 2007).

Les cucurbitacines sont aussi de puissants analgésiques. Elles inhibent la libération de l'élastase, une enzyme sécrétée durant l'inflammation par les neutrophiles et qui entraîne la protéolyse du collagène IV et de l'élastine de la matrice extracellulaire du cartilage. La cucurbitacine R et la 23,24-dihydrocucurbitacine B présentent presque les mêmes caractéristiques de traitement que l'ibuprofène, anti-inflammatoire non stéroïdien utilisé pour soulager les symptômes de l'arthrite et comme analgésique (Escandell *et al.*, 2006). Une étude réalisée avec la 23,24-dihydrocucurbitacine B a montré qu'elle inhibe à 100% la production de TNF- α et de l'IL-1 β dans les lymphocytes humains, tandis que dans les macrophages de murins, la production de ces deux cytokines n'est pas affectée (Escandell *et al.*, 2006; Escandell *et al.*, 2007b). Il a été montré que la cucurbitacine R réduit la prolifération des lymphocytes T humains stimulés par la phytohémagglutinine A (utilisée comme mitogène pour déclencher la division cellulaire des lymphocytes T) et la production de cytokines comme IL-2, IL-4, IL-10 et l'interféron gamma (IFN γ). La réponse inflammatoire induite à la fois par l'oxazolone et dinitrofluorobenzène a été réduite, mais aussi contre l'œdème induit dans les pattes de souris, avec réduction de la production d'IL-1 β , IL-4, et du TNF- α dans la patte enflammée (Escandell *et al.*, 2010). Les cucurbitacines B, D, E et I isolées des fruits de la *Cucurbita andreana* (Cucurbitaceae) inhibent à 100 $\mu\text{g/mL}$ l'activité de la COX-2 mais pas celle de la COX-1. Cette inhibition est de l'ordre de 32, 29, 35 et 27% pour les cucurbitacines B, D, E et I, respectivement. L'inhibition de la COX-2 augmente en présence du groupement acétyle-C28 qui est présent dans les cucurbitacines B et E et absent dans les cucurbitacines D et I (Jayaprakasam *et al.*, 2003).

II.2.7 Autres activités des cucurbitacines

La recherche sur les effets hépatoprotecteurs des cucurbitacines a été principalement menée par des chercheurs chinois, inspirés par l'expérience accumulée par la médecine traditionnelle (Chen *et al.*, 2012). Les formes B et E isolées ou mélangées, protègent les rats d'une atteinte hépatique aiguë induite par le tétrachlorométhane (CCl₄), en réduisant par la dégénérescence et la nécrose des hépatocytes (Yang *et al.*, 2005). La cucurbitacine B inhibe également l'apoptose induite par le peroxyde d'oxygène H₂O₂ en culture primaire d'hépatocytes de rats nouveau-nés (Cao *et al.*, 2005). Nous n'avons pas retrouvé de nouvelles publications dans ce domaine depuis 2005.

Les cucurbitacines D et la 23,24-dihydrocucurbitacine D présentent une cytotoxicité contre les cellules cancéreuses du mélanome en inhibant la synthèse de mélanine par inhibition de l'activité de la tyrosinase, enzyme clé dans la biosynthèse de la mélanine (Oh *et al.*, 2002).

Les cucurbitacines B et D sont des antagonistes des hormones stéroïdiennes des insectes en agissant sur le récepteur de l'ecdysone (EcR), en empêchant la fixation de la 20-hydroxy-ecdysone, hormone stéroïde la plus active qui intervient notamment dans le processus de la mue des arthropodes et dans le contrôle de leur reproduction (Dinan *et al.*, 1997a). L'étude structure/activité souligne l'importance du groupement fonctionnel Δ^{23-22} -oxo dans la chaîne latérale des cucurbitacines dans cet antagonisme (Dinan *et al.*, 1997a). L'interaction avec le récepteur de l'ecdysone pourraient expliquer en grande partie les propriétés insecticide des cucurbitacines (Shaw and Hummel, 2003). L'absence de ce type de récepteur dans les cellules de mammifères, exclut la possibilité d'être une cible moléculaire des cucurbitacines. Or, l'interaction des cucurbitacines avec les récepteurs des oxystérols⁶ (liver X receptors, LXR), ou des récepteurs des stéroïdes (steroid receptors, SR) dans les cellules de mammifères, justifie d'autres études pour une compréhension plus complète de leurs effets (Chen *et al.*, 2012).

La figure 22 résume les cibles potentielles des cucurbitacines (Chen *et al.*, 2012).

⁶ Les oxystérols sont des dérivés oxydés du cholestérol, possédant comme lui 27 atomes de carbone et un noyau stérol commun. L'oxydation peut avoir lieu sur le noyau stérol et plus particulièrement sur les positions 4, 5, 6 et 7 qui sont les plus sensibles à l'oxydation. Les oxydations peuvent également se produire sur les positions 24, 25 et 27 de la chaîne latérale ce qui conduit à une grande diversité de molécules créant ainsi la famille des oxystérols.

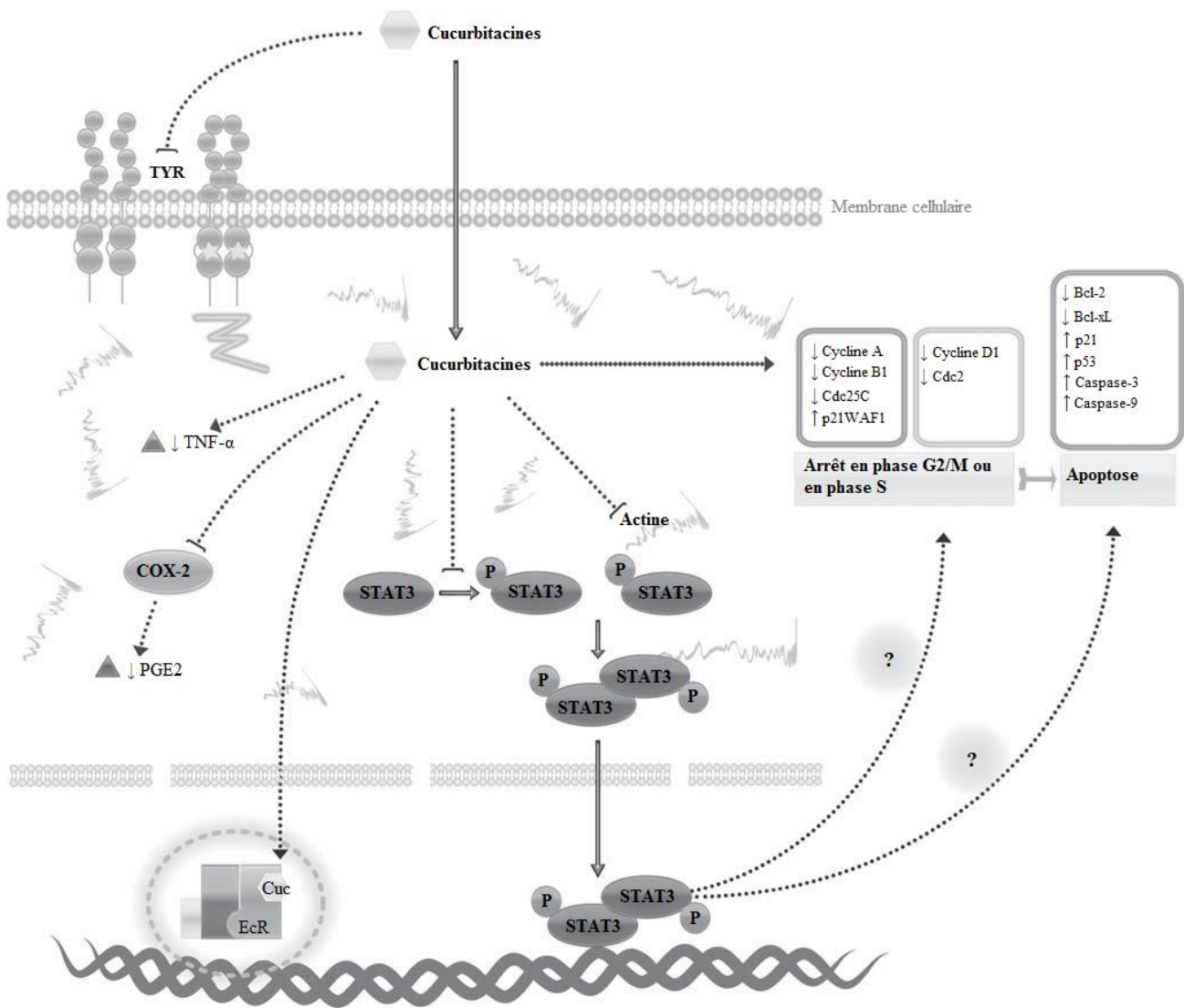


Figure 22 : Cibles moléculaires potentielles des cucurbitacines (Chen *et al.*, 2012)

Le cytosquelette d'actine et la protéine STAT3 sont les principales cibles moléculaires des cucurbitacines. Les cucurbitacines induisent l'agrégation des filaments d'actine, entraînant des changements dans la morphologie et la fonction des cellules; elles inhibent également la phosphorylation de STAT3, principalement, en affectant la voie JAK2 / STAT3. Plusieurs études ont montré que les cucurbitacines peuvent induire l'arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M ou en phase S dans différentes lignées cellulaires par le contrôle de la cycline A, cycline B1, cdc25C, p21WAF1, et la cycline D1, cdc2, respectivement, ce qui pourrait conduire à l'apoptose médiée par p53, p21, les protéines Bcl-2, Bcl-xL, caspase-3, caspase-9. Aussi, ces molécules ont montré un effet inhibiteur sur l'enzyme pro-inflammatoire COX-2. COX-2, cyclo-oxygénase-2; EcR, récepteur de l'ecdysone; NO, oxyde nitrique; PGE2, prostaglandine E2; TYR, tyrosinase.

OBJECTIFS DE MES TRAVAUX DE THESE

CONTEXTE DE L'ETUDE

Au cours de ce travail, on s'est intéressé à l'espèce *Citrillus colocynthis*, utilisée dans la médecine traditionnelle pour le traitement de diverses affections. Les graines de cette espèce renferment environ 17 à 27 % d'huile riche en acides gras insaturés (Nehdi *et al.*, 2013; Sebbagh *et al.*, 2009).

Dans le cadre d'une étude préliminaire, nous avons évalué l'impact d'extraits huileux de *C. colocynthis* (huile de coloquinte, HC) sur différents aspects phénotypiques de cultures de cellules HeLa à différentes dilutions. Cet essai consiste à traiter les cellules par des quantités variables d'HC puis à réaliser un triple marquage à la β -tubuline, des filaments d'actine et de l'ADN suivi d'une observation en microscopie à fluorescence. Le marquage de la β -tubuline permet de visualiser l'organisation du réseau microtubulaire dans les cellules en interphase et du fuseau mitotique dans les cellules en mitose. Le marquage de l'actine permet d'observer l'architecture des filaments d'actine qui contribuent à la détermination de la morphologie et participent à la mobilité cellulaire. Le marquage de l'ADN permet l'observation de l'aspect et de la morphologie du noyau. Ce marquage multi-paramétrique rend aussi possible l'évaluation de la densité et de la morphologie cellulaires, et définit une partie de l'impact phénotypique induit par l'extrait huileux de *C. colocynthis*.

L'extrait huileux fourni par le laboratoire LAPRONA, a été obtenu par une extraction au Soxhlet (6 h d'extraction) sur une matrice solide qui est un broyat de graines de coloquinte, en utilisant l'éther de pétrole comme solvant. L'éther de pétrole ayant une température d'ébullition entre 40 et 60°C, minimisera les traces résiduelles dans l'huile extraite. Le rendement d'extraction est d'environ 17 % (estimé par le rapport de masses de l'huile extraite et de la matière végétale séchée) (Sebbagh *et al.*, 2009).

Les premières observations en microscopie de phase des cellules HeLa traitées par l'HC à une dilution de (1/10 000) montrent des altérations majeures de la morphologie de ces cellules. Alors que les cellules non traitées forment un tapis homogène et bien étalé, les cellules traitées à l'HC apparaissent rétractées, de forme plus au moins arrondies et souvent plus petites et plus granuleuses après 24 h (figure annexe 2A). Les modifications morphologiques engendrées par l'HC nous ont amené à considérer l'aspect du cytosquelette car c'est un élément clé dans la régulation de la morphologie cellulaire. Les images de microscopie à fluorescence présentées dans la figure annexe 2A, montrent une agrégation

massive de l'actine dans les cellules HeLa exposées à l'HC après 24 h. En effet, contrairement aux cellules témoins où on observe une forte densité de fibre de stress d'actine, les cellules traitées par l'HC (1/10 000) montrent une désorganisation des filaments d'actine marqués par la formation de larges agrégats qui entourent le noyau. Cependant, le réseau des microtubules n'est pas affecté dans ces conditions (figure annexe 2B). De manière surprenante, plusieurs noyaux apparaissent dans ces cellules à très haute dilution (1/100 000) après 24 h d'incubation ce qui laisse supposer que l'HC inhibe la cytokinèse mais pas la caryocinèse.

Nous avons complété ces observations par l'analyse du cycle cellulaire par cytométrie de flux. Les résultats sont présentés sur la figure annexe 2C. Après 24 h d'incubation, en présence d'HC, nous observons une accumulation des cellules HeLa en G2/M : de 16 % pour les cellules témoins à 40 % en présence d'HC au 1/10 000, concomitante à une diminution du nombre des cellules en phase G0/G1 pour les cellules traitées. Ces observations indiquent que l'HC contient une ou des substances bioactives à fort impact sur le cytosquelette d'actine.

Nous avons donc, entrepris la recherche et l'identification de ces substances. Une première analyse de la composition chimique de l'HC par RMN du proton sans séparation préalable s'est avérée complexe. En effet, la majorité des signaux d'intensité importante correspondaient aux hydrogènes des acides gras, ce qui est cohérent avec le fait que cette huile est constituée en moyenne de 98 à 99 % de glycérides et de 0,2 à 2 % d'insaponifiable. Cette dernière fraction comprend divers constituants qui varient selon leur nature chimique et leur proportion. La fraction insaponifiable peut ainsi contenir des alcools terpéniques, des stérols, des triterpènes, des tocophérols, des composés phénoliques et des constituants extrêmement divers vraisemblablement responsables de l'activité biologique observée. Il est nécessaire de souligner que le solvant d'extraction détermine la quantité et la nature des composés extraits. C'est pourquoi, l'extraction au Soxhlet à l'éther de pétrole menant à un extrait huileux qui renferme majoritairement des corps gras constitue un handicap pour l'identification des constituants qui y sont minoritaires.

OBJECTIFS DE L'ETUDE

D'après la littérature, les métabolites secondaires majoritairement présents dans le fruit de *Citrillus colocynthis* sont les cucurbitacines.

Les cucurbitacines ont montré des effets cytotoxiques envers plusieurs lignées de cellules cancéreuses en entraînant des altérations dans le cytosquelette d'actine et provoquant l'arrêt de leur prolifération en phase G2/M responsable d'une apoptose. Au regard de ces données, et au vu de nos résultats obtenus avec l'HC, nous avons émis l'hypothèse que l'activité biologique contenue dans l'HC et responsable des effets que nous avons observé est due à la présence de molécules appartenant à la famille des cucurbitacines.

Mes travaux de recherche ont été divisés en deux parties :

1/ Purifier des formes hydrosolubles de cucurbitacines contenues dans des extraits aqueux de graines de *Citrillus colocynthis*, caractériser leur structure par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN), puis comparer leur activité biologique à leur contrepartie non hydrosolubles.

Nous avons identifié les cucurbitacines J, K, I, L, et E glycosylées. Du fait, d'un faible rendement obtenu pour les cucurbitacines J et K (qui sont des stéréo-isomères), nous avons focalisé notre étude sur les cucurbitacines I et E glycosylées en comparant leurs effets par rapport aux formes aglycones I et E sur la prolifération, le cycle cellulaire et sur les protéines JAK2/STAT3.

2/ Tenter de comprendre comment la cucurbitacine I (et par extension, les cucurbitacines) agissent sur le cytosquelette d'actine.

RESULTATS

PREMIERE PARTIE

Les résultats sont présentés en deux parties distinctes. Dans la première partie nous avons comparé les effets des cucurbitacines E et I glycosylées et non glycosylées sur le cytosquelette et la division cellulaire. Dans la seconde, nous avons étudié le mécanisme d'action de la cucurbitacine I (et par extension, des cucurbitacines) sur le cytosquelette d'actine.

I. Matériels et Méthodes

I.1 Récolte des graines de coloquinte

La coloquinte pousse spontanément dans la région méditerranéenne et la zone pré-désertique d'Afrique et d'Asie. Pour notre part, les fruits sont récoltés dans une région située dans l'ouest du Sahara Algérien par une équipe d'ethnobotanistes du laboratoire de Produits Naturels (Université de Tlemcen, Algérie). La récolte se fait en automne (de septembre à novembre) lorsque les fruits commencent à jaunir ; ces derniers sont séchés au laboratoire à l'ombre et à température ambiante. Les graines sont ensuite extraites des fruits séchés et envoyées sous cette forme au laboratoire SABNP de l'Université d'Evry (France), où nous les conservons à l'abri de la lumière.

I.2 Préparation des extraits aqueux des graines de coloquinte

Les molécules présentes dans les graines de coloquinte sont extraites par macération dans l'eau, selon le ratio de 1 g de graine/2,5 mL d'eau. La macération est réalisée dans un incubateur à 60°C, pendant 1 h, sous agitation (300 rpm). Après macération, l'extrait obtenu est séparé des graines par filtration sur une membrane d'esters de cellulose avec un seuil de coupure de 0,22 µm.

I.3 Purification des principes actifs de l'extrait aqueux

➤ Démarche expérimentale

Le schéma de purification est présenté sur la figure 23. La préparation des fractions à tester se fait par chromatographie liquide. Le fractionnement successif est guidé à chaque étape par les résultats d'activité cellulaire des fractions.

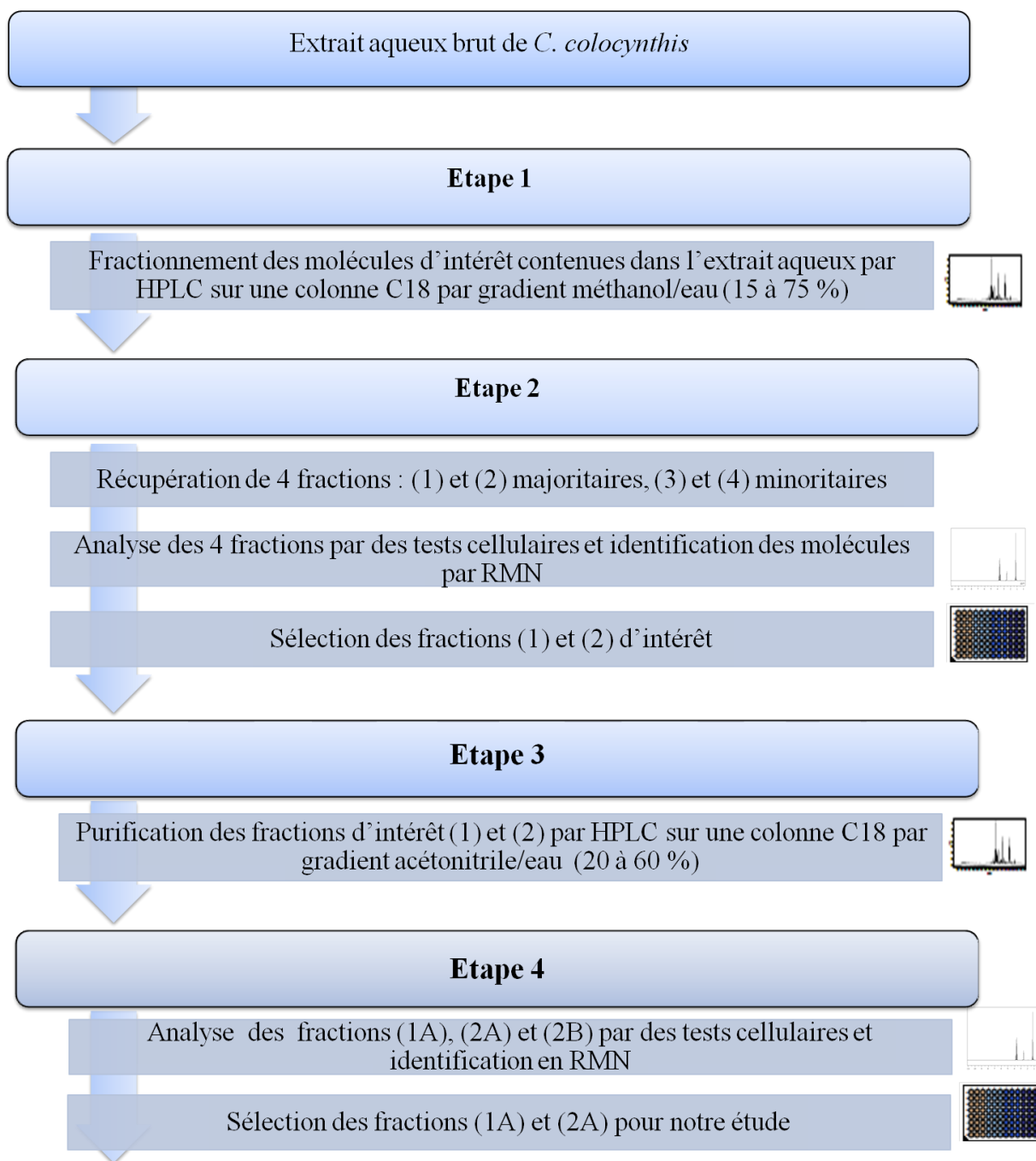


Figure 23 : Démarche expérimentale pour la séparation et l'identification de principes actifs issus d'extraits aqueux de graines de coloquinte.

➤ **Fractionnement de l'extrait aqueux par HPLC préparative**

La chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC - High Performance Liquid Chromatography, utilisant des pressions pouvant aller jusqu'à 250 bars) est une technique de séparation moléculaire à haute résolution s'appuyant sur l'interaction différentielle entre des molécules en solution et une phase immobile, dont l'affinité varie selon la nature des solvants. L'échantillon à analyser est ainsi entraîné par un éluant liquide (phase mobile) dans une colonne remplie d'une phase stationnaire composée de grains solides très fins de 1,8 à 7 μm . Dans la colonne, les composants moléculaires de l'échantillon sont séparés en raison de leurs affinités variables à l'égard des deux phases – stationnaire et mobile.

Etape 1 : Dans notre étude, l'extrait aqueux est fractionné par HPLC (GE Healthcare Life Sciences) en phase inverse à l'aide d'une colonne de silice greffée par des chaînes linéaires de groupement carbonés octadécyle (C18) (5 μm , 250 x 4,6 mm). La phase mobile est un mélange de méthanol/eau, appliquée avec un gradient variant de 15 à 75 % à 1 mL/min. L'absorbance est mesurée en sortie de colonne à 238 nm. Le volume injecté pour les différentes analyses est compris entre 20 et 50 μL . Toutes les chromatographies et analyses ont été effectuées à température ambiante.

Etape 2 : Les fractions obtenues après séparation par le gradient méthanol/eau ont été totalement évaporées afin d'éliminer le solvant puis dissoutes dans le D_2O . Ces dernières ont été testées pour leur activité cellulaire et deux fractions (1 et 2) se sont révélées d'intérêt mais n'apparaissaient pas pures par spectroscopie RMN. Nous avons alors procédé à une deuxième étape de purification.

➤ **Purification des fractions (1 et 2) issues de la première étape**

Etape 3 : La purification des fractions obtenues (1 et 2) a été réalisée par HPLC en phase inverse avec la même colonne que celle utilisée à l'étape 1. Un gradient linéaire d'acétonitrile/eau (20 à 60 %) est appliqué contenant 0,01 % d'acide trifluoroacétique TFA (la concentration en acétonitrile va en croissant au cours de l'éluion) et le débit est fixé à 0,3 mL/min. L'absorbance en sortie de colonne est suivie à 238 nm. Toutes les chromatographies et analyses ont été effectuées à température ambiante.

Etape 4 : Les fractions purifiées ont été analysées par RMN afin de vérifier la pureté des molécules isolées. Deux fractions (1A et 2A) ont été retenues pour la suite de nos investigations.

I.4 Identification des molécules d'intérêt par spectroscopie

La spectrométrie de masse (MS) permet de détecter et d'identifier des molécules d'intérêt par mesure de leur masse moléculaire, et d'obtenir dans certains cas leur structure chimique. Son principe réside dans la séparation de molécules chargées (ions) en fonction de leur rapport masse/charge (m/z). Lorsque la présence d'une molécule connue est suspectée, l'analyse en spectrométrie de masse haute résolution permet de confirmer sa présence ou son absence dans l'échantillon. Cependant, les conditions d'ionisation et les risques d'effets de la matrice peuvent affecter la reproductibilité dans l'analyse des métabolites secondaires. En termes de sensibilité cette technique est avantageuse, mais la quantification absolue des composés n'est possible qu'à partir de courbes d'étalonnage de tous les composés séparés (Verpoorte *et al.*, 2008). Il en est de même pour le couplage HPLC-MS où cette technique a montré ses limites lorsque les constituants ont des structures très proches (stéréo-isomères notamment), des indices de rétention très voisins ou encore des spectres de masse insuffisamment différenciés (Nam, 2014).

Il a souvent été reproché à la spectrométrie RMN son manque de sensibilité et la superposition des signaux, mais avec le développement de cryosondes, la RMN a pris une grande importance pour l'analyse des métabolites secondaires extraits de produits naturels. La superposition des signaux peut être diminuée en ayant recours à la spectrométrie RMN à deux dimensions (Mahrous and Farag, 2015; Vaysse *et al.*, 2010; Verpoorte *et al.*, 2008). De plus, au cours des deux dernières décennies, la RMN ^1H s'est avérée être un excellent outil pour la quantification absolue des composés dans un mélange en raison de la corrélation directe entre la concentration molaire du composé quelconque et l'aire sous la courbe (intégration) de chacun de ses signaux correspondants, à condition que tous les composés soient solubles dans le solvant et suffisamment stables dans les conditions d'analyse (Mahrous and Farag, 2015). Si ces conditions sont respectées, l'intensité du signal dépend uniquement de la concentration molaire des composés dans la solution (Pauli *et al.*, 2005).

Les avantages de la spectrométrie RMN ^1H par rapport aux autres techniques utilisées dans l'étude des métabolites secondaires sont résumés dans le tableau 3.

Tableau 3 : Comparaison des méthodes analytiques couramment utilisées en métabolomique (Verpoorte *et al.*, 2008)

	HPLC	LC-MS	MS	RMN
Préparation échantillon*	++	-	+	+++
Reproductibilité	-	-	+	+++
Quantification Absolue	-	-	-	+++
Quantification Relative	+	+	++	+++
Identification	+	++	++	++
Sensibilité	+	++	+++	+

HPLC, Chromatographie liquide à haute performance ; LC-MS, Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse ; MS, Spectrométrie de masse ; RMN, Résonance nucléaire magnétique. La gamme de l'échelle est comprise entre «-» (pour le maximum d'inconvénients) et « +++ » (pour le maximum d'avantages). *NB : Le nombre de croix porté pour la préparation de l'échantillon augmente la facilité de la mise en oeuvre de l'échantillon à analyser.

➤ Spectroscopie RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

La Résonance Magnétique Nucléaire en milieu liquide est une technique puissante qui permet notamment de déterminer la structure des molécules, en s'appuyant sur les propriétés magnétiques de certains noyaux atomiques dont le proton (^1H), le carbone (^{13}C), l'azote (^{15}N), le fluor (^{19}F) ou encore le phosphore (^{31}P), dotés d'un spin nucléaire. La RMN étudie le comportement des noyaux atomiques en présence d'un champ magnétique externe. Le champ magnétique appliqué aux produits entraîne un dédoublement des niveaux d'énergie du spin nucléaire, de sorte qu'on puisse induire des transitions entre eux, suite à l'absorption d'une radiation électromagnétique adéquate. Les échantillons sont dissous dans un solvant deutéré qui peut être de l'eau, du méthanol, du chloroforme etc... Le tube contenant l'échantillon est soumis au champ magnétique permettant l'obtention des spectres utiles à la l'élucidation structurale.

Dans nos travaux, les spectres RMN sont acquis à 20°C à l'aide d'un spectromètre Bruker Avance 600 MHz équipé d'une cryosonde. Les échantillons ont été solubilisés dans des solvants deutérés (D_2O , $\text{DMSO-}d_6$) et toutes les expériences sont effectuées dans des tubes capillaires de petits diamètres, et volumes (60 μL) avec un système MATCH (Cortecnet, Paris, France). Chaque spectre est obtenu après 64 scans. Les spectres sont

analysés par le logiciel Topspin 3.1 (Bruker). Le 2,2- Dimethyl-2-silapentane-5-sulfonic acide est utilisé comme référence externe dans du D₂O pour calibrer les déplacements chimiques du proton. La RMN étant une technique non destructive, l'échantillon peut être récupéré et éventuellement soumis à d'autres analyses.

Corrélations homonucléaires :

- **COSY** (¹H – ¹H): cette expérience fournit des informations sur les couplages homonucléaires ²J et ³J.
- **NOESY** (¹H – ¹H) : cette technique permet d'observer, dans l'espace, les corrélations entre protons d'une même molécule.

Corrélations hétéronucléaires :

- **HSQC** (¹J_{H-C}) : cette technique permet d'observer les couplages chimiques entre les carbones et les protons directement liés entre eux.
- **HMBC** (²J_{H-C}, ³J_{H-C}) : cette technique fournit une carte de corrélation entre proton et atome de carbone séparés par deux ou trois liaisons ²J_{H-C} et ²J_{H-C}.

I.5 Evaluation de l'activité biologique des fractions

I.5.1 Culture cellulaire et entretien

La lignée cellulaire HeLa issue d'un adénocarcinome du col de l'utérus humain a été obtenue auprès de l'ATCC (American Type Culture Collection). Ce sont des cellules adhérentes et de type épithélial. Elles sont cultivées dans du milieu DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) contenant 5 % (v/v) de sérum de veau fœtal (SVF, Invitrogen), 1 % (v/v) d'un mélange d'antibiotique (10000 U/mL pénicilline, 10000 µg/mL streptomycine) (Invitrogen), et 2 mM L-glutamine. Les cellules sont placées sous atmosphère humide à 37°C en présence de 5 % de CO₂. Le milieu de culture est renouvelé tous les deux jours afin que les nutriments du milieu ne deviennent pas limitant pour le bon développement des cellules. De la trypsine (2,5 g/L) est utilisée pour décrocher les cellules de leur support afin de procéder aux différentes expérimentations ou pour réaliser les repiquages. Après récupération des cellules, leur nombre est déterminé par un comptage à l'aide d'une cellule de Mallassez après coloration au bleu Trypan. Toutes les expériences sont réalisées avec des cultures n'excédant pas 20 repiquages.

I.5.2 Traitements cellulaires

Les cellules sont cultivées à 60 % de confluence sur des lamelles de verre stérilisées. 24 h après ensemencement, les cellules sont traitées avec des volumes variables d'extraits ou de fractions ou des concentrations connues de molécules commerciales. Parallèlement à cela, les cellules témoins reçoivent le même volume de solvant que les cellules traitées (maximum 1 % (v/v) pour le DMSO). Les cultures sont ensuite incubées à 37°C pour des périodes de temps variables.

I.5.3 Evaluation de l'activité des extraits sur la prolifération cellulaire

I.5.3.1 *Test de MTT*

L'impact des extraits sur la prolifération cellulaire est déterminé par l'utilisation du MTT (bromure de 3-(4,5-diMethylThiazol-2-yl)-2,5-diphenyl Tetrazolium). Ce test donne une indication du fonctionnement mitochondrial. Il consiste à mesurer l'activité de la succinate déshydrogénase mitochondriale qui n'est observée que sur des cellules vivantes. Cette enzyme, par coupure du cycle tétrazolium, transforme le MTT, de couleur jaune, en cristaux de formazan bleus. Après dissolution des cristaux, une lecture spectrophotométrique est réalisée à 570 nm (avec soustraction du bruit de fond à 690 nm). Les absorbances obtenues sont directement proportionnelles au nombre de cellules vivantes.

Le test au MTT est réalisé en plaque 24 puits. 500 µL de milieu de culture contenant $1,5 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ de cellules HeLa est déposé dans chacun des puits. Le test est valable si les cellules sont en phase exponentielle de croissance. Pour respecter la loi de Beer-Lambert, l'absorbance mesurée à 570 nm ne doit pas être supérieure à 2,5. L'activité de nos fractions ou des produits commerciaux à différente concentration est évaluée pendant 24 ou 48 h sous atmosphère contrôlée à 5 % de CO₂ et à 95 % d'humidité. Après incubation, 50 µL de MTT à 5 mg/mL préparé dans du tampon PBS 1X (pH 7,4 ; 0,1 M) sont déposés dans chacun des puits. Les plaques sont mises à incuber pendant 3 h à 37°C sous une atmosphère contrôlée à 5 % de CO₂ et à 95 % d'humidité. Le milieu de culture est retiré, et les cristaux de formazan sont dissous dans une solution de solubilisation [10 % Triton X100 dans l'isopropanol 0,1 N HCl], (200 µL dans chacun des puits). Enfin, l'absorbance est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre Specord 250® plus (Analytik Jena AG, Allemagne). Les tests sont réalisés en triplicate. Les pourcentages de croissance pour chaque fraction ou molécule testée sont déterminés à partir de l'équation :

$$\% \text{ Croissance} = \frac{A_{570} (\text{test})}{A_{570} (\text{témoin})} \times 100 \%$$

A_{570} (test) : Absorbance mesurée à 570 nm des cellules en présence d'un volume donné de fraction ou d'une concentration déterminée de cucurbitacines commerciales.

A_{570} (témoin) : Absorbance mesurée à 570 nm des cellules en absence d'extrait ou de molécule commerciale.

I.5.3.2 *Test d'exclusion au bleu Trypan*

L'effet des fractions et composés sur la croissance cellulaire a été évalué grâce à la réalisation de courbes de croissance. Pour cela, les cellules sontensemencées en plaque 6 puits à raison de 3×10^5 cellules/puits. Après adhésion cellulaire, les cellules sont mises en présence de fractions ou de composés à tester. Toutes les 24 h, le milieu de culture (contenant les cellules mortes flottantes) est récupéré et les cellules adhérentes sont détachées de leur support après action de la trypsine. Le nombre de cellules vivantes et mortes est déterminé directement par comptage en cellule de Malassez après coloration au bleu Trypan. Les cellules vivantes, dont la membrane est intacte, sont imperméables aux colorants vitaux comme le bleu Trypan, alors que les cellules mortes, qui ont perdu l'intégrité de leur membrane cytoplasmique, se colorent en bleu.

I.5.4 Analyse du cycle cellulaire

La cytométrie en flux permet de caractériser la distribution des cellules dans chaque phase du cycle cellulaire, à savoir les phases G0/G1, S ou G2/M en mesurant la quantité d'ADN présent dans la cellule. Pour cette analyse, nous avons utilisé l'iodure de propidium (IP) qui est un agent fluorescent intercalant de l'ADN. Sous excitation à 488 nm, la fluorescence émise par l'IP est mesurée cellule par cellule, ce qui permet d'entretenir un profil de fluorescence par la population cellulaire examinée et de déterminer le nombre et le pourcentage de cellules dans chaque phase du cycle cellulaire.

Les cellules HeLa ($3 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$) sontensemencées, traitées avec les molécules d'intérêt, prélevées par trypsinisation après des périodes d'incubation variables puis centrifugées à $1000 \times g$ pendant 10 min. Après un lavage au PBS 1X (qui au préalable est incubé dans la glace) et une centrifugation dans les mêmes conditions, les cellules sont perméabilisées dans 3 mL de PBS 1X : éthanol absolu (1/4, v/v) (froid) et placées à 4°C pour la nuit. L'éthanol fragilise les membranes cellulaires et facilite le passage de l'IP dans les

cellules. Avant l'analyse au cytomètre, les cellules sont lavées au PBS 1X, centrifugées et le culot est repris dans 200 µL de PBS 1X contenant 50 µg/mL d'IP et 60 µg/mL de RNase A (Sigma Aldrich, USA). Après incubation à l'obscurité et à 37°C pendant 30 min, les cellules sont analysées par cytométrie en flux sur un appareil FACScan (canal FL-2). Après exclusion des débris, l'analyse de la fluorescence est réalisée sur 10000 cellules.

I.5.5 Marquage par immunofluorescence

Après incubation des cellules HeLa avec des fractions ou des molécules d'intérêt, les cellules sont lavées dans le PBS 1X puis sont fixées par incubation avec du paraformaldéhyde (4% v/v) dans du PBS 1X, sucrose 50 mM pendant 30 min à 37°C. Après trois lavages de 5 min dans le PBS, les sites non spécifiques sont saturés par incubation pendant 1 h à 37°C avec un tampon de saturation [NaCl 0,15M, Tris-HCl pH7,4 0,02 M, Triton 0,1 %, BSA 2 %]. Les cellules sont ensuite incubées avec l'anticorps primaire anti-β-tubuline (dilution 1:2500) dans le tampon de saturation pendant une nuit à 4°C. Les échantillons sont ensuite rincés avec du PBS 1X puis incubés pendant 1 h à température ambiante avec les anticorps secondaires (dilution 1:2500) couplés à des fluorochromes (Alexa Fluor 488 Invitrogen, USA) et la phalloïdine – rhodamine (dilution 1:1000 Invitrogen, USA) dans le tampon de saturation. La phalloïdine couplée à la rhodamine permet de marquer l'actine du cytosquelette. Après trois lavages de 10 min dans le PBS 1X, l'ADN est marqué au 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (4 µg/mL, 20 sec) dans le PBS 1X puis, les lamelles contenant les cellules sont montées sur des lames de verre à l'aide du milieu de montage (Sigma Aldrich, Allemagne). La fluorescence émise est ensuite analysée sur un microscope à fluorescence (Carl Zeiss Jena, Allemagne) avec un objectif 63X.

I.5.6 Vidéomicroscopie en phase

Afin d'analyser la division des cellules HeLa traitées par la cucurbitacine I, ces dernières sont ensemencées 24 h avant le traitement à raison de 3×10^5 cellules/boîte de 32 mm de diamètre. Le jour de l'expérimentation, le milieu est renouvelé et la boîte est placée dans la chambre d'incubation d'un vidéomicroscope (Axiovert 220, Carl Zeiss MicroImaging, Jena, Allemagne). La vidéomicroscopie est réalisée à l'aide d'un objectif 40X, dans une enceinte thermostatée à 37°C et humidifiée à 5 % CO₂. La sortie du microscope est reliée à une caméra HDCam, elle-même reliée à un ordinateur doté d'un programme d'acquisition d'images numérisées permettant de prendre une photographie du champ cellulaire à intervalle régulier et pour une durée variable. Dans une séquence de vidéomicroscopie typique,

l'acquisition démarre par la prise de vue de cellules en dehors de tout traitement, puis la cucurbitacine I est ajoutée dans le milieu, et la séquence dure 24 h avec une prise d'image/2 min.

I.5.7 Analyse par immuno-empreinte (Western Blot)

➤ *Préparation des échantillons cellulaires cytosolubles*

La préparation des échantillons pour analyse par western-blot nécessite d'incuber les cellules pendant 30 min à 4°C dans du tampon de lyse [50 mM Tris- HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 0,1 % (v/v) Triton 100X, mélange d'antiprotéases (Roche, Allemagne) et mélange d'antiphosphatases (Roche, Allemagne)]. Les suspensions cellulaires obtenues sont centrifugées à 15000 × g, pendant 20 min à 4°C ce qui permet de séparer les molécules solubles présentes dans le surnageant des débris membranaires retrouvés dans le culot.

➤ *Estimation du contenu en protéines de l'extrait cellulaire cytosoluble*

La concentration protéique du lysat cellulaire est déterminée par la méthode de Bradford (Bradford, 1976). Pour chaque échantillon, 5 µL de surnageant issus de l'extraction sont ajoutés à 5 mL du mélange réactionnel de Bradford (1 mL de réactif de Bradford + 4 mL d'eau). Les différents tubes sont mis à incuber pendant 5 min sur glace. L'absorbance du mélange est lue à 595 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (UV/Vis, Specord 250® plus, Analytik Jena AG, Allemagne). Préalablement au dosage, une gamme étalon est établie avec différentes concentration (1 à 10 µg/mL) d'une solution d'albumine de sérum de veau (BSA).

➤ *Dénaturation des échantillons protéiques*

Cette étape entraîne la dénaturation des structures secondaires, tertiaires et quaternaires des protéines par le SDS, qui se fixe sur les protéines et les charge négativement. La quantité de protéines déposée dans un puits typique de gel de polyacrylamide peut aller jusqu'à environ 100 mg de protéine. Chaque extrait cellulaire est mélangé avec du tampon de charge [4X: Tris-HCl 100 mM pH 8,0, DTT 50 mM, SDS 20 %, bleu de bromophénol 0,1 %, glycérol 10 %], de telle sorte à ce que le mélange soit à une concentration finale en tampon 1X. Les échantillons sont portés à 100°C pendant 5 min pour permettre la dénaturation des protéines.

➤ *Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE)*

L'électrophorèse en gel de polyacrylamide (PAGE) est réalisée en conditions dénaturantes, en présence de dodécylsulfate de sodium (SDS) qui confère aux protéines une charge négative et permet de les séparer selon leur masse apparente. La concentration du gel en acrylamide varie typiquement de 7,5 à 15 % de façon inversement proportionnelle à la gamme de masse moléculaire des protéines à analyser. Après le dépôt des échantillons et de marqueurs de poids moléculaire, la migration s'effectue à température ambiante dans un champ électrique typiquement (50 à 150 V) en présence de tampon de migration [Tris 25 mM, glycine 192 mM, SDS 0,1 %, pH 8,8].

➤ *Transfert et réalisation de l'immunoempreinte*

Après électrophorèse SDS-PAGE, les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose en présence de tampon de transfert [Tris 25 mM, 192 mM glycine, 20 % (v/v) éthanol]. Le transfert se fait sous une tension de 30 V pendant une nuit à 4°C. L'efficacité du transfert est alors vérifiée par coloration de la membrane au rouge Ponceau [0,2 % (m/v) de Rouge Ponceau, 3 % (v/v) d'acide acétique]. Après lavage de la membrane à l'eau, une photocopie de celle-ci est réalisée pour garder l'image de la position et de l'intensité des bandes protéiques. La membrane est ensuite débarrassée du rouge ponceau par incubation rapide dans un tampon de transfert puis saturée dans du tampon PBS 1X contenant 5 % (m/v) de lait écrémé pendant 1 h à température ambiante. Après lavage (3 × 5 min) dans du tampon PBS 1X, 0,1 % Tween 20, la membrane est incubée avec l'anticorps primaire pendant la nuit à 4°C. Les anticorps primaires sont dilués dans du tampon PBS 1X, 0,1 % Tween 20, 5 % (m/v) lait écrémé [anti-STAT3 polyclonal (K-15, Santa Cruz) au 1:200, anti-JAK2 polyclonal (HR-758, Santa Cruz) au 1:200, anti-p-JAK2 polyclonal (Tyr 1007/Tyr 1008, Santa Cruz) au 1:200, anti-p-STAT3 polyclonal (Tyr 705, Cell Signaling) au 1:1000, anti-GADPH monoclonal (Abcam) au 1:5000]. La membrane est ensuite lavée (3 × 5 min) avant d'être marquée pendant une heure avec un anticorps secondaire [anti-goat IRDye 800, anti-rabbit 800 ou anti-mouse IRDye 680 au 1:5000 (Odyssey)]. Après lavage (3 × 5 min) dans le même tampon que précédemment, la fluorescence des anticorps secondaires est révélée à l'aide d'un système d'imagerie Odyssey (LI-COR biosciences).

I.6 Analyses statistiques

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne \pm somme des écarts à la moyenne. Le traitement statistique des résultats a été réalisé à l'aide du logiciel OriginLab8. Les effets des différentes conditions expérimentales et leurs interactions ont été évalués par une analyse de variance factorielle (ANOVA) à un facteur. Pour l'ensemble du traitement statistique de ce travail, le seuil de significativité retenu était de $*p \leq 0,05$.

II. Résultats

Les plantes sont considérées comme source d'une multitude de composés chimiques. Ces composés possèdent des propriétés physico-chimiques très variées et sont présents à des concentrations très variables. Cette complexité est directement liée au fait que les plantes sont des organismes statiques qui ont dû développer une grande diversité métabolique et chimique pour se nourrir et se défendre. Les extraits naturels fournissent donc de nombreux principes actifs, néanmoins, le solvant et la méthode d'extraction ont une influence considérable sur la nature et la quantité des composés extraits.

À partir de l'huile de coloquinte, nous avons tout d'abord mis en évidence son effet cytotoxique responsable d'une altération importante de l'organisation du cytosquelette d'actine et arrêt du cycle cellulaire avec un contenu en ADN de type 4N G2/M. Nous avons tenté d'identifier les molécules responsables de ces effets par RMN. Les résultats ont montré la présence de pics minoritaires pouvant correspondre à des cucurbitacines. Dans la suite de nos travaux, nous avons préparé un extrait aqueux de graines de coloquinte étant donné que l'analyse de l'huile brute par RMN s'est avérée complexe. Les analyses par HPLC et RMN de l'extrait aqueux ont permis d'identifier des molécules de type cucurbitacines glycosylées ou pas. En comparant l'activité des molécules glycosylées par rapport à leur aglycone sur la prolifération, le cycle cellulaire, et l'organisation du cytosquelette d'actine des cellules HeLa, nous avons montré que l'activité inhibitrice de la croissance des cellules cancéreuses induite par les aglycones de cucurbitacines est fortement réduite par la présence d'un résidu osidique dans ces molécules.

II.1 Extraction et identification des cucurbitacines

Les cucurbitacines existent dans la plante sous forme de glycosides solubles dans l'eau, mais ces derniers sont fréquemment hydrolysés lors de l'extraction pour donner l'aglycone, si l'enzyme « élastérase » est présente et active dans la plante. Il est intéressant de noter que divers stress abiotiques d'origine physique (comme les blessures) chez la plante entraînent des changements dans son métabolisme. Certains changements sont rapides, par exemple au bout de quelques minutes les glucosides s'hydrolysent (Gry *et al.*, 2006; Verpoorte *et al.*, 2008). Dans les graines, les aglycones des cucurbitacines sont naturellement présents et sont peu solubles dans l'eau mais solubles dans l'éther de pétrole, le chloroforme, le méthanol et l'éthanol (Dinan *et al.*, 2001; Gry *et al.*, 2006).

A partir de ces données et dans le but d'extraire les cucurbitacines, nous avons choisi une méthode d'extraction de référence qui se doit d'être efficace tout en respectant la nature des composés d'intérêt. Les cucurbitacines et les composés analogues ont été largement étudiés d'un point de vue analytique. Diverses méthodes d'extraction de la plante ont été décrites aboutissant à des mélanges de triterpènes (Dinan *et al.*, 2001; Halaweish and Tallamy, 1993). Les essais pour l'optimisation de l'extraction et de l'analyse des cucurbitacines contenues dans la plante nous ont amenés à les réaliser à partir des graines entières. Ces dernières sont mises en suspension dans de l'eau (0,25 g/mL). L'extraction est effectuée par macération à 60°C pendant 1 h sous agitation dans le but d'accélérer l'extraction. En effet, nous avons constaté que l'augmentation de la température accroît la solubilité et la diffusion des analytes dans le solvant d'extraction. Enfin, l'extrait obtenu est séparé des graines par filtration.

II.1.1 Données spectrales des cucurbitacines

Nous avons cherché à identifier les cucurbitacines dans l'extrait aqueux de *C. colocynthis*. Pour cela, plusieurs techniques de chromatographies ou de spectroscopies peuvent être utilisées en fonction de la nature des constituants et de la complexité du mélange, comme par exemple l'HPLC, la MS, l'HPLC couplée à la MS (LC-MS) ou la RMN.

➤ **RMN ¹H**

Dans notre laboratoire, nous disposons d'un spectromètre RMN ¹H 600 MHz équipé d'une cryosonde reliée à une unité cryogénique à l'hélium, qui rend accessible l'observation par RMN de très faibles quantités de substances naturelles (quelques dizaines de ng de produits, soit des solutions à des concentrations μM).

Les signaux des cucurbitacines glycosylées et non glycosylées ont été décrits en RMN ¹H par Seger *et al.* (Seger *et al.*, 2005). Une comparaison des déplacements chimiques (δ) décrits dans la littérature avec ceux obtenus pour nos échantillons indiquent la présence des hydrogènes correspondant aux cucurbitacines E, I et L (figure 24, flèches noires) glycosylées (flèches rouges).

Les variations entre les valeurs des déplacements chimiques décrites par ces auteurs et celles du spectre que nous avons enregistré sont faibles (0,00-0,09 ppm).

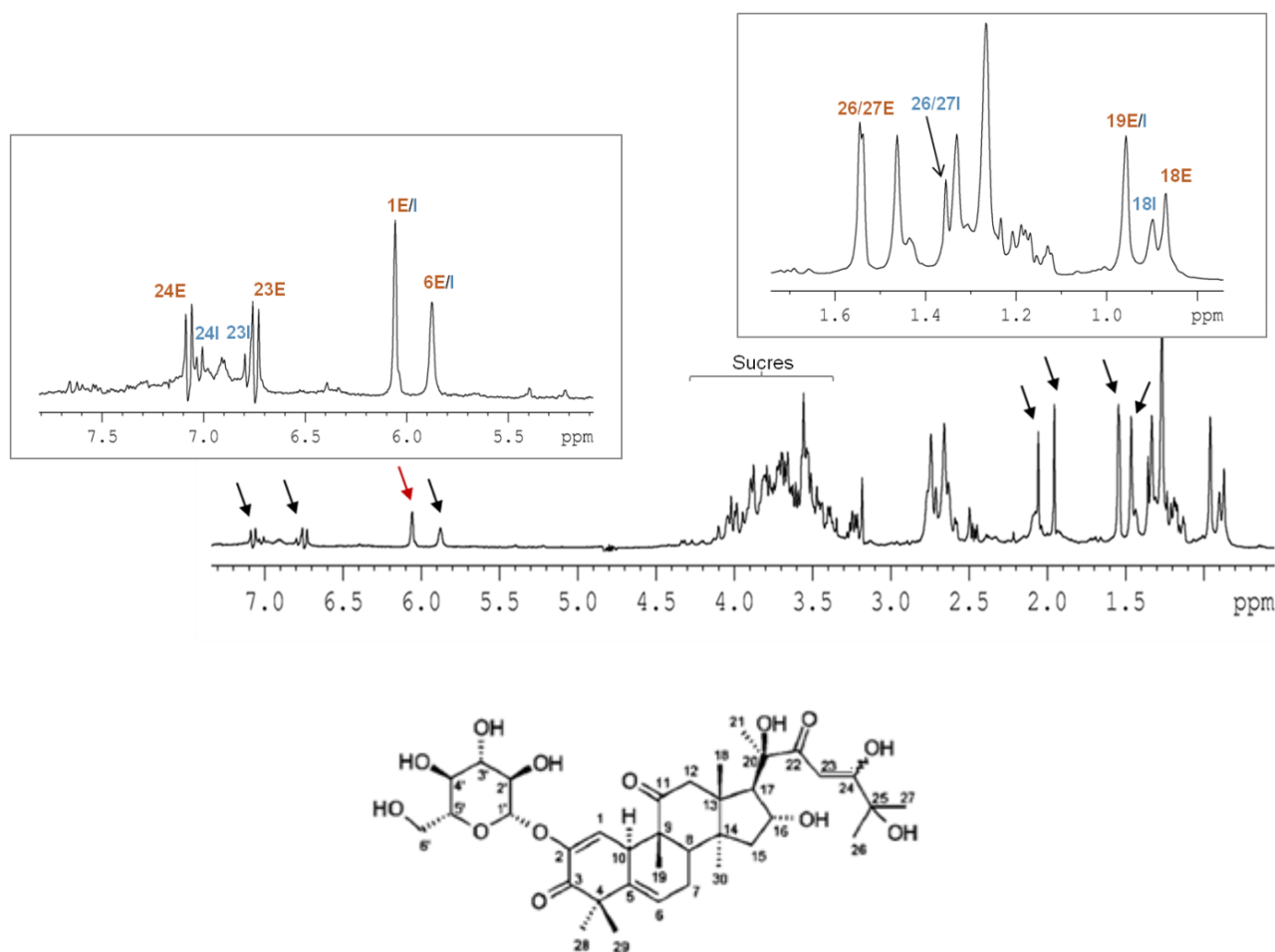


Figure 24 : Spectre RMN ^1H de l'extrait aqueux de *C. colocynthis* enregistré dans du D_2O .

La formule plane de la cucurbitacine I glycosylée est présentée sous les spectres.

II.1.2 Quantification des cucurbitacines par RMN ^1H

Pour la quantification des cucurbitacines, nous avons utilisé une méthode par étalonnage externe. La référence est la cucurbitacine I non glycosylée commerciale (Sigma Aldrich, pureté 97%). La première étape d'une quantification par RMN ^1H est le choix du signal. A partir du spectre de RMN ^1H de la cucurbitacine I commerciale nous devons choisir pour l'intégration un signal qui est distinct et non superposé aux signaux des protons des autres constituants de l'extrait aqueux. Le choix s'est porté sur les protons H-1 (6,08 ppm), et H-6 (5,91 ppm). Ainsi, la comparaison des aires des signaux des composés et de la référence permet de calculer la concentration des constituants du mélange. Il en ressort que dans l'extrait aqueux produit dans nos conditions d'extraction, la concentration des cucurbitacines est d'environ 5 mM.

II.1.3 Evaluation de l'activité de l'extrait aqueux sur les cellules HeLa

L'extrait aqueux apparaît donc comme contenant un mélange de cucurbitacines. Il a été évalué pour son activité anti-proliférative et pour son activité sur le cytosquelette d'actine de cellules HeLa. La figure 25 présente les cinétiques de viabilité des cellules en fonction de la concentration du mélange des cucurbitacines contenues dans l'extrait aqueux en μM , déterminées à l'aide du test colorimétrique MTT. Ces résultats montrent une diminution de la viabilité cellulaire après 24 h (CI_{50} de $40,4 \pm 3 \mu\text{M}$ et $20,5 \pm 2 \mu\text{M}$ après 24 et 48 h de traitement, respectivement), alors que pour des plus faibles concentrations de l'ordre du nM, aucun effet n'est observé.

Les observations microscopiques confirment les activités évaluées par le MTT, car pour une concentration de $10 \mu\text{M}$ de cucurbitacines contenues dans l'extrait aqueux, la densité des cellules diminue et de larges agrégats d'actine sont observés. De plus, plusieurs noyaux apparaissent dans ces cellules après 24 h de traitement.

II.1.4 Profil HPLC des cucurbitacines séparées (Etape1)

L'évaluation des méthodes de séparation d'extraits bruts de cucurbitacines montre que la chromatographie liquide haute performance (HPLC) est une des plus efficaces (Dinan *et al.*, 2001; Gry *et al.*, 2006). Les cucurbitacines sont des composés polaires à moyennement polaires, ainsi la séparation sur colonne en phase inverse et notamment sur colonne de silice greffée C18, s'appuyant sur des paramètres de polarité et d'hydrophobicité des analytes, semble être adaptée. Nous avons choisi de détecter les composés à la longueur d'onde de 238 nm suite à l'analyse de l'absorbance de la cucurbitacines I commerciale dissoute dans du DMSO (figure 36, page 122).

Nous avons ainsi pu séparer les cucurbitacines contenues dans l'extrait aqueux sur une colonne en mode préparatif (250 x 4,6 mm, taille des particules : $5 \mu\text{m}$, Deerfield USA) en s'inspirant des travaux de Dinan *et al.* (Dinan *et al.*, 1997a). Après une optimisation du gradient, composé de solvant A (eau) et de solvant B (méthanol), la meilleure séparation a été obtenue pour une injection de $200 \mu\text{L}$ avec un gradient de solvant B de 15 à 70 % sur 45 min, un débit de $1 \text{ mL}/\text{min}$, et à température ambiante. Cette séparation nous a permis d'obtenir essentiellement 4 fractions, deux majoritaires, (1), (2) et deux minoritaires (3), (4) (figure 26).

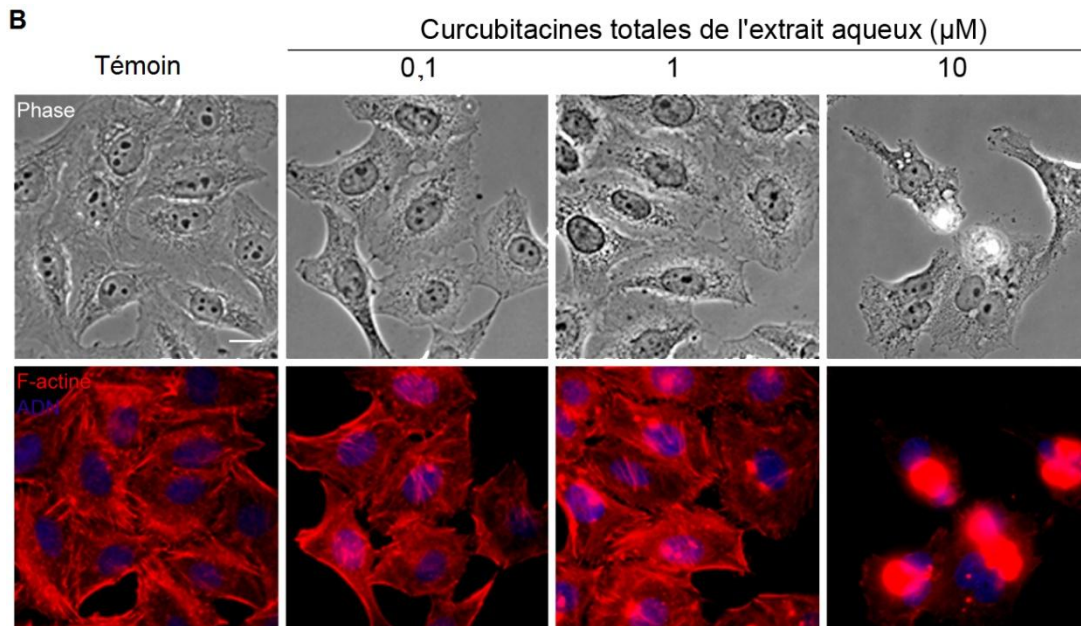
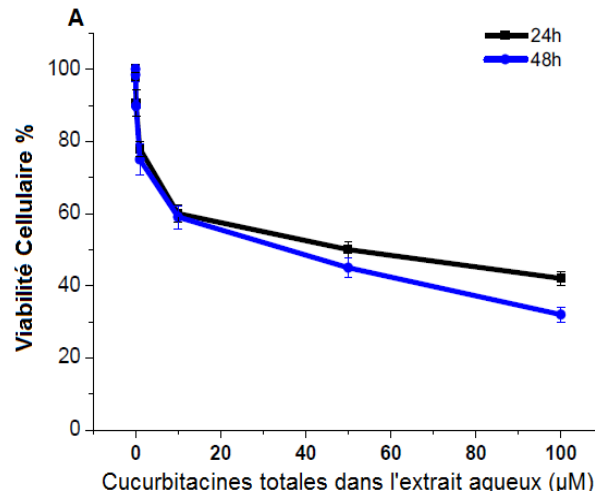


Figure 25 : Effet de l'extrait aqueux contenant des cucurbitacines sur la prolifération, la morphologie, et le cytosquelette d'actine de cellules HeLa.

A : Viabilité de cellules HeLa déterminée par le test colorimétrique MTT et traitées pendant 24 h et 48 h avec différents volumes d'extrait aqueux aboutissant à la concentration totale de cucurbitacines indiquée. L'expérience est faite en triplicate.

B: Cellules HeLa non traitées (Témoin) ou traitées pendant 24 h avec différents volumes d'extrait aqueux de *C. colocynthis* aboutissant à la concentration totale de cucurbitacines indiquée. L'actine est marquée à la phalloïdine-rhodamine fluorescente (rouge) et le noyau au DAPI (bleu). Barre d'échelle 20 µm.

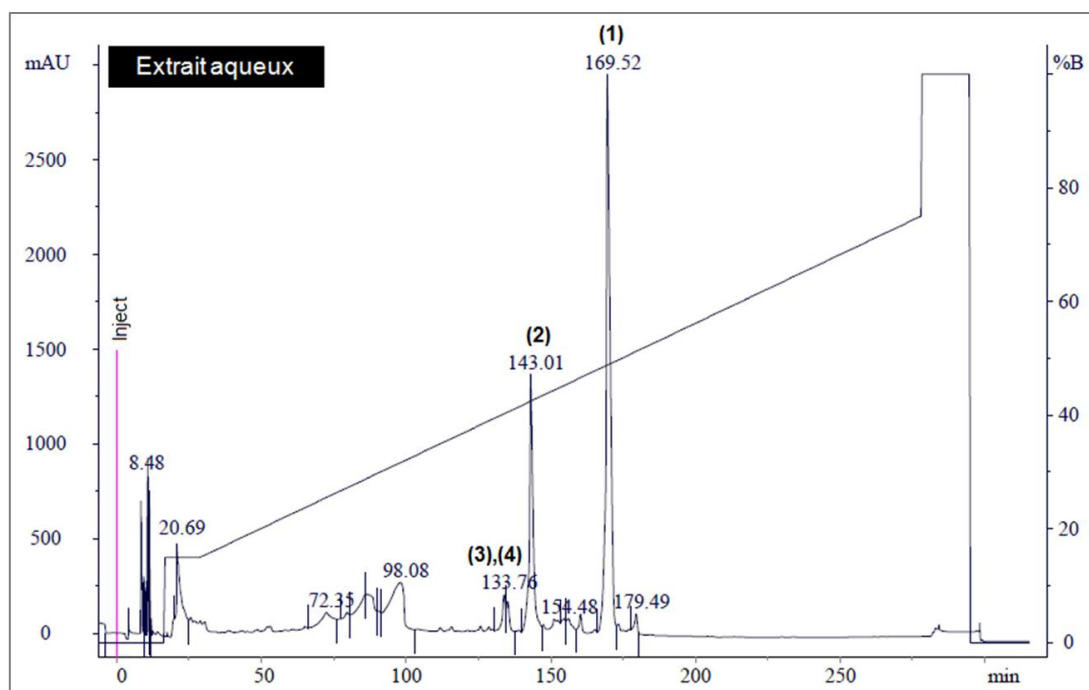


Figure 26 : Chromatogramme de séparation par HPLC (C18, gradient eau/méthanol [B %]) de l'extrait aqueux de *C. colocynthis*. Détection à 238 nm.

II.1.5 Identification des cucurbitacines (Etape 2)

➤ RMN ^1H

Les fractions (1) à (4) ont été analysées par RMN ^1H (figure 27) dans du D_2O . Les déplacements chimiques et les attributions des signaux sont présentés dans les tableaux dans la section annexes. Les données de la RMN ^1H associées à celles de la RMN bidimensionnelle HMBC, ont permis d'identifier la présence des cucurbitacines E, I, L, J, K glycosylées par comparaison aux résultats de Seger *et al.* (Seger *et al.*, 2005) obtenues de *C. colocynthis*. Ainsi, la fraction (1) contient la cucurbitacine E glycosylée (caractérisée par la présence d'une double liaison entre C23-C24 et une fonction acétyle en C25) qui est majoritaire ; la fraction (2) est un mélange de cucurbitacines I et L glycosylées (la cucurbitacine L glycosylée appelée également 23,24-dihydrocucurbitacine I glycosylée et toute les deux présentent une fonction hydroxyle en C25) et les fractions (3) et (4) sont un mélange de cucurbitacines J et K glycosylées (qui sont des stéréo-isomères au niveau de la réduction de la double liaison en C23-C24 et présentent une fonction hydroxyle en C25) présentes en faible quantité.

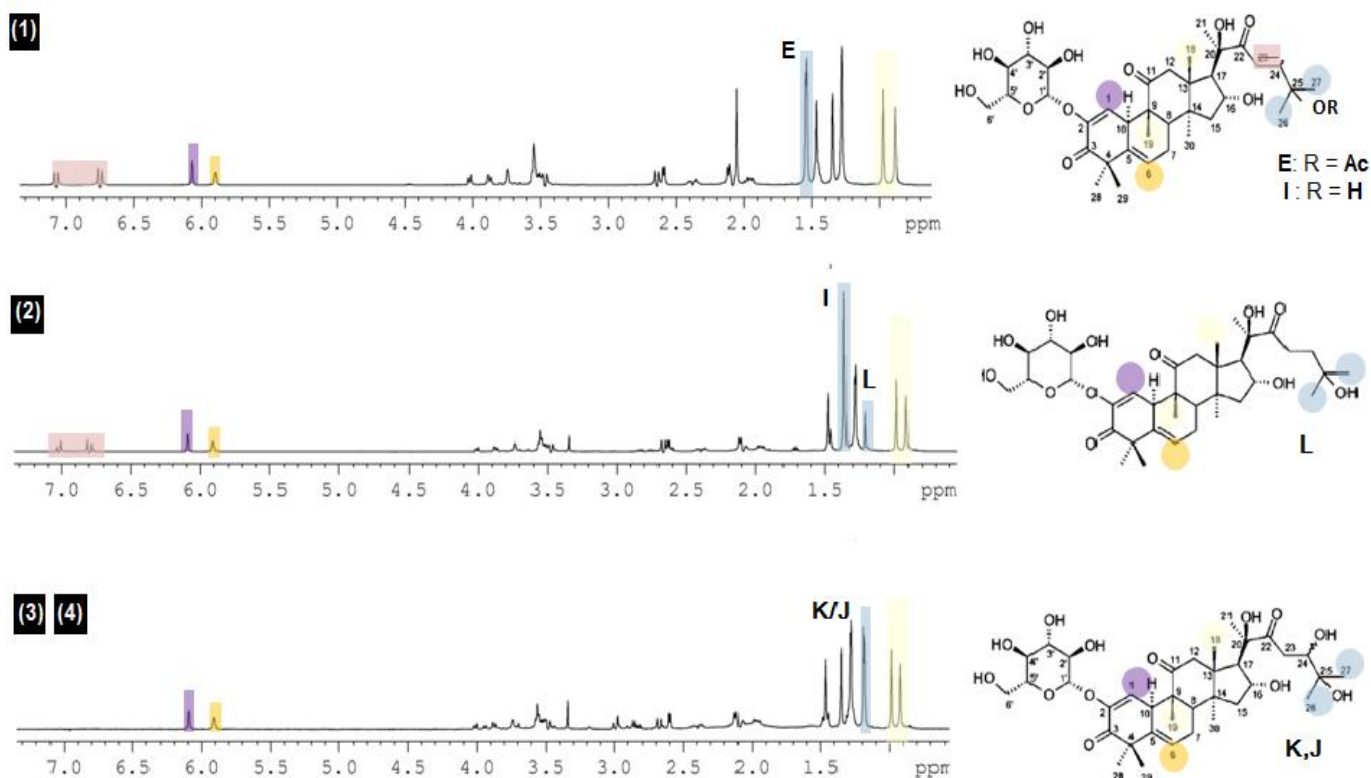


Figure 27 : Spectre RMN ^1H des fractions (1), (2), (3) et (4) enregistrées dans le D_2O

La quantification de la concentration des cucurbitacines de chaque fraction a été déterminée selon la méthode décrite dans le paragraphe II.1.2.

Tableau 4 : Quantification par RMN ^1H des quatre fractions obtenues après fractionnement de l'extrait aqueux de *C. colocynthis*.

Echantillon	Extrait aqueux	Fraction (1)	Fraction (2)	Fraction (3)	Fraction (4)
Concentration (mM)	10,5	8,2	3,5	0,65	0,58

II.1.6 Purification des cucurbitacines (Etape 3 et 4)

Les deux fractions majeures d'intérêt (1) et (2) ont été purifiées en phase inverse et éluées avec un gradient eau/acétonitrile (20 à 60%). La fraction (2) contient un mélange de cucurbitacines I et L glycosylées, ce qui nécessite pour leur séparation l'ajout d'additifs dans la phase mobile. Ainsi dans le cas des cucurbitacines I et L glycosylées, leur séparation a été réalisée par l'ajout d'acide trifluoroacétique 0,01% dans la phase mobile composée

d'eau/acétonitrile sur une colonne C18 avec un débit plus lent (0,3 mL/min) (Sturm and Stuppner, 2000).

La figure 28 présente les chromatogrammes à 238 nm des fractions (1) et (2) de l'extrait aqueux de *C. colocynthis*.

Le chromatogramme A indique que la fraction (1) est constituée d'un pic majoritaire 94,98 % (1A). Le spectre RMN ^1H de la sous-fraction (1A) confirme la structure de la cucurbitacine E glycosylée (figure non présentée).

Le chromatogramme B indique que la fraction (2) est constituée de deux molécules majoritaires (2A) (65,20%) et (2B) (30,1%) identifiées par la RMN ^1H cucurbitacine I glycosylée et cucurbitacine L glycosylée respectivement (figure non présentée).

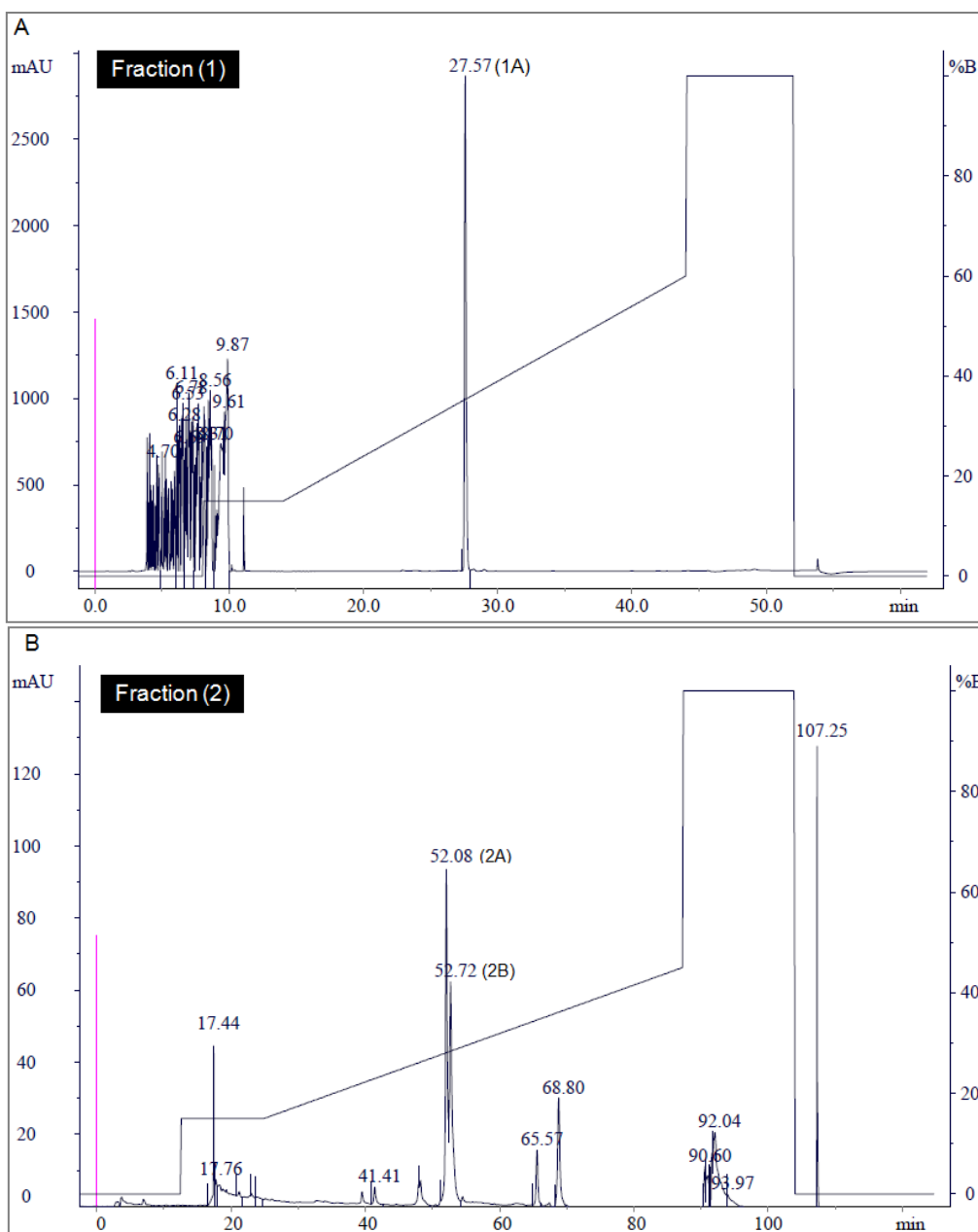


Figure 28 : Chromatogrammes des fractions (1) et (2) purifiées (C18, gradient eau/acétonitrile [B %]), à 238 nm, en mode préparatif.

Tableau 5 : Quantification par RMN ¹H des trois fractions obtenues après purification.

Echantillon	Fraction (1A)	Fraction (2A)	Fraction (2B)
Concentration (mM)	2,5	1,0	0,45

En conclusion, nous avons isolé et identifié cinq cucurbitacines glycosylées de l'extrait aqueux de *C. colocynthis* en combinant séparation par l'HPLC et l'analyse par RMN ¹H. Cette dernière constitue un bon moyen d'identification des stéréo-isomères dont l'analyse par les techniques conventionnelles est délicate.

II.2 Comparaison de l'activité des cucurbitacines E et I glycosylées et non glycosylées

Après avoir extrait les cucurbitacines E et I glycosylées, une étude structure-activité de chaque cucurbitacine glycosylée et de leur aglycone a été menée sur cellules HeLa. La première approche a été de mettre en évidence l'activité antiproliférative des composés. Pour cela, deux techniques d'évaluation de la prolifération cellulaire sont fréquemment utilisées : la technique du MTT et la technique du bleu trypan.

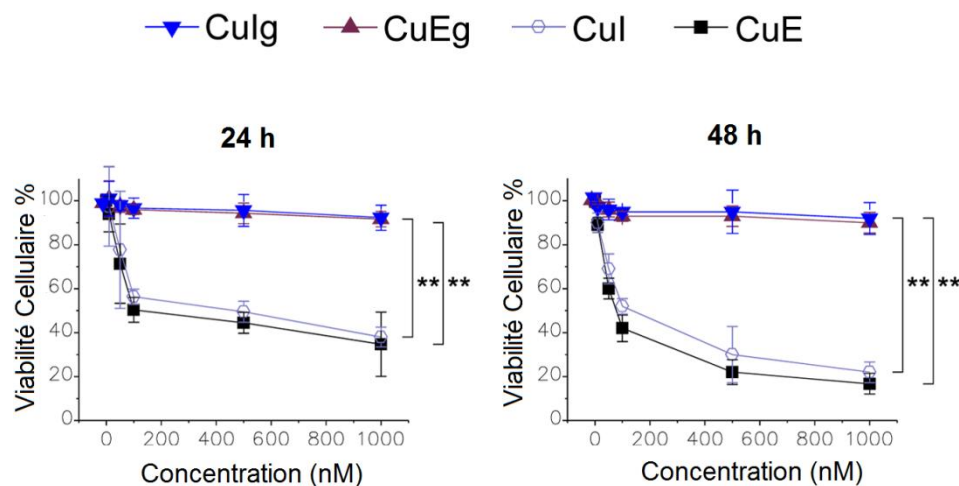
II.2.1 Tests de viabilité cellulaire

La viabilité cellulaire a été déterminée après traitement des cellules HeLa avec différentes concentrations (50, 100, 500 and 1000 nM) de cucurbitacines E, I glycosylées (CuE_g, CuI_g) et leurs aglycones (CuE, CuI commerciales Sigma Aldrich) pendant 24 ou 48 h. Les résultats des tests MTT (exprimés en pourcentage de viabilité par rapport aux cellules témoins non traitées) présentés en figure 29A indiquent que les cucurbitacines non glycosylées (CuE, CuI) exercent un effet antiprolifératif qui est dose et temps dépendant. Ces courbes ont permis de calculer les CI₅₀ (tableau de la figure 29B). Les cucurbitacines E et I (CuE et CuI) à 100 nM, induisent respectivement 43 et 52% de mortalité après 24 h, et 50 et 62% de mortalité après 48 h de traitement et par conséquent, la CuE présente un effet cytotoxique légèrement plus important que celui de la CuI.

Contrairement à leur forme aglycone, les cucurbitacines E et I glycosylées (CuE_g, CuI_g) ne sont pas cytotoxique à 100 et même à 1000 nM. Cependant, il a été observé que l'extrait aqueux contenant un mélange de cucurbitacines présentait une CI₅₀ de 20 µM à 24 h. Or, sur la figure 30 présentant les CI₅₀ en µM pour l'extrait aqueux de *C. colocynthis*, comparé aux CuE_g et de CuI_g isolées, on observe que les valeurs des CI₅₀ augmentent lorsque les cucurbitacines sont isolées. Ce résultat suggère que l'activité antiproliférative mesurée dans l'extrait aqueux brut de départ peut être due à un phénomène de synergie d'action entre différentes molécules du mélange, ou bien peut être due à la présence, en plus d'autres

métabolites comme les aglycones de cucurbitacines en très faible quantité pour être identifiés en RMN.

A



B

		CuE		CuI	
		CI ₅₀ (nM)		CI ₅₀ (nM)	
HeLa	24 h	91 ± 0,07	130 ± 0,10		
	48 h	75 ± 0,07	100 ± 0,09		

Figure 29 : Etude de la viabilité de cellules HeLa en présence de cucurbitacines après 24 et 48 h.

A : Cellules HeLa traitées par le DMSO 0,01% (Témoin) ou par les cucurbitacines E ou I glycosylées (CuE_g, CuI_g) ou leur aglycone (CuE, CuI) à différentes concentrations (10, 50, 100, 500, 1000 nM). Les pourcentages de survie cellulaire présentés sont la moyenne de trois mesures ± SE. L'effet des cucurbitacines non glycosylées est statistiquement significatif comparé à leur forme glycosylée (** p < 0,005).

B : Détermination des CI₅₀ (concentration inhibitrice médiane) calculée à l'aide du logiciel OriginLab.

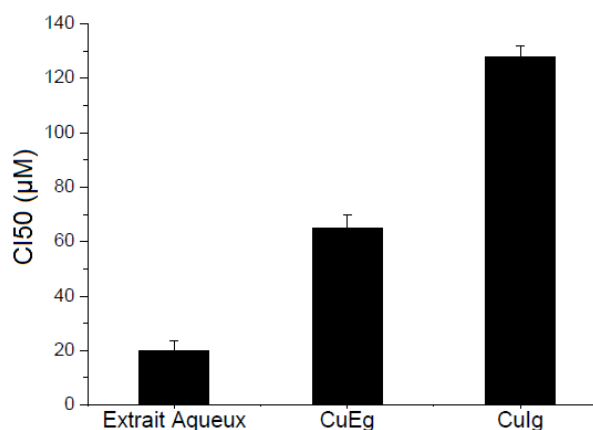


Figure 30 : CI₅₀ de l'extrait aqueux de *C. colocynthis*, de sa fraction CuE_g et de sa fraction CuI_g sur la lignée cellulaire HeLa après 48 h.

Cellules HeLa traitées par différentes concentrations d'extrait aqueux, CuE_g ou Cul_g pendant 48 h. Les CI₅₀ sont déterminées en utilisant le logiciel OriginLab. Les CI₅₀ présentées sont la moyenne de trois expériences ± SE.

Dans un deuxième temps, la croissance de cellules HeLa, en présence de cucurbitacine E et I glycosylées et leurs aglycones, a été suivie par comptages en cellule de Malassez. Les courbes de croissance obtenues sont présentées en figure 31. En présence de DMSO seul (témoin), et des CuE_g ou CuI_g, la croissance des cellules HeLa est linéaire pendant les 96 h de l'expérience. Le traitement des cellules par les cucurbitacines (100 nM) provoque une réduction massive de leur croissance qui peut être due à un arrêt du cycle et/ou l'induction de la mort cellulaire. En présence de la CuE_g, ou la CuI_g, à une concentration de 100 nM, la croissance des cellules HeLa se poursuit de façon exponentielle jusqu'à 96 h comme dans le cas du témoin.

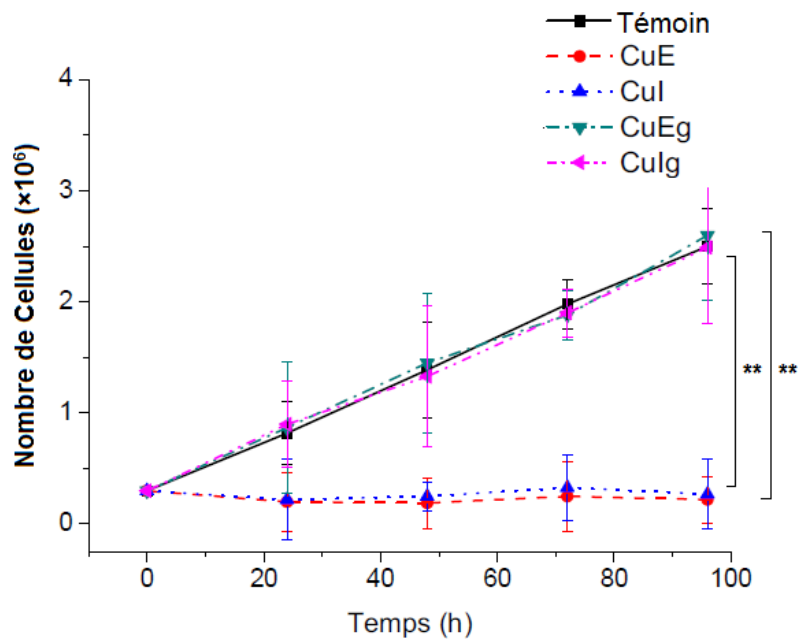


Figure 31 : Croissance de cellules HeLa en absence ou en présence de différentes formes de cucurbitacines.

Cellules HeLa cultivées pour des durées variables (0-96 h) en présence de DMSO 0,01% (Témoin), ou de cucurbitacines glycosylées (CuE_g, CuI_g), ou de leur aglycone (CuE, CuI) à 100 nM. Le nombre de cellules présenté est la moyenne de trois expériences \pm SE. L'effet des cucurbitacines non glycosylées est statistiquement significatif comparé à leurs formes glycosylées (** p < 0,005).

II.2.2 Impact des différentes cucurbitacines sur la morphologie et le cytosquelette d'actine de cellules HeLa

Les résultats de la prolifération cellulaire ont été mis en regard d'observations en microscopie de cellules HeLa traitées, pour des temps variables, par les cucurbitacines glycosylées E et I et leurs aglycones (figure 32).

Dans les cellules HeLa témoins (traitées par le DMSO seul), la microscopie en phase montre un agencement typique des cellules en tapis jointif qui adhèrent au support par des prolongements cellulaires. Dans ces cellules, l'actine marquée par la phalloïdine-rhodamine et visualisée par microscopie à fluorescence laisse voir une forte densité de fibre de stress (milieu de culture supplémenté en SVF 5%). Après 2 h de traitement par les CuE ou CuI à une concentration de 10 nM, la morphologie des cellules HeLa reste inchangée comme dans le témoin, mais le marquage à la phalloïdine-rhodamine révèle la présence de fibres de stress et la formation de nombreux agrégats punctiformes d'actine, qui deviennent de larges agrégats juxtanucléaires après 24 h. Par contre, lorsque les cellules sont traitées à 100 nM

correspondant aux CI_{50} des CuE et CuI, on constate que la morphologie est massivement altérée, les cellules sont rétractées, de forme plus au moins arrondies (distorsion), et souvent plus petites après 24 h. L'actine forme de larges agrégats après 24 h qui enclavent le noyau. De plus, le marquage de l'ADN au DAPI permet d'observer une multinucléation dans les cellules traitées par les CuE ou CuI après 24 h ce qui laisse penser que ces composés inhibent la cytokinèse, la dernière étape de la mitose qui prend place une fois que le génome est ségrégué en deux noyaux. Cependant, en présence de cucurbitacines glycosylées (CuE_g, CuI_g) et à des concentrations similaires à celles que l'on a utilisé pour leurs aglycone, aucun effet sur la morphologie et le cytosquelette d'actine n'est observé. Ces résultats sont en parfait accord avec les tests précédents de mesure de viabilité cellulaire qui montrent une différence majeure entre les formes glycosylées et leurs aglycones.

II.2.3 Analyse du cycle cellulaire

Afin de caractériser le mécanisme conduisant à la multinucléation, nous avons suivi des ensembles de cellules HeLa par vidéomicroscopie en contraste de phase. De façon surprenante, nous constatons que la cucurbitacine I induit un changement morphologique massif de façon extrêmement rapide. En effet, les cellules commencent à former des blebs (dès les premières minutes d'incubation) puis se rétractent en quelques minutes. La rétraction cellulaire persiste pendant environ 10 h, temps pendant lequel la duplication du noyau se poursuit de façon étonnamment normale. La vidéomicroscopie met enfin en évidence, un défaut d'abscission conduisant à une non séparation des deux futures cellules filles comme cela est illustré sur la figure 33. Ce résultat est cohérent avec nos observations précédentes puisque les cucurbitacines entraînent une altération massive de l'actine qui joue un rôle déterminant dans la dernière phase de la division cellulaire, la cytokinèse, en formant un anneau contractile responsable de la séparation des deux cellules filles (Burgess, 2005).

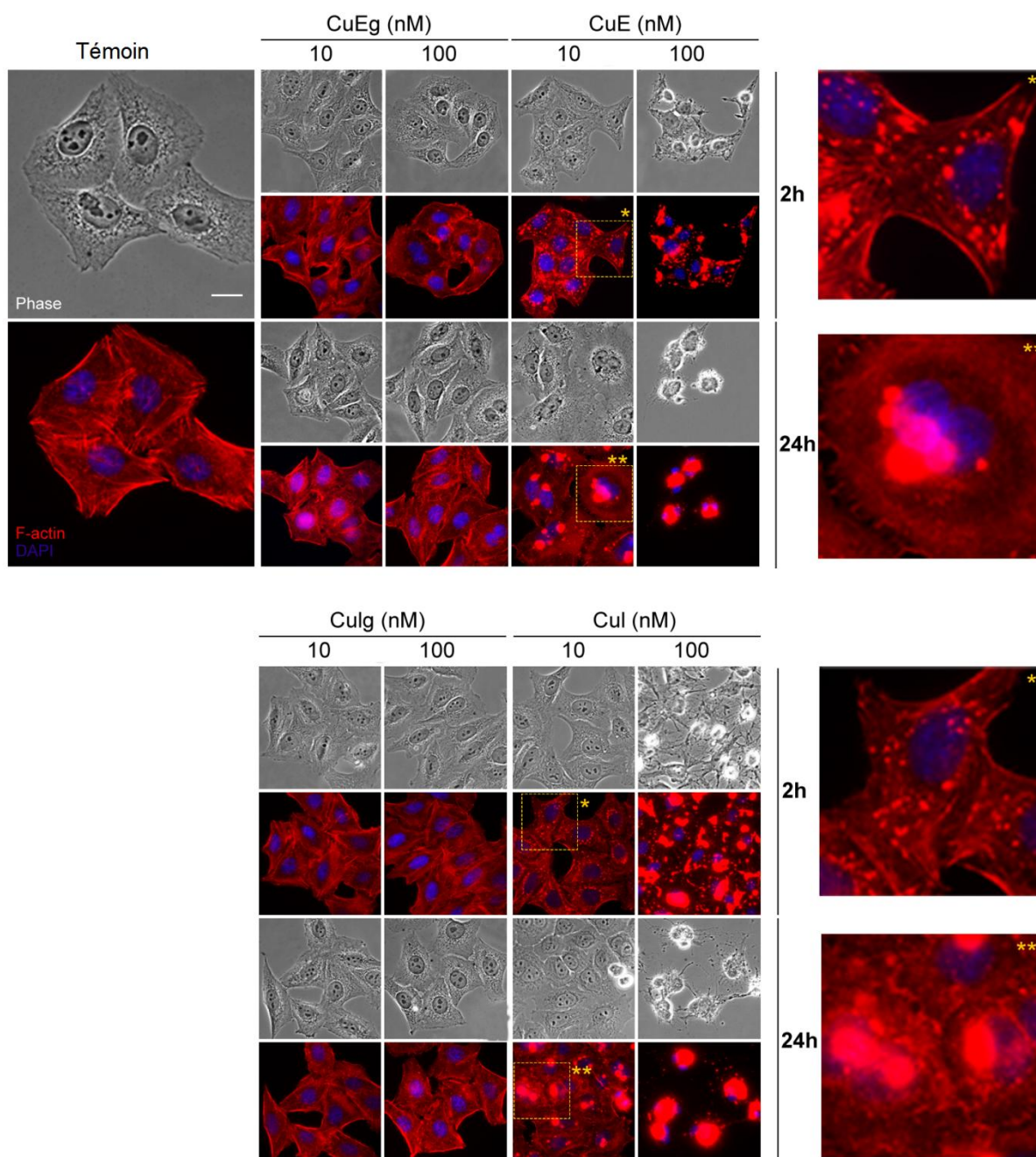


Figure 32 : Observation microscopique de cellules HeLa en présence de DMSO (Témoin), ou des cucurbitacines E et I glycosylées (CuE_g, CuI_g) et de leurs aglycones (CuE, CuI).

Cellules HeLa traitées par du DMSO 0,01% (Témoin), ou par les cucurbitacines E et I glycosylées (CuE_g, CuI_g), ou leur aglycone (CuE, CuI) à différentes concentrations (10, 100 nM) pendant 2 et 24 h. Après traitement, les cellules sont fixées et marquées à la phalloïdine-rhodamine pour visualiser l'actine (rouge) et au DAPI pour visualiser le noyau (bleu). Barre d'échelle : 20 µm.

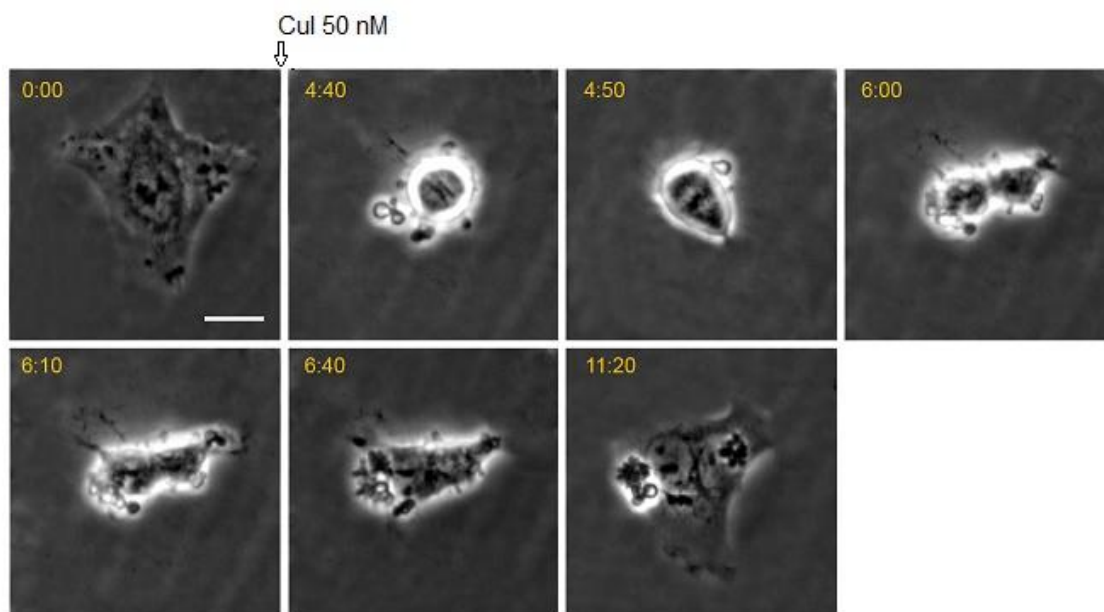


Figure 33 : Vidéomicroscopie en phase de cellules HeLa traitées par la CuI à 50 nM

Sur la figure, le temps est indiqué en heure et minutes. Barre d'échelle : 20 μ m.

Nous avons étendu ces analyses en étudiant, cette fois, les effets des cucurbitacines glycosylées et leurs aglycones sur le cycle cellulaire. Pour cela, les cellules HeLa ont été traitées dans les mêmes conditions que pour les tests de prolifération, et soumises à une analyse de la répartition des cellules dans les différentes phases du cycle par cytométrie de flux, après marquage de l'ADN à l'iodure de propidium (IP). Les résultats sont exprimés en pourcentage de cellules dans chaque phase du cycle après 24 et 48 h de traitement avec ces molécules (figure 36).

Comme le montre la figure 36, dès 24 h de traitement par les aglycones CuE et CuI à 100 nM, la répartition des cellules HeLa dans les différentes phases du cycle cellulaire est affectée. Une diminution significative du nombre de cellules en phase G0/G1 est observée, avec une augmentation du nombre de cellules avec un contenu en ADN de type 4N G2/M qui est maintenu pour des temps de traitement plus longs (par exemple à 48 h, 12% de cellules HeLa avec ce contenu pour le témoin vs 46 et 38 % après le traitement par CuE et CuI à 100 nM, respectivement). Il apparaît aussi un pic sub-G1, caractéristique d'une population apoptotique, quand les cellules HeLa sont traitées avec 100 nM de CuE (7,8 et 10,7 % après 24 et 48 h respectivement), de façon cohérente avec le fait que cette concentration est supérieure à l' CI_{50} .

Cependant, en présence des cucurbitacines glycosylées CuE_g, CuI_g (100 nM), nous n'observons pas d'accumulation des cellules HeLa dans une phase spécifique du cycle cellulaire, ni à 24, ni à 48 h d'incubation.

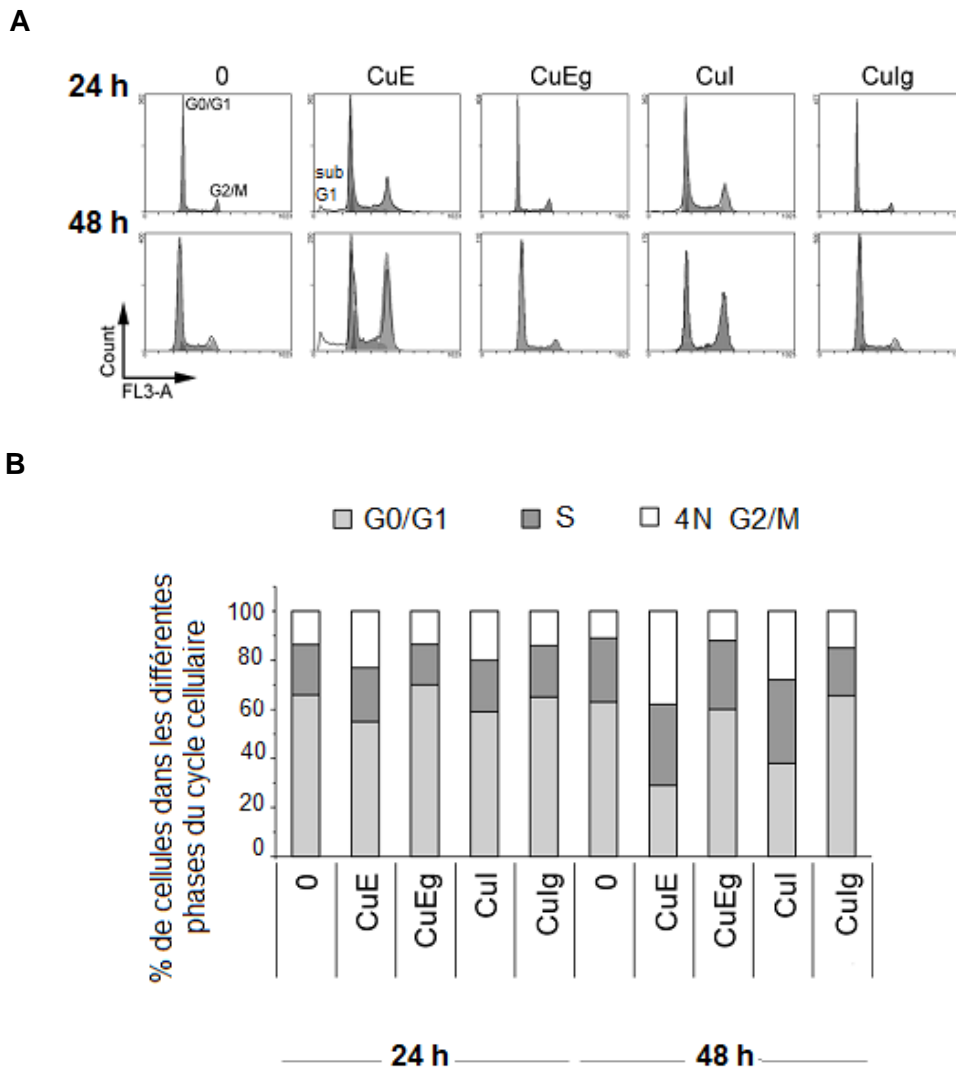


Figure 34 : Répartition des cellules HeLa dans les différentes phases du cycle cellulaire en réponse aux cucurbitacines E et I glycosylées (CuE_g, CuI_g) et leur aglycone (CuE, CuI) après 24 ou 48 h.

Cellules HeLa traitées par le DMSO 0,01% (Témoin), ou par les cucurbitacines E et I glycosylées (CuE_g, CuI_g), ou leur aglycone (CuE, CuI) à une concentration de 100 nM, pendant 24 et 48 h. L'analyse du cycle cellulaire par incorporation d'Iodure de Propidium est effectuée en cytomètre de flux.

A : Exemple représentatif du profil de distribution des cellules HeLa dans le cycle après 24 et 48 h de traitement en absence (0) ou en présence de 100 nM de cucurbitacines (CuE_g, CuI_g, CuE, CuI).

B : évolution de la distribution des cellules HeLa, traitées ou non avec 100 nM de cucurbitacine, dans les différentes phases du cycle après 24 et 48 h de traitement. Les valeurs correspondent à la moyenne de 3 expériences indépendantes \pm SE.

II.2.4 Effets des cucurbitacines sur la voie JAK2/STAT3

La protéine STAT3 (signal transducer and activator of transcription) est impliquée dans de nombreux processus liés à la prolifération cellulaire, et cette voie est anormalement activée dans de multiples cancers. De ce fait, elle est considérée comme étant une cible thérapeutique potentielle. Le facteur de transcription STAT3 est présent dans le cytoplasme des cellules à l'état inactif. Son activation résultant de sa phosphorylation. Elle est initiée par la liaison de différents facteurs de croissance à leurs récepteurs comme l'EGF (epidermal growth factor), le PDGF (platelet-derived growth factor) ou l'HGF (hepatocyte nuclear factor) (Boccaccio *et al.*, 1998) ou des cytokines comme l'IL-6 (interleukin 6). Ces récepteurs activés phosphorylent directement STAT3 grâce à leur propre activité tyrosine kinase ou de manière indirecte par l'intermédiaire de kinases cytoplasmiques comme JAK (janus kinase). Par exemple, la liaison de l'IL-6 sur son récepteur membranaire gp130 va entraîner la dimérisation du récepteur, l'activation des kinases JAK2 (par phosphorylation) et la phosphorylation de STAT3 sur le résidu tyrosine 705 (Yu *et al.*, 2009). En se fixant sur le promoteur de ses gènes cibles, STAT3 régule la prolifération cellulaire, l'entrée en phase S du cycle cellulaire (en activant les gènes de la cycline D et de cd25A) mais aussi la survie cellulaire (en activant la transcription de gènes anti-apoptotiques, Bcl-xl et Bcl2), l'angiogénèse, la mobilité cellulaire et le développement tumoral (Catlett-Falcone *et al.*, 1999; Fukada *et al.*, 1998; Puthier *et al.*, 1999).

De nombreux travaux ont montré l'effet inhibiteur de certaines cucurbitacines sur l'activation des protéines JAK2 et STAT3 dans les lignées cancéreuses mais ces résultats restent controversés. En effet, plusieurs études ont montré que de fortes concentrations de cucurbitacines E, I ou B sont nécessaires pour inhiber l'activation de la protéine STAT3 dans les cellules cancéreuses (Banerjee *et al.*, 2010; Blaskovich *et al.*, 2003; Sun *et al.*, 2010; Sun *et al.*, 2005; Yuan *et al.*, 2014), alors que pour de faible concentration (de l'ordre du nanomolaire) aucun effet n'est observé (Lopez-Haber and Kazanietz, 2013; Nakashima *et al.*, 2010; Yasuda *et al.*, 2010).

Nous avons de notre côté, examiné l'effet de cucurbitacines glycosylées et de leurs aglycones sur l'activité des protéines JAK2 et STAT3 dans des cellules HeLa. Après traitement des cellules par les CuE et CuI à une forte concentration (10 μ M) pendant 4 h, une inhibition de la phosphorylation des protéines JAK2 (sur la tyrosine 1007/1008) et de STAT3 (sur la tyrosine 705) est observée, équivalente à l'inhibition observée avec la tyrphostine

AG490 utilisée ici comme témoin positif (inhibe JAK2 et bloque l'activation de STAT3). À l'inverse les formes glycosylées ne préviennent pas la phosphorylation de STAT3 et de JAK2 dans ces cellules (figure 35). De plus, les cucurbitacines glycosylées ou non glycosylées ne changent pas l'expression de STAT3 ou de JAK2 (figure 35).

Cependant, il est important de préciser que le traitement des cellules HeLa par de faibles concentrations de CuE et CuI (de l'ordre du nanomolaire) pour lesquelles une agrégation massive de l'actine est observé, ne préviennent pas la phosphorylation des protéines JAK2 et de STAT3.

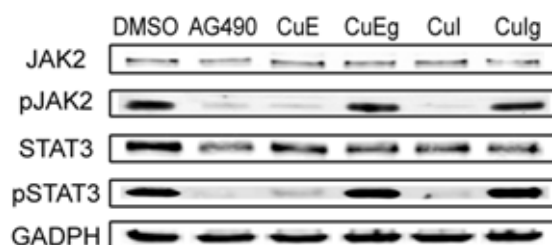


Figure 35 : Effet des cucurbitacines E et I glycosylées et leur aglycone sur la phosphorylation des protéines JAK2 et STAT3 suite à la stimulation par l'IL-6

Cellules HeLa traitées par le DMSO 0,01% (Témoin), AG490 (inhibiteur de JAK2/STAT3) ou les cucurbitacines E et I glycosylées (CuE_g, CuI_g), ou leur aglycone (CuE, CuI) à une concentration de 10 μM, pendant 4 h. Suite à la stimulation par l'IL-6 (20 ng/mL, pendant 30 min), la phosphorylation de STAT3 et JAK2 a été analysée par western blot en utilisant des anticorps polyclonaux dirigés contre la forme totale de STAT3 et de JAK2, ainsi que sur la forme phosphorylée sur la tyrosine 705 de STAT3 et la forme phosphorylée sur la tyrosine 1007/1008 de JAK2. GADPH est utilisée comme témoin de charge protéique.

III. Discussion et Conclusion

Les triterpénoïdes sont une classe de métabolites secondaires qui regroupent des composés dérivés d'une unité à 30 carbones et représentent le plus grand groupe de composés phytochimiques. Il a été estimé que plus de 20 000 triterpénoïdes existent dans la nature (Liby *et al.*, 2007). Les nombreuses activités biologiques de ces molécules en font un groupe de produits naturels de première importance. Ils sont fréquemment rencontrés dans la nature sous une forme glycosylée. Le terme glycoside désigne le nom général d'un aglycone (partie non sucrée) lié de manière covalente à un hydrate de carbone par un lien O-glycosidique, C-glycosidique ou N-glycosidique selon le type d'atome impliqué dans la liaison. Il est généralement accepté que les glycosides présentent une plus grande hydrosolubilité que leurs aglycones respectifs (Kren and Martinkova, 2001). C'est pourquoi, dans la plante, les glycosides jouent un rôle essentiel dans les phénomènes d'accumulation, de stockage et de transport des substances hydrophobes. En revanche, les formes glycosylées sont en règle moins actives ce qui permet le stockage des molécules par la cellule à l'extérieur d'une vacuole et protège ainsi la plante contre une toxicité ou bioactivité potentielle de l'aglycone libre (de Roode *et al.*, 2003; Gauthier *et al.*, 2006).

Au cours de ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés aux composés triterpéniques issus de *C. colocynthis*. Dans un premier temps, des extraits bruts obtenus à partir des graines de cette plante ont été analysés par HPLC. Deux composés majoritaires ont été mis en évidence, ainsi que deux composés minoritaires. Une purification par HPLC de ces extraits bruts a permis d'isoler deux composés majoritaires, les cucurbitacine E et I glycosylées (CuE_g, CuI_g) conformément avec des données publiées précédemment (Seger *et al.*, 2005).

Dans un second temps, l'activité des cucurbitacines E et I glycosylées isolées (CuE_g, CuI_g) a été évaluée sur la prolifération des cellules HeLa, et comparée à l'effet induit par leur aglycone (CuE, CuI). Cette activité a été caractérisée à l'aide des tests colorimétrique MTT et au bleu de trypan. Lorsque les cucurbitacines E et I non glycosylées sont administrées à des cellules proliférant normalement, ces dernières induisent, pour des concentrations comprises entre 50 et 150 nM, un ralentissement significatif de la croissance cellulaire par rapport à leur forme glycosylée respective. Cet arrêt de la prolifération est la conséquence d'une accumulation des cellules en phase G2/M du cycle cellulaire. Parallèlement à cet impact sur la prolifération cellulaire, nous avons observé des modifications morphologiques majeures, une

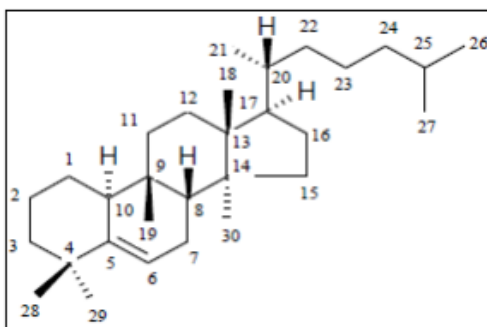
multinucléation et une altération massive de l'actine du cytosquelette engendrés par les formes aglycones de ces cucurbitacines, et ce toujours à des concentrations de l'ordre du nM. A l'inverse, les concentrations de cucurbitacines glycosylées (CuE_g ou de CuI_g) nécessaires pour ralentir la prolifération cellulaire d'une ampleur similaire à leur forme aglycone sont environ 1000 fois plus importants. En effet, les CuE_g et CuI_g présentent une concentration inhibitrice moyenne CI₅₀ comprise entre 60 et > 100 µM, respectivement, sur les cellules HeLa, alors que celles des CuE et CuI sont entre 72 et 100 nM respectivement.

Nous avons dans un deuxième temps montré que les voies de signalisation impliquées dans l'inhibition de la prolifération et l'augmentation de la population cellulaire avec un contenu d'ADN de type 4N G2/M induites par la CuE et CuI dans les cellules HeLa s'accompagnent à très forte concentration (10 µM) d'une inhibition de la phosphorylation de la protéine STAT3 précédant l'inhibition de la protéine JAK2. Cet effet n'est significatif que pour les formes non glycosylées de cucurbitacines E et I, les formes glycosylées n'ayant pas en effet d'impact notable sur ces voies. Il est très important de préciser que l'inhibition de la voie JAK2/STAT3 n'est pas observée lorsque les aglycones de cucurbitacines E et I sont administrés à des concentrations nanomolaires, alors que l'ensemble des effets biologiques majeurs sont présents (altération morphologique et du cytosquelette d'actine). Ces résultats suggèrent que d'autres mécanismes moléculaires sont responsables de ces effets biologiques.

L'effet antiprolifératif des aglycones de cucurbitacines E et I a été montré sur plusieurs lignées de cellules cancéreuses du foie, du colon, du sein, de l'ovaire, de la prostate, de leucémies/lymphome et de mélanome (Duncan *et al.*, 1996; Jayaprakasam *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2014b; Konopa *et al.*, 1974; Li *et al.*, 2010; Nakashima *et al.*, 2010; Shi *et al.*, 2006; Su *et al.*, 2008; Sun *et al.*, 2010; van Kester *et al.*, 2008). Des études de type relation-structure-activité réalisées pour ces cucurbitacines suggèrent que certains groupements chimiques sont importants pour que ces molécules puissent exercer une activité antitumorale, tout au moins *in vitro* (Duncan *et al.*, 1996; Frei *et al.*, 1998). La chaîne latérale en C17 semble ainsi indispensable à l'inhibition de la prolifération des cellules cancéreuses. De même, la présence d'une fonction cétone en C3 et en particulier sa combinaison avec groupement hydroxyle en C2 semble aussi essentielle, puisqu'il a été montré que la glycosylation des cucurbitacines D et B en C2 ne présentent pas d'activité biologique (Frei *et al.*, 1998). Des études réalisées par d'autres auteurs montrent que la cytotoxicité des cucurbitacines envers la lignée HepG2 de cancer du foie humain augmente avec leur hydrophobicité (Bartalis and Halaweish, 2005). Ainsi, on peut justifier nos résultats par le fait

que les aglycones des cucurbitacines E et I de nature hydrophobe peuvent traverser plus facilement les membranes biologiques où elles peuvent manifester leurs activités biologiques, alors que, la présence d'un glucose augmente grandement la polarité et le volume de ces structures ce qui peut restreindre ou inhiber la diffusion de ces dernières à travers la membrane cellulaire.

D'un point de vue quantitatif, nous avons montré que la CuE est plus efficace que la CuI sur les cellules HeLa, mais l'effet n'est pas statistiquement significatif tant au niveau de l'arrêt de la prolifération que de l'accumulation en phase G2/M. Ces résultats corroborent cependant, des travaux antérieurs, sur les lignées cellulaires leucémiques (U937), où il a été montré que la présence du groupe acétyle en C25 dans la CuE rend son effet cytotoxique beaucoup plus important que celui de la CuI qui possède un groupe hydroxyle en C25 (Nakashima *et al.*, 2010).



Pour rappel, la Structure de base des cucurbitanes [19-(10→9β)-abeo-10α-lanost-5-ène]

A ce stade de notre étude, l'ensemble de nos données constitue un faisceau d'arguments qui plaident clairement en faveur d'une perte d'activité des cucurbitacines lorsqu'elles sont glycosylées. Afin de déterminer le mécanisme d'action des cucurbitacines sur l'agrégation d'actine, nous avons décidé de poursuivre les investigations avec la cucurbitacine I non glycosylée plutôt qu'avec la cucurbitacine E, car moins d'étude y ont été consacrées.

DEUXIEME PARTIE

Depuis plusieurs années, les recherches s'intensifient pour élucider le mécanisme d'action des cucurbitacines sur le cytosquelette d'actine, mais les résultats restent controversés. C'est dans ce contexte que s'inscrit la seconde partie de notre travail qui aura pour objectif d'approfondir la connaissance des mécanismes pouvant expliquer l'agrégation de l'actine en se focalisant principalement sur la cucurbitacine I et dans les cellules HeLa. Les hypothèses majeures émises ont été décrites dans la section « Résultats ».

I. Matériels et Méthodes

I.1 Produits chimiques utilisés

Tableau 6 : Produits chimiques utilisés lors des expérimentations.

<i>Produit chimique</i>	<i>Origine</i>	<i>Effets rapportés dans la littérature</i>
Cucurbitacine I (CuI)	Sigma Aldrich, UK	Inhibiteur JAK2/STAT3 aux doses micromolaire
N-AcétylCystéine (NAC)	Sigma Aldrich, Chine	Antioxydant, précurseur du glutathion
Glutathion Réduit (GSH)	Sigma Aldrich, Japon	Antioxydant
Vitamine E (Vit E)	Sigma Aldrich, Allemagne	Antioxydant
Vitamine C (Vit C)	Sigma Aldrich, Chine	Antioxydant
Quercétine	Sigma Aldrich, USA	Antioxydant
N ω -Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride (L-NAME)	Sigma Aldrich, USA	Inhibiteur de l'oxyde nitrique (NO) synthase
Diphenyleneiodonium chloride (DPI)	Sigma Aldrich, Israël	Inhibiteur de la NADPH oxydase
Sodium 4,5-dihydroxybenzene-1,3-disulfonate (Tiron)	Sigma Aldrich, Allemagne	Piègeur des ions superoxydes
Lanthane (III) chlorure (Lanthanum)	VWR, Belgique	Inhibiteur des canaux calciques de type L et T
BAPTA-AM	Tocris Bioscience, UK	Chélateur de calcium intracellulaire
Acide Ethylèneglycol Tétracétique (EGTA)	Sigma Aldrich, USA	Chélateur calcique
Nimodipine	Sigma Aldrich, USA	Antagoniste des canaux calciques voltage-dépendants de type L

Acide Cyclopiazonique (CPA)	Tocris Bioscience, UK	Inhibiteur du transporteur calcique du réticulum endoplasmique lisse (pompe SERCA)
Nocadazole	Sigma Aldrich, Israël	Dépolymérisation des microtubules
Taxol	Sigma Aldrich, USA	Stabilisation des microtubules
BMS3	SYNKinase, Chine	Inhibiteur de LIM Kinase
Blebbistatine	Sigma Aldrich, USA	Inhibiteur de la myosine II ATPase
Y27632	Sigma Aldrich, USA	Inhibiteur de ROCK

Les structures chimiques des composés utilisés sont présentées en annexe 2.

I.2 Culture cellulaire

La lignée cellulaire HeLa a été mise en culture selon le protocole décrit dans Matériels et Méthodes, en première partie.

Les cultures primaires de neurones corticaux de souris sauvages (DIV7) m'ont été fournies par le Docteur Andrea Burgo du laboratoire SABNP U829. Ces cellules sont cultivées dans du HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) additionné en HEPES (acide 4-[2-hydroxyéthyl]-1-pipérazine éthane sulfonique) 20 mM et maintenue dans une étuve à 37°C en atmosphère humide contenant 5 % CO₂.

I.3 Préparation des vecteurs codant la β -actine-GFP mutée

I.3.1 Construction de plasmide codant pour l'actine portant la mutation C374A et fusionnée avec la GFP (EGFP/ β -actine C374A)

L'insert β -actine est amplifié par PCR à partir d'une banque de cDNA fabriquée par rétrotranscription d'ARN poly-A de cellules HeLa, en utilisant des oligonucléotides complémentaires aux parties 5' et 3' codantes de la β -actine et additionnés en 5' de séquences reconnues par des enzymes de restriction nécessaires au clonage dans le MCS du vecteur pEGFP (voir ci-dessous). Séquences des oligonucléotides utilisés pour la PCR :

Mutant	Amorce sens
	Amorce anti sens
C257A	5' CAATGAGCGGTTCCGG GCT CCGGAGGCGCTGTTCC 3'
	5' GGAACAGCGCCTCCGG AGCC CGGAACCGCTCATTG 3'
C272A	5' GGCATGGAGTCC GCT GGCATCCACGAAAC 3'
	5' GTTTCGTGGATGCC AGC GGACTCCATGCC 3'

Le protocole et les solutions utilisées pour la réaction d'amplification, la digestion du plasmide natif, ainsi que les bactéries compétentes (XL-10 Gold) sont fournis dans le QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, USA).

Le criblage des clones mutés est fait par séquençage après avoir purifié une petite quantité du plasmide par «Qiagen Mini-Prep kit». Des grandes quantités du plasmide muté sont ensuite préparées en utilisant le «Qiagen Maxi- Prep kit ».

I.4 Transfection cellulaire

La transfection des cellules HeLa se fait au moyen de la Lipofectamine®2000 (Invitrogen, USA) selon le protocole décrit par ce fabricant. La Lipofectamine®2000 est un lipide cationique qui va former une micelle autour du plasmide et c'est la micelle qui aura la capacité de traverser la membrane des cellules. Brièvement, 24 h avant la transfection, les cellules sontensemencées dans des boîtes de 24 puits à raison de 5×10^4 mL⁻¹ cellules/puit de façon à atteindre ~90 % de confluence au moment de la transfection. La lipofectamine®2000 diluée au 1/100 dans du opti-MEM (sans sérum et sans antibiotique) est mixée avec 1 µg d'ADN β-actine-EGFP sauvage et muté (C374A, C257A, C272A), dilué dans du opti-MEM (sans sérum et sans antibiotique). 20 min après, le complexe est déposé immédiatement goutte à goutte sur les cellules HeLa (qui, au préalable, sont incubées dans un milieu sans sérum et sans antibiotiques). Une incubation pendant 4 h à 37°C, 5% CO₂ en présence du complexe est indispensable pour assurer la bonne transfection des cellules. Ces dernières sont ensuite lavées avec du PBS 1X, avant de remettre un milieu de culture complet avec 10 % de sérum. Les expériences d'immunofluorescence sont réalisées 24 h après la transfection.

I.5 Traitements cellulaires

Les cellules sont cultivées jusqu'à 60 % de confluence sur des lamelles de verre stérilisées. 24 h après ensemencement, les cellules sont traitées avec des concentrations connues de molécules commerciales (tableau 6). Parallèlement à cela, les témoins reçoivent le

même volume de solvant que les cellules traitées (maximum 1 % (v/v) pour le DMSO). Les cultures sont ensuite incubées à 37°C pour des périodes de temps variables.

I.6 Immunofluorescence

La préparation des échantillons suit le même procédé que celui exposé dans la première partie de cette thèse. Les échantillons sont incubés dans le tampon de saturation avec les anticorps primaires anti-myosine IIA (dilution 1:50, Cell Signaling Technology), anti-pMLC (dilution 1:50, Cell Signaling Technology), anti-cofiline (1:1000, Santa Cruz) et anti- β -tubuline (dilution 1:2500) pendant une nuit. Les échantillons sont ensuite rincés avec du PBS 1X puis incubés avec les anticorps secondaires (dilution 1:2500) couplés à des fluorochromes (Alexa Fluor 488, Invitrogen) et la phalloïdine – rhodamine (dilution 1:1000, Invitrogen) utilisé pour le marquage de l'actine. Après rinçage au PBS 1X, les lamelles recouvertes de cellules sont montées sur des lames de verre à l'aide du milieu de montage. La fluorescence émise est ensuite analysée à l'aide d'un microscope Zeiss Axioplan 2.

I.7 Evaluation du stress oxydant intracellulaire

I.7.1 Sonde fluorescente : H2DCF-DA

Certaines sondes fluorescentes détectent la production cellulaire d'espèces radicalaires. Ces sondes sont des marqueurs du stress oxydant via le piégeage de radicaux. La sonde la plus utilisée est la dichlorofluoresceine diacetate (H2DCF-DA). Elle a la caractéristique de pénétrer dans les cellules et de s'accumuler dans le cytosol. Le H2DCF-DA est une petite molécule non polaire, non fluorescente qui diffuse librement dans les cellules dans lesquelles elle sera déacétylée par les estérases intracellulaires en un composé polaire et non fluorescent. En présence d'espèces réactives de l'oxygène (ERO), et plus particulièrement en présence de peroxyde d'hydrogène, ce composé va être rapidement oxydé en 2',7'-dichlorofluoresceine (H2DCF), qui fluoresce à 535 nm quand il est excité à 485 nm. La fluorescence résultante sera donc proportionnelle à la concentration en ERO intracellulaires. Cette sonde permet la détection des espèces RO^{\bullet} , ROO^{\bullet} , $NO^{\bullet 2}$, $^{\bullet}OH$, et $^{\bullet}NO$.

I.7.1.1 Détection qualitative

Les cellules (3×10^5 cellules/boîte de 32 mm de diamètre) sont incubées avec la sonde fluorescente H2DCF-DA 5 μ M dans DMSO (Sigma Aldrich, USA) pendant 30 min à 37°C, dans un milieu DMEM sans rouge phénol. Le milieu est renouvelé et la boîte est placée dans

la chambre d'incubation d'un vidéomicroscope (Axiovert 220, Carl Zeiss MicroImaging, Jena, Germany) (voir section 1.5.6 de la première partie). L'acquisition se fait pendant 30 min. une image est prise après 1 min de traitement des cellules par la cucurbitacine I (100 nM, DMSO), puis après 5, 10, et 30 min. L' H_2O_2 est utilisé comme témoin positif (1 mM pendant 5 min). Des cellules non traitées servent de témoin pour une éventuelle autofluorescence. C'est une méthode facile d'utilisation mais elle ne permet pas de déterminer la quantité d'ERO induite par la cucurbitacine I.

I.7.1.2 *Détection et quantification*

Après traitement par la cucurbitacine I (à 100 nM à différents temps) et par l' H_2O_2 (1 mM pendant 5 min), la totalité des cellules (3×10^5 cellules) est récupérée et lavée au PBS 1X. Les cellules sont ensuite marquées au H2DCF-DA (5 μM dans DMSO). Après 15 min d'incubation à l'obscurité, l'analyse des échantillons est réalisée par cytométrie en flux (FACSCalibur).

I.8 Mesure du pouvoir antioxydant de la cucurbitacine I

Les propriétés antioxydantes sont évaluées au moyen de tests simples par spectrophotométrie UV-visible avec des radicaux stables tels que le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH \cdot) et par Résonance Paramagnétique Electronique (RPE).

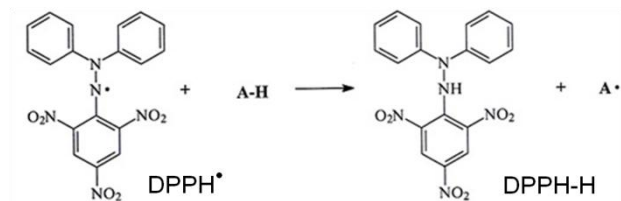
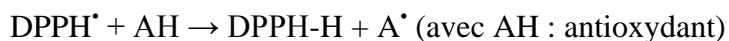
Beaucoup de tests standardisés évaluant l'activité antioxydante sont simples, peu coûteux et rapides à mettre en œuvre. Le test DPPH a été retenu dans le cadre de cette étude (Belkheiri *et al.*, 2010; Kordali *et al.*, 2005). Des modifications ont été, cependant, apportées afin de l'optimiser et de l'adapter à nos conditions.

I.8.1 Test DPPH

I.8.1.1 *Principe*

La méthode DPPH consiste à utiliser le radical DPPH \cdot (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) de couleur violette foncée et disponible commercialement (Sigma Aldrich, Chine). Le principe du test est le suivant : l'addition du radical DPPH \cdot à une solution méthanolique (ou éthanolique) contenant un composé potentiellement antioxydant (AH) et pouvant céder un atome d'hydrogène entraîne une diminution de la coloration violette caractéristique de l'apparition de la forme réduite du DPPH. La perte de couleur, qui est suivie par

spectrophotométrie à 517 nm, reflète la capacité réductrice de l'antioxydant vis-à-vis du radical DPPH[•] selon le mécanisme suivant :



Le choix de ce test était adéquat puisque le maximum d'absorption de la cucurbitacine I (figure 36) ne se situe pas dans la zone d'absorption du radical DPPH[•] à 517 nm.

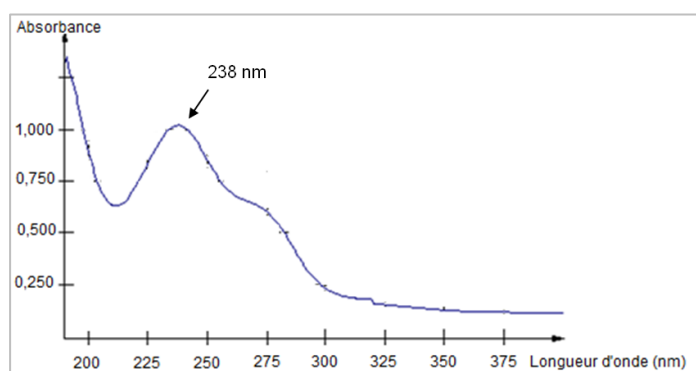


Figure 36 : Spectre d'absorbance de la cucurbitacine I (100 μM, DMSO)

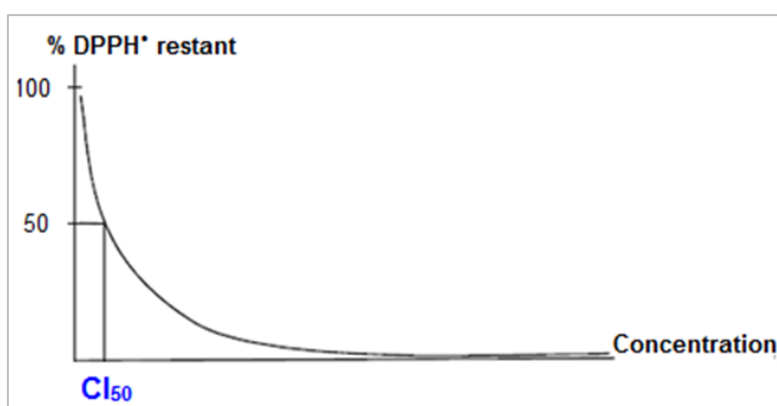
I.8.1.2 Conditions expérimentales

Une solution de DPPH méthanolique (75 μM) est préparée le jour des analyses car ce radical se dégrade à la lumière, par suite l'absorbance de la solution de couleur violette est de 0,93 à 517 nm. Une solution mère (fraîche) de vitamine C est réalisée à 1 mM dans le méthanol. La cucurbitacine I est également dissoute dans du méthanol à un stock de 10 mM.

Pour chaque composé, différentes concentrations sont ajoutés à 200 μL de solution de DPPH[•] (75 μM). La variation de l'absorbance à 517 nm est alors mesurée immédiatement et durant 60 min. L'ensemble des mesures permet de tracer pour chaque concentration une courbe du suivi cinétique de la réaction. À partir de ce graphique, le pourcentage de DPPH restant est relevé pour chaque concentration lorsqu'un plateau est atteint (selon la formule ci-dessous). Cela signifie que la mesure du pouvoir antioxydant n'est possible que pour des

cinétiques de réaction permettant d'atteindre un plateau avant 60 min, sachant que plus le plateau est obtenu tôt, plus la cinétique de la capture du radical DPPH^{*} par l'antioxydant est élevée. Les valeurs obtenues sont ensuite reportées sur un autre graphique représentant le pourcentage de DPPH restant en fonction des concentrations d'antioxydants [antioxydant] f/ [DPPH] f (figure ci-dessous). Cela permet de déterminer l'CI₅₀ de l'antioxydant, qui est la concentration d'antioxydant nécessaire pour diminuer de 50 % la concentration de DPPH initial. Pour chaque concentration, l'expérience est réalisée 3 fois.

$$\% \text{ DPPH résiduel} = \frac{\text{DPPH résiduel (absorbance mesurée au plateau à } t_f)}{\text{DPPH initial (absorbance DPPH mesurée à } t_0)} \times 100$$



Plus la valeur de l'CI₅₀ est faible, plus le composé est antioxydant. Le problème que pose ce radical est son instabilité à la lumière. Son absorbance à 517 nm décroît sans l'intervention d'un quelconque antioxydant. C'est pourquoi les tests réalisés avec le DPPH se font impérativement dans l'obscurité.

I.8.2 Etude par Résonance Paramagnétique Nucléaire (RPE) : réaction de Fenton

I.8.2.1 *Principe*

La résonance paramagnétique électronique (RPE), également connue sous le nom de résonance de spin électronique, est une technique spectroscopique qui permet d'étudier et de détecter les espèces comportant un ou plusieurs électrons célibataires. Cette méthode peut donc s'appliquer à l'étude des radicaux libres. Sa capacité à détecter de faibles concentrations

de radicaux (10^{-8} M) et sa sensibilité au mouvement et à l'environnement moléculaire, ont contribué grandement à sa popularité.

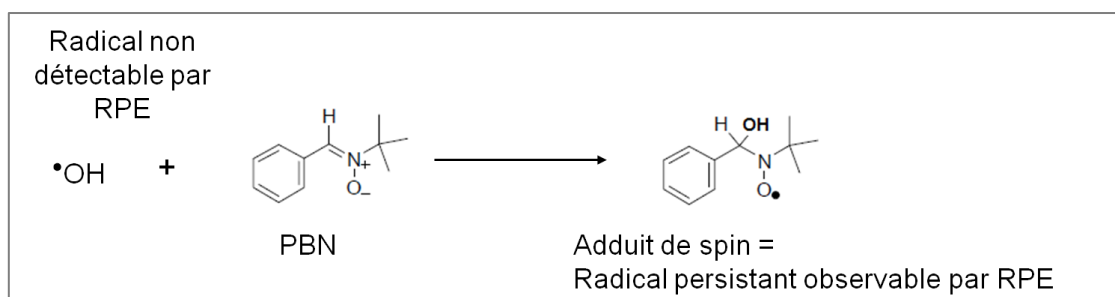
Cependant, les radicaux libres, de courte durée de vie, relèvent de systèmes réactionnels où leur concentration instantanée est très faible du fait de leur haute réactivité. Ainsi, ce problème majeur est rencontré lors de la détection et la mise en évidence d'espèces radicalaires dans les milieux vivants. En effet, très peu d'intermédiaires radicalaires impliqués dans les processus biologiques ont une durée de vie suffisante dans les conditions physiologiques pour maintenir une concentration stationnaire supérieure ou égale au seuil de détection RPE. L'observation RPE devient donc difficile et on fait ainsi généralement appel à une méthodologie de piégeage des radicaux, encore appelée « spin trapping », qui permet la formation d'adduits radicalaires plus stables et donc plus faciles à mettre en évidence (Janzen, 1984). Le principe consiste à additionner au système étudié une molécule qui va servir à piéger de façon très rapide un radical libre afin de former un nouveau radical (adduit de spin) beaucoup plus stable. C'est ainsi que les espèces radicalaires qui ne sont au départ pas détectables dans le système sont converties en radicaux de durée de vie significativement plus longue, qui vont quant à eux pouvoir s'accumuler dans le milieu afin d'être étudiés plus facilement par spectroscopie RPE. L'amplitude des raies du spectre RPE enregistré est alors proportionnelle à la quantité d'« adduit de spin » formés, et de ce fait à la concentration du radical évalué dans le milieu.

I.8.2.2 *Conditions expérimentales*

Les réactions de Fenton sont dans la plupart des cas à l'origine de la formation du radical hydroxyle $\cdot\text{OH}$, une espèce radicalaire particulièrement délétère.



La RPE permet la mesure de la capacité d'un composé antioxydant à capter les radicaux hydroxyles $\cdot\text{OH}$ générés par la réaction de Fenton par rapport à la molécule utilisée en tant que piégeur de spin, le PBN.



Les radicaux hydroxyles ont été générés par une réaction de Fenton. Les réactions ont été réalisées en présence de peroxyde d'hydrogène (100 μM , 30%; Sigma Aldrich, USA), chlorure de fer (FeCl_2 , 200 μM), α -phényl-N-tertbutylnitron (PBN, Sigma Aldrich, USA) à 3 mM dans le DMSO qui montre d'excellentes propriétés de piégeage des radicaux oxygénés de type hydroxyle (Finkelstein *et al.*, 1979; Finkelstein *et al.*, 1980), et la cucurbitacine I (CuI, 50 ou 100 nM, DMSO).

La technique et les mesures ont été réalisées en collaboration avec le Docteur Martha Cecilia Rosales-Hernandez au sein du laboratoire de biophysique et de biocatalyse à l'institut national polytechnique de Mexico (Mexique). Les spectres RPE ont été réalisés sur un spectromètre Bruker BioSpin's e-scan (Elzach, Germany) avec une fréquence de modulation : 86 kHz. Les expériences ont été conduites à une température ambiante.

I.9 Etude de l'interaction Cucurbitacine I/thiols *in vitro*

La conjugaison entre la cucurbitacine I et le N-acétylcystéine (NAC) ou le β -mercaptoéthanol (βMet) a été étudiée par résonance magnétique nucléaire (RMN). La cucurbitacine I (CuI 0,5 mM dans du DMSO-*d6*) a été incubée avec la NAC (500 mM dans du DMSO ou βMet (500 mM dans du DMSO-*d6*) pendant 72 h, à température ambiante à l'abri de la lumière. Les échantillons ont ensuite été analysés par RMN. Les spectres sont acquis à 20°C par un spectromètre Bruker Avance 600 MHz équipé d'une cryosonde. Toutes les expériences sont effectuées dans des tubes capillaires de petits diamètres, et volumes (60 μL) avec un système MATCH (Cortecnet, Paris, France). Les spectres sont analysés par le logiciel Topspin 3.1 (Bruker).

I.10 Imagerie calcique en microscopie à épifluorescence

Pour étudier la signalisation calcique en réponse à la cucurbitacine I, une sonde fluorescence sensible au Ca^{2+} , le Fluo 3-AM (ester Aceto Methoxyl de Fura, Invitrogen, USA), est utilisée. Cette technique permet de visualiser la propagation des vagues calciques

dans les cellules et de mesurer les variations de la concentration de Ca^{2+} dans le cytosol. En effet, lorsque le Ca^{2+} se lie à la sonde, elle change de conformation et sa fluorescence augmente. Par conséquent, plus il y a du Ca^{2+} dans le cytoplasme d'une cellule plus il se lie à la sonde et plus la fluorescence de la sonde augmente.

Les neurones cultivés sur des lamelles, sont incubés dans une solution contenant 10 mM HEPES pH 7,3, 145 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 11 mM glucose, 1,2 mM MgCl_2 , en présence de 2 μM de Fluo 3-AM et 20 % de pluronic[®] F-127 (un surfactant qui permet à la sonde de traverser la membrane), pendant 30 min à 37°C dans un milieu contenant 2 mM de CaCl_2 à l'abri de la lumière. A la fin de l'incubation, les cellules sont rincées dans du PBS1X afin d'éliminer la sonde en excès. Une fois préparée, la lamelle est placée dans une chambre d'incubation contenant 1 mL de milieu.

Les cellules sont observées sous le vidéomicroscope à épifluorescence (Axiovert 220; Carl Zeiss MicroImaging, Jena, Allemagne) avec un objectif à immersion 63X à huile. La sonde est excitée à 488 nm. Une première acquisition d'image permet de définir des zones d'intérêt dans les cellules avant de rajouter la cucurbitacine I à une concentration finale de 100 nM. Enfin on rajoute du KCl (50 mM) comme témoin positif. Les images sont prises toute les 6 sec pour une durée de 15 min.

I.11 Etude de l'interaction cofiline/cucurbitacine I

I.11.1 Interaction cofiline/cucurbitacine I par spectroscopie RMN

La protéine humaine recombinante cofiline 1 (Cytoskeleton ®, USA) a été préparée à une concentration stock de 5 mg/mL. Pour les études d'interaction, la cofiline 1 a été incubée avec 0,5 mM de cucurbitacine I (ratio 1:100) en absence de DTT (pour éviter la réduction des ponts disulfures) pendant 24, 48 et 72 h à 4°C dans un tampon contenant 10 mM Tris/HCl pH 8,0, puis l'échantillon a été analysé par spectroscopie RMN ^1H à 20 °C. Pour chaque molécule seule (cofiline et cucurbitacine I), le spectre RMN ^1H est enregistré afin d'observer d'éventuelles modifications engendrées après co-incubation.

I.11.2 Test de l'activité de la cofiline/LIM Kinase

I.11.2.1 *Préparation des échantillons*

La protéine humaine recombinante cofiline 1 a été reconstituée comme précédemment, mais en présence de 1 mM de DTT. La protéine LIM kinase 1 active (Merk Millipore, UK) est diluée dans 20 mM de MOPS-NaOH pH 7,0, EDTA 1 mM, 0,01 % de Brij-35, 5 % de glycerol, 0,1 % de β -mercaptoéthanol, et 1 mg/mL de BSA. La réaction kinase a été réalisée dans 15 μ L contenant 1X de tampon réactionnel (8 mM de MOPS-NaOH pH 7,0, EDTA 200 μ M), 2 ng / μ L LIM kinase 1 active, 1 mM d'ATP, 0,167 mg/mL cofiline 1 et la cucurbitacine I (glycosylée et non glycosylée) ou BMS3 pendant 30 min à 30°C. La réaction est arrêtée par addition d'un tampon de charge SDS et pour distinguer la cofiline phosphorylée de sa forme non phosphorylée, les échantillons sont séparés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide « Phos-Tag »TM.

I.11.3 Électrophorèse sur gel de polyacrylamide-Phos-TagTM

Cette technique nouvelle pour l'analyse de la phosphorylation s'appuie sur le Phos-TagTM, une molécule fonctionnelle qui lie les ions phosphorylés et de ce fait, lorsqu'elle est ajoutée dans le gel d'électrophorèse, la vitesse de migration des protéines phosphorylées diminue ce qui les séparent des protéines non phosphorylées. Elle ne nécessite pas de marquage par des isotopes radioactifs ce qui constitue un avantage certain. La figure 37 ci-dessous décrit le principe de séparation des protéines phosphorylées des non phosphorylées par l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide Phos-TagTM.

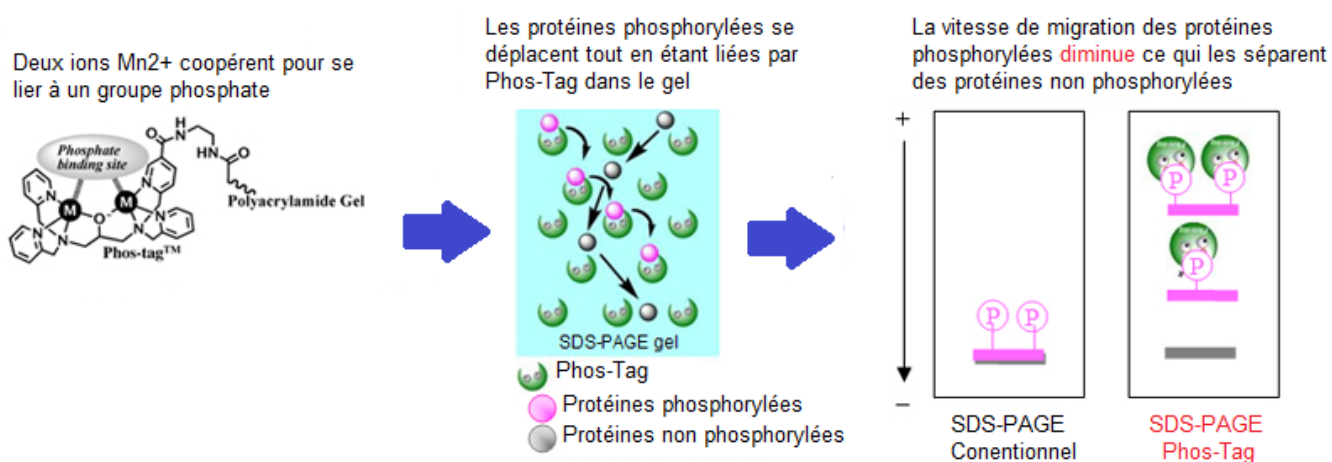


Figure 37 : Principe de l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide-Phos-TagTM (Kinoshita *et al.*, 2006).

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide-Phos-TagTM est réalisée comme décrit par Kinoshita *et al.* (Kinoshita *et al.*, 2006). Dans notre cas, nous avons préparé : 1,8 mL de gel de concentration [4,5 % (p/v) de Polyacrylamide, 125 mM de Tris-HCl (pH 6,8) et 0,1 % (p/v) de SDS], et 7 mL de gel de séparation 7 mL [10 % (p/v) de Polyacrylamide, 375 mM de Tris-HCl (pH 8,8) et 0,10 % (p/v) de SDS] dans lequel est ajouté le même volume d'acrylamide-Phos-TagTM (AAL 107 chez Wako Chemicals, Allemagne) (100 µM) et MnCl₂ (200 µM) avant la polymérisation. Après l'électrophorèse, les protéines sont fixées dans une solution aqueuse [40 % (v/v) de méthanol et 10% (v/v) d'acide acétique pendant 10 min], puis le gel est coloré par le Bleu de Coomassie Brillant pendant 1 h. Après décoloration du gel dans une solution aqueuse [25 % (v/v) de méthanol et 10 % (v/v) d'acide acétique], les protéines sont révélées à l'aide d'un système d'imagerie Odyssey (LI-COR biosciences).

I.11.4 Méthodes d'amarrage moléculaire (*docking*) de LIMK1, cucurbitacine I et BMS3

Cette étude a été réalisée en collaboration avec le Dr. Guillaume Bollot et le Dr. Cyril Bauvais fondateurs de la société *Synsight* spin off issue du laboratoire SABNP.

La formation du complexe protéine/ligand par liaison covalente se fait en deux étapes, une première étape de reconnaissance, où le ligand entre dans le site actif, puis une seconde étape où le lien covalent se forme. Le *docking* permet d'appréhender la situation lors de la première étape. Le but du *docking* est d'anticiper la possibilité qu'un ligand quelconque puisse ou non se loger dans une poche de la protéine avec une bonne affinité. Ainsi, le *docking* de chaque ligand génère un ensemble de modes de liaison appelés « poses » pour lesquelles un score est calculé. Ce score est une approximation de l'énergie de liaison du complexe (kcal/mol) et donc plus il est négatif, meilleure est l'affinité prédite. Cependant, le score en lui-même est peu informatif et il est plus intéressant de le comparer au score obtenu pour un inhibiteur confirmé de la cible kinase visée, dont l'affinité et le mode de liaison sont connus.

La structure cristalline de LIM Kinase1 humaine (APB code: 3S95)⁷ a été utilisée pour étudier l'amarrage. OpenBabel (O'Boyle *et al.*, 2011) et la combinaison d'Autodock (Morris *et al.*, 2009) ont été utilisés pour effectuer l'amarrage moléculaire. La molécule « staurosporine » est présente dans la structure cristallisée du domaine kinase (résidus 330-637) et toutes les

⁷ <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=3S95>

molécules d'eau ont été retirées de la protéine. Les structures des molécules de staurosporine, BMS3 et cucurbitacine I ont été obtenues du site PubChem : 44259, 644328 et 5281321 respectivement.

I.12 RhoA-GTP pull down

Afin d'étudier l'activation des protéines Rho endogènes, l'équipe de Ren a mis au point un système de mesure de la quantité des protéines Rho activées dans un lysat cellulaire (Ren and Schwartz, 2000). Ce système, nommé TRBD (Rhotekin Rho-binding domain), permet de précipiter spécifiquement les formes liées au GTP des protéines Rho endogènes. Il s'appuie sur l'utilisation du Rho Binding Domain (RBD) de la Rhotekin, un des effecteurs des protéines Rho. Ce domaine se lie de façon spécifique aux protéines Rho-GTP. Le lysat cellulaire est incubé avec ce RBD qui va précipiter par affinité les protéines Rho liées au GTP.

Les cellules à confluence ont été privées de sérum pendant 48 h puis traitées avec la cucurbitacine I. Le niveau RhoA-GTP a été déterminé avec un pull down à l'aide du domaine de liaison Rhotekin et détecté par Western blot avec un anticorps anti-RhoA (Xiao *et al.*, 2009). Le protocole a été fourni avec le coffret « Rho activation assay kit » de Cell Biolabs, Inc, USA. Brièvement, les cellules ont été lysées dans un tampon de lyse 1X contenant 125 mM HEPES, pH 7.5, 750 mM NaCl, 5 % NP-40, 50 mM MgCl₂, 5 mM EDTA, 10 % glycérol, auquel est additionné un mélange d'antiprotéases (Roche). Le surnageant a été recueilli après centrifugation (10 min à 4°C, 14000 x g), et on l'incube avec les billes d'agarose RBD Rhotekin (20 µg) pendant 60 min à 4°C. Les billes ont été lavées avec le tampon de lyse 1X, puis mises à bouillir avec du tampon SDS contenant 5 % de 2-mercaptoéthanol. Enfin, les échantillons du pull down sont soumis à une électrophorèse sur gel de polyacrylamide comme décrit dans la première partie de matériels et méthodes.

I.13 Analyse par immunoempreinte (Western Blot)

La préparation des échantillons suit le même procédé que celui exposé dans la première partie.

Les anticorps primaires utilisés : anti-myosine IIA polyclonal, anti-p-myosin light chain Ser 19 (Cell Signaling Technology) au 1:1000, anti-p-cofiline Ser 3 polyclonal (Santa Cruz) au 1:1000, anti-phospho MYPT1 (Thr 853, Cell Signaling Technology) au 1:1000, anti-RhoA (Cell Biolabs, Inc) au 1:1000, anti-GADPH monoclonal (Abcam) au 1:5000. Les

anticorps secondaire anti-rabbit 800 ou anti-mouse IRDye 680 au 1:5000 (Odyssey) sont utilisés.

II. Résultats

Une des actions des cucurbitacines sur les cellules est d'agréger massivement l'actine. De nombreux travaux de recherche ont été menés afin d'éclaircir les différents acteurs et mécanismes cellulaires impliqués dans l'action de ces molécules, mais les résultats restent encore controversés, notamment parce que les cibles cellulaires des cucurbitacines apparaissent nombreuses. Afin de contribuer à une meilleure compréhension du mécanisme d'action moléculaire des cucurbitacines, la deuxième partie de notre travail a consisté à tenter de déterminer le mécanisme d'action moléculaire de la cucurbitacine I sur le cytosquelette d'actine. Dans un premier temps, nous avons postulé que le mécanisme d'action des cucurbitacines était en relation avec le déclenchement d'un stress oxydatif car beaucoup de travaux se sont penchés sur l'effet protecteur d'un antioxydant, la N-acétylcystéine sur les effets induits par les cucurbitacines. Toutefois, les résultats que nous avons obtenus nous ont permis d'éliminer cette hypothèse car seuls les antioxydants possédant un groupement thiol dans leur structure protégèrent la cellule des effets de la cucurbitacine I. Cela semble tenir au fait d'une interaction directe entre la cucurbitacine I et le groupement $-SH$ de ces antioxydants que nous avons mis en évidence. Plus surprenant encore, est la capacité de la cucurbitacine I à capturer les radicaux libres, ce qui laisse plutôt penser que la cucurbitacine I agit dans une certaine mesure comme un antioxydant, même si d'autres expériences seront nécessaires pour décrire le mécanisme sous jacent. Dans un second temps, le fait que cucurbitacine I induise un blebbing et désorganise le cytosquelette d'actine, nous ont conduit à examiner ses effets sur les voies de signalisation LIM kinase/cofiline et Rho/Rho kinase/Myosine II qui sont clairement impliquées dans la régulation du cytosquelette d'actine.

II.1 Agrégats d'actine sous l'effet de la cucurbitacine I

Nous avons examiné la manière dont le cytosquelette d'actine est perturbé suite à l'application de la cucurbitacine I et de la cytochalasine D, une molécule connue pour inhiber la polymérisation de l'actine en se fixant sur l'extrémité barbée du filament, empêchant ainsi l'ajout des monomères d'actine-G (Cooper 1987). Le traitement des cellules HeLa par ces molécules entraîne une désorganisation des filaments d'actine marquée par la formation d'agrégats d'actine ainsi qu'une altération de la morphologie cellulaire après 2 h d'exposition (figure 38A). Ensuite, nous avons étudié la réversibilité de ces effets, en effectuant des lavages puis en incubant les cellules dans un milieu sans drogues. Suite à l'élimination de la cytochalasine D, la forme de la cellule et l'organisation du cytosquelette d'actine sont

complètement restaurés après 4 h de lavage en accord avec les résultats de Lazaro-Diequez *et al.* (Lazaro-Diequez *et al.*, 2008). Le retrait de la cucurbitacine I pour une période équivalente de 4 h, ne semble pas s'accompagner d'une disparition de la désorganisation du cytosquelette d'actine qui était observée en présence de cucurbitacine I (2 h de traitement). Après une plus longue période de retrait de la cucurbitacine I (72 h), les cellules HeLa récupèrent cependant leur morphologie qui redevient comparable à celles des cellules témoins. Néanmoins et de façon surprenante, de larges agrégats d'actine persistent et entourent le noyau dans ces cellules. De même les cellules restent multinucléées, ce qui démontre le caractère irréversible de l'effet de la cucurbitacine I (figure 38B). Ces résultats sont en accord avec ceux de Sorensen *et al.*, Zhang *et al.* et Boykin *et al.* qui rapportent le caractère irréversible de l'effet des cucurbitacines E, B et IIa respectivement sur le cytosquelette d'actine après leur élimination du milieu (20 h) (Boykin *et al.*, 2011; Sorensen *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2013b).

Le traitement des cellules HeLa par la cucurbitacine I à différentes concentrations n'a montré aucun effet sur le réseau des microtubules, ce qui rejoint les résultats précédents obtenus en utilisant les cucurbitacines E ou B (Duncan *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2013b). Cependant, sur la figure 32, on peut remarquer la formation de nombreux agrégats punctiformes d'actine après 2 h de traitement des cellules HeLa par la cucurbitacine I à 10 nM, qui ensuite deviennent de larges agrégats juxtanucléaires après 24 h. Nous avons tenté de déterminer si la formation des agrégats d'actine dans les cellules HeLa traitées par la cucurbitacine I était dépendante du réseau des microtubules. À cette fin, nous avons utilisé des drogues comme le nocodazole (NZ) qui dépolymérise les microtubules ou le taxol (TX) qui les stabilise.

Il a été montré avec la jasplakinolide (une toxine naturelle connue pour stabiliser les filaments d'actine) que le prétraitement des cellules Vero (cellules rénales du singe vert africain) avec le nocodazole et ensuite co-incubées avec la jasplakinolide, se forment un grand nombre d'agrégats punctiformes d'actine dans le cytoplasme au lieu des larges agrégats d'actine juxtanucléaires observés en absence de nocodazole. En cohérence avec ces observations, quand le nocodazole a été éliminé en présence continue de cette toxine, les agrégats d'actine punctiformes se repositionnent dans la région centrosomale produisant de larges agrégats. Cela suggère que la formation de ce type de structure résulte de la coalescence d'agrégats d'actine punctiformes à la suite d'un transport rétrograde dépendant des microtubules et est considéré comme un agrésome (Lazaro-Diequez *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 1998).

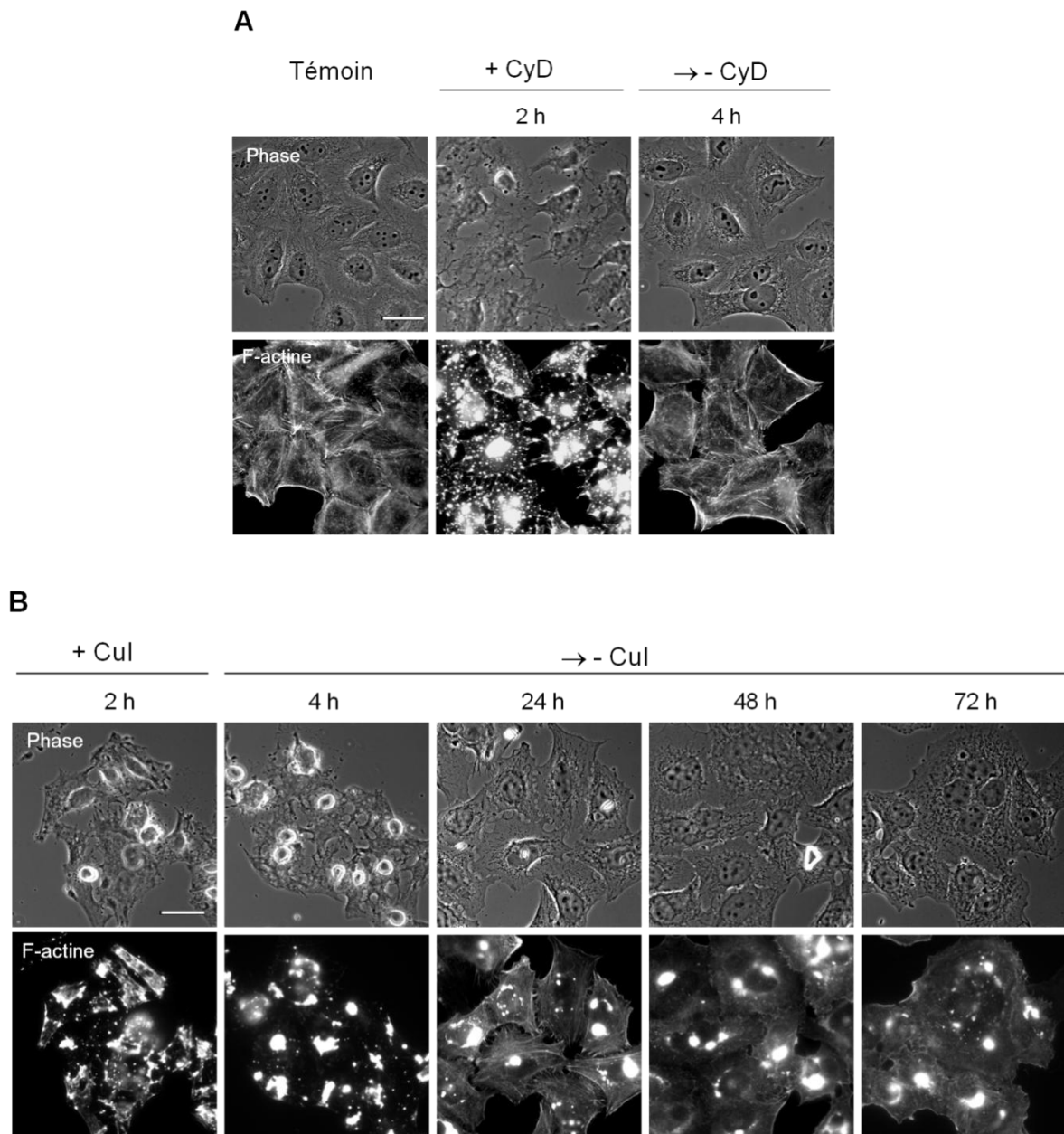


Figure 38 : L'effet de la cucurbitacine I sur l'agrégation de l'actine est irréversible.

A : Cellules HeLa traitées par le DMSO 0,01% (Témoin), ou la cytochalasine D (CyD, 1 μ M), ou B : la cucurbitacine I (Cul, 100 nM) pendant 2 h. Pour étudier la réversibilité, les cellules sont lavées (\rightarrow - CyD ou \rightarrow - Cul) puis incubées dans un milieu de culture frais puis examinées sur une longue période. Les cellules ont été fixées et marquées à la phalloïdine-rhodamine pour visualiser l'actine. Barres d'échelle : 20 μ m.

Dans les cellules HeLa traitées par le nocodazole (5 μM) pendant 6 h et co-incubées avec la cucurbitacine I (50 nM) pendant 16 h, de larges agrégats d'actine apparaissent autour du noyau comme dans le cas des cellules HeLa traitées par la cucurbitacine I seule, et ceci malgré une altération de l'architecture et de la dynamique des microtubules. Lorsque le nocodazole a été éliminé en présence continue de la cucurbitacine I, le positionnement des agrégats d'actine reste inchangé, de même quand les cellules ont été incubées avec la cucurbitacine I, puis avec le nocodazole (5 μM , 6 h). Des effets similaires ont été obtenus lorsque les cellules ont été traitées avec le taxol (20 μM , 6 h) (figure 39). Par conséquent, nos résultats indiquent que la formation et le positionnement des agrégats d'actine sous l'effet de la cucurbitacine I dans les cellules HeLa sont indépendants de la dynamique des microtubules, contrairement à ce qui était observé avec la jasplakinolide (Lazaro-Dieiguez *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 1998).

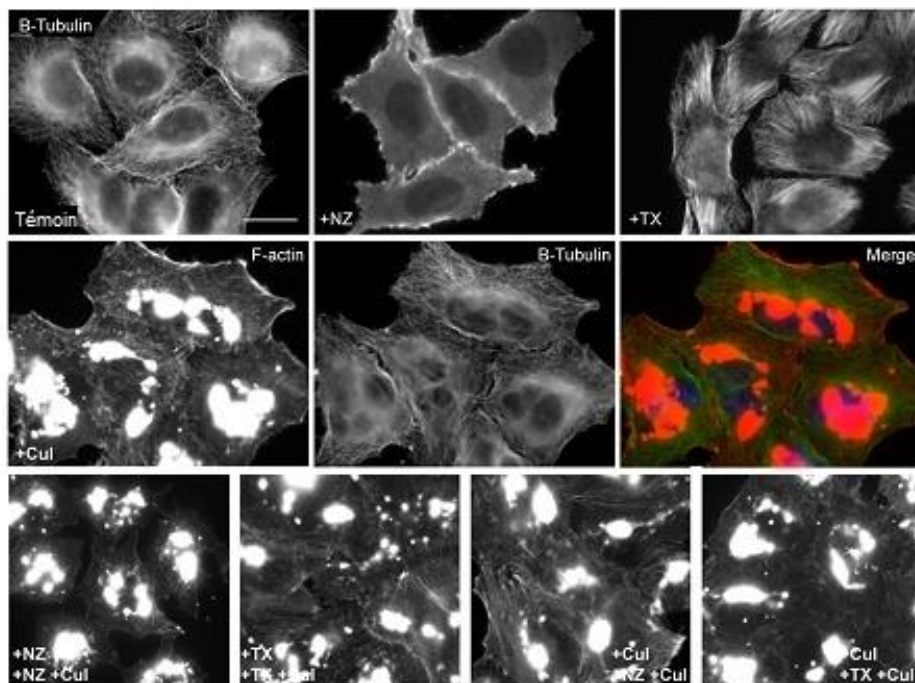


Figure 39: La formation et le positionnement des agrégats d'actine induits par la cucurbitacine I sont indépendants des microtubules.

Cellules HeLa traitées avec du nocodazole (5 μM , 6 h, + NZ), ou du taxol (20 μM , 6 h, + TX), ou de la cucurbitacine I (50 nM, 16 h) seule ou en co-incubation (+ NZ + CuI). Les cellules sont fixées puis immuno-marquées avec l'anticorps anti- β -tubuline afin de visualiser les microtubules, et avec la phalloïdine-rhodamine pour l'actine. (+NZ, +CuI) ou (+TX, +CuI) : cellules prétraitées par le nocodazole (ou le taxol) puis avec la cucurbitacine I aux mêmes concentrations. (+CuI, +NZ) ou (+CuI, +TX) : cellules prétraitées par la cucurbitacine I puis avec le nocodazole (ou le taxol) aux mêmes concentrations. Barre d'échelle: 20 μm .

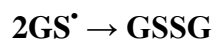
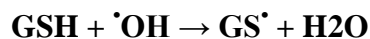
II.2 Cucurbitacine I et stress oxydant

II.2.1 Effet des antioxydants sur l'agrégation de l'actine induite par la cucurbitacine I

Le stress oxydatif est un type d'agression des constituants de la cellule qui résulte de l'augmentation de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) et/ou de la carence en antioxydants ou en cofacteurs des systèmes enzymatiques antioxydants. Des études ont montré que le prétraitement des cellules par un antioxydant, la N-acétylcystéine (NAC) réduisait de manière significative les agrégats d'actine induits par les cucurbitacines B ou I (Kausar *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2013a). En s'inspirant des observations précédemment exposées, nous avons décidé d'étudier l'effet d'autres types d'antioxydant comme cela est illustré dans la figure 40 afin de vérifier si la formation des agrégats d'actine est bien dépendante de phénomènes d'oxydation-réduction.

Nous avons donc prétraité des cellules HeLa pendant 1 h soit avec :

→ Le **glutathion réduit (GSH)**, tripeptide constitué de cystéine, glutamate et glycine, et qui est le thiol le plus abondant dans les organismes et les systèmes vivants. Il est antioxydant par son caractère nucléophile et radicalaire :



Le GSH exerce un effet protecteur vis-à-vis des radicaux libres, grâce à son pouvoir réducteur important ou par l'intermédiaire d'enzymes antioxydantes dont il sert de cofacteur. (Halliwell, 1999).

→ La **N-acétylcystéine (NAC)**, dérivée acétylée de l'acide aminé L-cystéine, constitue une excellente source de groupements sulfhydriles (SH) capables de stimuler la production de glutathion réduit (GSH). Il agit également comme piègeur de radicaux libres et réagit avec les ERO (Zafarullah *et al.*, 2003).

→ La **Vitamine C (Vit C, ou acide L-ascorbique)** est une molécule soluble dans l'eau, synthétisée par les plantes et la plupart des animaux, exceptés certains mammifères tels que l'homme (d'où son nom de vitamine). C'est une molécule antioxydante capable de réagir directement avec tous les ERO réduisant ainsi la peroxydation lipidique et les dommages aux protéines et à l'ADN. La vitamine C a également un pouvoir antioxydant

indirect en recyclant la vitamine E. D'un autre côté, la vitamine C permet le recyclage de Fe^{3+} en Fe^{2+} favorisant ainsi la réaction de Fenton et a donc de manière indirecte une action pro-oxydante (Gate *et al.*, 1999).

- La **Vitamine E (Vit E ou α -tocophérol)**, est un antioxydant liposoluble et est considérée comme l'antioxydant membranaire majeur utilisé par les cellules (Burton and Ingold, 1989). La fonction principale de la vitamine E est de protéger les cellules contre la peroxydation lipidique (Pryor, 2000). Elle réagit directement avec les ERO ou d'autres molécules radicalaires. La vitamine E est produite dans les chloroplastes des plantes, en revanche les animaux doivent la trouver dans leur alimentation (Gate *et al.*, 1999).
- Le **Diphényliodonium (DPI)** inhibe les flavoprotéines, une classe de transporteur dans la chaîne mitochondriale de transport des électrons (Cross and Jones, 1986). Elles contiennent des coenzymes de type FAD (flavine adénine dinucléotide) ou FMN (flavine mononucléotide).
- Le **N ω -Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride (L-NAME)** inhibe la NO synthase (nitric oxide synthase) (Joly *et al.*, 1994; Verchier *et al.*, 2007). Cette enzyme induit la formation d'un composé radicalaire l'oxyde nitrique, NO^{\bullet} (Michel and Feron, 1997; Stuehr, 2004). Le NO^{\bullet} peut réagir très rapidement avec l'anion superoxyde pour former le peroxydinitrite, qui a un fort pouvoir oxydant et est capable d'induire la fragmentation de l'ADN et la lipoperoxydation des lipides membranaires (Carr and Frei, 2001).
- Le **sodium 4,5-dihydroxybenzene-1,3-disulfonate (Tiron)** capture les ions superoxydes ($\text{O}_2^{\bullet-}$) (Grange *et al.*, 2006; Greenstock and Miller, 1975).
- La **quercétine** est un flavonoïde présent chez les plantes comme métabolite secondaire. C'est un piègeur efficace des radicaux hydroxyles et peroxyles (OH^{\bullet} , ROO^{\bullet}) (Rice-Evans *et al.*, 1996).

Dans tous les cas, nous prétraitons les cellules pendant 1 h avec ces antioxydants, puis la cucurbitacine I est ajoutée dans le milieu de culture pour 2 ou 24 h supplémentaires. Comme illustré dans la figure 41, on constate qu'en présence de NAC ou de GSH (10 mM) et de cucurbitacine I, la morphologie des cellules HeLa reste intacte, identique à celle des cellules témoins après 2 et 24 h d'exposition. En examinant l'actine marquée à la phalloïdine-rhodamine, une nette diminution du nombre et de la taille d'agrégats d'actine est notée dans ces cellules traitées par la cucurbitacine I après 24 h, voire leur absence après un temps court (2 h), alors qu'avec les autres antioxydants ne contenant pas de groupement thiol, une

altération massive de la morphologie des cellules HeLa et une agrégation d'actine sont toujours observées.

En vu de ces résultats, nous avons également testé le β -mercaptoéthanol (β Met) ou le dithiothréitol (DTT) présentant une fonction thiol ($-SH$) et qui sont des réducteurs très utilisés en biochimie pour protéger les protéines contre l'oxydation. Pour cela, nous avons prétraités les cellules HeLa par différentes concentrations de DTT ou de β Met (0,1, 0,5, 1, 2, 5 et 10 mM) pendant 1 h. Mais du fait de leur forte cytotoxicité, il était difficile d'optimiser les concentrations efficaces afin d'empêcher l'effet de la cucurbitacine I sur l'agrégation de l'actine sans provoquer la mort cellulaire.

Par ailleurs, on a constaté que l'élimination de la NAC ou de GSH avant l'ajout de la cucurbitacine I ou l'addition de la NAC ou de GSH, 2 h, après un traitement avec la cucurbitacine I n'empêchait pas la formation des agrégats d'actine suggérant ainsi :

- (i) la nécessité de la présence simultanée de la NAC ou de GSH et de cucurbitacine I pour empêcher l'effet de cette molécule,
- (ii) et le caractère irréversible de l'effet de la cucurbitacine I.

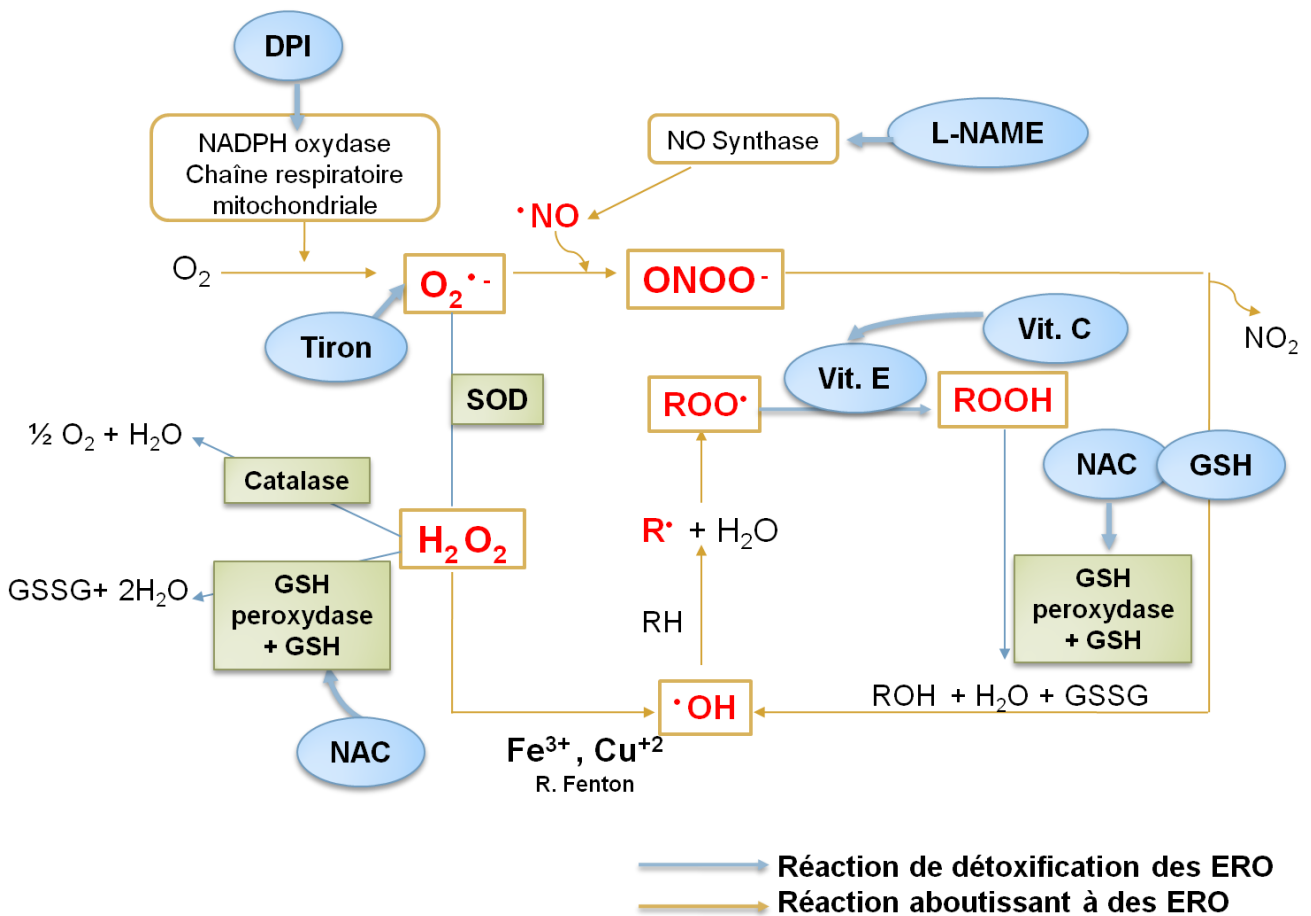


Figure 40 : Les espèces réactives de l'oxygène (ERO) et leur système de détoxification.

Les ERO sont des radicaux libres issus de l'oxygène et représentent la plus importante classe d'espèces réactives générées dans les organismes vivants en lien avec l'importance du métabolisme aérobie. L'ion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) est naturellement produit dans toutes les cellules respirant le dioxygène, en particulier dans les mitochondries. Le superoxyde peut réagir avec le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), pour donner le radical hydroxyle ($\cdot OH$) hautement réactif. Cette réaction est catalysée par des ions de certains métaux de transition, tels que le fer ou le cuivre. Il peut aussi réagir avec le monoxyde d'azote (NO) pour donner l'anion peroxydite ($ONOO\cdot$). A côté de cela, les antioxydants sont des molécules susceptibles d'inhiber la production, de limiter la propagation ou de détruire les ERO. Il existe des systèmes de défense enzymatique (la SOD : superoxyde dismutase, la catalase, la GSH : glutathion peroxydase) et non enzymatique (Vitamines E, C, le glutathion, NAC, L-NAME, DPI, Tiron) capables de s'opposer aux ERO.

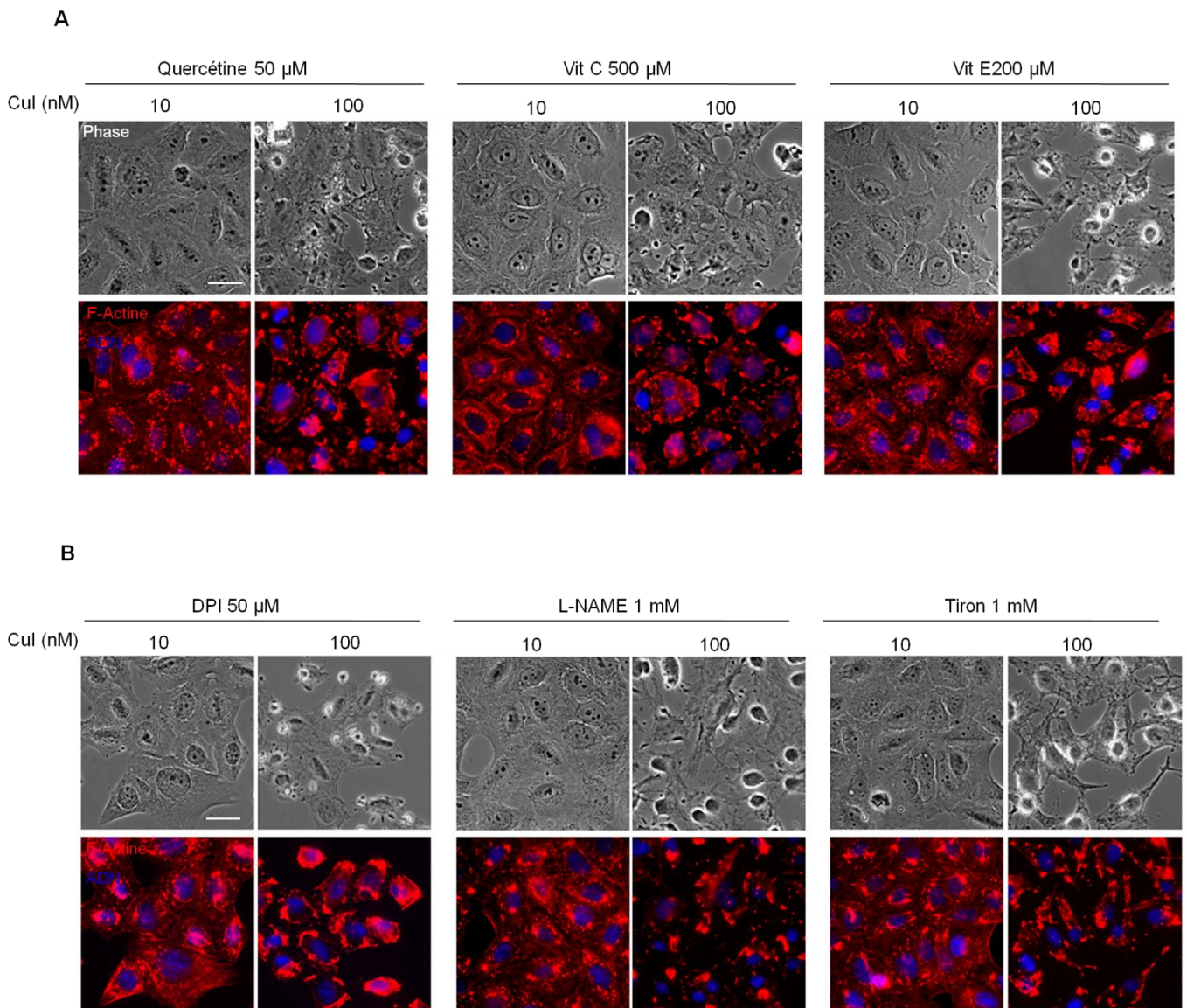


Figure 41 : Effets d'antioxydants dépourvus de groupes thiols sur les cellules HeLa traitées par la cucurbitacine I.

A : Cellules HeLa prétraitées (pendant 1 h) soit avec la Quercétine (50 μ M), la Vitamine C (Vit C, 500 μ M), la Vitamine E (Vit E, 200 μ M),

B : le DPI (50 μ M), L-NAME (1 mM) ou le Tiron (1 mM) puis co-incubées avec la cucurbitacine I (CuI, 10 ou 100 nM) pendant 2 h.

Les cellules ont été marquées avec la phalloïdine-rhodamine pour visualiser l'actine (rouge) et au DAPI (ADN) (bleu). Barres d'échelle : 20 μ m.

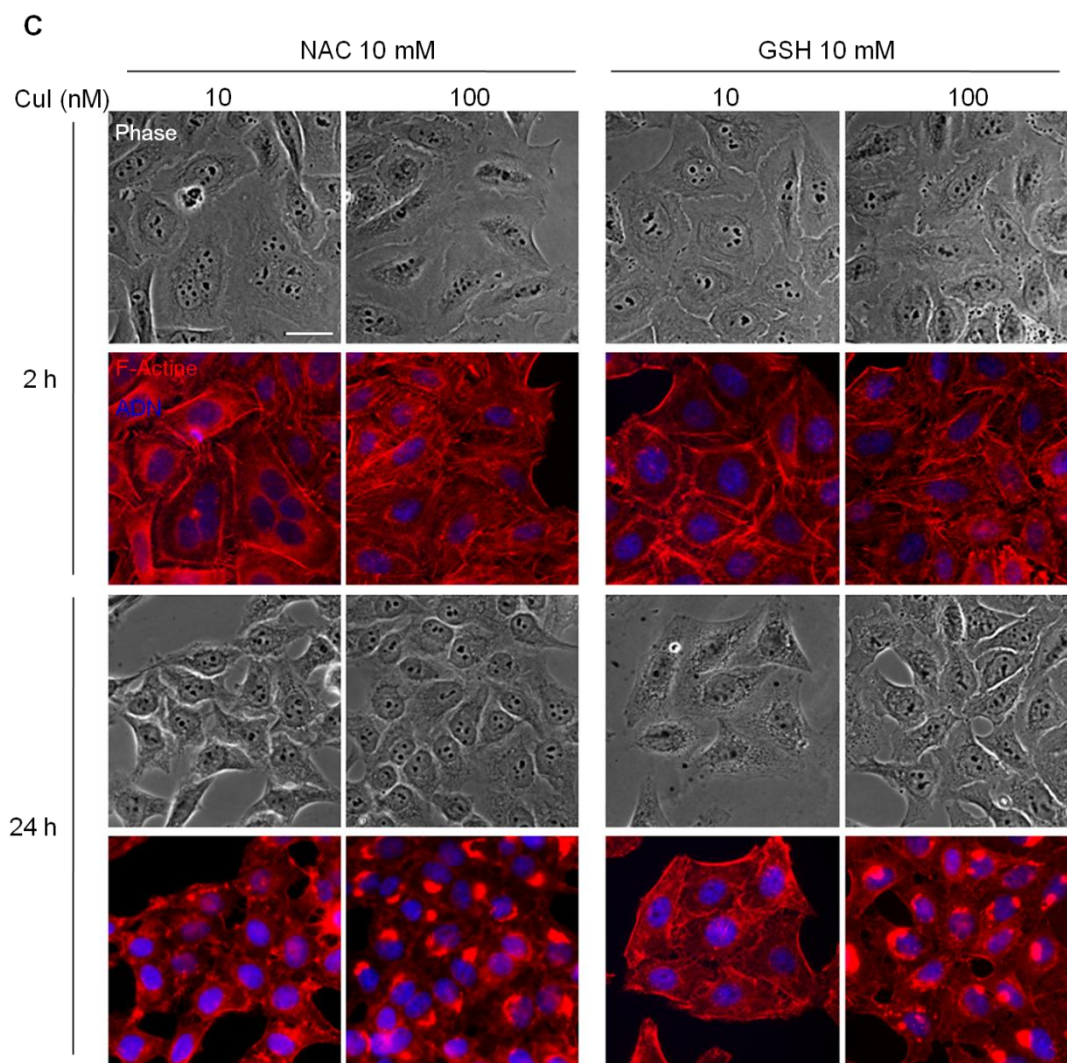


Figure 41 : Effets d'antioxydants possédant des groupes thiols sur les cellules HeLa traitées par la cucurbitacine I

C: Cellules HeLa prétraitées (pendant 1 h) avec la NAC (10 mM) ou le GSH (10 mM) puis co-incubées avec la cucurbitacine I (CuI, 10 ou 100 nM) pendant 2 ou 24 h. Les cellules ont été marquées avec la phalloïdine-rhodamine pour visualiser l'actine (rouge) et au DAPI (ADN) (bleu). Barre d'échelle : 20 μ m.

Il a été proposé que les effets protecteurs de la NAC sont attribués à son action antioxydante en supposant que les cucurbitacines B ou I induisent une augmentation de la production des ERO intracellulaires (mesurés après 1 h à 24 h d'exposition) (Guo *et al.*, 2014a; Lopez-Haber and Kazanietz, 2013; Yasuda *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2012). Cependant, d'autres travaux réfutent ce résultat (Kausar *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2013b).

Afin d'apporter des éléments pour éclaircir cette controverse, le statut redox des cellules HeLa a été évalué qualitativement en microscopie à fluorescence et quantitativement par cytométrie en flux en utilisant le H2DCF-DA (2',7'-dichlorodihydrofluoresceine diacétate) comme sonde qui réagit avec les ERO, en balayant une échelle de temps allant de 1 min à 1 h après addition de 100 nM de cucurbitacine I. L'oxydation de cette sonde par les ERO la rend fluorescente, alors qu'elle ne l'est pas à l'état basal. L'augmentation de la fluorescence des cellules étant proportionnelle à la quantité des ERO générées. La détection de la fluorescence du H2DCF-DA se fait par vidéomicroscopie à fluorescence.

Nos résultats montrent que le traitement des cellules HeLa par l'H₂O₂ (témoin positif à 1 mM) entraîne une augmentation de l'intensité de fluorescence; indiquant l'oxydation de la H2DCF-DA par les ERO, alors que le traitement par la cucurbitacine I montre une très légère augmentation des ERO après 5 min puis un rapide retour à la normale après 10 min puisque l'intensité de fluorescence est comparable à celle du témoin négatif (sans traitement) (figure 42A). Les analyses par cytométrie en flux montrent également, une très légère augmentation des ERO après 5 min, mais qui est non significative, puis de façon étonnante leur diminution par rapport au témoin négatif après 60 min d'exposition (figure 42B, C).

La production très précoce des ERO laisse penser que l'actine pourrait être oxydée et que peut être cette oxydation serait la cause de son agrégation. Toutefois, d'une part, cela n'explique pas l'effet protecteur observé seulement avec la NAC ou le GSH : Est-ce que cette sélectivité est liée à la présence de groupements thiols dans ces deux molécules ? Par ailleurs, la diminution des ERO dans les cellules HeLa traitées par la cucurbitacine I après 60 min peut-elle refléter un caractère antioxydant de cette molécule ?

Afin de répondre à ces questions, nous avons tenté, dans un premier temps, de rechercher une éventuelle activité antioxydante de la cucurbitacine I *in vitro* par des méthodes couramment utilisées. Dans un second temps, nous avons étudié une éventuelle interaction de

la cucurbitacine I avec le groupement thiol d'antioxydants comme la NAC ou le β -mercaptoéthanol *in vitro* par résonance magnétique nucléaire du proton (RMN ^1H).

II.2.2 Capacité antioxydante de la cucurbitacine I

Halliwell et Gutteridge ont défini les antioxydants comme « toute substance qui, lorsqu'elle est présente à faible concentration par rapport au substrat oxydable, retarde de manière significative ou inhibe l'oxydation de ce substrat » (Halliwell and Gutteridge, 1995). Depuis, cette définition a été élargie en « toute substance qui retarde, ou inhibe les dommages oxydatifs de la molécule cible » (Halliwell, 2007). La même année Khlebnikov *et al.* ont défini les antioxydants comme « toute substance qui piège directement ou indirectement les ERO en régulant les défenses antioxydantes ou inhibe la production de ces espèces » (Khlebnikov *et al.*, 2007). De nombreuses méthodes permettant d'évaluer le pouvoir antioxydant de molécules isolées ont été développées (Antolovich *et al.*, 2002). Pour notre part, nous avons évalué l'activité antioxydante de la cucurbitacine I en mesurant sa capacité à inhiber le radical 1,1-diphényl-2-picryl-hydrazyl (DPPH $^\bullet$) ou le radical hydroxyle ($^\bullet\text{OH}$). L'activité anti-DPPH $^\bullet$ est mesurée par spectrophotométrie, alors que l'activité anti- $^\bullet\text{OH}$ est mesurée par Résonance Paramagnétique Electronique (RPE).

- **Activité anti-DPPH $^\bullet$**

Dans un premier temps, nous avons validé la méthode en utilisant l'acide ascorbique (Vit C) et la NAC comme références. Ces derniers présentent des concentrations inhibitrices 50 % (CI_{50}) de 19 et 70 μM respectivement et étant proche de ceux décrits dans la littérature (Jiang *et al.*, 2003; Quelever *et al.*, 2005; Tannin-Spitz *et al.*, 2007a), avec une cinétique rapide (plateau atteint en moins de 5 min). Dans un second temps, lorsque nous avons testé la cucurbitacine I diluée dans le méthanol, nous n'avons pas observé de diminution significative de l'absorbance à 517 nm pour des concentrations inférieures à 100 μM . Cependant, à des concentrations plus élevées, on constate une réduction du radical DPPH $^\bullet$ mais avec une cinétique plus lente (le plateau n'est pas atteint après 60 min de réaction). La CI_{50} de ce composé n'a pas été déterminée tant la concentration nécessaire à l'observation d'une activité est élevée (supérieure à 500 μM pour une inhibition voisine des 30 % en moyenne). Cela traduit un pouvoir antioxydant faible vis-à-vis du radical DPPH $^\bullet$ comparé aux antioxydants de référence.

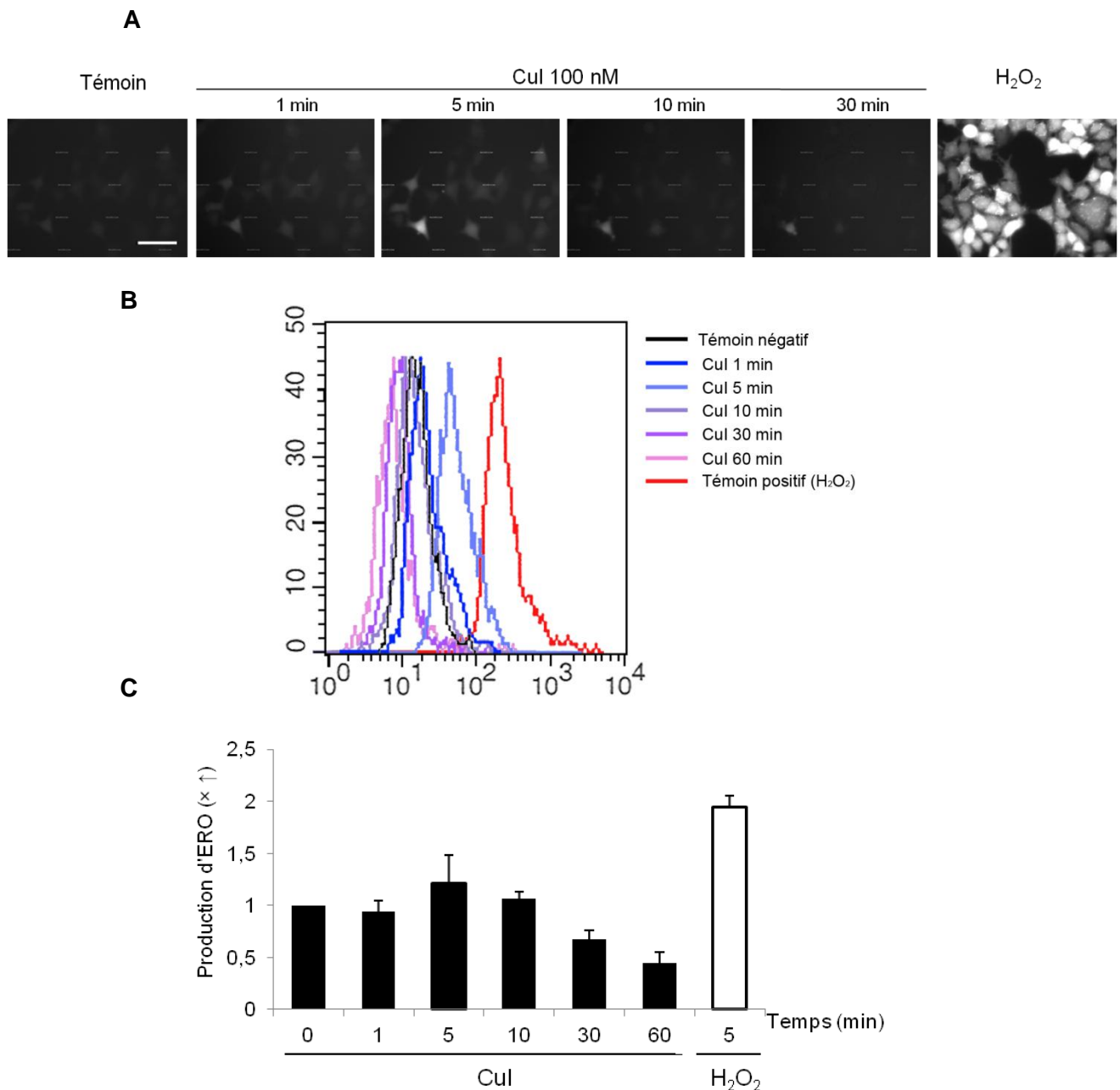


Figure 42 : Détection des ERO dans les cellules HeLa traitées ou non par la cucurbitacine I.

A : Cellules HeLa incubées avec la H₂DCF-DA puis traitées par la cucurbitacine I à 100 nM. Les photos de microscopie à fluorescence (Axiovert 220, Carl Zeiss, objective 20X) sont prises après 0 (Témoin négatif) 1, 5, 10 et 30 min après l'ajout de la CuI. Le témoin positif utilisé est l'H₂O₂ (1 mM, 5 min). Barre d'échelle : 10 µm.

B : Cellules HeLa non traitées (Témoin négatif) ou traitées par la CuI à 100 nM pendant 1, 5, 10, 30, 60 min puis incubées avec la H₂DCF-DA. La production d'ERO intracellulaire est déterminée immédiatement en mesurant la fluorescence du produit d'oxydation du H₂DCF-DA par cytométrie en flux. Grâce au marquage par l'IP (5 µg/mL), la population morte est discriminée de la population vivante. **C** : A partir des moyennes de fluorescence obtenues, la production d'ERO a été calculée par rapport aux cellules HeLa non traitées marquées (Témoin négatif) et normalisées à 1. Les données correspondent à la moyenne de trois expériences indépendantes ± SE.

- Activité anti- $\cdot\text{OH}$

Une deuxième méthode a été utilisée afin de déterminer les propriétés antioxydantes de la cucurbitacine I vis à vis des radicaux hydroxyles générés par la réaction de Fenton *in vitro*. Cette exploration a été entreprise en collaboration avec le Dr Martha Rosales-Hernandez au sein du laboratoire de biophysique et de biocatalyse à l'institut national polytechnique, de Mexico (Mexique). Les concentrations de cucurbitacine I utilisées sont les mêmes que celles utilisées pour les traitements cellulaires. En absence de cucurbitacine I, un signal caractéristique en RPE qui est un triplet dédoublé de l'adduit PBN/OH formé lors de la réaction de Fenton est obtenu (le triplet originaire de l'interaction entre le spin de l'électron non apparié et le spin nucléaire de l'azote, et le doublet originaire de l'interaction du spin de l'électron non apparié et le spin nucléaire de l'hydrogène) (Mendez-Garrido *et al.*, 2014) (figure 43). L'addition de la cucurbitacine I à différentes concentrations (50 et 100 nM) induit une diminution de 40 à 70 % de l'intensité du signal attribué au piégeage des radicaux hydroxyles à 50 nM et 100 nM de cucurbitacine I respectivement par rapport au témoin sans cucurbitacine (figure 43). Nous avons donc une augmentation de la capture des radicaux hydroxyles par la cucurbitacine I dépendante de sa concentration (comme on peut l'attendre d'un antioxydant), à des concentrations similaires à celles utilisées sur les cellules et où nous avons observé une diminution des ERO marquées par l'H2DCF-DA mesurées par cytométrie en flux après 60 min lors des investigations précédentes. Ces résultats peuvent témoigner du potentiel antioxydant de la cucurbitacine I contre les radicaux hydroxyles.

Jayaprakasam *et al.* ont montré que les cucurbitacines B et I inhibaient la peroxydation lipidique (59 et 23% respectivement) pour une concentration de 100 $\mu\text{g/mL}$ ($\sim 200 \mu\text{M}$) après 21 min (Jayaprakasam *et al.*, 2003), alors que la cucurbitacine E n'y a pas d'effet (Arel-Dubeau *et al.*, 2014; Jayaprakasam *et al.*, 2003). Une autre étude a montré que le mélange des cucurbitacine E et B glycosylées présentait une activité antiradicalaire, contre le radical ABTS $^{\cdot+}$ (acide 2,2'-azinobis3-(éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)) avec une CI_{50} de 145 μM , alors que le resvératrol, l'acide ascorbique et le trolox utilisés comme références présentait des CI_{50} de l'ordre de 9, 15, et 26 μM respectivement. Ils ont également montré que ce mélange est capable de piéger le radical hydroxyle, l'anion superoxyde, et l'oxygène singulet mesurés par RPE, avec des CI_{50} de 0,38 mM pour le radical hydroxyle, 8 mM pour l'anion superoxyde, et 11 mM pour l'oxygène singulet (Tannin-Spitz *et al.*, 2007a). De même, Abdelwahab *et al.* ont démontré l'effet antioxydant de la cucurbitacine L glycosylée évalué par le test ORAC (qui mesure la capacité d'un composé étudié à préserver une sonde de

fluorescence de l'oxydation par un radical peroxy) et le test FRAP (s'appuyant sur la réduction de l'ion ferrique Fe^{3+} en ion ferreux Fe^{2+} par un antioxydant) (Abdelwahab *et al.*, 2012).

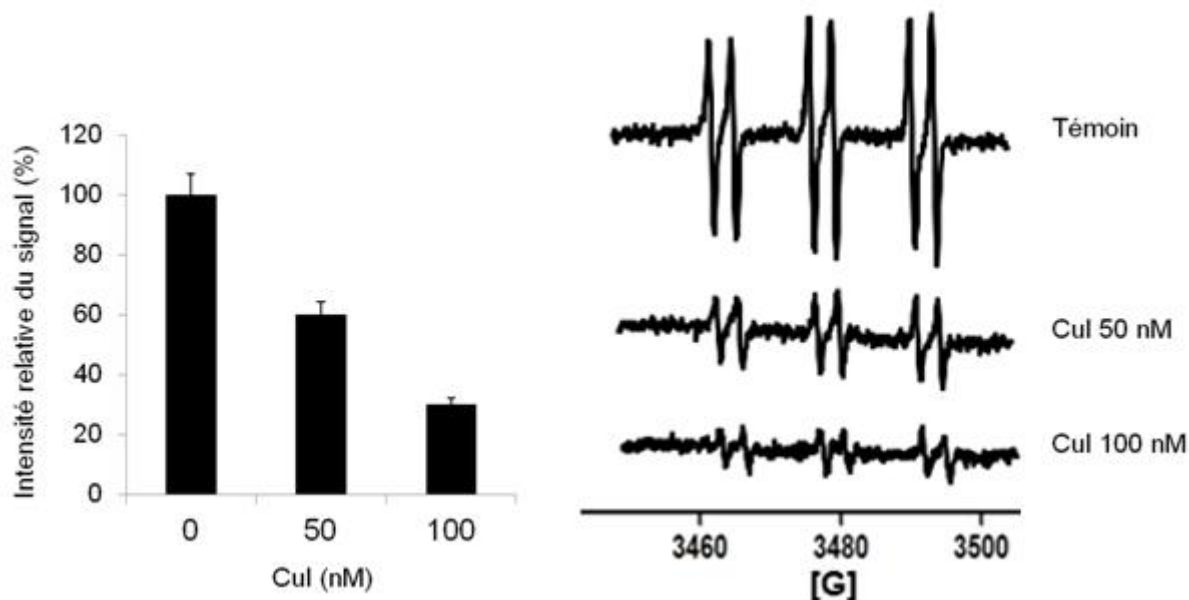


Figure 43 : La cucurbitacine I se comporte comme un antioxydant capable de piéger les radicaux $\cdot OH$.

Pourcentage du signal de l'adduit PBN/OH obtenu en présence de CuI par rapport au témoin sans CuI (100 %). A droite, le signal RPE de l'adduit PBN/OH en absence ou en présence de CuI.

Les radicaux hydroxyles ont été générés par une réaction de Fenton en présence de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2 , 100 μM), chlorure de fer ($FeCl_2$, 200 μM), α -phényl-N-terbutylnitronne (PBN, 3 mM, DMSO). La cucurbitacine I est utilisée à des doses nanomolaires (CuI, 50 ou 100 nM, DMSO).

Nos données ont montré que la cucurbitacine I induisait une légère augmentation des ERO dans les cellules HeLa pendant un temps très court puis leur diminution après 1 h reflétant un effet antioxydant. Halliwell a postulé que l'augmentation des ERO peut être bénéfique, car l'application d'un faible degré de stress oxydatif pourrait élever les niveaux de défenses antioxydantes conduisant à une cytoprotection globale (Halliwell, 2008). D'après Singh *et al.*, les antioxydants sont passés de « molécules miracles » à de « molécules merveilleuses » et enfin à des « molécules physiologiques » (Singh *et al.*, 2010). Nul doute que ces molécules jouent un rôle vital dans les défenses cellulaires, mais des éléments contradictoires récents ont forcé la communauté universitaire à revenir sur le rôle des molécules considérées comme antioxydantes et prooxydantes. Plusieurs composés

phytochimiques identifiés comme des antioxydants se sont étonnamment avérés avoir un comportement prooxydant (Carocho and Ferreira, 2013).

Les flavonoïdes par exemple sont capables de réduire les radicaux libres oxydants comme le superoxyde, le peroxyde (ROO[•]), l'alkoxyde (RO[•]) et l'hydroxyde par transfert d'hydrogène :

$Fl-OH + R^{\bullet} \rightarrow Fl-O^{\bullet} + RH$, où R[•] représente l'anion superoxyde, le peroxyde, l'alkoxyde ou l'hydroxyde.

En outre, le radical flavonoxy (FL-O[•]) peut interagir avec l'oxygène pour donner une quinone et un anion superoxyde. Cette réaction est responsable d'un effet prooxydant indésirable des flavonoïdes (Prochazkova *et al.*, 2011).

Les caroténoïdes (comme le β-carotène) peuvent également se comporter comme des prooxydants en fonction de leur concentration dans les systèmes biologiques (Palozza *et al.*, 2003).

II.2.3 Interaction cucurbitacine I et antioxydants à fonction thiol

Étant donné que la présence simultanée de la NAC et de cucurbitacine I dans le milieu de culture cellulaire était nécessaire pour prévenir les effets de la cucurbitacine, une analyse RMN en absence ou en présence de la NAC ou du βMet a été effectuée afin de vérifier une possible interaction entre ces deux molécules *in vitro*. Pour cela, la cucurbitacine I a été incubée avec la NAC ou le βMet *in vitro* (ratio 1:1000) pendant 72 h à température ambiante, puis l'échantillon a été analysé par RMN ¹H à 20°C en comparant les spectres de la cucurbitacine I seule ou en présence de la NAC ou le βMet dans les mêmes conditions.

Nous avons observé qu'en présence de la NAC ou du βMet la disparition des pics à δ 6,91 et 7,00 ppm correspondant aux protons insaturés H-23 et H-24 de la cucurbitacine I, suggérant une modification au niveau du groupement cétone α-β insaturé de la cucurbitacine I. La disparition de ce pic laisserait supposer la formation du produit issu de la thiol addition (figure 44A). Cependant lors de cette réaction, les protons H-23 et H-24 devraient se déplacer vers δ 2,80 ppm. Malheureusement, nous ne pouvions pas observer l'apparition de pics autour de δ 2,80 ppm en raison de la superposition des résonances avec la NAC ou du βMet. Néanmoins, nous avons observé des modifications des déplacements chimiques des protons et

des carbones autour des positions 23 et 24 qui sont en accord avec une réaction d'addition de Michael (création d'une liaison carbone-soufre) (tableau 7, figure 44B).

Tableau 7 : Expérimental (exp) et prédiction (pred) des déplacements chimiques ^a des protons et carbones de CuI avant et après la réaction d'addition de Michael avec le β-mercaptoéthanol (βMet).

	CuI exp		CuI-βMet exp		CuI pred		CuI- βMet pred	
	¹ H	¹³ C	¹ H	¹³ C	¹ H	¹³ C	¹ H	¹³ C
22	-	206	-	211	-	201	-	211
23	6.91	121	nd ^b	nd ^b	6.34	126	2.78	30
24	7.00	156	nd ^b	54	7.01	147	2.82	54
25	-	72	-	74	-	71	-	75
26/27	1.37	31	1.37	28	1.36	30	1.26	27

^a Les déplacements chimiques (ppm) ¹H et ¹³C mesurés avec une précision de ± 0,01 et ± 1 ppm respectivement.

^b Non déterminé en raison de la superposition des résonances avec le βMet.

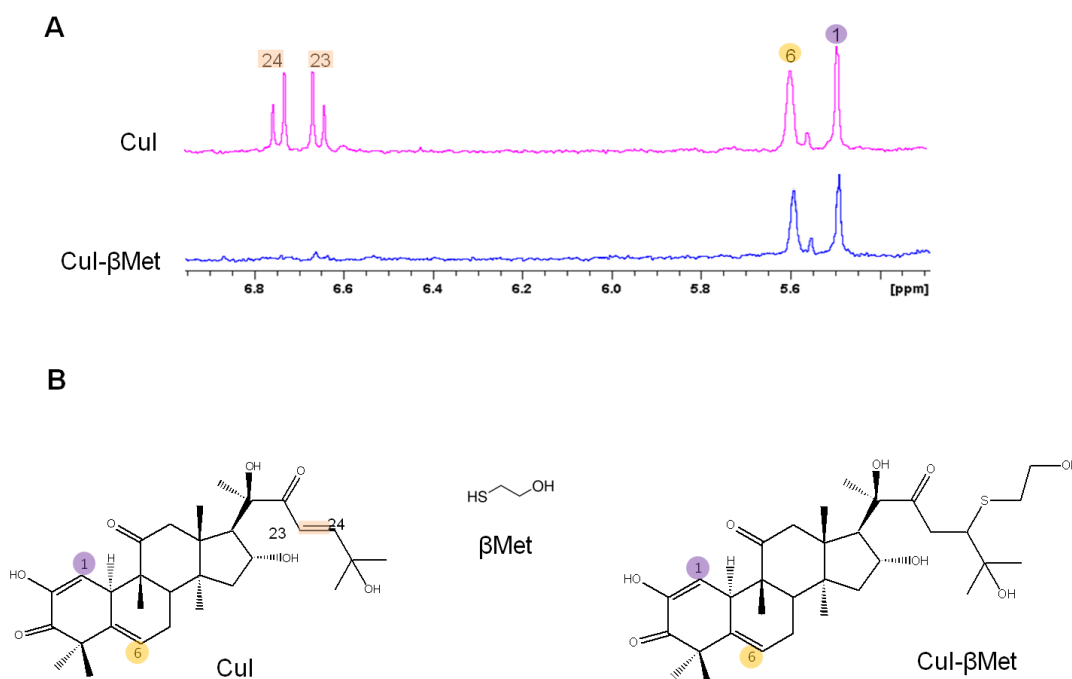


Figure 44 : Interaction de la cucurbitacine I avec le β-mercaptoéthanol

A : Spectres RMN ¹H de la cucurbitacine I (CuI, 0,5 mM) seule ou en présence du β-mercaptoéthanol (βMet, 500 mM) pendant 72 h à température ambiante enregistrés dans DMSO-*d*₆ à 20°C.

B : Modèle d'interaction entre la cucurbitacine I et le β-mercaptoéthanol.

Comme la cucurbitacine I présente un groupement cétone α - β insaturé dans sa structure, une liaison covalente peut se former entre ce groupement fonctionnel et le groupement thiol de la NAC ou du β -mercaptoéthanol en subissant une addition de Michael (création d'une liaison carbone-soufre). Bien que des hypothèses similaires ont été proposées par (Whitehouse and Doskotch, 1969), notre analyse par RMN ^1H démontre une interaction directe de la cucurbitacine I avec des nucléophiles thiols comme la NAC ou le β -mercaptoéthanol, à travers les changements observés dans la structure de la cucurbitacine I par RMN ^1H .

Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Kausar *et al.* qui ont démontré une interaction de la cucurbitacine B avec la NAC par spectrométrie de masse à travers l'identification des produits d'addition (Kausar *et al.*, 2013). Bien que la NAC ou le GSH bloquent les effets de la cucurbitacine I dans les cellules HeLa, les autres antioxydants (comme les vitamines C ou E, les inhibiteurs des ERO...) que l'on a testé n'ont pas eu cet effet. Ces résultats suggèrent que, plutôt que d'inhiber l'effet de la cucurbitacine I à travers leur propriété antioxydante cellulaire, l'effet inhibiteur de la NAC ou de GSH est plus susceptible d'être une conséquence de sa conjugaison directe avec la cucurbitacine I pour former majoritairement un adduit de Michael par attaque du groupement nucléophile de la NAC sur le groupement cétone α - β insaturé de la cucurbitacine I. Cette réaction d'addition pourrait expliquer l'effet « détoxifiant » de ces composés à thiol vis-à-vis des cucurbitacines.

La capacité de la NAC à piéger les ERO pour neutraliser les effets des cucurbitacines a été largement interprétée comme une preuve que la génération d'ERO, est une partie de leur mécanisme d'action (Guo *et al.*, 2014a; Lopez-Haber and Kazanietz, 2013; Yasuda *et al.*, 2010). Nos résultats ont apporté une autre explication à l'effet protecteur unique de la NAC ou du GSH, puisque la neutralisation des effets biologiques des cucurbitacines semble plutôt due à leur conjugaison directe avec la NAC ou le GSH dans le milieu de culture cellulaire.

De plus, de nombreuses molécules chimiques électrophiles réactives (caractérisés par leur capacité à former une liaison avec un autre composé en acceptant un doublet électronique de celui-ci), peuvent se lier aux groupes fonctionnels -SH de leur cystéine (Casini *et al.*, 2002). Récemment, il a été montré que la cucurbitacine E peut se lier aux groupements thiols des cystéines des filaments d'actine (Sorensen *et al.*, 2012), ce qui démontre une fois de plus, la capacité de ces molécules à se lier aux groupements thiols.

II.2.4 Effet de la cucurbitacine I sur l'actine mutée sur ses cystéines de surface

Du fait de l'observation d'une production très précoce des ERO dans les cellules HeLa traitées par la cucurbitacine I quand bien même elle est faible, nous avons émis l'hypothèse qu'un processus d'oxydation de l'actine serait la cause de son agrégation. Nous avons donc étudié la possibilité que l'oxydation de l'actine par les ERO résulte en la formation de ponts disulfures entre ses cystéines de surface. En effet, des travaux ont démontré que la β -actine est une cible d'agents oxydants comme l' H_2O_2 qui peut causer une perte complète de sa polymérisation (Fiaschi *et al.*, 2006; Lassing *et al.*, 2007; Lind *et al.*, 2002). S'il s'avérait que la β -actine pouvait constituer une cible directe pour les agents oxydants, cette oxydation pourrait se traduire par la formation de ponts disulfures.

La β -actine contient 6 résidus cystéines. Dans la structure de la β -actine oxydée (figure 45), 4 cystéines sont enfouies : les cystéines 17, 217, 257 et 285 et parmi celles-ci, les cystéines 217 et 257 peuvent former un pont disulfure intramoléculaire. À l'inverse, les cystéines 272 et 374 exposées à la surface pourraient être engagées dans des ponts disulfures intermoléculaires et responsables des phénomènes d'agrégation observés.

Par ailleurs, une étude a montré que la cucurbitacine E se lie aux filaments d'actine par une liaison covalente au niveau de la cystéine 257, et les auteurs ont proposé que cette liaison est responsable d'une inhibition de la dépolymérisation de ces filaments (Sorensen *et al.*, 2012).

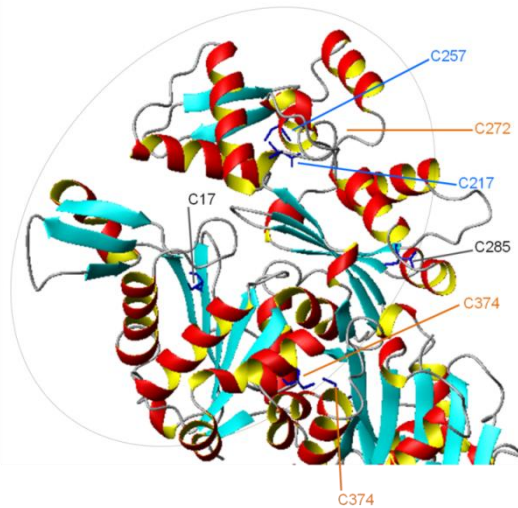


Figure 45 : Structure tridimensionnelle de la β -actine oxydée (pdb : 2OAN)

Cystéines 17 et 285 (noir), Cystéines 217 et 257 (bleu), Cystéines 272 et 374 exposées à la surface (orange).

Nous avons donc examiné si l'agrégation de l'actine par la cucurbitacine I persiste en présence de β -actine mutée sur ses résidus cystéines (Cys 272, Cys 374 et Cys 257) (mutations cystéine en alanine). Nous avons également fusionné ces constructions β -actine Cys→Ala à la protéine fluorescente EGFP afin de visualiser son comportement dans la cellule par microscopie à fluorescence. Ces constructions d'actine ont été exprimées dans des cellules HeLa, ensuite traitées ou non, par la cucurbitacine I à faible concentration (10 nM), et marquées à la rhodamine-phalloïdine afin de comparer l'effet de la cucurbitacine I sur l'actine transfectée révélée par la EGFP et l'actine totale révélée par la phalloïdine. Les résultats présentés sur la figure 46 montrent que pour les constructions EGFP β -actine (sauvage) et mutants (C272A, C374A, C257A) témoins (sans traitement), les structures de microfilaments sont bien organisées, comprenant des fibres de stress et très semblables au cytosquelette d'actine des cellules HeLa non transfectées marquées directement avec la rhodamine-phalloïdine. Cela est en accord avec des résultats relatifs à l'actine sauvage et au mutant flag-actine-C374A exprimés dans deux lignées différentes de cellules de mammifère (Ballestrem *et al.*, 1998; Tsapara *et al.*, 1999). De façon intéressante et surprenante, on note, en examinant le cytosquelette d'actine des cellules HeLa exprimant les formes mutantes de β -actine et traitées par la cucurbitacine I, la formation d'agrégats similaires à ceux observés avec l'actine sauvage (témoin). À partir de ces résultats, nous avons émis les hypothèses suivantes :

- (i) L'agrégation de l'actine ne dépend pas de la formation de ponts disulfure impliquant les cystéines que nous avons muté.
- (ii) Il se pourrait que l'agrégation de l'actine ne résulte pas d'une oxydation directe de cette protéine ou bien des résidus cystéines.
- (iii) Il se pourrait également que les actines mutées et sauvages soient mélangées au sein d'un même filament, et de ce fait l'agrégation de l'actine sauvage entraîne avec elle l'actine mutée.

Pour tester l'éventualité d'une telle co-agrégation, nous avons décidé de tenter de supprimer l'actine endogène en traitant les cellules avec une dose « agrégeante » de cucurbitacine I avant de pratiquer les transfections. On s'attend de cette façon à réduire de façon significative les phénomènes de co-agrégation. Dans ce but, des cellules HeLa ont été traitées pendant 2 h avec deux concentrations différentes de cucurbitacine (20 ou 50 nM), lavées puis transfectées avec les différentes constructions (EGFP/ β -actine sauvage, EGFP/ β -actine C272A et EGFP/ β -actine C374A) puis fixées 15 h après transfection avec du PFA 4% comme décrit précédemment. Ces expériences doivent permettre de voir si l'on peut réexprimer de l'actine dans ces conditions et si cette actine forme des filaments dans les cellules dont le cytosquelette « naturel » a été fortement endommagé par la cucurbitacine.

Les résultats montrent que l'actine sauvage et les mutants C272A, C257A peuvent reformer des filaments avec une densité proche de celle observée dans les cellules non traitées. A l'inverse, le mutant C374A ne semble pas capable de reformer un réseau filamentaire (figure non présentée).

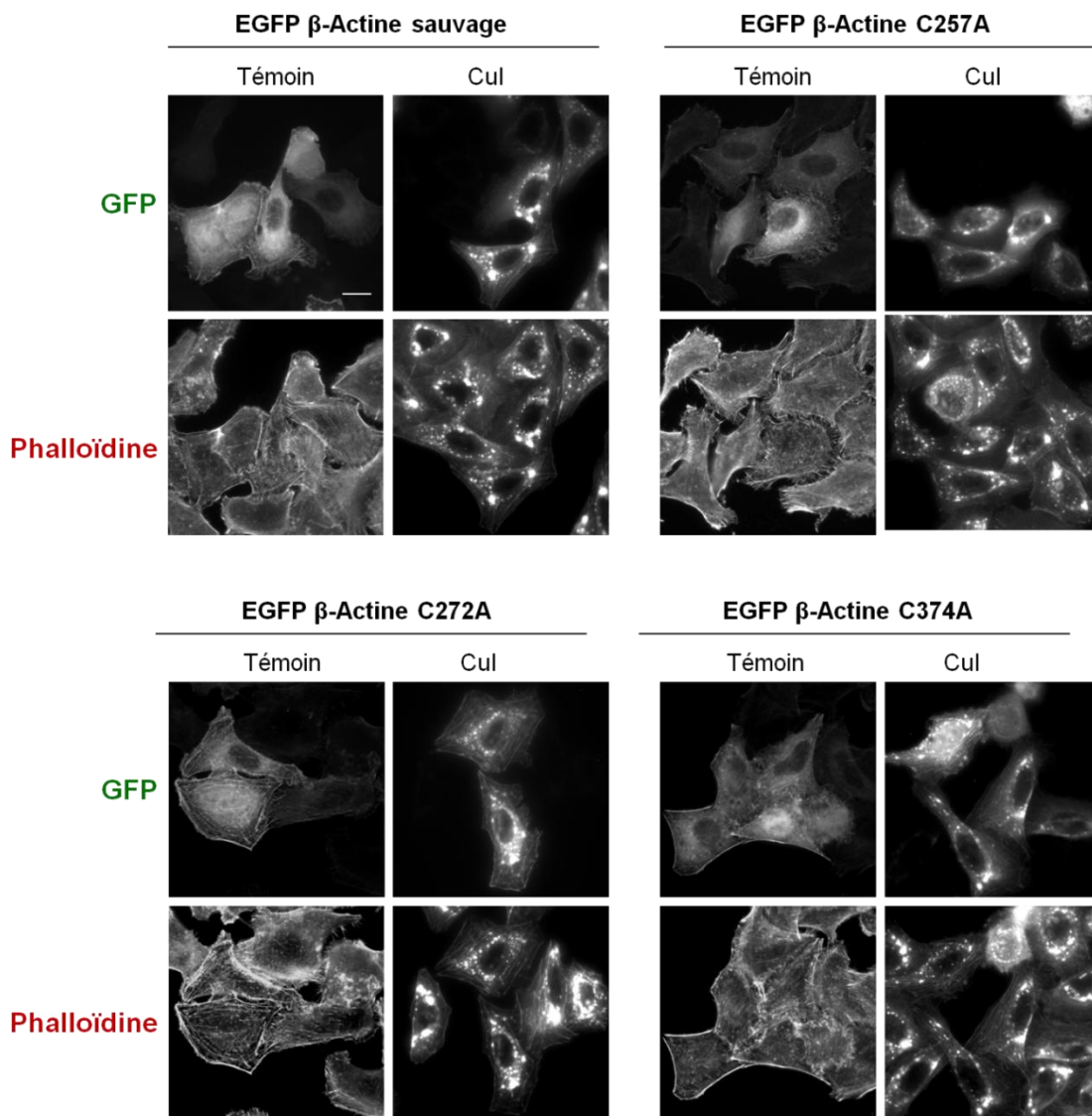


Figure 46 : Visualisation par microscopie de fluorescence de cellules HeLa transfectées par les plasmides EGFP β -actine sauvage et mutés en absence ou en présence de cucurbitacine I.

Cellules HeLa transfectées avec les plasmides EGFP β -actine sauvage et mutés C257A, 272A et C374A, puis traitées ou non avec la cucurbitacine I (CuI, 10 nM) pendant 2 h. Les cellules sont fixées et marquées à la phalloïdine-rhodamine pour visualiser l'actine endogène.

II.3 Les seconds messagers intracellulaires : Le calcium (Ca^{2+})

Le calcium, comme les ERO, est un important messager intracellulaire. Il est impliqué dans de nombreuses fonctions cellulaires telles que la contraction musculaire, la libération de neurotransmetteurs, la sécrétion d'enzymes, la polarisation membranaire ou encore la mort cellulaire (Berridge *et al.*, 2003; Petersen *et al.*, 2005). Lors d'un signal calcique, l'augmentation de calcium dans la cellule peut avoir deux origines distincte : l'entrée de Ca^{2+} extracellulaire ou par la libération de Ca^{2+} à partir de réserves intracellulaires (Berridge *et al.*, 2003; Cancela, 2001; Petersen *et al.*, 2005). La signalisation calcique n'est possible que par ce qu'il existe des gradients importants de concentration entre le cytoplasme, les différents compartiments cellulaires, et le milieu extracellulaire. Si la concentration de Ca^{2+} cytosolique basale est proche de 100 nM, la concentration extracellulaire est généralement de 1 à 2 mM, tandis que celle des réserves intracellulaires est variable, avec une concentration de l'ordre de 500 μM pour le réticulum endoplasmique qui constitue la principale réserve intracellulaire. Lors d'un stimulus, la concentration de Ca^{2+} augmente rapidement soit par influx à travers la membrane plasmique soit par efflux en libérant le Ca^{2+} de ces réserves (Yan *et al.*, 2006).

Il existe de nombreux types de canaux membranaires perméables au Ca^{2+} dans les cellules excitables comme les neurones ou les cellules musculaires. Les VOC (Voltage-Operated Channel) sont des canaux voltage-dépendants qui s'ouvrent lors d'une dépolarisation de la membrane plasmique. Les VOC ont été classés à l'origine selon leurs propriétés pharmacologiques et électrophysiologiques avec un type à bas potentiel, le canal T qui possède une ouverture transitoire, et cinq types de canaux s'ouvrant à un potentiel plus élevé, les canaux L, N, P, Q et R (Spedding and Paoletti, 1992). Un deuxième type est activé par la liaison à différents agonistes (hormones, neuromédiateurs...) et ces canaux sont appelés ROC (pour Receptor-Operated Channel). Ils sont présents dans les neurones et les cellules sécrétrices. On trouve également, les canaux SOC (pour Store-Operated Channel) activés en réponse à une déplétion calcique des stocks intracellulaires. Plusieurs systèmes contrôlent l'homéostasie calcique : Les pompes à Ca^{2+} (Ca^{2+} -ATPase) de la membrane plasmique (ou PMCA pour plasma membrane calcium ATPase) assurent le pompage des ions Ca^{2+} du cytoplasme vers le milieu extracellulaire (Strehler *et al.*, 2007). L'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ assure la sortie d'un ion Ca^{2+} contre l'entrée de trois ions Na^+ . La vitesse d'échange dépend donc de la concentration de ces ions de part et d'autre de la membrane (Philipson *et al.*, 2002). Au niveau du réticulum endoplasmique, les pompes SERCA (sarco-endoplasmic reticulum calcium ATPase) sont responsables du remplissage des réservoirs de Ca^{2+} du réticulum

endoplasmique en hydrolysant de l'ATP pour transporter le Ca^{2+} contre son gradient électrochimique (Dong *et al.*, 2006).

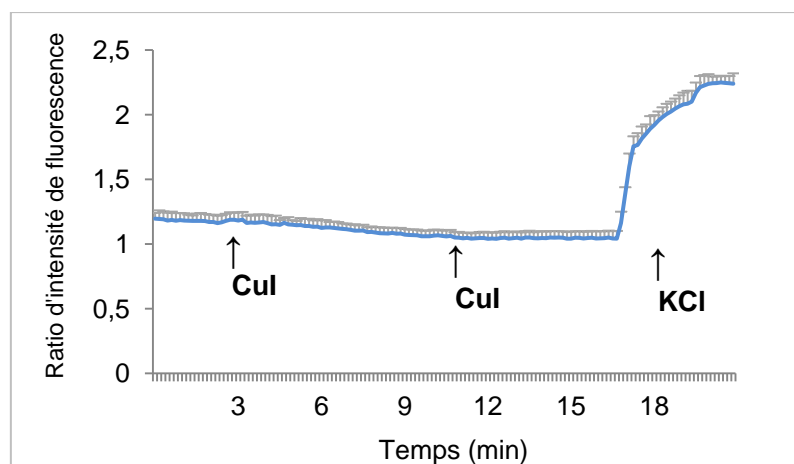
Le calcium exerce des effets multiples sur la structure et la dynamique du cytosquelette d'actine (Furukawa *et al.*, 2003). Par exemple, il peut affecter les processus biologiques et permettre la contraction en stimulant l'assemblage de la myosine au filament d'actine (Tan and Boss, 1992), activer des protéines de coiffe (Yamamoto *et al.*, 1982), inhiber l' α -actinine, une protéine de réticulation des filaments d'actine (Witke *et al.*, 1993), ou encore d'autres cibles potentielles. Il a été clairement démontré que l'utilisation de chélateurs calciques intracellulaires induit des changements de la morphologie cellulaire et du cytosquelette d'actine (Saoudi *et al.*, 2004).

Afin de vérifier l'implication du calcium dans l'agrégation de l'actine sous l'effet de la cucurbitacine I, nous avons, dans un premier temps, évalué l'effet de la cucurbitacine I sur le niveau du Ca^{2+} intracellulaire par imagerie en microscopie à fluorescence en utilisant une sonde calcique fluorescente (Fluo 3-AM). Lorsque le Ca^{2+} se lie à la sonde, cette dernière change de conformation et sa fluorescence augmente. Par conséquent, plus il y'a du Ca^{2+} dans le cytoplasme d'une cellule, plus il se lie à la sonde, et plus la fluorescence de la sonde augmente ce qui permet de suivre les variations intracellulaires de calcium libre. Ce type de sonde doit être spécifique de l'ion Ca^{2+} , avoir une distribution homogène dans le cytosol des cellules chargées et ne pas avoir tendance à fuir ou à se distribuer de façon préférentielle dans certains compartiments. Nos premiers travaux ont concerné les cellules HeLa, mais, pour des raisons inexplicables, la distribution de la sonde Fluo-3-AM n'y était pas homogène. Nous avons donc décidé de travailler sur des cellules excitables comme les neurones corticaux de souris (DIV7). Ces cellules sont incubées avec la sonde fluorescente (Fluo3-AM) dans un milieu contenant 2 mM de CaCl_2 . Les variations du Ca^{2+} intracellulaire sont étudiées en temps réel par vidéomicroscopie à fluorescence. Après un temps de stabilisation de 2 min, 100 nM de cucurbitacine I ont été ajoutées au milieu. Nos résultats montrent que la cucurbitacine I n'induit pas de variation du Ca^{2+} intracellulaire dans ces neurones. La fluorescence de la sonde Fluo3-AM ne varie pas non plus, lors d'une deuxième application de la cucurbitacine I (100 nM), comme cela est illustré sur la figure 47A. On observe en effet au cours du temps une lente dérive (probablement à cause du photoblanchiment). L'absence d'effet de la cucurbitacine I sur la concentration intracellulaire de calcium n'est pas liée à une erreur dans le désignation des conditions expérimentales comme l'atteste l'application du KCl (témoin

positif) qui provoque une réponse nette en activant différents types de canaux calciques voltage dépendant (Paillusson *et al.*, 2010; Ratz *et al.*, 2005), (figure 49A).

Pour s'assurer que l'impact de la cucurbitacine I sur l'agrégation de l'actine est indépendant de la signalisation calcique, nous avons dans un second temps, prétraité les neurones par différents inhibiteurs calciques ou par des chélateurs de calcium, puis co-incubé ces neurones avec de la cucurbitacine I. Comme dans les cellules HeLa, le traitement des neurones par la cucurbitacine I seule (100 nM, 1 h) entraîne une agrégation d'actine (figure 47B). Le prétraitement des neurones au BAPTA-AM (30 μ M, 1 h, en absence de calcium extracellulaire), un chélateur calcique intracellulaire, n'empêche pas la formation d'agrégats d'actine montrant que la formation de ces structures ne dépend pas de l'afflux de calcium. Ensuite, nous avons fait les mêmes expériences en présence de certains inhibiteurs des canaux calciques. L'acide cyclopiazonique (CPA, 50 μ M) a été utilisé afin d'inhiber le transporteur calcique du réticulum endoplasmique lisse (pompe SERCA), causant ainsi la déplétion et empêchant le remplissage des réserves de calcium intracellulaires. Dans le même ordre d'idée, afin d'inhiber l'influx calcique, les antagonistes des canaux calciques voltage-dépendants de types L (Nimodipine, 10 μ M) et T (Lanthanum, 100 μ M), ont été ajoutés au milieu extracellulaire dans lequel le Ca^{2+} est absent (EGTA, 2 mM). Malgré la présence de ces inhibiteurs, la cucurbitacine I entraîne toujours l'agrégation d'actine dans ces neurones. L'ensemble de ces résultats indique que le mécanisme d'action de la cucurbitacine I n'est très probablement pas dû à des variations du calcium intra-cytosolique qu'elle pourrait provoquer à des temps courts.

A



B

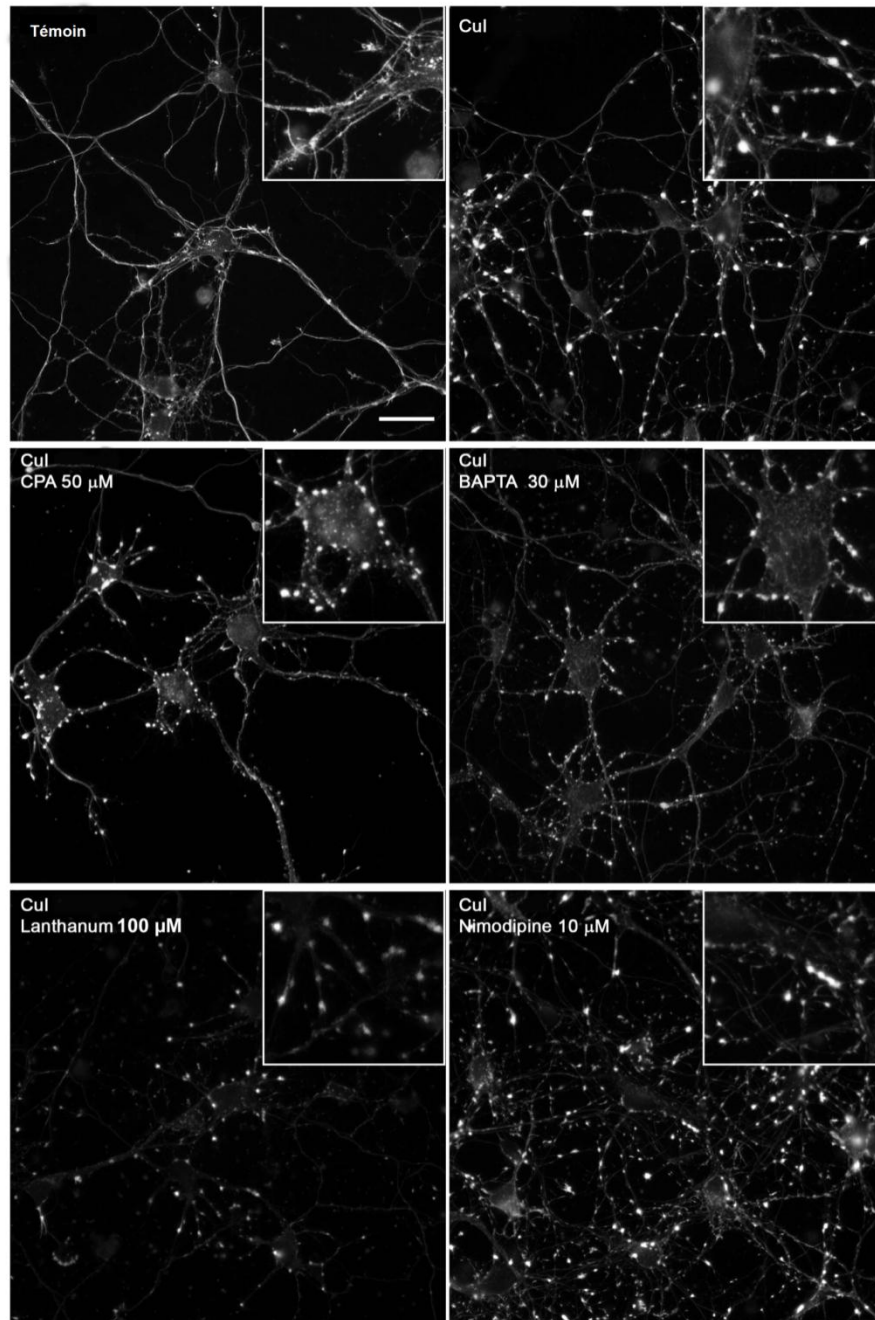


Figure 47 : L'effet de la cucurbitacine I sur l'agrégation de l'actine dans les neurones corticaux est indépendant des variations du calcium intracellulaire.

A : Mesure fluorométrique du calcium intracellulaire au cours du temps après l'ajout de la cucurbitacine I (100 nM). Le KCl est utilisé comme témoin positif (50 mM). Les résultats sont présentés sous forme de ratio calculé par rapport à un témoin non traité. Les valeurs indiquées sont les moyennes \pm écart type.

B : Neurones corticaux de souris traités par le DMSO 0,01% (Témoin) ou la cucurbitacine I seule (CuI, 100 nM) pendant 1 h ou prétraités (pendant 1 h) par le Lanthanum / EGTA (100 μ M / 2 mM), la Nimodipine (10 μ M), BAPTA-AM / EGTA (30 μ M / 2 mM) ou l'acide cyclopiazonique CPA (50 μ M) et co-incubés avec la cucurbitacine I (CuI, 100 nM) pendant 1h. Les neurones ont été fixés puis marqués avec la phalloïdine-rhodamine. Barre d'échelle : 20 μ m.

II.4 Impact de la cucurbitacine I sur les voies de signalisation LIM kinase/cofiline et Rho/Rho kinase/Myosine II

Les voies LIM kinase/cofiline et Rho/Rho kinase sont des cascades de signalisation centrales dans la régulation du cytosquelette d'actine. Nous avons donc exploré l'impact de la cucurbitacine I sur ces voies, en les explorant à différents niveaux.

II.4.1 La cucurbitacine I inhibe la phosphorylation de la cofiline dans les cellules HeLa

Les travaux de Nakashima *et al.* (Nakashima *et al.*, 2010) avaient conduit à identifier la cofiline comme une cible de la cucurbitacine E dans les lysats cellulaires, et également à montrer, que les cucurbitacines E et I bloquent la phosphorylation de la cofiline de façon dose dépendante. Ces résultats ont été retrouvés pour la cucurbitacine B (Zhang *et al.*, 2013b). Récemment, Gabrielsen *et al.* ont rapporté que les cucurbitacines se liaient d'une manière covalente aux cystéines de la cofiline 1 (Gabrielsen *et al.*, 2013) et inhibaient ainsi sa phosphorylation. Cependant, la suppression de la cofiline 1 par siRNA dans la cellule n'est pas suffisante pour empêcher l'agrégation de l'actine sous l'effet de la cucurbitacine E ou B. cela a conduit les auteurs à proposer qu'il existe de multiples protéines cibles pour ces composés (Gabrielsen *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2013b).

De notre côté, nous avons également retrouvé une inhibition de la phosphorylation de la cofiline 1 dans les cellules HeLa traitées par les cucurbitacines I ou E de façon dose dépendante (figure 48B) et montré que les formes glycosylées des cucurbitacines I ou E (10 μ M) ne préviennent pas la phosphorylation de cette protéine à des concentrations équivalentes. Le BMS3 proposé comme inhibiteur spécifique de LIMK1/2 initialement synthétisé par Bristol Myers Squibb (BMS) (Ross-Macdonald *et al.*, 2008), empêche également la phosphorylation de la cofiline dans les cellules HeLa, en accord avec les résultats de Ross-Macdonald (Ross-Macdonald *et al.*, 2008). De plus, nous avons observé que la localisation cellulaire de la cofiline 1 ne varie pas de façon parallèle à celle de l'actine sous l'effet de la cucurbitacine I. En effet, bien que de nombreux agrégats punctiformes d'actine périnucléaires se forment dans les cellules HeLa traitées par la cucurbitacine I (10 nM, pendant 2 h), la distribution de la cofiline 1 ne suit pas celle de l'actine (figure 48A). Ce résultat est en accord avec les observations de Gabrielsen *et al.* faites dans des cellules

tumorales mammaires humaines MCF7 traitées par la cucurbitacine E à différentes concentrations (30 – 300 nM) (Gabrielsen *et al.*, 2013).

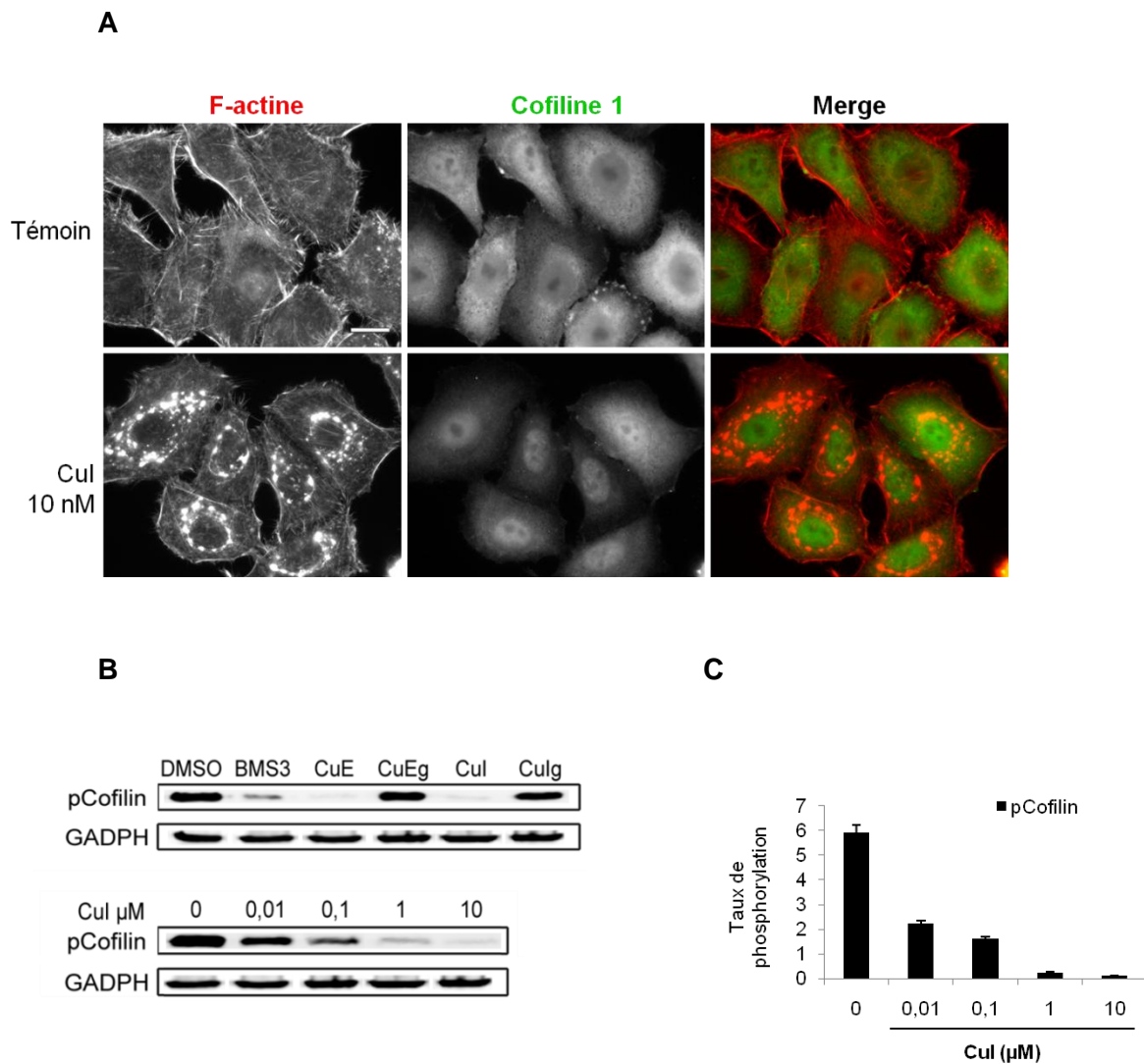


Figure 48 : Les cucurbitacines I et E inhibent la phosphorylation de la cofiline 1.

A : Cellules traitées par le DMSO 0,01% (Témoin) ou par la cucurbitacine I (CuI, 10 nM pendant 2 h), puis fixées et immuno-marquées avec l'anticorps polyclonal anti-cofiline 1 (vert), et avec la phalloïdine-rhodamine pour mettre en évidence l'actine (rouge). Sous l'effet de la cucurbitacine I, on voit apparaître de nombreux agrégats d'actine notamment dans la région périnucléaire. On observe pour la cofiline 1 une inversion du rapport nucléo-cytoplasmique mais pas d'agrégation ni de co-localisation avec l'actine. Barre d'échelle 20 μm.

B : Cellules HeLa traitées par le DMSO 0,01% (Témoin), BMS3 (inhibiteur de LIMK) ou les cucurbitacines E et I glycosylées (CuE_g, CuI_g) et leur aglycone (CuE, CuI) à une concentration de 10 μM (figure B, en haut) pendant 4 h ou par la CuI à différentes concentration (0,01, 0,1, 1 ou 10 μM) (figure B, en bas) pendant 4 h. La phosphorylation de cofiline 1 a été analysée par western blot en utilisant un anticorps polyclonal dirigé contre la forme phosphorylée de la cofiline (anti sérine 3 phosphorylée). La GADPH est utilisée comme témoin de charge protéique.

C : Les histogrammes représentent l'analyse densitométrique de l'inhibition la phosphorylation de cofiline par la cucurbitacine I de manière dose dépendante.

II.4.2 La cucurbitacine I inhibe la phosphorylation de cofiline par LIMK *in vitro*

Nous avons montré que les cucurbitacines inhibent la phosphorylation de la cofiline. Les LIM kinases, comprenant LIMK1 et LIMK2 chez les mammifères, jouent un rôle central dans la régulation du cytosquelette d'actine par phosphorylation de la sérine 3 de la cofiline ce qui a pour effet d'inactiver sa capacité de dépolymérisation des filaments d'actine (Blanchoin *et al.*, 2000c; Maekawa *et al.*, 1999; Moriyama *et al.*, 1996; Sumi *et al.*, 1999). Nous avons donc examiné l'influence de la cucurbitacine I sur la voie LIMK 1/2 de façon indirecte *in vivo* en faisant appel au BMS3, inhibiteur pharmacologique de LIMK1/2 (Ray *et al.*, 2014; Ross-Macdonald *et al.*, 2008) puis directement *in vitro*. Nos résultats montrent que le prétraitement des cellules HeLa par le BMS3 (10 nM, pendant 1 h) inhibe en partie l'agrégation de l'actine habituellement induite par l'administration de la cucurbitacine I à la concentration de 10 nM pendant 2 h (figure 49A). Nous avons ensuite examiné l'effet de la cucurbitacine I sur la phosphorylation de la cofiline par LIMK *in vitro*. En absence de cucurbitacine I, la LIM kinase 1 (LIMK1) à des concentrations ~ 100 fois inférieures à celle de la cofiline 1 phosphoryle efficacement cette protéine. A l'inverse, l'addition de cucurbitacine I ou de BMS3 à 10 µM inhibe la phosphorylation de cofiline 1 par LIMK1. Par contre, la forme glycosylée de la cucurbitacine I (10 µM) n'a pas d'effet sur la phosphorylation de la cofiline 1 à cette concentration (figure 49B).

II.4.3 Les simulations d'amarrage moléculaire de la cucurbitacine I et d'inhibiteurs de LIMK1 suggèrent que la cucurbitacine I est un inhibiteur compétitif de l'ATP

Nous avons montré que la cucurbitacine I inhibe l'activité de LIMK1 *in vitro*. Cet effet pourrait résulter d'une inhibition du site catalytique de l'enzyme ou bien d'une interaction directe de la cucurbitacine I avec la cofiline qui gênerait sa phosphorylation. Nous avons examiné par RMN, la possibilité d'une telle interaction *in vitro*. Pour cela, la cofiline 1 a été incubée avec la cucurbitacine I à un ratio (1/100) en absence d'agent réducteur comme le DTT pendant 24, 48 et 72 h à 4°C (les figures ne sont pas présentées). La présence d'une éventuelle interaction a été suivie sur l'évolution du spectre 1D de la cucurbitacine I. Les résultats montrent clairement que dans ces conditions expérimentales, la cucurbitacine I n'interagit pas avec la cofiline 1. Ces résultats sont en accord avec les travaux de Knecht *et al.* (Knecht *et al.*, 2010) qui ont étudié une possible interaction entre la cofiline et la

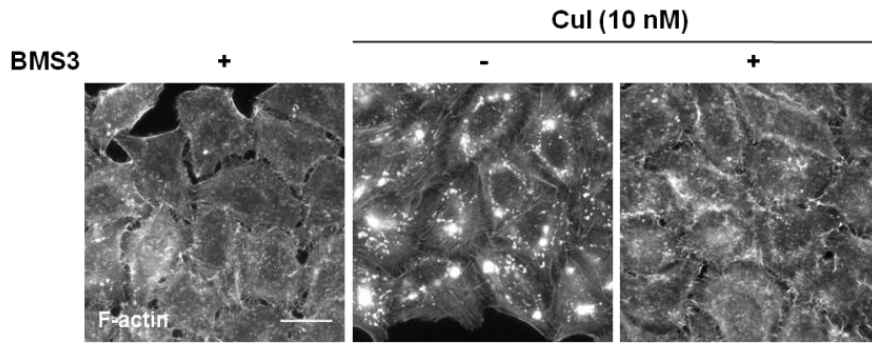
cucurbitacine I (ratio 15/100) par spectrométrie de masse, mais nos résultats sont en contradiction avec les résultats publiés par Gabrielsen *et al.* obtenus avec les cucurbitacines E, I et D (Gabrielsen *et al.*, 2013). Ces données RMN suggèrent donc que la cucurbitacine I inhibe LIMK1 plutôt par interaction avec cette enzyme. Nous avons donc examiné l'interaction de la cucurbitacine I avec LIMK1 par simulation moléculaire *in silico*. L'interaction cucurbitacine I – LIMK1 a ensuite été comparée à l'interaction d'une série d'inhibiteurs de LIMK comme le BMS3 ou la staurosporine.

La staurosporine est un inhibiteur compétitif de la liaison de l'ATP à différentes cibles (Meggio *et al.*, 1995). De façon intéressante, LIMK1 a été récemment cristallisée en présence de staurosporine et également cristallisée dans LIMK1 (code APB 3S95). La liaison LIMK1 – staurosporine implique deux liaisons hydrogènes (G414, I416) situées dans la région charnière de l'enzyme (figure 49C, à gauche). La staurosporine apparaît sous forme plane et occupe la poche de l'ATP. Les résultats d'amarrage moléculaire LIMK1 – BMS3 ou LIMK1 – cucurbitacine I montrent un regroupement significatif du BMS3 (figure 49C, à droite) et des molécules cucurbitacine I (figure 49D) dans la poche ATP. De plus, la liaison hydrogène clé I416 (région charnière) est conservée pour toutes les molécules.

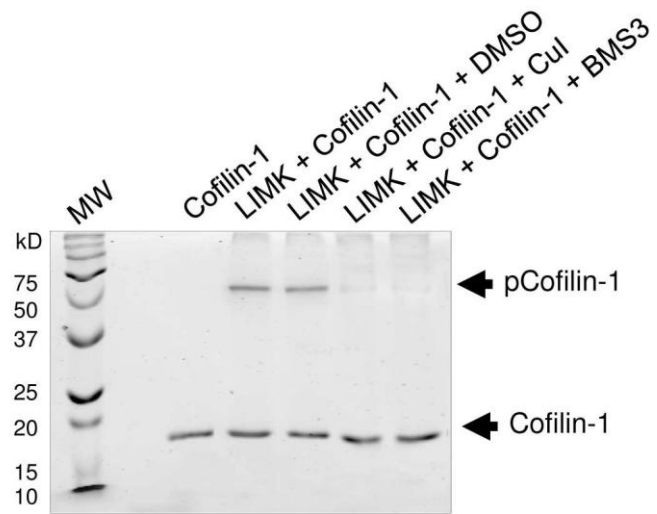
L'étude d'amarrage moléculaire montre que les liaisons hydrogène (G414 et I416) sont des interactions clés avec la région charnière pour le BMS3 et la cucurbitacine I. L'occupation de la poche ATP à proximité de la région charnière amène à considérer la cucurbitacine I comme inhibiteur de LIMK1 par interaction compétitive avec l'ATP en cohérence avec nos mesures expérimentales.

D'après les résultats expérimentaux, la cucurbitacine I glycosylée n'empêche pas la phosphorylation de la cofiline par LIMK1 *in vitro* aux concentrations utilisées, cette dernière étant moins active que son aglycone ($CI_{50} > 100 \mu\text{M}$ et 100 nM respectivement après 48 h). Les résultats Autodock montrent que le point de greffage du glucose en C2 doit perturber fortement l'interaction de la cucurbitacine I avec la poche ATP de LIMK.

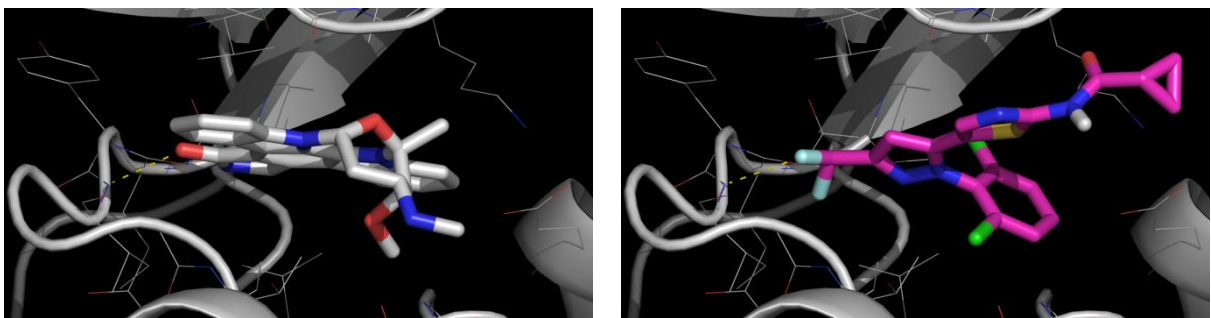
A



B



C



D

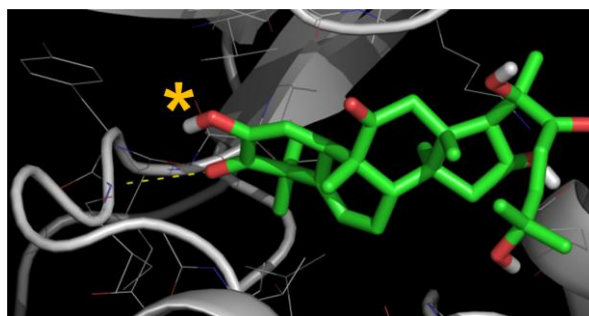


Figure 49 : Interaction LIMK1/cucurbitacine I

A : Le BMS3 inhibe partiellement l'effet de la cucurbitacine I sur l'agrégation de l'actine. Cellules HeLa prétraitées par BMS3 (10 nM, 1 h) et co-incubées avec la cucurbitacine I (Cul, 10 nM, pendant 2 h). Les cellules ont été fixées et marquées avec la phalloïdine-rhodamine. Barre d'échelle : 20 μ m.

B : La cucurbitacine I inhibe la phosphorylation de la cofiline1 *in vitro*. La réaction kinase effectuée dans 15 μ L de tampon kinase contenant 1 x tampon de réaction (8 mM de MOPS-NaOH pH 7,0, EDTA 200 μ M), 2 ng/ μ L LIM kinase 1 activée, 1 mM d'ATP avec 167 ng/ μ L cofiline 1 et incubées avec du DMSO (Témoin), Cul ou BMS3 à 10 μ M pendant 30 min à 30 °C. Les échantillons sont migrés sur un gel de Polyacrylamide Phos-Tag™ (voir matériels et méthodes).

C : La cucurbitacine I occupe dans LIMK1 une poche similaire à celle occupée par les inhibiteurs de LIMK1 (staurosporine, BMS3). Staurosporine (Code PDB: 3S95, à gauche) et BMS3 (structure dockée, à droite). Les inhibiteurs sont représentés sous forme de bâtonnets blanc et magenta, respectivement. LIMK1 est représentée sous forme de ruban et fils de couleur blanche.

D : Cucurbitacine I (vert) dans LIMK1 (Code PNB: 3S95). L'étoile jaune indique le groupement OH qui peut être substitué par un résidu glucose dans la forme glycosylée de cucurbitacine I.

Cependant, malgré l'inhibition de la phosphorylation de la cofiline par la cucurbitacine I et malgré l'inhibition mesurée de LIMK *in vitro*, et cette proposition simulée de mécanisme d'action, la présence de BMS3 n'empêche pas l'agrégation de l'actine de cellules HeLa traitées par la cucurbitacine I. Cela suggère que l'agrégation de l'actine dans les cellules sous l'effet de la cucurbitacine I ne dépend pas exclusivement d'une inhibition de la voie LIMK/cofiline et que l'une de ces molécules ou les deux agissent sur d'autres cibles et de façon différente.

Devant ces contradictions apparentes, nous avons donc décidé d'explorer plus avant les mécanismes et les auteurs responsables du blebbing et de régulation du cytosquelette d'actine.

II.4.4 Cucurbitacine I et « blebbing »

Nos premières observations par vidéomicroscopie réalisée à intervalles très courts (20 sec) ont montré que la cucurbitacine I (50 nM) provoquait une altération très rapide (dans les premières minutes du traitement) de la membrane cellulaire des cellules HeLa, sous forme de blebs, puis les cellules se rétractent, avec une altération majeure de la morphologie cellulaire (figure 50A, t = 2 h). Après plusieurs heures d'exposition à la cucurbitacine I, les images de vidéomicroscopie prises à intervalles plus longs (2 min), font apparaître une multinucléation de cellules HeLa (22 h) et leur ré-étalement (figure 50A, 22 h), comme nous l'avons montré précédemment (figure 33). Ces observations rejoignent celles obtenues par d'autres auteurs avec les cucurbitacines E, I et B sur différentes lignées cellulaires (Duncan *et al.*, 1996; Knecht *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2011).

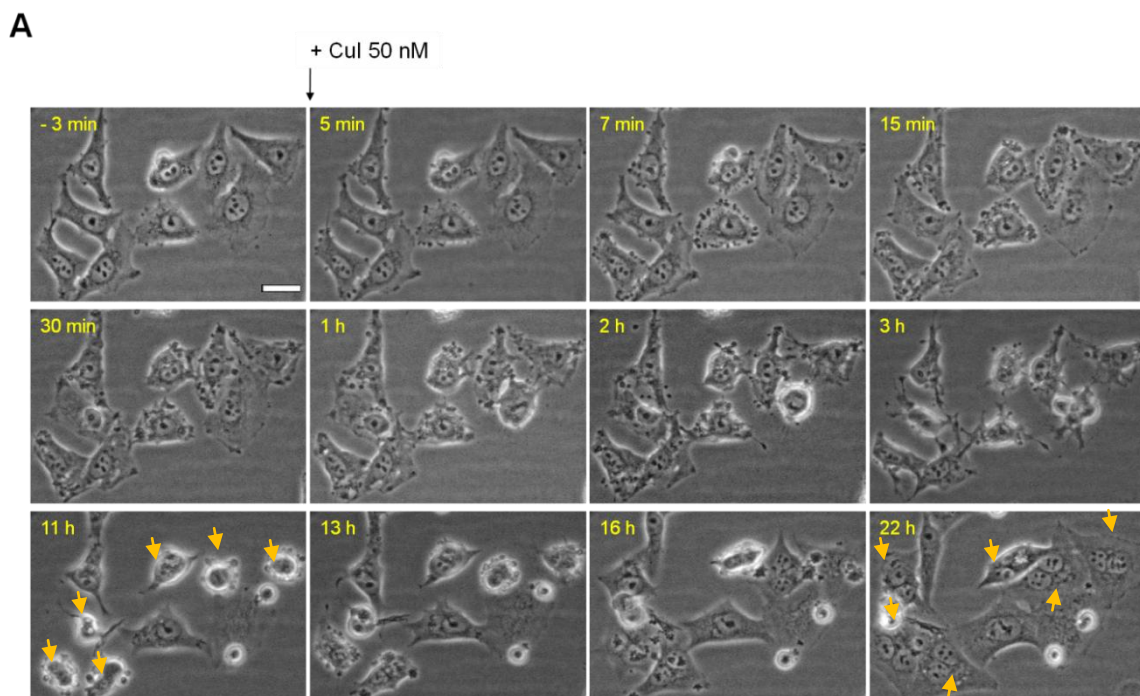
D'un point de vue mécanistique, l'expansion de blebs se produit lorsque la membrane plasmique se détache du cortex d'actine (Charras *et al.*, 2005). Comme cela est illustré sur la figure 50B, nous voyons sur la série d'imagerie en vidéomicroscopie à fluorescence de cellules HeLa exprimant la EGFP β -actine et traitées par la cucurbitacine I, l'absence de EGFP-actine à la surface du bleb pendant son inflation, alors qu'elle est bien visible au sein du cytoplasme, et que le cortex d'actine persiste dans le corps de la cellule, juste en dessous du bleb en croissance. L'actine corticale reste, ainsi, sous le site de détachement de la membrane dans le corps de la cellule lors de l'expansion du bleb (figure 50B, t = 150 sec). De façon intéressante, l'actine est ensuite progressivement recrutée à la surface du bleb de façon concomitante à sa rétraction, comme en témoigne la bordure d'actine fluorescente bien visible à t = 210 sec (figure 50B). Cela est mieux mis en évidence sur la superposition d'images montrant le cycle de vie d'un bleb (figure 50C). On remarque également que dans ces cellules traitées par la cucurbitacine I, l'accumulation d'actine corticale à la périphérie de la cellule en général (figure 50B, t = 330 sec, figure 50D). Globalement, ces blebs sont relativement de courte durée de vie (moyenne 120 sec) de leur apparition jusqu'à leur rétraction. Il faut aussi noter que les blebs sont en continuelle apparition sous l'effet de la cucurbitacine I, et sont suivis d'une contraction cellulaire qui réduit la taille de la cellule (figure 50D), comme mentionné précédemment.

Des études ont montré que c'est le complexe actomyosine, c'est-à-dire l'interaction des myosines de classes II avec le réseau d'actine corticale qui est à l'origine des projections et des rétractions de la membrane plasmique (Clark *et al.*, 2007; Paluch *et al.*, 2006). En effet, la

formation de blebs est souvent corrélée à une activité élevée de la myosine II, et son inhibition empêcherait le blebbing (Charras and Paluch, 2008; Mills *et al.*, 1998; Sahai and Marshall, 2003).

La myosine non musculaire de classe II, associée aux filaments d'actine, est impliquée dans différents processus intracellulaires qui sont dépendants de la contraction cellulaire non musculaire et du transport intracellulaire, comme la motilité cellulaire, la cytokinèse...(Sellers, 2000).

On distingue deux modes d'action pour les hexamères de myosine II : le premier est la stabilisation locale des filaments d'actine par liaison des MHC avec le filament d'actine. Le second est le rôle de moteur moléculaire, c'est-à-dire le déplacement des têtes globulaires des MHC sur le filament d'actine, qui nécessite la liaison, au préalable, des MHC aux filaments d'actine. Ces deux modes d'action consomment de l'énergie. En tant que moteur moléculaire, les myosines et plus spécifiquement les MHC, convertissent l'énergie de l'hydrolyse de l'ATP en une force ou énergie motrice qui permet le mouvement et la tension, par déplacement des myosines sur les filaments d'actine.



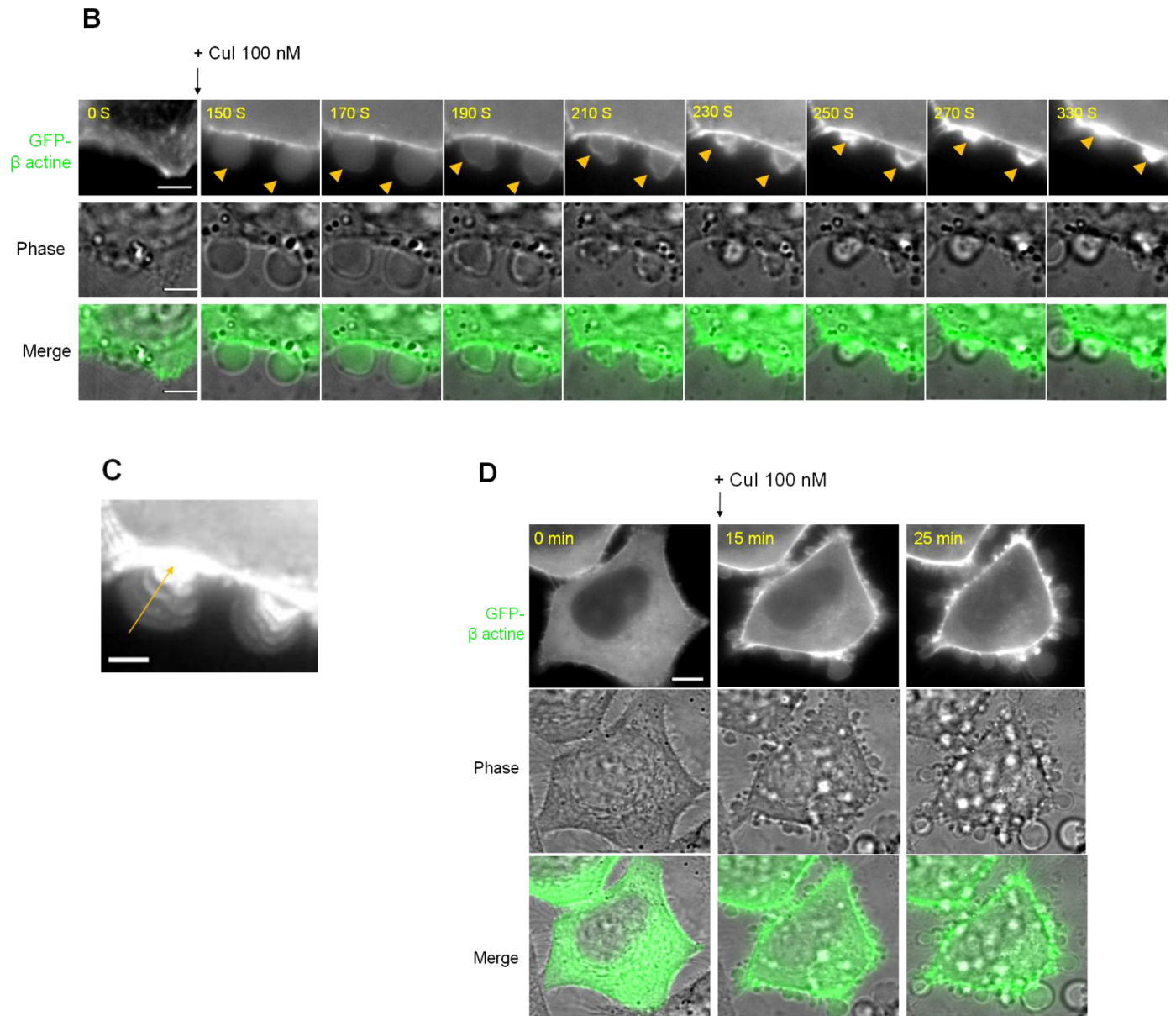


Figure 50 : Cucurbitacine I et blebbing.

A : Vidéomicroscopie en phase de cellules HeLa traitées par la cucurbitacine I (CuI, 50 nM) pendant 24 h. Les photos sont prises toute les 20 sec pendant les premières 20 min puis toute les 2 min pour le temps restant. Barre d'échelle : 20 μ m.

B : Vidéomicroscopie à fluorescence des cellules HeLa transfectées par EGFP- β -actine et traitées par la cucurbitacine I (CuI, 100 nM). Les photos sont prises toute les 20 sec. Les flèches indiquent les blebs. Barre d'échelle : 5 μ m.

C : Projection en Z de la dynamique du bleb. Barre d'échelle : 2 μ m.

D : Vidéomicroscopie à fluorescence des cellules HeLa transfectées par EGFP- β -actine et traitées par la cucurbitacine I (CuI, 100 nM). Barre d'échelle : 20 μ m.

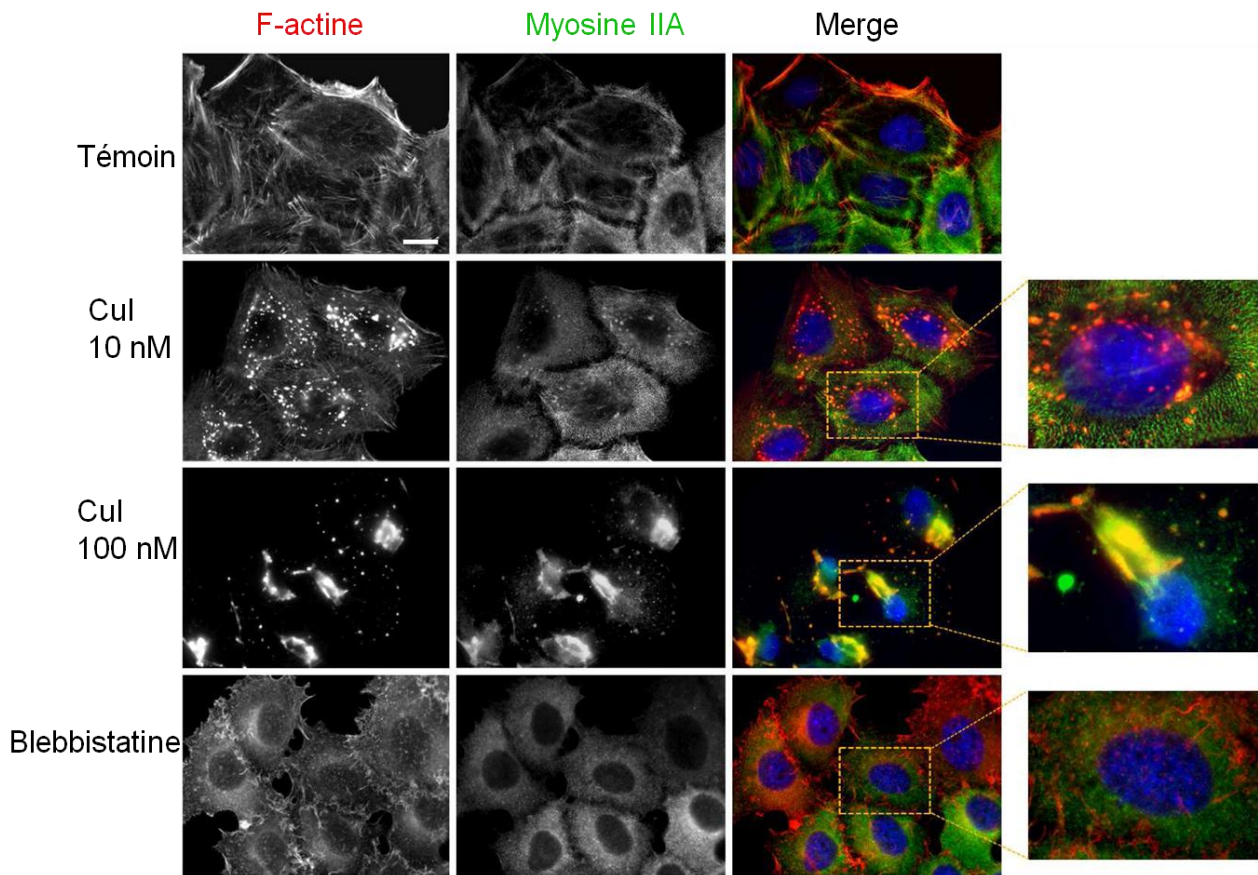
II.4.5 La cucurbitacine I provoque l'agrégation de la myosine IIA

Chez les vertébrés, il existe au moins trois isoformes de myosine non musculaires de classe II nommées myosine IIA (myoIIA), myosine IIB (myoIIB) ou myosine IIC (myoIIC) qui varient selon le type cellulaire (Golomb *et al.*, 2004; Vicente-Manzanares *et al.*, 2009). Nous avons examiné la distribution de la myosine IIA endogène dans les cellules HeLa traitées ou non pas la cucurbitacine I. Dans les cellules HeLa témoins, l'immuno-marquage myosine IIA est punctiforme, avec une distribution diffuse dans le cytoplasme et une légère accumulation de la myosine le long des fibres de stress et du cortex cellulaire (figure 51A). Ce marquage est similaire à ce qui a été montré par Wiggan *et al.* dans ces mêmes cellules (Wiggan *et al.*, 2012).

De façon surprenante, lorsqu'on traite les cellules par la cucurbitacine I, la myosine IIA s'accumule de façon massive et cette protéine co-localise alors avec les agrégats d'actine (figure 51A). De plus, cette accumulation et agrégation de la myosine IIA sous traitement par la cucurbitacine I ne semble pas s'accompagner d'une élévation de son expression comme le montre l'évaluation semi-quantitative par western blot (figure 51B).

La phosphorylation des MLCR sur leurs résidus Sérine19 (Ser19) et Thréonine18 (Thr18) (Bresnick, 1999) stimule l'activité ATPasique de la MHC et l'interaction myosine-actine. Pour cela, nous avons également examiné la distribution de la MLCR phosphorylée (pMLC, sur la serine19) dans les cellules HeLa traitées ou non pas la cucurbitacine I. Nous avons observé une accumulation de la pMLC dans les cellules traitées par la cucurbitacine I qui co-localise avec les agrégats d'actine marqués à la rhodamine phalloïdine (Figure 51C). Ces résultats suggèrent fortement que c'est surtout la forme phosphorylée de la myosine II qui co-agrège avec l'actine.

A



B



C

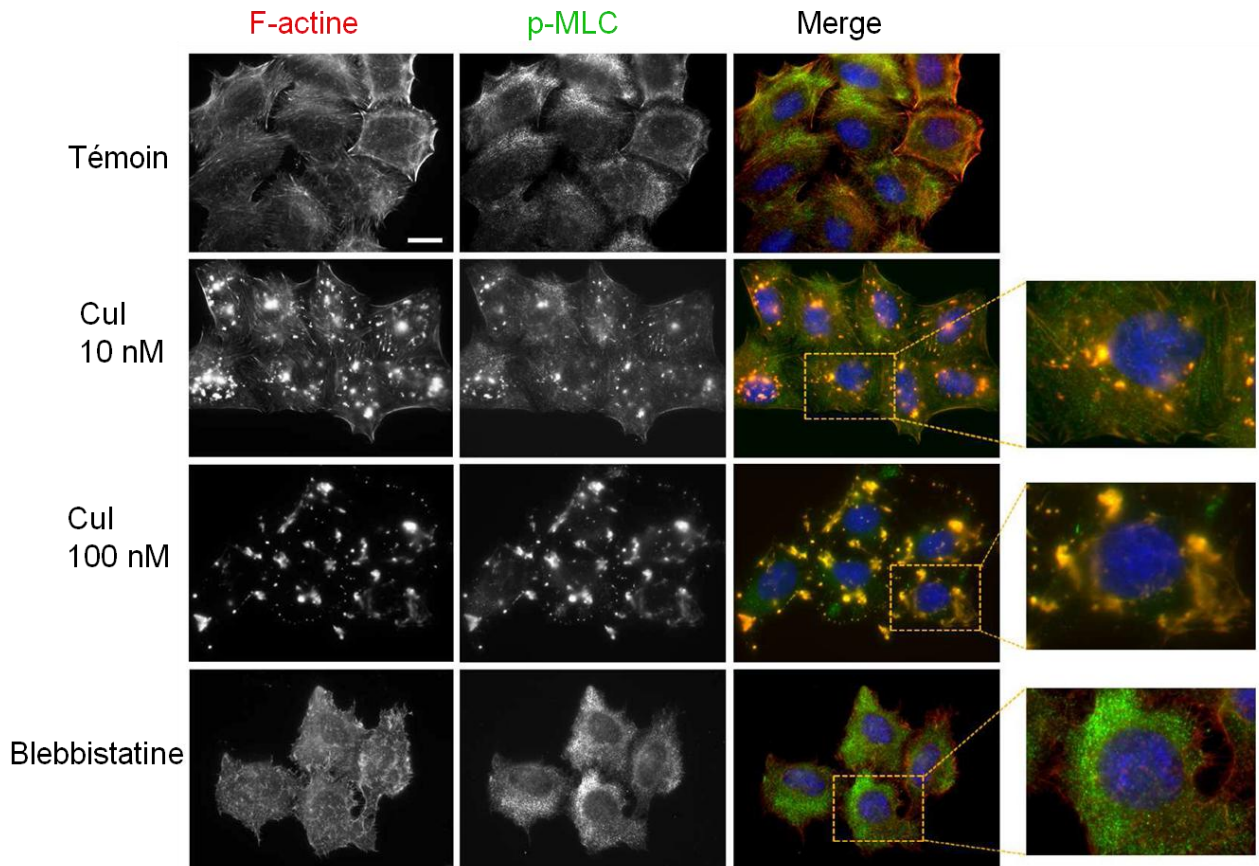


Figure 51 : La myosine IIA s'agrège avec les agrégats d'actine dans les cellules HeLa traitées par la cucurbitacine I

A : Cellules traitées par le DMSO 0,01% (Témoïn), la cucurbitacine I à différentes concentrations (CuI, pendant 2 h) ou par la blebbistatine (100 μ M, 30 min), puis sont fixées et marquées pour visualiser la myosine IIA (vert), l'actine (phalloïdine-rhodamine, rouge). Barre d'échelle : 20 μ m.

B : Cellules HeLa traitées par le DMSO 0,01% (Témoïn), ou la cucurbitacine I (CuI) à 100 nM, pendant 2 h. Le niveau d'expression de la myosine IIA a été analysé par western blot en utilisant un anticorps dirigés contre la forme totale de myosine IIA. La GADPH est utilisée comme témoin de charge protéique.

C : Cellules traitées par le DMSO 0,01% (Témoïn), la cucurbitacine I à différentes concentrations (CuI, pendant 2 h) ou par la blebbistatine (100 μ M, 30 min), puis sont fixées et marquées pour visualiser la phospho-myosin light chain^{Ser 19} (p-MLC, vert), l'actine (phalloïdine-rhodamine, rouge). Barre d'échelle : 20 μ m.

Devant cette découverte, nous avons donc testé si nous pouvions empêcher la formation d'agrégats d'actine dans les cellules traitées par la cucurbitacine I, en inhibant la contractilité du système actomyosine. Pour cela, nous avons prétraité les cellules HeLa par la blebbistatine, un inhibiteur spécifique de la myosine II phosphorylée ou non (Straight *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2008), qui agit en inhibant l'activité ATPasique des MHCs et donc l'activité de moteur moléculaire. La blebbistatine est nommée ainsi pour son effet de blocage du «blebbing» cellulaire et aussi de la migration cellulaire dépendante de ce processus. Lorsqu'on prétraite les cellules HeLa par de forte dose de blebbistatine (100 μ M) puis par la cucurbitacine I, on remarque l'absence de la formation de blebs dans ces cellules après quelques minutes d'exposition à 100 nM de cucurbitacine I. De plus, lorsque les cellules sont fixées à ce stade (quelques minutes d'expositions à 100 nM de cucurbitacine I), on constate l'absence d'agrégation de l'actine (figure 52A). Après 2 h d'application de la cucurbitacine I à 10 nM, on note l'absence des agrégats punctiformes qui sont habituellement formés dans ces conditions. Néanmoins, à plus forte concentration de cucurbitacine I (100 nM), et après ce même laps de temps (2 h), l'actine finit par s'agréger (figure 52B).

Pour compléter ces travaux, nous avons ensuite examiné l'impact de la cucurbitacine I sur la voie RhoA. Pour cela, nous avons utilisé de l'Y27632, inhibiteur spécifique l'activité de ROCK, une kinase effectrice de RhoA qui régule l'activité de la myosine II. En effet, l'activation des kinases ROCK par Rho-GTP augmente l'état de phosphorylation des chaînes légères régulatrices des myosines (MLCR) :

- directement, en phosphorylant les MLCR (Amano *et al.*, 1996; Maekawa *et al.*, 1999)

- indirectement par phosphorylation/inactivation de la phosphatase MYPT1 des MLCR (Kawano *et al.*, 1999; Kimura *et al.*, 1996).

La chaîne légère régulatrice des myosines doit être phosphorylée pour que les myosines soient actives, cette phosphorylation ayant comme effet d'augmenter l'activité ATPasique des chaînes lourdes de la myosine II, et leur fixation aux filaments d'actine. Le Y27632 diminue donc la concentration de myosines actives.

À 10 nM de cucurbitacine I, le Y27632 empêche complètement la cucurbitacine I de perturber l'organisation du cytosquelette d'actine après 2 h de traitement. L'effet du Y27632 est proche de celui de la blebbistatine. Lorsqu'on augmente concentration de la cucurbitacine

I à 100 nM, l'effet du Y27632 est plus faible que celui de la blebbistatine, ce qui suggère que l'effet de l'inhibition de l'activité ATPasique de la myosine II sur l'agrégation de l'actine est plus fort que celui de l'inhibition de la protéine ROCK (figure 52).

En revanche, la combinaison des deux drogues (blebbistatine + Y27632) induit un effet très spectaculaire puisque, dans ces conditions, nous n'observons plus d'agrégats d'actine dans les cellules traitées par 100 nM de cucurbitacine I (figure 52). Ainsi, l'inhibition de la contractilité du système d'actomyosine prévient les effets de la cucurbitacine I sur le cytosquelette d'actine dans les cellules HeLa.

II.4.6 La cucurbitacine I active RhoA et ROCK

Les expériences précédentes établissent que ROCK participe à la signalisation cucurbitacine I dépendante. Nous avons donc poursuivi nos explorations en examinant l'impact de la cucurbitacine I sur RhoA qui se situe en amont de ROCK.

Les résultats montrent que la cucurbitacine I augmente le taux de RhoA-GTP (Figure 53). Cet effet est induit à 10 ou 100 nM de cucurbitacine I au cours du temps. De façon intéressante, la cucurbitacine I ne modifie pas le niveau de RhoA. De plus, nous avons découvert que le BMS3 s'oppose à cet effet de la cucurbitacine I (figure 53).

Un dernier point concerne le lien entre la cascade RhoA/ROCK et la MLCR. ROCK étant le principal effecteur de RhoA, nous avons étudié l'effet de la cucurbitacine I sur l'activation de cette kinase dans les cellules HeLa. Pour cela, nous avons examiné la phosphorylation de la MYPT1, seule phosphatase connue à ce jour, pour déphosphoryler les MLCR (Hartshorne *et al.*, 1998), et donc réduit l'interaction de la myosine II avec les filaments d'actine. En effet, ROCK phosphoryle et inhibe la phosphatase MYPT1 qui à son tour cible les MLCR. Nos résultats montrent que la cucurbitacine I induit une phosphorylation de MYPT1 et comme nous l'envisagions, l'activation de ROCK par la cucurbitacine I est bloquée par le prétraitement des cellules avec le BMS3 (figure 53). Ces résultats indiquent donc, que la cucurbitacine I active RhoA et influence ainsi, l'ensemble des réponses médiées par cette voie.

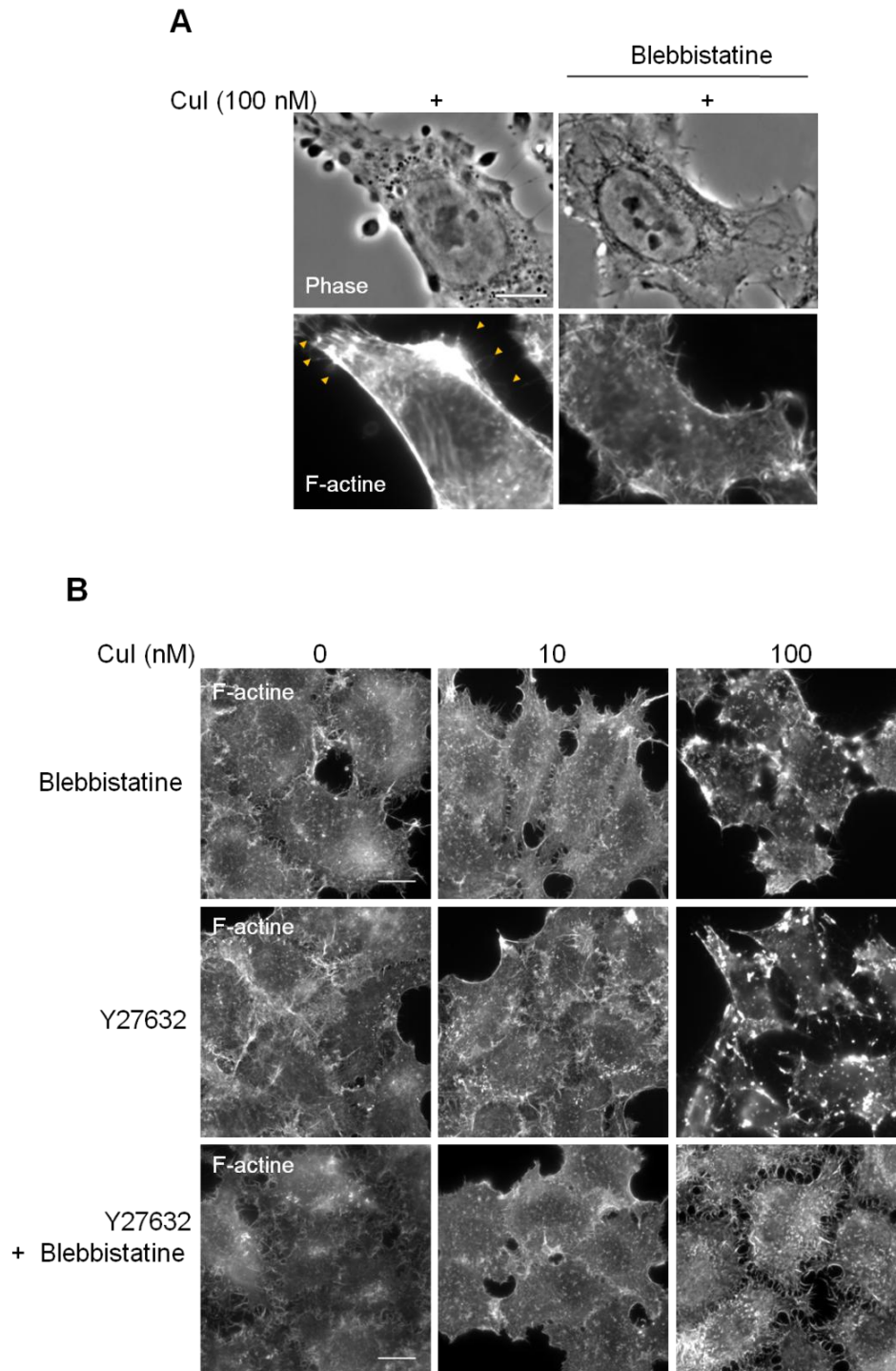


Figure 52 : Les inhibiteurs de la myosine II préviennent l'agrégation de l'actine induite par la cucurbitacine I dans les cellules HeLa

A : Cellules HeLa prétraitées par la blebbistatine (100 μ M, 30 min) ou non et en présence de cucurbitacine I (CuI, 100 nM) pendant 20 min. Les cellules ont été fixées et marquées avec la phalloïdine-rhodamine pour visualiser l'actine. Barre d'échelle : 20 μ m.

B : Cellules HeLa prétraitées par la blebbistatine (100 μ M, 30 min), l'Y27632 (50 μ M, 30 min) ou par la combinaison des deux drogues (blebbistatine + Y27632) puis co-incubées avec la cucurbitacine I (Cul) à 10 nM ou 100 nM pendant 2 h. Les cellules ont été fixées et marquées avec la phalloïdine-rhodamine. Barre d'échelle : 20 μ m.

En résumé, nous avons montré que la cucurbitacine I modifiait le taux d'activation de la RhoA GTPase dans les cellules HeLa avec pour conséquence une activité accrue de la myosine II ; le traitement des cellules HeLa avec un inhibiteur direct de myosine II ou indirect via les ROCK avant administration de cucurbitacine I, prévient la majorité des effets de la cucurbitacine I sur l'organisation du cytosquelette d'actine. Nous avons également établi que le BMS3 a les mêmes effets que la cucurbitacine I sur LIMK mais qu'il s'oppose aux effets de la cucurbitacine I sur la voie RhoA/ROCK. Le partage d'effets (LIMK) ou l'inhibition (RhoA/ROCK) tient probablement à un partage de propriétés structurales entre le BMS3 et la cucurbitacine I comme le suggère nos travaux de stimulation moléculaire (amarrage sur LIMK1).

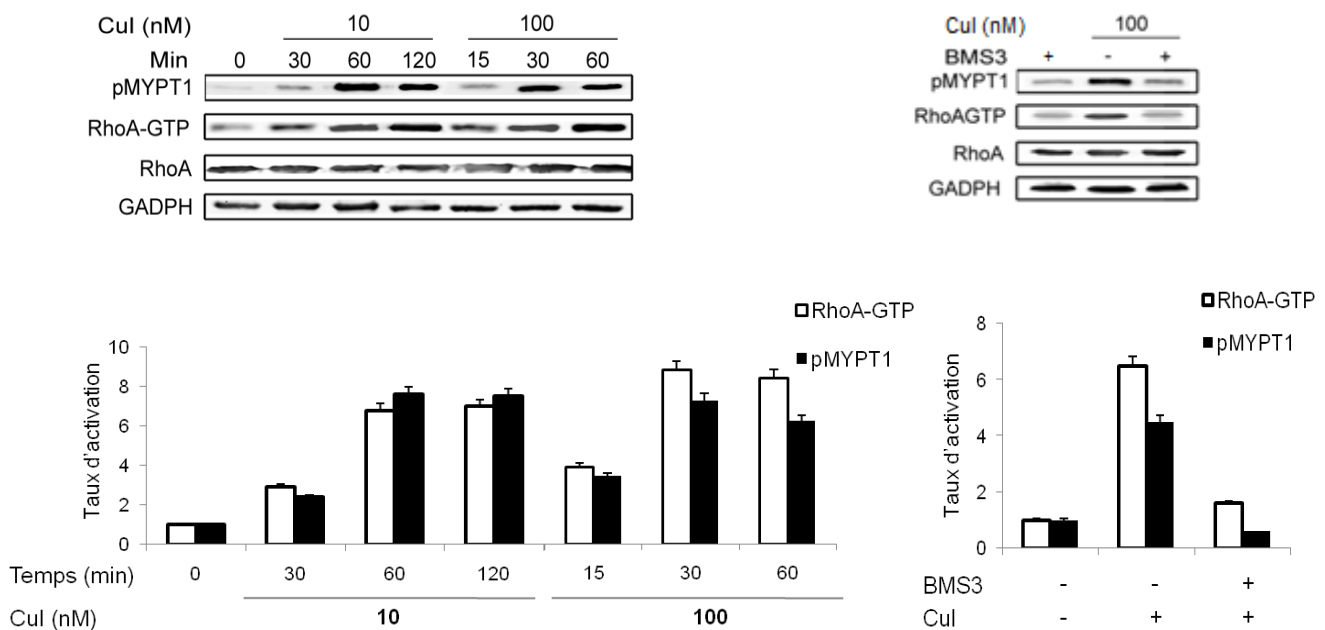


Figure 53 : La cucurbitacine I active la voie RhoA/ROCK par activation de RhoA-GTP

Les cellules HeLa ont été privées de sérum pendant 48 h, puis traitées avec la cucurbitacine I (10 et 100 nM), ou prétraitées avec du BMS3 (1 μ M pendant 1 h) pour être ensuite co-incubées avec la cucurbitacine I (100 nM, 30 min). Les niveaux de RhoA-GTP ont été déterminés par immunoprécipitation. La phosphorylation de la Thr⁸⁵³ de la protéine MYPT1 a été déterminée sur les extraits cellulaires par Western blot.

Les histogrammes représentent l'analyse densitométrique de l'activation de RhoA et de la phosphorylation de MYPT1 sur la Thr⁸⁵³.

II.4.7 La cucurbitacine I induit la formation des fibres de stress

L'activation de la GTPase Rho induit l'activation du complexe d'actomyosine via les kinases ROCK et augmente de ce fait la contraction cellulaire et à l'assemblage des fibres de stress (Ridley and Hall, 1992). Nos résultats précédents ont montré que la cucurbitacine I induit l'activation de RhoA, ceci nous a conduit, à examiner son effet sur la formation des fibres de stress. Pour cela, les cellules HeLa ont été privées de sérum pendant 48 h, puis ont été traitées par la cucurbitacine I à 10 et 50 nM afin de pouvoir visualiser les fibres de stress.

Comme illustré dans la figure 54, la cucurbitacine I induit la formation de fibres de stress, en accord avec les résultats de (Lopez-Haber and Kazanietz, 2013), qui ont observé une activation de RhoA dans les cellules MCF7 traitées par la cucurbitacine I à 100 nM (30 min). En outre, l'inhibiteur de ROCK (Y27632) bloque la formation des fibres de stress en réponse à la cucurbitacine I (10 nM). Pris dans l'ensemble, les résultats montrent que la cucurbitacine I active RhoA et ROCK dans les cellules HeLa et que cette activation est centrale dans son effet cellulaire.

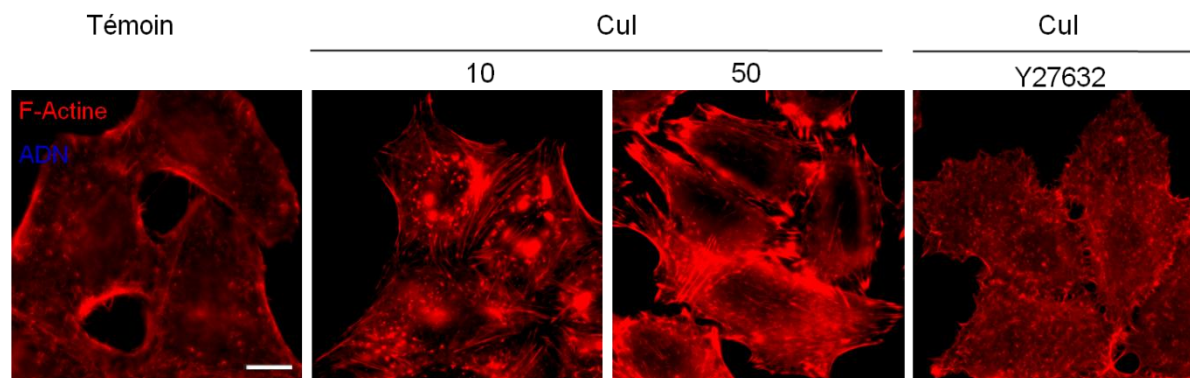


Figure 54 : La cucurbitacine I induit la formation des fibres de stress

Les cellules HeLa ont été privées de sérum pendant 48 h, puis traitées par le DMSO 0,01% (Témoin) ou par la cucurbitacine I (10 et 50 nM pendant 2 h et 30 min respectivement), ou prétraitées avec le Y27632 (50 μ M, pendant 30 min) pour être ensuite co-incubées avec la cucurbitacine I (10 nM, pendant 2h). Les cellules ont été fixées et marquées avec la phalloïdine-rhodamine. Barre d'échelle : 20 μ m.

III. Discussion et conclusion

Un des points clés préalable à l'utilisation éventuelle des substances naturelles en tant que candidat médicament est de comprendre leur mécanisme d'action moléculaire. Une des difficultés dans ce domaine réside dans le fait, que bien souvent, les petites molécules ont une variété de cibles biologiques avec lesquelles elles interagissent, avec différentes affinités. L'effet « net » de tels agents étant la résultante de cette multitude d'actions. De ce point de vue, la compréhension du mode d'action des cucurbitacines se révèle particulièrement ardue. Comment ces molécules agissent sur leurs cibles ? Cette question devient particulièrement critique si l'on envisage d'améliorer la sélectivité et l'efficacité de tels candidats médicaments, tout en minimisant leur toxicité potentielle.

Avant que nous n'entamions ce travail de thèse, les mécanismes d'action proposés pour rendre compte de l'effet des cucurbitacines sur la prolifération et la division cellulaire avaient essentiellement trait à l'inhibition de la voie JAK2/STAT3. Mais cette inhibition n'est observée pour la cucurbitacine I qu'à forte concentration (10 μ M), c'est-à-dire bien au delà des concentrations où l'on note des changements morphologiques cellulaires et la survenue d'agrégats d'actine (à partir de 10 nM). Cela suggérerait que l'altération du cytosquelette d'actine sous l'effet de ces molécules, fait appel à un ou d'autre(s) mécanisme(s) moléculaire.

Dans ce contexte, nous avons successivement montré, à l'instar d'autres auteurs (Duncan *et al.*, 1996; Duncan and Duncan, 1997; Graness *et al.*, 2006; Haritunians *et al.*, 2008; Knecht *et al.*, 2010; Maloney *et al.*, 2008), que les cucurbitacines entraînent une altération de la morphologie cellulaire concomitante à une agrégation massive de l'actine. Nous avons montré que cet effet est irréversible, comme en témoigne la persistance des agrégats d'actine après retrait de la cucurbitacine I y compris après une longue période de retrait (72 h). De façon plus spécifique, en explorant une grande variété de mécanismes d'action potentiels, nous avons pu démontrer dans ce travail de thèse que :

1. L'action intracellulaire de la cucurbitacine I est ERO-indépendante bien que son effet soit inhibé par des agents antioxydants à fonction thiol. L'inhibition par ces antioxydants étant la résultante de leur conjugaison directe à la cucurbitacine I.

Ces données sont nouvelles et innovantes car nombre d'auteurs en se penchant sur la compréhension du mécanisme d'action des cucurbitacines sur le cytosquelette d'actine ont invoqué sa supposée capacité pro-oxydante. Un focus particulier a été fait sur le fait que la N-

acétylcystéine, antioxydant possédant un groupement thiol, empêche les effets induits par les cucurbitacines au niveau cellulaire (Guo *et al.*, 2014b; Haritunians *et al.*, 2008; Kausar *et al.*, 2013; Lopez-Haber and Kazanietz, 2013; Yasuda *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2013a). En étendant ces travaux en examinant l'effet d'autres antioxydants de différentes natures, nous avons constaté que, seul le prétraitement des cellules par des antioxydants dotés d'une fonction thiol (comme la NAC ou le GSH) les protégeait des effets de la cucurbitacine I, alors que de nombreux autres antioxydants agissant par d'autres mécanismes d'action, n'exercent aucun effet de protection vis-à-vis de la cucurbitacine I. Dans ce contexte, nous avons d'ailleurs montré que la NAC (ou le GSH) sont incapables de détoxifier les cellules des effets de la cucurbitacine I sur le cytosquelette d'actine montrant le caractère irréversible des effets de cette molécule.

Dans le prolongement de ces explorations, et alors que plusieurs travaux avançaient une augmentation de la génération des ERO sous l'effet de cucurbitacines (après plusieurs heures d'exposition) comme étant à l'origine de leur action (Guo *et al.*, 2014a; Guo *et al.*, 2014b; Lopez-Haber and Kazanietz, 2013; Yasuda *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2012), les travaux que nous avons menés sur le niveau des ERO dans les cellules HeLa ont montré que la cucurbitacine I ne provoque qu'une très légère augmentation (non significative) de la production de ces espèces dans les premières minutes d'exposition (max à 5 min) et d'une manière intéressante leur diminution après 1 h. De plus des essais que nous avons entrepris *in vitro* pour rechercher un effet antioxydant direct de la cucurbitacine I nous ont plutôt conduits à attribuer à la cucurbitacine I des propriétés plutôt antioxydantes. Nous n'avons pas poussé ces dernières explorations et d'autres approches sont nécessaires pour mieux documenter cet effet antioxydant et son mécanisme qui semble être dépendant des concentrations et des conditions opératoires. En effet, les tests d'activité antioxydante que l'on a réalisés ne mettent en jeu que deux types de radicaux et sont effectués dans un milieu relativement simple par rapport à la complexité du milieu biologique.

L'ensemble de ces résultats montre que l'effet protecteur unique des antioxydants à fonction thiol, passe par un mécanisme qui ne suppose pas la génération d'ERO par la cucurbitacine mais plutôt par la neutralisation de cette molécule par sa conjugaison directe avec ce type d'antioxydants. Ces résultats permettent de comprendre pourquoi certains antioxydants s'opposent aux effets de la cucurbitacine I (et probablement des cucurbitacines en général) mais donc n'expliquent pas le ou les mécanisme(s) moléculaires conduisant à l'agrégation de l'actine dans les cellules traitées par la cucurbitacine I.

2. La cucurbitacine I n'entraîne pas de variations du calcium intra cytoplasmique dans les cellules HeLa. Nos résultats sont en accord avec l'étude d'Escandell *et al.* rapportant que la cucurbitacine R (10 - 30 μ M) n'affecte pas la concentration du calcium intracellulaire mesurée par cytométrie en flux dans les lymphocytes marqués par le Fluo3-AM pendant les cinq premières minutes d'exposition (Escandell *et al.*, 2010). En revanche, Guo *et al.* observent une augmentation du calcium intracellulaire dans les cellules leucémiques humaines K562 traitées par la cucurbitacine B (100 nM) après 24 h. Cela tient probablement au fait que les cellules s'engagent dans un processus apoptotique après une longue période d'incubation avec la cucurbitacine B (Guo *et al.*, 2014b). Or, l'agrégation de l'actine se produit quelques minutes après l'addition de cucurbitacines, et donc, si l'on devait invoquer qu'une voie calcique participe au mécanisme d'action des cucurbitacines, il serait plus cohérent que les variations du calcium intracellulaire se produisent dans les instants qui suivent leur application sur les cellules. De plus, nous avons montré que la chélation du calcium intracellulaire et l'inhibition des canaux calciques n'empêchaient pas l'action de la cucurbitacine I sur le cytosquelette d'actine dans nos conditions expérimentales.

3. Nos résultats indiquent que la cucurbitacine I inhibe la phosphorylation de la cofiline dans les cellules HeLa, et ce de manière dose dépendante. Ces résultats sont en accord avec les nombreux travaux montrant une inhibition de la phosphorylation de cette protéine dans différents types cellulaires sous l'effet de cucurbitacines E et B (Gabrielsen *et al.*, 2013; Nakashima *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2013a). Par contre peu d'explications ont été apportées pour expliquer cet effet. Seuls Gabrielsen *et al.* proposent une interaction possible entre les cucurbitacines I, E ou D et la cofiline 1, et qui serait supposée inhiber son activité (Gabrielsen *et al.*, 2013).

Cependant, *in vitro*, nous avons montré que la cucurbitacine I pouvait inhiber la phosphorylation de la cofiline 1 par LIMK1 comme le fait le BMS3, inhibiteur connu de LIMK1/2. Par ailleurs, nous n'avons pas observé d'interaction entre la cucurbitacine I et la cofiline 1 *in vitro* par RMN ^1H , ce qui est conforme aux résultats de Knecht *et al.* (Knecht *et al.*, 2010). Enfin, nous avons montré par simulation d'amarrage moléculaire que la cucurbitacine I agirait plutôt comme un inhibiteur de LIMK1 en se logeant dans la poche ATP et agirait en tant que compétiteur de la liaison de l'ATP comme le fait le BMS3. De ce point de vue score, Autodock prédit un score pour la cucurbitacine I proche de celui du BMS3 ($\Delta G = -7,16$ et $-7,44$ kcal/mol respectivement). Toutefois, et de façon très surprenante, nous voyons que dans la cellule, le BMS3 s'oppose aux effets de la cucurbitacine I sur l'agrégation

de l'actine. Cette contradiction (cucurbitacine et BMS3 ayant les mêmes effets sur l'inhibition de LIMK1 et des effets cellulaires opposés) suggère que la cucurbitacine ou le BMS3 ou ces deux agents ont d'autres cibles dans la cellule, ce que nous avons confirmé par ailleurs.

4. Une des originalités a été de montrer pour la première fois que l'inhibition de la contractilité de l'actomyosine dans les cellules HeLa diminue l'action de la cucurbitacine I sur le cytosquelette d'actine.

La myosine II est un hexamère formé de deux chaînes lourdes (MHC), de deux chaînes légères essentielles et de deux chaînes légères régulatrices (MLC). C'est la tête globulaire des chaînes lourdes qui détient l'activité ATPasique et le domaine de liaison aux filaments d'actine responsables de la propriété contractile de la myosine II. En effet, on appelle le complexe actomyosine, l'association de la myosine II avec les filaments d'actine. Certains processus cellulaires comme la motilité cellulaire et l'apoptose, sont dépendants de la contraction cellulaire non-musculaire c'est-à-dire des forces de traction exercées par le complexe d'actomyosine. La forme cellulaire dépend de la modulation du cytosquelette d'actine et donc du rôle exercé par le complexe actomyosine sur les filaments d'actine.

Nos premières observations par vidéomicroscopie indiquent que la cucurbitacine I (100 nM) induit un phénomène de blebbing dans les premières minutes de son application sur les cellules. Les mécanismes de formation et déformation des blebs ont été largement étudiés dans plusieurs processus cellulaires (Charras *et al.*, 2005; Charras *et al.*, 2008; Fackler and Grosse, 2008; Lammermann and Sixt, 2009). Le blebbing se produirait là où l'énergie de liaison entre la membrane plasmique et le cortex d'actine ne peut contenir l'augmentation de pression intracellulaire induite par la contraction de l'anneau d'actomyosine. La forte pression hydrostatique qui s'exerce alors sur la membrane, provoque son étirement et la formation d'un bleb. Celui-ci se décolle progressivement du cortex d'actine en augmentant le diamètre de la base du bleb, jusqu'à ce qu'il atteigne sa taille maximale (phase d'expansion). La rétraction est due à la contraction du cortex d'actine qui réapparaît dans les blebs matures (marquage de l'actine corticale (Charras *et al.*, 2005)). Les phases de blebbing et de contraction cellulaire sont directement liées à l'activité de la myosine II et l'inhibiteur spécifique de la myosine II, la blebbistatine (Kovacs *et al.*, 2004) détient son nom du fait, qu'il bloque le blebbing.

On a montré à travers nos travaux que l'inhibition directe de l'activité de la myosine II (blebbistatine) ou indirecte par l'inhibition des kinases ROCK ((Y27632) empêchait les effets induits par la cucurbitacine I à la fois sur le blebbing, la morphologie cellulaire et le

cytosquelette de l'actine. Cela suggère que les agrégats d'actine formés lors du traitement des cellules par la cucurbitacine I peuvent être le résultat d'une activité accrue de la myosine II. Le marquage de la myosine II dans les cellules traitées par la cucurbitacine I révèle l'agrégation de cette protéine qui co-localise avec les agrégats d'actine observés.

L'activité du complexe d'actomyosine est contrôlée par la Rho GTPase en induisant la formation des fibres de stress et en contrôlant la formation et des adhésions focales. Il est connu que les petites protéines G, dont les Rho GTPases, sont des acteurs importants de la régulation du cytosquelette d'actine (Hall, 1998), et on les nomme communément «interrupteurs biologiques» puisque ces protéines se présentent sous deux formes: une forme active, liée au GTP qui transmet le signal à des effecteurs et une forme inactive liée au GDP. L'échange du GDP pour le GTP étant assuré par les facteurs d'échange GEF (Guanine nucleotide Exchange Factor = protéine d'échange du GDP en GTP) et l'hydrolyse du GTP en GDP étant catalysée par les GAP (GTPase Activating Protein = protéine activatrice des GTPases).

Parmi les effecteurs de Rho, les ROCK (kinases liées aux Rho) phosphorylent et par là inhibe les protéines MLCR et la phosphatase MYPT1 de MLCR. Il en résulte une contraction des fibres de stress avec génération de forces (Amano *et al.*, 1996; Kimura *et al.*, 1996).

Nous avons montré que la cucurbitacine I est capable d'induire l'activation de RhoA et la formation des fibres de stress à dose nanomolaire en accord avec les résultats de Lopez-Haber et Kazanietz. Ces auteurs ont en effet trouvé que la cucurbitacine I active la voie RhoA/ROCK à la dose de 100 nM dans les cellules MCF7 (Lopez-Haber and Kazanietz, 2013). Mais, à la différence de ces auteurs, nous proposons que l'activation de RhoA ne résulte pas de l'induction d'un stress oxydant déclenché par la cucurbitacine I comme ils le proposent et que par ailleurs la cucurbitacine conduise *in fine* à la phosphorylation de la myosine II qui participe à la formation d'agrégats d'actine-myosine II. En parallèle à cela et concernant l'impact des cucurbitacines sur les voies de transductions, il est intéressant de noter que dans une étude récente Boykin *et al.* ont montré que la cucurbitacine IIa ne parvient pas à inhiber la voie JAK2/STAT3 alors qu'elle entraîne des effets importants sur la réorganisation du cytosquelette d'actine et provoque un phénotype caractéristique de l'activation de RhoA (Boykin *et al.*, 2011). Cela conforte nos résultats et suggère également que les effets sur la voie JAK2/STAT3 et sur la morphologie et le cytosquelette d'actine des

cellules peuvent être dissociés et résultent éventuellement des mécanismes différents (Boykin *et al.*, 2011).

Nous avons enfin montré que l'inhibition de la phosphorylation ou du cycle de la myosine II empêche les effets précoces de la cucurbitacine I.

Nous proposons donc que l'action rapide de la cucurbitacine quand elle est utilisée à doses nanomolaires (< 100 nM) sur les cellules, et qui est caractérisée par une phase de blebbing, de contraction cellulaire et d'agrégation de l'actine résulte d'un effet combiné sur l'activation de la cofiline par inhibition de sa phosphorylation ce qui va libérer des fragments de filament d'actine ou de l'actine-G et d'une activation de myosines de type II qui peuvent à la fois interagir avec le réseau d'actine corticale à l'origine des protrusions de type blebs et participer à la formation de co-agrégats avec l'actine libérée par l'action de la cofiline également source d'une altération majeure de la morphologie cellulaire.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

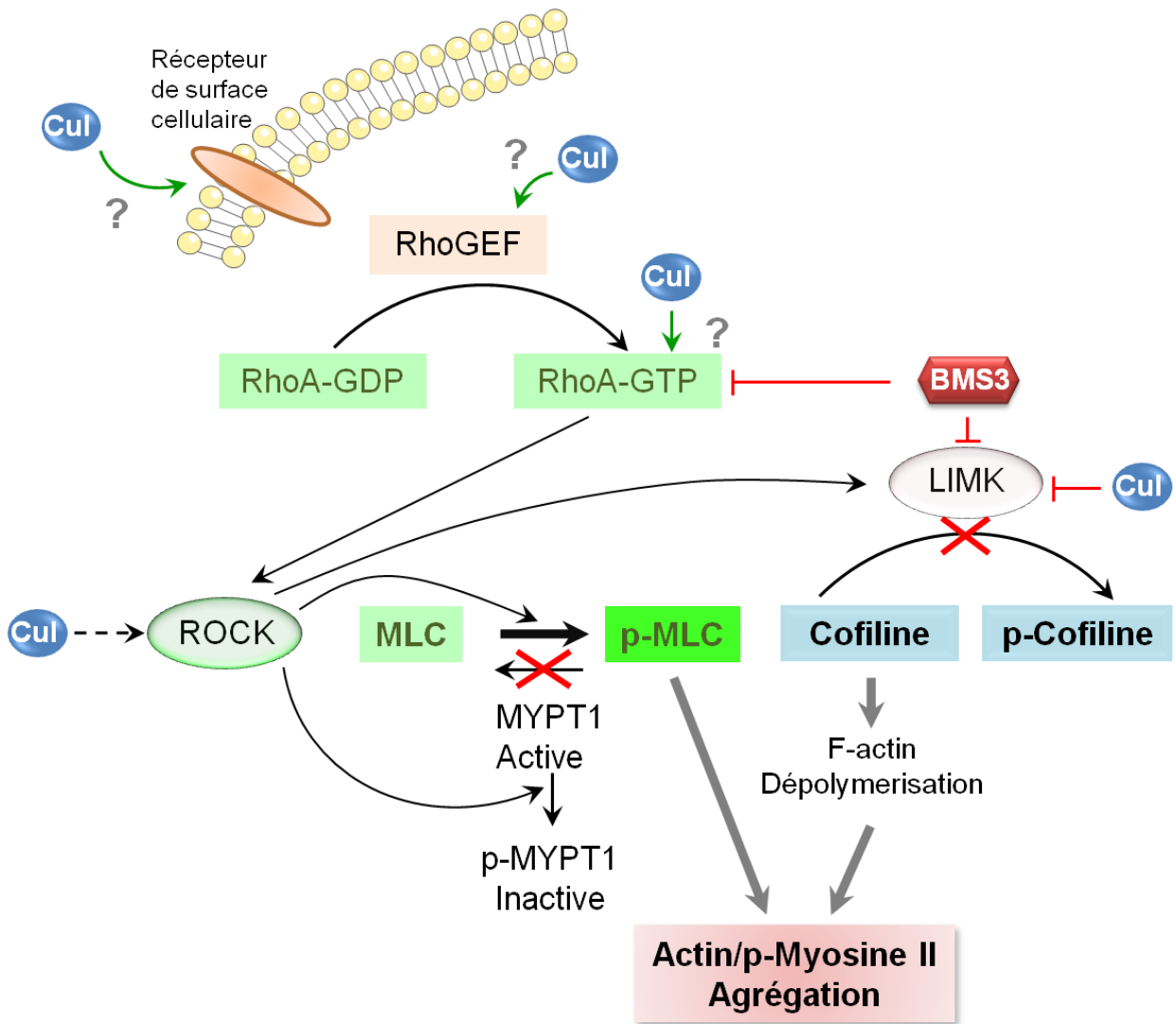
« Toute plante est un sac de molécules d'une grande diversité chimique, formatées pour agir sur le vivant, donc qui ont potentiellement une utilité. » (Bruno David, Pharmacien, Botaniste).

Les cucurbitacines sont des substances naturelles auxquelles les êtres humains peuvent être exposés quotidiennement à travers leur alimentation ou leur mode de vie. Ce sont des molécules volumineuses et poly-hydroxylées de la famille des triterpénoïdes, auxquelles on attribue différentes propriétés pharmacologiques.

Les effets biologiques de ces molécules ont été étudiés de longue date et leur mode d'action n'était pas très clair au début de mes travaux de thèse. Certains auteurs évoquaient la capacité des cucurbitacines à induire un stress oxydant, d'autres le fait que ces molécules pouvaient former des complexes covalents avec des protéines cibles et d'autres encore une action sur la voie JAK2/STAT3 ou bien RhoA/ROCK, avec dans le cas de JAK2/STAT3 et de la cucurbitacine I des doses 100 à 1000 fois supérieures aux doses induisant les effets biologiques prééminents.

Nos travaux apportent une vision claire et synthétique sur le mode d'action de la cucurbitacine I, à savoir une combinaison d'activation de la cascade RhoA/ROCK et une inhibition de la voie LIMK conduisant à la formation de co-agrégat d'actine-myosine II. Nous pensons que ce modèle est valide pour les autres types de cucurbitacines, cela reste bien entendu à démontrer.

Au-delà de ces aspects fondamentaux qui précisent le mécanisme d'action de la cucurbitacine I, nos résultats ouvrent la voie à des études complémentaires en vue de modifier la cucurbitacine I ou les cucurbitacines en général afin de conserver leur potentiel antiprolifératif qui peut avoir un réel intérêt pour lutter contre le cancer et réduire leurs effets secondaires qui aujourd'hui fait que ces molécules ne sont pas utilisées en clinique.



Modèle d'action de la cucurbitacine I sur l'agrégation de l'actine/myosine II

GEF, guanine nucleotide exchange factor; MLC, myosin light-chain; p-MLC, phospho-myosin light chain; MYPT1, myosin phosphatases target subunit 1; ROCK, Rho associated kinase

En perspective, notre étude mérite d'être approfondie sur les points suivants :

- Les effets possibles de la cucurbitacine I sur les facteurs d'échange qui favorisent la liaison du GTP sur RhoA ou d'autres mécanismes en amont qui contribuent à l'activation de RhoA. Il peut être également possible que cucurbitacine I affecte l'activité des RhoGDI (Rho guanine nucleotide dissociation inhibitors), protéines qui inhibent la dissociation du GDP de la GTPase et donc empêchent la liaison de GTP.

- La participation de chacune des Rho GTPases sous l'effet de la cucurbitacine I. Il a été montré que l'activation de Rac1 a l'effet opposé à RhoA. En effet, l'activation de Rac1 induit l'activation des kinases PAKs qui inhibent la phosphorylation de MLCR et, donc contribue à diminuer la contraction cellulaire (van Leeuwen *et al.*, 1999). Comme il a été observé une activation de Rac1 avec la blebbistatine, cela semble confirmer que l'activation de Rac1 est stimulée par la déstabilisation du complexe actomyosine (Solinet *et al.*, 2011). De plus, des études ont montré un antagonisme fonctionnel où l'activation d'une de ces deux GTPases inhibe l'organisation de l'actine régie par l'autre (Nimnual *et al.*, 2003; Wildenberg *et al.*, 2006). Dans ce cas, on pourrait s'attendre à une inhibition de Rac1 sous l'effet de la cucurbitacine I.

- Par ailleurs, nos investigations ont porté sur les effets de la cucurbitacine I à des temps précoces. Or, on n'explique toujours pas clairement les mécanismes moléculaires conduisant à la multinucléation (défaut de cytokinèse) des cellules traitées par cette molécule. Cela met à nouveau l'accent sur la complexité des effets de ces molécules et les mécanismes de signalisation par lesquelles, elles agissent.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

- Abbas, S., Vincourt, J. B., Habib, L., Netter, P., Greige-Gerges, H. and Magdalou, J.** (2013). The cucurbitacins E, D and I: investigation of their cytotoxicity toward human chondrosarcoma SW 1353 cell line and their biotransformation in man liver. *Toxicol. Lett.* 216, 189-199.
- Abdel-Hassan, I. A., Abdel-Barry, J. A. and Tariq, M. S.** (2000). The hypoglycaemic and antihyperglycaemic effect of citrullus colocynthis fruit aqueous extract in normal and alloxan diabetic rabbits. *J. Ethnopharmacol.* 71, 325-330.
- Abdelwahab, S. I., Hassan, L. E., Abdul Majid, A. M., Yagi, S. M., Mohan, S., Elhassan Taha, M. M., Ahmad, S., Chuen, C. S., Narrima, P., Rais, M. M. et al.** (2012). Cucurbitacin L 2-O-beta-Glucoside Demonstrates Apoptogenesis in Colon Adenocarcinoma Cells (HT-29): Involvement of Reactive Oxygen and Nitrogen Species Regulation. *Evid. Based. Complement Alternat. Med.* 2012, 490136.
- Al-Ghaithi, F., El-Ridi, M. R., Adeghate, E. and Amiri, M. H.** (2004). Biochemical effects of Citrullus colocynthis in normal and diabetic rats. *Mol. Cell Biochem.* 261, 143-149.
- Allingham, J. S., Klenchin, V. A. and Rayment, I.** (2006). Actin-targeting natural products: structures, properties and mechanisms of action. *Cell Mol. Life Sci.* 63, 2119-2134.
- Almeida, F. R., Rao, V. S. and Matos, M. E.** (1989). Inhibition of formaldehyde-induced arthritis by a purified fraction prepared from *Wilbrandia (cf) verticillata* which contains novel norcucurbitacin glucosides. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 22, 1397-1399.
- Amano, M., Ito, M., Kimura, K., Fukata, Y., Chihara, K., Nakano, T., Matsuura, Y. and Kaibuchi, K.** (1996). Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase). *J. Biol. Chem.* 271, 20246-20249.
- Amano, T., Tanabe, K., Eto, T., Narumiya, S. and Mizuno, K.** (2001). LIM-kinase 2 induces formation of stress fibres, focal adhesions and membrane blebs, dependent on its activation by Rho-associated kinase-catalysed phosphorylation at threonine-505. *Biochem. J.* 354, 149-159.
- Andrianantoandro, E. and Pollard, T. D.** (2006). Mechanism of actin filament turnover by severing and nucleation at different concentrations of ADF/cofilin. *Mol. Cell* 24, 13-23.
- Antolovich, M., Prenzler, P. D., Patsalides, E., McDonald, S. and Robards, K.** (2002). Methods for testing antioxidant activity. *Analyst* 127, 183-198.
- Arber, S., Barbayannis, F. A., Hanser, H., Schneider, C., Stanyon, C. A., Bernard, O. and Caroni, P.** (1998). Regulation of actin dynamics through phosphorylation of cofilin by LIM-kinase. *Nature* 393, 805-809.
- Arel-Dubeau, A. M., Longpre, F., Bournival, J., Tremblay, C., Demers-Lamarche, J., Haskova, P., Attard, E., Germain, M. and Martinoli, M. G.** (2014). Cucurbitacin E has neuroprotective properties and autophagic modulating activities on dopaminergic neurons. *Oxid. Med. Cell Longev.* 2014, 425496.
- Babiychuk, E. B., Monastyrskaya, K., Potez, S. and Draeger, A.** (2011). Blebbing confers resistance against cell lysis. *Cell Death. Differ.* 18, 80-89.

- Bagheri-Yarmand, R., Mazumdar, A., Sahin, A. A. and Kumar, R.** (2006). LIM kinase 1 increases tumor metastasis of human breast cancer cells via regulation of the urokinase-type plasminogen activator system. *Int. J. Cancer* 118, 2703-2710.
- Bailly, C.** (2009). Ready for a comeback of natural products in oncology. *Biochem. Pharmacol.* 77, 1447-1457.
- Ballestrem, C., Wehrle-Haller, B. and Imhof, B. A.** (1998). Actin dynamics in living mammalian cells. *J. Cell Sci.* 111 (Pt 12), 1649-1658.
- Balliano, G., Caputo, O., Viola, F., Delprino, L. and Cattel, L.** (1983). The transformation of 10 cucurbita 5,24 diene ol into cucurbitacin D by seedlings of Cucumis sativus. *Phytochem.* 22, 909-913.
- Bamburg, J. R.** (1999). Proteins of the ADF/cofilin family: essential regulators of actin dynamics. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 15, 185-230.
- Banerjee, S., Byrd, J. N., Gianino, S. M., Harpstrite, S. E., Rodriguez, F. J., Tuskan, R. G., Reilly, K. M., Piwnica-Worms, D. R. and Gutmann, D. H.** (2010). The neurofibromatosis type 1 tumor suppressor controls cell growth by regulating signal transducer and activator of transcription-3 activity in vitro and in vivo. *Cancer Res.* 70, 1356-1366.
- Bartalis, J. and Halaweish, F. T.** (2005). Relationship between cucurbitacins reversed-phase high-performance liquid chromatography hydrophobicity index and basal cytotoxicity on HepG2 cells. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 818, 159-166.
- Belkheiri, N., Bouguerne, B., Bedos-Belval, F., Duran, H., Bernis, C., Salvayre, R., Negre-Salvayre, A. and Baltas, M.** (2010). Synthesis and antioxidant activity evaluation of a syringic hydrazones family. *Eur. J. Med. Chem.* 45, 3019-3026.
- Bellakhdar, J., Claisse, R., Fleurentin, J. and Younos, C.** (1991). Repertory of standard herbal drugs in the Moroccan pharmacopoea. *J. Ethnopharmacol.* 35, 123-143.
- Benariba, N., Bellakhdar, W., Djaziri, R., Hupkens, E., Louchami, K. and Malaisse, W. J.** (2013a). Protective action of seed extracts against the deleterious effect of streptozotocin on both glucose-stimulated insulin release from rat pancreatic islets and glucose homeostasis. *Biomed. Rep.* 1, 119-121.
- Benariba, N., Djaziri, R., Bellakhdar, W., Belkacem, N., Kadiata, M., Malaisse, W. J., Sener, A. and Abdelkrim, C.** (2013b). Phytochemical screening and free radical scavenging activity of Citrullus colocynthis seeds extracts. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 3, 35-40.
- Benariba, N., Djaziri, R., Hupkens, E., Louchami, K., Malaisse, W. J. and Sener, A.** (2013c). Insulinotropic action of Citrullus colocynthis seed extracts in rat pancreatic islets. *Mol. Med. Rep.* 7, 233-236.
- Benariba, N., Djaziri, R., Zerriouh, B. H., Bellakhdar, W., Hupkens, E., Boucherit, Z. and Malaisse, W. J.** (2012). Short- and long-term effects of various Citrullus colocynthis seed extracts in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Int. J. Mol. Med.* 30, 1528-1536.

- Bernstein, B. W. and Bamburg, J. R.** (1982). Tropomyosin binding to F-actin protects the F-actin from disassembly by brain actin-depolymerizing factor (ADF). *Cell Motil.* 2, 1-8.
- Berridge, M. J., Bootman, M. D. and Roderick, H. L.** (2003). Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 517-529.
- Blanchoin, L., Amann, K. J., Higgs, H. N., Marchand, J. B., Kaiser, D. A. and Pollard, T. D.** (2000a). Direct observation of dendritic actin filament networks nucleated by Arp2/3 complex and WASP/Scar proteins. *Nature* 404, 1007-1011.
- Blanchoin, L., Boujemaa-Paterski, R., Sykes, C. and Plastino, J.** (2014). Actin dynamics, architecture, and mechanics in cell motility. *Physiol Rev.* 94, 235-263.
- Blanchoin, L. and Pollard, T. D.** (1998). Interaction of actin monomers with Acanthamoeba actophorin (ADF/cofilin) and profilin. *J. Biol. Chem.* 273, 25106-25111.
- Blanchoin, L. and Pollard, T. D.** (1999). Mechanism of interaction of Acanthamoeba actophorin (ADF/Cofilin) with actin filaments. *J. Biol. Chem.* 274, 15538-15546.
- Blanchoin, L., Robinson, R. C., Choe, S. and Pollard, T. D.** (2000b). Phosphorylation of Acanthamoeba actophorin (ADF/cofilin) blocks interaction with actin without a change in atomic structure. *J. Mol. Biol.* 295, 203-211.
- Blanchoin, L., Robinson, R. C., Choe, S. and Pollard, T. D.** (2000c). Phosphorylation of Acanthamoeba actophorin (ADF/cofilin) blocks interaction with actin without a change in atomic structure. *J. Mol. Biol.* 295, 203-211.
- Blaskovich, M. A., Sun, J., Cantor, A., Turkson, J., Jove, R. and Sebt, S. M.** (2003). Discovery of JSI-124 (cucurbitacin I), a selective Janus kinase/signal transducer and activator of transcription 3 signaling pathway inhibitor with potent antitumor activity against human and murine cancer cells in mice. *Cancer Res.* 63, 1270-1279.
- Bobkov, A. A., Muhlrad, A., Pavlov, D. A., Kokabi, K., Yilmaz, A. and Reisler, E.** (2006). Cooperative effects of cofilin (ADF) on actin structure suggest allosteric mechanism of cofilin function. *J. Mol. Biol.* 356, 325-334.
- Boccaccio, C., Ando, M., Tamagnone, L., Bardelli, A., Michieli, P., Battistini, C. and Comoglio, P. M.** (1998). Induction of epithelial tubules by growth factor HGF depends on the STAT pathway. *Nature* 391, 285-288.
- Bollag, D. M., McQueney, P. A., Zhu, J., Hensens, O., Koupal, L., Liesch, J., Goetz, M., Lazarides, E. and Woods, C. M.** (1995). Epothilones, a new class of microtubule-stabilizing agents with a taxol-like mechanism of action. *Cancer Res.* 55, 2325-2333.
- Boucrot, E. and Kirchhausen, T.** (2007). Endosomal recycling controls plasma membrane area during mitosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 104, 7939-7944.
- Boykin, C., Zhang, G., Chen, Y. H., Zhang, R. W., Fan, X. E., Yang, W. M. and Lu, Q.** (2011). Cucurbitacin IIa: a novel class of anti-cancer drug inducing non-reversible actin aggregation and inhibiting survivin independent of JAK2/STAT3 phosphorylation. *Br. J. Cancer* 104, 781-789.

- 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.
- Bray, D.** (2001). *Cell movement*.
- Bray, D. and White, J. G.** (1988). Cortical flow in animal cells. *Science* 239, 883-888.
- Bresnick, A. R.** (1999). Molecular mechanisms of nonmuscle myosin-II regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 11, 26-33.
- Bubb, M. R., Senderowicz, A. M., Sausville, E. A., Duncan, K. L. and Korn, E. D.** (1994). Jasplakinolide, a cytotoxic natural product, induces actin polymerization and competitively inhibits the binding of phalloidin to F-actin. *J. Biol. Chem.* 269, 14869-14871.
- Bubb, M. R., Spector, I., Beyer, B. B. and Fosen, K. M.** (2000). Effects of jasplakinolide on the kinetics of actin polymerization. An explanation for certain in vivo observations. *J. Biol. Chem.* 275, 5163-5170.
- Burgess, D. R.** (2005). Cytokinesis: new roles for myosin. *Curr. Biol.* 15, R310-R311.
- Burton, G. W. and Ingold, K. U.** (1989). Vitamin E as an in vitro and in vivo antioxidant. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 570, 7-22.
- Cancela, J. M.** (2001). Specific Ca²⁺ signaling evoked by cholecystokinin and acetylcholine: the roles of NAADP, cADPR, and IP₃. *Annu. Rev. Physiol* 63, 99-117.
- Cao, S. G., Chang, Y. Q., Qu, H. G., Zheng, L. H., Wei, Z. R. and Yang, S. J.** (2005). Inhibited effects and mechanisms of cucurbitacin B on apoptosis of neonate rat hepatocytes induced by H₂O₂. *Food Sci* 26, 527-530.
- Carlier, M. F.** (1991a). Actin: protein structure and filament dynamics. *J. Biol. Chem.* 266, 1-4.
- Carlier, M. F.** (1991b). Actin: protein structure and filament dynamics. *J. Biol. Chem.* 266, 1-4.
- Carlier, M. F., Laurent, V., Santolini, J., Melki, R., Didry, D., Xia, G. X., Hong, Y., Chua, N. H. and Pantaloni, D.** (1997). Actin depolymerizing factor (ADF/cofilin) enhances the rate of filament turnover: implication in actin-based motility. *J. Cell Biol.* 136, 1307-1322.
- Carocho, M. and Ferreira, I. C.** (2013). A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food Chem. Toxicol.* 51, 15-25.
- Carr, A. C. and Frei, B.** (2001). The nitric oxide congener nitrite inhibits myeloperoxidase/H₂O₂/Cl⁻-mediated modification of low density lipoprotein. *J. Biol. Chem.* 276, 1822-1828.

- Casini, A., Scozzafava, A. and Supuran, C. T.** (2002). Cysteine-modifying agents: a possible approach for effective anticancer and antiviral drugs. *Environ. Health Perspect.* 110 Suppl 5, 801-806.
- Catlett-Falcone, R., Landowski, T. H., Oshiro, M. M., Turkson, J., Levitzki, A., Savino, R., Ciliberto, G., Moscinski, L., Fernandez-Luna, J. L., Nunez, G. et al.** (1999). Constitutive activation of Stat3 signaling confers resistance to apoptosis in human U266 myeloma cells. *Immunity.* 10, 105-115.
- Ceriotti, G.** (1967). Narciclasine: an antimitotic substance from Narcissus bulbs. *Nature* 213, 595-596.
- Chan, K. T., Meng, F. Y., Li, Q., Ho, C. Y., Lam, T. S., To, Y., Lee, W. H., Li, M., Chu, K. H. and Toh, M.** (2010). Cucurbitacin B induces apoptosis and S phase cell cycle arrest in BEL-7402 human hepatocellular carcinoma cells and is effective via oral administration. *Cancer Lett.* 294, 118-124.
- Charras, G. and Paluch, E.** (2008). Blebs lead the way: how to migrate without lamellipodia. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 730-736.
- Charras, G. T., Coughlin, M., Mitchison, T. J. and Mahadevan, L.** (2008). Life and times of a cellular bleb. *Biophys. J.* 94, 1836-1853.
- Charras, G. T., Yarrow, J. C., Horton, M. A., Mahadevan, L. and Mitchison, T. J.** (2005). Non-equilibration of hydrostatic pressure in blebbing cells. *Nature* 435, 365-369.
- Chen, J. C., Chiu, M. H., Nie, R. L., Cordell, G. A. and Qiu, S. X.** (2005). Cucurbitacins and cucurbitane glycosides: structures and biological activities. *Nat. Prod. Rep.* 22, 386-399.
- Chen, X., Bao, J., Guo, J., Ding, Q., Lu, J., Huang, M. and Wang, Y.** (2012). Biological activities and potential molecular targets of cucurbitacins: a focus on cancer. *Anticancer Drugs* 23, 777-787.
- Chisholm, R. L., Rushforth, A. M., Pollenz, R. S., Kuczmarski, E. R. and Tafuri, S. R.** (1988). Dictyostelium discoideum myosin: isolation and characterization of cDNAs encoding the essential light chain. *Mol. Cell Biol.* 8, 794-801.
- Clark, K., Langeslag, M., Figdor, C. G. and van Leeuwen, F. N.** (2007). Myosin II and mechanotransduction: a balancing act. *Trends Cell Biol.* 17, 178-186.
- Conti, M. A. and Adelstein, R. S.** (2008). Nonmuscle myosin II moves in new directions. *J. Cell Sci.* 121, 11-18.
- Cooper, J. A., Walker, S. B. and Pollard, T. D.** (1983). Pyrene actin: documentation of the validity of a sensitive assay for actin polymerization. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 4, 253-262.
- Coue, M., Brenner, S. L., Spector, I. and Korn, E. D.** (1987). Inhibition of actin polymerization by latrunculin A. *FEBS Lett.* 213, 316-318.

- Cross, A. R. and Jones, O. T.** (1986). The effect of the inhibitor diphenylene iodonium on the superoxide-generating system of neutrophils. Specific labelling of a component polypeptide of the oxidase. *Biochem. J.* 237, 111-116.
- Cunningham, C. C.** (1995). Actin polymerization and intracellular solvent flow in cell surface blebbing. *J. Cell Biol.* 129, 1589-1599.
- Dan, C., Kelly, A., Bernard, O. and Minden, A.** (2001). Cytoskeletal changes regulated by the PAK4 serine/threonine kinase are mediated by LIM kinase 1 and cofilin. *J. Biol. Chem.* 276, 32115-32121.
- Darwish-Sayed, M., Balbaa, S. I. and Affi, M. S.** (1974). The glycosidal content of the different organs of *Citrullus colocynthis*. *Planta Med.* 26, 293-298.
- Davila, M., Frost, A. R., Grizzle, W. E. and Chakrabarti, R.** (2003). LIM kinase 1 is essential for the invasive growth of prostate epithelial cells: implications in prostate cancer. *J. Biol. Chem.* 278, 36868-36875.
- de Roode, B. M., Franssen, M. C., van der Padt, A. and Boom, R. M.** (2003). Perspectives for the industrial enzymatic production of glycosides. *Biotechnol. Prog.* 19, 1391-1402.
- DesMarais, V., Ichetovkin, I., Condeelis, J. and Hitchcock-DeGregori, S. E.** (2002). Spatial regulation of actin dynamics: a tropomyosin-free, actin-rich compartment at the leading edge. *J. Cell Sci.* 115, 4649-4660.
- Dinan, L., Harmatha, J. and Lafont, R.** (2001). Chromatographic procedures for the isolation of plant steroids. *J. Chromatogr. A* 935, 105-123.
- Dinan, L., Whiting, P., Girault, J. P., Lafont, R., Dhadialla, T. S., Cress, D. E., Mugat, B., Antoniewski, C. and Lepesant, J. A.** (1997a). Cucurbitacins are insect steroid hormone antagonists acting at the ecdysteroid receptor. *Biochem. J.* 327 (Pt 3), 643-650.
- Dinan, L., Whiting, P., Sarker, S. D., Kasai, R. and Yamasaki, K.** (1997b). Cucurbitane-type compounds from *Hemsleya carnosiflora* antagonize ecdysteroid action in the *Drosophila melanogaster* BII cell line. *Cell Mol. Life Sci.* 53, 271-274.
- Dirr, H. W., Schabert, J. C. and Weitz, C.** (1986). Cucurbitacin delta 23-reductase from the fruit of *Cucurbita maxima* var. Green Hubbard. Physicochemical and fluorescence properties and enzyme-ligand interactions. *Biochem. J.* 233, 649-653.
- Dong, Z., Saikumar, P., Weinberg, J. M. and Venkatachalam, M. A.** (2006). Calcium in cell injury and death. *Annu. Rev. Pathol.* 1, 405-434.
- Duncan, K. L., Duncan, M. D., Alley, M. C. and Sausville, E. A.** (1996). Cucurbitacin E-induced disruption of the actin and vimentin cytoskeleton in prostate carcinoma cells. *Biochem. Pharmacol.* 52, 1553-1560.
- Duncan, M. D. and Duncan, K. L.** (1997). Cucurbitacin E targets proliferating endothelia. *J. Surg. Res.* 69, 55-60.

- Edwards, D. C. and Gill, G. N.** (1999). Structural features of LIM kinase that control effects on the actin cytoskeleton. *J. Biol. Chem.* 274, 11352-11361.
- Edwards, D. C., Sanders, L. C., Bokoch, G. M. and Gill, G. N.** (1999). Activation of LIM-kinase by Pak1 couples Rac/Cdc42 GTPase signalling to actin cytoskeletal dynamics. *Nat. Cell Biol.* 1, 253-259.
- Engel, J. N., Gunning, P. W. and Kedes, L.** (1981). Isolation and characterization of human actin genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 78, 4674-4678.
- Escandell, J. M., Recio, M. C., Giner, R. M., Manez, S., Cerda-Nicolas, M., Merfort, I. and Rios, J. L.** (2010). Inhibition of delayed-type hypersensitivity by Cucurbitacin R through the curbing of lymphocyte proliferation and cytokine expression by means of nuclear factor AT translocation to the nucleus. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 332, 352-363.
- Escandell, J. M., Recio, M. C., Manez, S., Giner, R. M., Cerda-Nicolas, M., Gil-Benso, R. and Rios, J. L.** (2007a). Dihydrocucurbitacin B inhibits delayed type hypersensitivity reactions by suppressing lymphocyte proliferation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 322, 1261-1268.
- Escandell, J. M., Recio, M. C., Manez, S., Giner, R. M., Cerda-Nicolas, M. and Rios, J. L.** (2006). Dihydrocucurbitacin B, isolated from *Cayaponia tayuya*, reduces damage in adjuvant-induced arthritis. *Eur. J. Pharmacol.* 532, 145-154.
- Escandell, J. M., Recio, M. C., Manez, S., Giner, R. M., Cerda-Nicolas, M. and Rios, J. L.** (2007b). Cucurbitacin R reduces the inflammation and bone damage associated with adjuvant arthritis in lewis rats by suppression of tumor necrosis factor-alpha in T lymphocytes and macrophages. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 320, 581-590.
- Espina, B. and Rubiolo, J. A.** (2008). Marine toxins and the cytoskeleton: pectenotoxins, unusual macrolides that disrupt actin. *FEBS J.* 275, 6082-6088.
- Fabian, L., Troscianczuk, J. and Forer, A.** (2007). Calyculin A, an enhancer of myosin, speeds up anaphase chromosome movement. *Cell Chromosome.* 6, 1.
- Fackler, O. T. and Grosse, R.** (2008). Cell motility through plasma membrane blebbing. *J. Cell Biol.* 181, 879-884.
- Fiaschi, T., Cozzi, G., Raugei, G., Formigli, L., Ramponi, G. and Chiarugi, P.** (2006). Redox regulation of beta-actin during integrin-mediated cell adhesion. *J. Biol. Chem.* 281, 22983-22991.
- Finkelstein, E., Rosen, G. M. and Rauckman, E. J.** (1980). Spin trapping of superoxide and hydroxyl radical: practical aspects. *Arch. Biochem. Biophys.* 200, 1-16.
- Finkelstein, E., Rosen, G. M., Rauckman, E. J. and Paxton, J.** (1979). Spin trapping of superoxide. *Mol. Pharmacol.* 16, 676-685.
- Fletcher, D. A. and Mullins, R. D.** (2010). Cell mechanics and the cytoskeleton. *Nature* 463, 485-492.

- Frantz, C., Barreiro, G., Dominguez, L., Chen, X., Eddy, R., Condeelis, J., Kelly, M. J., Jacobson, M. P. and Barber, D. L.** (2008). Cofilin is a pH sensor for actin free barbed end formation: role of phosphoinositide binding. *J. Cell Biol.* 183, 865-879.
- Frei, B., Heinrich, M., Herrmann, D., Orjala, J. E., Schmitt, J. and Sticher, O.** (1998). Phytochemical and biological investigation of *Begonia heracleifolia*. *Planta Med.* 64, 385-386.
- Fujimoto, H., Hagiwara, H., Suzuki, K. and Yamazaki, M.** (1987). New toxic metabolites from a mushroom, *Hebeloma vinosophyllum*. II. Isolation and structures of hebevinosides VI, VII, VIII, IX, X, and XI. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* 35, 2254-2260.
- Fukada, T., Ohtani, T., Yoshida, Y., Shirogane, T., Nishida, K., Nakajima, K., Hibi, M. and Hirano, T.** (1998). STAT3 orchestrates contradictory signals in cytokine-induced G1 to S cell-cycle transition. *EMBO J.* 17, 6670-6677.
- Furukawa, R., Maselli, A., Thomson, S. A., Lim, R. W., Stokes, J. V. and Fechheimer, M.** (2003). Calcium regulation of actin crosslinking is important for function of the actin cytoskeleton in *Dictyostelium*. *J. Cell Sci.* 116, 187-196.
- Gabrielsen, M., Schuldt, M., Munro, J., Borucka, D., Cameron, J., Baugh, M., Mleczak, A., Lilla, S., Morrice, N. and Olson, M. F.** (2013). Cucurbitacin covalent bonding to cysteine thiols: the filamentous-actin severing protein Cofilin1 as an exemplary target. *Cell Commun. Signal.* 11, 58.
- Gallily, R., Shohat, B., Kalish, J., Gitter, S. and Lavie, D.** (1962). Further studies on the antitumor effect of cucurbitacins. *Cancer Res.* 22, 1038-1045.
- Gate, L., Paul, J., Ba, G. N., Tew, K. D. and Tapiero, H.** (1999). Oxidative stress induced in pathologies: the role of antioxidants. *Biomed. Pharmacother.* 53, 169-180.
- Gauthier, C., Legault, J., Lebrun, M., Dufour, P. and Pichette, A.** (2006). Glycosidation of lupane-type triterpenoids as potent in vitro cytotoxic agents. *Bioorg. Med. Chem.* 14, 6713-6725.
- Gitter, S., Gallily, R., Shohat, B. and Lavie, D.** (1961). Studies on the antitumor effect of cucurbitacins. *Cancer Res.* 21, 516-521.
- Gohla, A., Birkenfeld, J. and Bokoch, G. M.** (2005). Chronophin, a novel HAD-type serine protein phosphatase, regulates cofilin-dependent actin dynamics. *Nat. Cell Biol.* 7, 21-29.
- Golomb, E., Ma, X., Jana, S. S., Preston, Y. A., Kawamoto, S., Shoham, N. G., Goldin, E., Conti, M. A., Sellers, J. R. and Adelstein, R. S.** (2004). Identification and characterization of nonmuscle myosin II-C, a new member of the myosin II family. *J. Biol. Chem.* 279, 2800-2808.
- Graceffa, P. and Dominguez, R.** (2003). Crystal structure of monomeric actin in the ATP state. Structural basis of nucleotide-dependent actin dynamics. *J. Biol. Chem.* 278, 34172-34180.

- Graness, A., Poli, V. and Goppelt-Struebe, M.** (2006). STAT3-independent inhibition of lysophosphatidic acid-mediated upregulation of connective tissue growth factor (CTGF) by cucurbitacin I. *Biochem. Pharmacol.* 72, 32-41.
- Grange, L., Nguyen, M. V., Lardy, B., Derouazi, M., Campion, Y., Trocme, C., Paclet, M. H., Gaudin, P. and Morel, F.** (2006). NAD(P)H oxidase activity of Nox4 in chondrocytes is both inducible and involved in collagenase expression. *Antioxid. Redox. Signal.* 8, 1485-1496.
- Greenstock, C. L. and Miller, R. W.** (1975). The oxidation of tiron by superoxide anion. Kinetics of the reaction in aqueous solution in chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta* 396, 11-16.
- Greige-Gerges, H., Abou, K. R., Chahine, R., Haddad, C., Harb, W. and Ouaini, N.** (2007a). Effect of cucurbitacins on bilirubin-albumin binding in human plasma. *Life Sci.* 80, 579-585.
- Greige-Gerges, H., Khalil, R. A., Mansour, E. A., Magdalou, J., Chahine, R. and Ouaini, N.** (2007b). Cucurbitacins from Ecballium elaterium juice increase the binding of bilirubin and ibuprofen to albumin in human plasma. *Chem. Biol. Interact.* 169, 53-62.
- Gry, J., oborg, I. and Andersson, HC.** (2006). *Cucurbitacins in Food Plants.*
- Guo, J., Wu, G., Bao, J., Hao, W., Lu, J. and Chen, X.** (2014a). Cucurbitacin B induced ATM-mediated DNA damage causes G2/M cell cycle arrest in a ROS-dependent manner. *PLoS. One.* 9, e88140.
- Guo, J., Zhao, W., Hao, W., Ren, G., Lu, J. and Chen, X.** (2014b). Cucurbitacin B induces DNA damage, G2/M phase arrest, and apoptosis mediated by reactive oxygen species (ROS) in leukemia K562 cells. *Anticancer Agents Med. Chem.* 14, 1146-1153.
- Gurib-Fakim, A.** (2006). Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Mol. Aspects Med.* 27, 1-93.
- Hagmann, J., Burger, M. M. and Dagan, D.** (1999). Regulation of plasma membrane blebbing by the cytoskeleton. *J. Cell Biochem.* 73, 488-499.
- Halaweish, F. T. and Tallamy, D. W.** (1993). A new cucurbitacin profile for Cucurbita andreana: A candidate for cucurbitacin tissue culture. *J. Chem. Ecol.* 19, 1135-1141.
- Hall, A.** (1998). Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* 279, 509-514.
- Halliwell, B.** (1999). Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning). *Free Radic. Res.* 31, 261-272.
- Halliwell, B.** (2007). Biochemistry of oxidative stress. *Biochem. Soc. Trans.* 35, 1147-1150.
- Halliwell, B.** (2008). Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and in vivo studies? *Arch. Biochem. Biophys.* 476, 107-112.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J. M.** (1995). The definition and measurement of antioxidants in biological systems. *Free Radic. Biol. Med.* 18, 125-126.

- Haritunians, T., Gueller, S., Zhang, L., Badr, R., Yin, D., Xing, H., Fung, M. C. and Koeffler, H. P.** (2008). Cucurbitacin B induces differentiation, cell cycle arrest, and actin cytoskeletal alterations in myeloid leukemia cells. *Leuk. Res.* 32, 1366-1373.
- Harshberger, J. W.** (1896). The purpose of ethnobotany. *Botanical Gazette* 21, 146-158.
- Hartshorne, D. J., Ito, M. and Erdodi, F.** (1998). Myosin light chain phosphatase: subunit composition, interactions and regulation. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 19, 325-341.
- Hawkins, M., Pope, B., Maciver, S. K. and Weeds, A. G.** (1993). Human actin depolymerizing factor mediates a pH-sensitive destruction of actin filaments. *Biochemistry* 32, 9985-9993.
- Herman, I. M.** (1993). Actin isoforms. *Curr. Opin. Cell Biol.* 5, 48-55.
- Hertzog, M., Yarmola, E. G., Didry, D., Bubb, M. R. and Carlier, M. F.** (2002). Control of actin dynamics by proteins made of beta-thymosin repeats: the actobindin family. *J. Biol. Chem.* 277, 14786-14792.
- Hirokawa, N., Noda, Y. and Okada, Y.** (1998). Kinesin and dynein superfamily proteins in organelle transport and cell division. *Curr. Opin. Cell Biol.* 10, 60-73.
- Hori, M., Saito, S., Shin, Y. Z., Ozaki, H., Fusetani, N. and Karaki, H.** (1993). Mycalolide-B, a novel and specific inhibitor of actomyosin ATPase isolated from marine sponge. *FEBS Lett.* 322, 151-154.
- Hotulainen, P., Paunola, E., Vartiainen, M. K. and Lappalainen, P.** (2005). Actin-depolymerizing factor and cofilin-1 play overlapping roles in promoting rapid F-actin depolymerization in mammalian nonmuscle cells. *Mol. Biol. Cell* 16, 649-664.
- Hsu, Y. C., Huang, T. Y. and Chen, M. J.** (2014). Therapeutic ROS targeting of GADD45gamma in the induction of G2/M arrest in primary human colorectal cancer cell lines by cucurbitacin E. *Cell Death. Dis.* 5, e1198.
- Huseini, H. F., Darvishzadeh, F., Heshmat, R., Jafariazar, Z., Raza, M. and Larijani, B.** (2009). The clinical investigation of Citrullus colocynthis (L.) schrad fruit in treatment of Type II diabetic patients: a randomized, double blind, placebo-controlled clinical trial. *Phytother. Res.* 23, 1186-1189.
- Hussain, A. I., Rathore, H. A., Sattar, M. Z., Chatha, S. A., Sarker, S. D. and Gilani, A. H.** (2014). Citrullus colocynthis (L.) Schrad (bitter apple fruit): A review of its phytochemistry, pharmacology, traditional uses and nutritional potential. *J. Ethnopharmacol.*
- Ikebe, M., Hartshorne, D. J. and Elzinga, M.** (1986). Identification, phosphorylation, and dephosphorylation of a second site for myosin light chain kinase on the 20,000-dalton light chain of smooth muscle myosin. *J. Biol. Chem.* 261, 36-39.
- Ishizaki, T., Maekawa, M., Fujisawa, K., Okawa, K., Iwamatsu, A., Fujita, A., Watanabe, N., Saito, Y., Kakizuka, A., Morii, N. et al.** (1996). The small GTP-binding protein Rho binds to and activates a 160 kDa Ser/Thr protein kinase homologous to myotonic dystrophy kinase. *EMBO J.* 15, 1885-1893.

- Ishizaki, T., Uehata, M., Tamechika, I., Keel, J., Nonomura, K., Maekawa, M. and Narumiya, S.** (2000). Pharmacological properties of Y-27632, a specific inhibitor of rho-associated kinases. *Mol. Pharmacol.* 57, 976-983.
- Ito, A., Munakata, K., Imazu, Y. and Watanabe, K.** (2012). First nationwide attitude survey of Japanese physicians on the use of traditional Japanese medicine (kampo) in cancer treatment. *Evid. Based. Complement Alternat. Med.* 2012, 957082.
- Ito, M., Nakano, T., Erdodi, F. and Hartshorne, D. J.** (2004). Myosin phosphatase: structure, regulation and function. *Mol. Cell Biochem.* 259, 197-209.
- Janzen, E. G.** (1984). Spin trapping. *Methods Enzymol.* 105, 188-198.
- Jayaprakasam, B., Seeram, N. P. and Nair, M. G.** (2003). Anticancer and antiinflammatory activities of cucurbitacins from *Cucurbita andreana*. *Cancer Lett.* 189, 11-16.
- Jiang, J. J., Chang, T. C., Hsu, W. L., Hwang, J. M. and Hsu, L. Y.** (2003). Synthesis and biological activity of sulfur-containing aryl-aldehyde Schiff bases. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* 51, 1307-1310.
- Joly, G. A., Ayres, M., Chelly, F. and Kilbourn, R. G.** (1994). Effects of NG-methyl-L-arginine, NG-nitro-L-arginine, and aminoguanidine on constitutive and inducible nitric oxide synthase in rat aorta. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 199, 147-154.
- Jones, V.** (1941). The nature and scope of ethnobotany. *Chronica Botanica* 6, 219-221.
- Jouad, H., Haloui, M., Rhiouani, H., El, H. J. and Eddouks, M.** (2001). Ethnobotanical survey of medicinal plants used for the treatment of diabetes, cardiac and renal diseases in the North centre region of Morocco (Fez-Boulemane). *J. Ethnopharmacol.* 77, 175-182.
- Kabsch, W., Mannherz, H. G., Suck, D., Pai, E. F. and Holmes, K. C.** (1990). Atomic structure of the actin:DNase I complex. *Nature* 347, 37-44.
- Kamal, J. K., Benchaar, S. A., Takamoto, K., Reisler, E. and Chance, M. R.** (2007). Three-dimensional structure of cofilin bound to monomeric actin derived by structural mass spectrometry data. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 104, 7910-7915.
- Kausar, H., Munagala, R., Bansal, S. S., Aqil, F., Vadhanam, M. V. and Gupta, R. C.** (2013). Cucurbitacin B potently suppresses non-small-cell lung cancer growth: identification of intracellular thiols as critical targets. *Cancer Lett.* 332, 35-45.
- Kawano, Y., Fukata, Y., Oshiro, N., Amano, M., Nakamura, T., Ito, M., Matsumura, F., Inagaki, M. and Kaibuchi, K.** (1999). Phosphorylation of myosin-binding subunit (MBS) of myosin phosphatase by Rho-kinase in vivo. *J. Cell Biol.* 147, 1023-1038.
- Kelleher, J. F., Atkinson, S. J. and Pollard, T. D.** (1995). Sequences, structural models, and cellular localization of the actin-related proteins Arp2 and Arp3 from *Acanthamoeba*. *J. Cell Biol.* 131, 385-397.
- Keller, H. and Eggl, P.** (1998). Protrusive activity, cytoplasmic compartmentalization, and restriction rings in locomoting blebbing Walker carcinoma cells are related to

- detachment of cortical actin from the plasma membrane. *Cell Motil. Cytoskeleton* 41, 181-193.
- Khlebnikov, A. I., Schepetkin, I. A., Domina, N. G., Kirpotina, L. N. and Quinn, M. T.** (2007). Improved quantitative structure-activity relationship models to predict antioxidant activity of flavonoids in chemical, enzymatic, and cellular systems. *Bioorg. Med. Chem.* 15, 1749-1770.
- Kim, H. J., Park, J. H. and Kim, J. K.** (2014a). Cucurbitacin-I, a natural cell-permeable triterpenoid isolated from Cucurbitaceae, exerts potent anticancer effect in colon cancer. *Chem. Biol. Interact.* 219C, 1-8.
- Kim, H. J., Park, J. H. and Kim, J. K.** (2014b). Cucurbitacin-I, a natural cell-permeable triterpenoid isolated from Cucurbitaceae, exerts potent anticancer effect in colon cancer. *Chem. Biol. Interact.* 219C, 1-8.
- Kimura, K., Ito, M., Amano, M., Chihara, K., Fukata, Y., Nakafuku, M., Yamamori, B., Feng, J., Nakano, T., Okawa, K. et al.** (1996). Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). *Science* 273, 245-248.
- Kinoshita, E., Kinoshita-Kikuta, E., Takiyama, K. and Koike, T.** (2006). Phosphate-binding tag, a new tool to visualize phosphorylated proteins. *Mol. Cell Proteomics.* 5, 749-757.
- Knecht, D. A., LaFleur, R. A., Kahsai, A. W., Argueta, C. E., Beshir, A. B. and Fenteany, G.** (2010). Cucurbitacin I inhibits cell motility by indirectly interfering with actin dynamics. *PLoS. One.* 5, e14039.
- Kobayashi, M., Tanaka, J., Katori, T. and Kitagawa, I.** (1990). Marine natural products. XXIII. Three new cytotoxic dimeric macrolides, swinholides B and C and isoswinholide A, congeners of swinholide A, from the Okinawan marine sponge *Theonella swinhoei*. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* 38, 2960-2966.
- Konopa, J., Zielinski, J. and Matuszkiewicz, A.** (1974). Cucurbitacins, cytotoxic and antitumor substances from *Bryonia alba* L. I: isolation and identification. *Arzneimittelforschung.* 24, 1554-1557.
- Kordali, S., Cakir, A., Mavi, A., Kilic, H. and Yildirim, A.** (2005). Screening of chemical composition and antifungal and antioxidant activities of the essential oils from three Turkish artemisia species. *J. Agric. Food Chem.* 53, 1408-1416.
- Korn, E. D.** (1982). Actin polymerization and its regulation by proteins from nonmuscle cells. *Physiol Rev.* 62, 672-737.
- Kornienko, A. and Evidente, A.** (2008). Chemistry, biology, and medicinal potential of narciclasine and its congeners. *Chem. Rev.* 108, 1982-2014.
- Kouyama, T. and Mihashi, K.** (1981). Fluorimetry study of N-(1-pyrenyl)iodoacetamide-labelled F-actin. Local structural change of actin protomer both on polymerization and on binding of heavy meromyosin. *Eur. J. Biochem.* 114, 33-38.

- Kovacs, M., Toth, J., Hetenyi, C., Malnasi-Csizmadia, A. and Sellers, J. R.** (2004). Mechanism of blebbistatin inhibition of myosin II. *J. Biol. Chem.* 279, 35557-35563.
- Kovar, D. R., Kuhn, J. R., Tichy, A. L. and Pollard, T. D.** (2003). The fission yeast cytokinesis formin Cdc12p is a barbed end actin filament capping protein gated by profilin. *J. Cell Biol.* 161, 875-887.
- Kren, V. and Martinkova, L.** (2001). Glycosides in medicine: "The role of glycosidic residue in biological activity". *Curr. Med. Chem.* 8, 1303-1328.
- Labbe, J. P., Harricane, M. C., Boyer, M., Derancourt, J., Roustan, C. and Benyamin, Y.** (1996). Biochemical evidence for the presence of an unconventional actin protein in a prokaryotic organism. *Comp Biochem. Physiol B Biochem. Mol. Biol.* 114, 287-293.
- Lammermann, T. and Sixt, M.** (2009). Mechanical modes of 'amoeboid' cell migration. *Curr. Opin. Cell Biol.* 21, 636-644.
- Lamoral-Theys, D., Andolfi, A., Van, G. G., Cimmino, A., Le, C. B., Wauthoz, N., Megalizzi, V., Gras, T., Bruyere, C., Dubois, J. et al.** (2009). Lycorine, the main phenanthridine Amaryllidaceae alkaloid, exhibits significant antitumor activity in cancer cells that display resistance to proapoptotic stimuli: an investigation of structure-activity relationship and mechanistic insight. *J. Med. Chem.* 52, 6244-6256.
- Lan, T., Wang, L., Xu, Q., Liu, W., Jin, H., Mao, W., Wang, X. and Wang, X.** (2013). Growth inhibitory effect of Cucurbitacin E on breast cancer cells. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 6, 1799-1805.
- Langridge, P. D. and Kay, R. R.** (2006). Blebbing of Dictyostelium cells in response to chemoattractant. *Exp. Cell Res.* 312, 2009-2017.
- Lassing, I., Schmitzberger, F., Bjornstedt, M., Holmgren, A., Nordlund, P., Schutt, C. E. and Lindberg, U.** (2007). Molecular and structural basis for redox regulation of beta-actin. *J. Mol. Biol.* 370, 331-348.
- Laster, S. M. and Mackenzie, J. M., Jr.** (1996). Bleb formation and F-actin distribution during mitosis and tumor necrosis factor-induced apoptosis. *Microsc. Res. Tech.* 34, 272-280.
- Lazaro-Dieguez, F., Aguado, C., Mato, E., Sanchez-Ruiz, Y., Esteban, I., Alberch, J., Knecht, E. and Egea, G.** (2008). Dynamics of an F-actin aggresome generated by the actin-stabilizing toxin jasplakinolide. *J. Cell Sci.* 121, 1415-1425.
- Lee, D. H., Iwanski, G. B. and Thoennissen, N. H.** (2010). Cucurbitacin: ancient compound shedding new light on cancer treatment. *ScientificWorldJournal.* 10, 413-418.
- Lee, E., Shelden, E. A. and Knecht, D. A.** (1998). Formation of F-actin aggregates in cells treated with actin stabilizing drugs. *Cell Motil. Cytoskeleton* 39, 122-133.
- Lefranc, F., Sauvage, S., Van, G. G., Megalizzi, V., Lamoral-Theys, D., Debeir, O., Spiegl-Kreinecker, S., Berger, W., Mathieu, V., Decaestecker, C. et al.** (2009). Narciclasine, a plant growth modulator, activates Rho and stress fibers in glioblastoma cells. *Mol. Cancer Ther.* 8, 1739-1750.

- Lehmann H.** (2013). *Le médicament à base de plantes en Europe. Statut, enregistrement, contrôles.*
- Li, Y., Wang, R., Ma, E., Deng, Y., Wang, X., Xiao, J. and Jing, Y.** (2010). The induction of G2/M cell-cycle arrest and apoptosis by cucurbitacin E is associated with increased phosphorylation of eIF2 α in leukemia cells. *Anticancer Drugs* 21, 389-400.
- Liang, Y. L., Wang, L. Y., Wu, H., Ma, D. Z., Xu, Z. and Zha, X. L.** (2003). PKB phosphorylation and survivin expression are cooperatively regulated by disruption of microfilament cytoskeleton. *Mol. Cell Biochem.* 254, 257-263.
- Liby, K. T., Yore, M. M. and Sporn, M. B.** (2007). Triterpenoids and rexinoids as multifunctional agents for the prevention and treatment of cancer. *Nat. Rev. Cancer* 7, 357-369.
- Lin, T. I. and Dowben, R. M.** (1982). Fluorescence spectroscopic studies of pyrene-actin adducts. *Biophys. Chem.* 15, 289-298.
- Lind, C., Gerdes, R., Hamnell, Y., Schuppe-Koistinen, I., von Lowenhielm, H. B., Holmgren, A. and Cotgreave, I. A.** (2002). Identification of S-glutathionylated cellular proteins during oxidative stress and constitutive metabolism by affinity purification and proteomic analysis. *Arch. Biochem. Biophys.* 406, 229-240.
- Liu, T., Zhang, M., Deng, Y., Zhang, H., Sun, C., Yang, X. and Ji, W.** (2008a). [Effects of cucurbitacin B on cell proliferation and apoptosis in Hep-2 cells]. *Lin. Chung Er. Bi Yan. Hou Tou. Jing. Wai Ke. Za Zhi.* 22, 403-407.
- Liu, T., Zhang, M., Zhang, H., Sun, C. and Deng, Y.** (2008b). Inhibitory effects of cucurbitacin B on laryngeal squamous cell carcinoma. *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.* 265, 1225-1232.
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, L., Matsudaira, P., Baltimore, D. and Darnell, J.** (2000). *Molecular Cell Biology, 4th edition.*
- Lopez-Haber, C. and Kazanietz, M. G.** (2013). Cucurbitacin I inhibits Rac1 activation in breast cancer cells by a reactive oxygen species-mediated mechanism and independently of Janus tyrosine kinase 2 and P-Rex1. *Mol. Pharmacol.* 83, 1141-1154.
- Maciver, S. K., Zot, H. G. and Pollard, T. D.** (1991). Characterization of actin filament severing by actophorin from *Acanthamoeba castellanii*. *J. Cell Biol.* 115, 1611-1620.
- MacLean-Fletcher, S. and Pollard, T. D.** (1980). Mechanism of action of cytochalasin B on actin. *Cell* 20, 329-341.
- Maekawa, M., Ishizaki, T., Boku, S., Watanabe, N., Fujita, A., Iwamatsu, A., Obinata, T., Ohashi, K., Mizuno, K. and Narumiya, S.** (1999). Signaling from Rho to the actin cytoskeleton through protein kinases ROCK and LIM-kinase. *Science* 285, 895-898.
- Mahrous, E. A. and Farag, M. A.** (2015). Two dimensional NMR spectroscopic approaches for exploring plant metabolome: A review. *J. Adv. Res.* 6, 3-15.

- Maloney, K. N., Fujita, M., Eggert, U. S., Schroeder, F. C., Field, C. M., Mitchison, T. J. and Clardy, J.** (2008). Actin-aggregating cucurbitacins from *Physocarpus capitatus*. *J. Nat. Prod.* 71, 1927-1929.
- Manser, E., Leung, T., Salihuddin, H., Zhao, Z. S. and Lim, L.** (1994). A brain serine/threonine protein kinase activated by Cdc42 and Rac1. *Nature* 367, 40-46.
- Marzouk, B., Marzouk, Z., Fenina, N., Bouraoui, A. and Aouni, M.** (2011). Anti-inflammatory and analgesic activities of Tunisian *Citrullus colocynthis* Schrad. immature fruit and seed organic extracts. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 15, 665-672.
- Matsui, T., Amano, M., Yamamoto, T., Chihara, K., Nakafuku, M., Ito, M., Nakano, T., Okawa, K., Iwamatsu, A. and Kaibuchi, K.** (1996). Rho-associated kinase, a novel serine/threonine kinase, as a putative target for small GTP binding protein Rho. *EMBO J.* 15, 2208-2216.
- McCullough, B. R., Blanchoin, L., Martiel, J. L. and De la Cruz, E. M.** (2008). Cofilin increases the bending flexibility of actin filaments: implications for severing and cell mechanics. *J. Mol. Biol.* 381, 550-558.
- McGough, A., Pope, B., Chiu, W. and Weeds, A.** (1997). Cofilin changes the twist of F-actin: implications for actin filament dynamics and cellular function. *J. Cell Biol.* 138, 771-781.
- Meggio, F., Donella, D. A., Ruzzene, M., Brunati, A. M., Cesaro, L., Guerra, B., Meyer, T., Mett, H., Fabbro, D., Furet, P. et al.** (1995). Different susceptibility of protein kinases to staurosporine inhibition. Kinetic studies and molecular bases for the resistance of protein kinase CK2. *Eur. J. Biochem.* 234, 317-322.
- Mendez-Garrido, A., Hernandez-Rodriguez, M., Zamorano-Ulloa, R., Correa-Basurto, J., Mendieta-Wejebe, J. E., Ramirez-Rosales, D. and Rosales-Hernandez, M. C.** (2014). In vitro effect of H₂O₂, some transition metals and hydroxyl radical produced via fenton and fenton-like reactions, on the catalytic activity of AChE and the hydrolysis of ACh. *Neurochem. Res.* 39, 2093-2104.
- Metcalf, R. L., Metcalf, R. A. and Rhodes, A. M.** (1980). Cucurbitacins as kairomones for diabroticite beetles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 77, 3769-3772.
- Michel, T. and Feron, O.** (1997). Nitric oxide synthases: which, where, how, and why? *J. Clin. Invest* 100, 2146-2152.
- Mills, J. C., Stone, N. L., Erhardt, J. and Pittman, R. N.** (1998). Apoptotic membrane blebbing is regulated by myosin light chain phosphorylation. *J. Cell Biol.* 140, 627-636.
- Mishima, T., Naotsuka, M., Horita, Y., Sato, M., Ohashi, K. and Mizuno, K.** (2010). LIM-kinase is critical for the mesenchymal-to-amoeboid cell morphological transition in 3D matrices. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 392, 577-581.
- Misra, U. K., Deedwania, R. and Pizzo, S. V.** (2005). Binding of activated alpha2-macroglobulin to its cell surface receptor GRP78 in 1-LN prostate cancer cells regulates PAK-2-dependent activation of LIMK. *J. Biol. Chem.* 280, 26278-26286.

- Mitchison, T. J.** (1993). Localization of an exchangeable GTP binding site at the plus end of microtubules. *Science* 261, 1044-1047.
- Miyoshi, T., Tsuji, T., Higashida, C., Hertzog, M., Fujita, A., Narumiya, S., Scita, G. and Watanabe, N.** (2006). Actin turnover-dependent fast dissociation of capping protein in the dendritic nucleation actin network: evidence of frequent filament severing. *J. Cell Biol.* 175, 947-955.
- Momma, K., Masuzawa, Y., Nakai, N., Chujo, M., Murakami, A., Kioka, N., Kiyama, Y., Akita, T. and Nagao, M.** (2008). Direct interaction of Cucurbitacin E isolated from *Alsomitra macrocarpa* to actin filament. *Cytotechnology* 56, 33-39.
- Moore, P. B., Huxley, H. E. and DeRosier, D. J.** (1970). Three-dimensional reconstruction of F-actin, thin filaments and decorated thin filaments. *J. Mol. Biol.* 50, 279-295.
- Morgan, T. E., Lockerbie, R. O., Minamide, L. S., Browning, M. D. and Bamburg, J. R.** (1993). Isolation and characterization of a regulated form of actin depolymerizing factor. *J. Cell Biol.* 122, 623-633.
- Moriyama, K., Iida, K. and Yahara, I.** (1996). Phosphorylation of Ser-3 of cofilin regulates its essential function on actin. *Genes Cells* 1, 73-86.
- Morris, G. M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M. F., Belew, R. K., Goodsell, D. S. and Olson, A. J.** (2009). AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J. Comput. Chem.* 30, 2785-2791.
- Moussavi, R. S., Kelley, C. A. and Adelstein, R. S.** (1993). Phosphorylation of vertebrate nonmuscle and smooth muscle myosin heavy chains and light chains. *Mol. Cell Biochem.* 127-128, 219-227.
- Nakanishi, O., Suetsugu, S., Yamazaki, D. and Takenawa, T.** (2007). Effect of WAVE2 phosphorylation on activation of the Arp2/3 complex. *J. Biochem.* 141, 319-325.
- Nakashima, S., Matsuda, H., Kurume, A., Oda, Y., Nakamura, S., Yamashita, M. and Yoshikawa, M.** (2010). Cucurbitacin E as a new inhibitor of cofilin phosphorylation in human leukemia U937 cells. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 20, 2994-2997.
- Nam, A. M.** (2014). Contribution de la RMN 13C a l'analyse des huiles vegetales, huiles essentielles et resines (*Olea europaea*, *Pinus halepensis* et *Cedrus atlantica*). pp. 1-187.
- Nayab, D., Ali, D., Arshad, N., Malik, A., Choudhary, M. I. and Ahmed, Z.** (2006). Cucurbitacin glucosides from *Citrullus colocynthis*. *Nat. Prod. Res.* 20, 409-413.
- Nehdi, I. A., Sbihi, H., Tan, C. P. and Al-Resayes, S. I.** (2013). Evaluation and characterisation of *Citrullus colocynthis* (L.) Schrad seed oil: Comparison with *Helianthus annuus* (sunflower) seed oil. *Food Chem.* 136, 348-353.
- Newman, D. J. and Cragg, G. M.** (2012). Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *J. Nat. Prod.* 75, 311-335.

- Nimmual, A. S., Taylor, L. J. and Bar-Sagi, D.** (2003). Redox-dependent downregulation of Rho by Rac. *Nat. Cell Biol.* 5, 236-241.
- Niwa, R., Nagata-Ohashi, K., Takeichi, M., Mizuno, K. and Uemura, T.** (2002). Control of actin reorganization by Slingshot, a family of phosphatases that dephosphorylate ADF/cofilin. *Cell* 108, 233-246.
- Nmila, R., Gross, R., Rchid, H., Roye, M., Manteghetti, M., Petit, P., Tijane, M., Ribes, G. and Sauvaire, Y.** (2000). Insulinotropic effect of *Citrullus colocynthis* fruit extracts. *Planta Med.* 66, 418-423.
- O'Boyle, N. M., Banck, M., James, C. A., Morley, C., Vandermeersch, T. and Hutchison, G. R.** (2011). Open Babel: An open chemical toolbox. *J. Cheminform.* 3, 33.
- Oh, H., Mun, Y. J., Im, S. J., Lee, S. Y., Song, H. J., Lee, H. S. and Woo, W. H.** (2002). Cucurbitacins from *Trichosanthes kirilowii* as the inhibitory components on tyrosinase activity and melanin synthesis of B16/F10 melanoma cells. *Planta Med.* 68, 832-833.
- Ohashi, K., Nagata, K., Maekawa, M., Ishizaki, T., Narumiya, S. and Mizuno, K.** (2000). Rho-associated kinase ROCK activates LIM-kinase 1 by phosphorylation at threonine 508 within the activation loop. *J. Biol. Chem.* 275, 3577-3582.
- Ohta, Y., Kousaka, K., Nagata-Ohashi, K., Ohashi, K., Muramoto, A., Shima, Y., Niwa, R., Uemura, T. and Mizuno, K.** (2003). Differential activities, subcellular distribution and tissue expression patterns of three members of Slingshot family phosphatases that dephosphorylate cofilin. *Genes Cells* 8, 811-824.
- Okamoto, I., Pirker, C., Bilban, M., Berger, W., Losert, D., Marosi, C., Haas, O. A., Wolff, K. and Pehamberger, H.** (2005). Seven novel and stable translocations associated with oncogenic gene expression in malignant melanoma. *Neoplasia.* 7, 303-311.
- Ono, S., Minami, N., Abe, H. and Obinata, T.** (1994). Characterization of a novel cofilin isoform that is predominantly expressed in mammalian skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 269, 15280-15286.
- Otterbein, L. R., Graceffa, P. and Dominguez, R.** (2001). The crystal structure of uncomplexed actin in the ADP state. *Science* 293, 708-711.
- Paavilainen, V. O., Oksanen, E., Goldman, A. and Lappalainen, P.** (2008). Structure of the actin-depolymerizing factor homology domain in complex with actin. *J. Cell Biol.* 182, 51-59.
- Page, R., Lindberg, U. and Schutt, C. E.** (1998). Domain motions in actin. *J. Mol. Biol.* 280, 463-474.
- Paillasson, S., Tasselli, M., Lebouvier, T., Mahe, M. M., Chevalier, J., Biraud, M., Cario-Toumaniantz, C., Neunlist, M. and Derkinderen, P.** (2010). alpha-Synuclein expression is induced by depolarization and cyclic AMP in enteric neurons. *J. Neurochem.* 115, 694-706.

- Palozza, P., Serini, S., Di, N. F., Piccioni, E. and Calviello, G.** (2003). Prooxidant effects of beta-carotene in cultured cells. *Mol. Aspects Med.* 24, 353-362.
- Paluch, E., Sykes, C., Prost, J. and Bornens, M.** (2006). Dynamic modes of the cortical actomyosin gel during cell locomotion and division. *Trends Cell Biol.* 16, 5-10.
- Pantaloni, D. and Carlier, M. F.** (1993a). How profilin promotes actin filament assembly in the presence of thymosin beta 4. *Cell* 75, 1007-1014.
- Pantaloni, D. and Carlier, M. F.** (1993b). How profilin promotes actin filament assembly in the presence of thymosin beta 4. *Cell* 75, 1007-1014.
- Parveen, Upadhyay, B., Roy, S. and Kumar, A.** (2007). Traditional uses of medicinal plants among the rural communities of Churu district in the Thar Desert, India. *J. Ethnopharmacol.* 113, 387-399.
- Pauli, G. F., Jaki, B. U. and Lankin, D. C.** (2005). Quantitative ¹H NMR: development and potential of a method for natural products analysis. *J. Nat. Prod.* 68, 133-149.
- Pavlov, D., Muhrad, A., Cooper, J., Wear, M. and Reisler, E.** (2007). Actin filament severing by cofilin. *J. Mol. Biol.* 365, 1350-1358.
- Pearson, R. B., Jakes, R., John, M., Kendrick-Jones, J. and Kemp, B. E.** (1984). Phosphorylation site sequence of smooth muscle myosin light chain (Mr = 20 000). *FEBS Lett.* 168, 108-112.
- Pellegrin, S. and Mellor, H.** (2005). The Rho family GTPase Rif induces filopodia through mDia2. *Curr. Biol.* 15, 129-133.
- Pellegrin, S. and Mellor, H.** (2007). Actin stress fibres. *J. Cell Sci.* 120, 3491-3499.
- Peters, R. R., Baier, K. P., Siqueira-Junior, J., da Silva Rocha, J. C., Marques, B. M., de Albuquerque, R. R., de Brum-Fernandes, A. J., Rocha, F. M., Castro da Rocha, F. A. and Ribeiro-do-Valle, R. M.** (2003). Nitric oxide and cyclooxygenase may participate in the analgesic and anti-inflammatory effect of the cucurbitacins fraction from *Wilbrandia ebracteata*. *Life Sci.* 73, 2185-2197.
- Petersen, O. H., Michalak, M. and Verkhratsky, A.** (2005). Calcium signalling: past, present and future. *Cell Calcium* 38, 161-169.
- Philipson, K. D., Nicoll, D. A., Ottolia, M., Quednau, B. D., Reuter, H., John, S. and Qiu, Z.** (2002). The Na⁺/Ca²⁺ exchange molecule: an overview. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 976, 1-10.
- Pollard, T. D.** (1986). Assembly and dynamics of the actin filament system in nonmuscle cells. *J. Cell Biochem.* 31, 87-95.
- Pollard, T. D., Blanchoin, L. and Mullins, R. D.** (2000). Molecular mechanisms controlling actin filament dynamics in nonmuscle cells. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 29, 545-576.

- Pollard, T. D. and Borisy, G. G.** (2003). Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* 112, 453-465.
- Powers, S.** (1875). *Aboriginal Botany*. pp. 373-379.
- Pring, M., Evangelista, M., Boone, C., Yang, C. and Zigmond, S. H.** (2003). Mechanism of formin-induced nucleation of actin filaments. *Biochemistry* 42, 486-496.
- Prochazkova, D., Bousova, I. and Wilhelmova, N.** (2011). Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia* 82, 513-523.
- Pruyne, D., Evangelista, M., Yang, C., Bi, E., Zigmond, S., Bretscher, A. and Boone, C.** (2002). Role of formins in actin assembly: nucleation and barbed-end association. *Science* 297, 612-615.
- Pryor, W. A.** (2000). Oxidative stress status-the fifth set. *Free Radic. Biol. Med.* 29, 1063.
- Puthier, D., Derenne, S., Barille, S., Moreau, P., Harousseau, J. L., Bataille, R. and Amiot, M.** (1999). Mcl-1 and Bcl-xL are co-regulated by IL-6 in human myeloma cells. *Br. J. Haematol.* 107, 392-395.
- Quelever, G., Kachidian, P., Melon, C., Garino, C., Laras, Y., Pietrancosta, N., Sheha, M. and Louis, K. J.** (2005). Enhanced delivery of gamma-secretase inhibitor DAPT into the brain via an ascorbic acid mediated strategy. *Org. Biomol. Chem.* 3, 2450-2457.
- Ratz, P. H., Berg, K. M., Urban, N. H. and Miner, A. S.** (2005). Regulation of smooth muscle calcium sensitivity: KCl as a calcium-sensitizing stimulus. *Am. J. Physiol Cell Physiol* 288, C769-C783.
- Ray, S., Fanti, J. A., Macedo, D. P. and Larsen, M.** (2014). LIM kinase regulation of cytoskeletal dynamics is required for salivary gland branching morphogenesis. *Mol. Biol. Cell* 25, 2393-2407.
- Recio, M. C., Prieto, M., Bonucelli, M., Orsi, C., Manez, S., Giner, R. M., Cerda-Nicolas, M. and Rios, J. L.** (2004). Anti-inflammatory activity of two cucurbitacins isolated from *Cayaponia tayuya* roots. *Planta Med.* 70, 414-420.
- Redowicz, M. J.** (2001). Regulation of nonmuscle myosins by heavy chain phosphorylation. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 22, 163-173.
- Reichenbach, H. and Hofle, G.** (1993). Biologically active secondary metabolites from myxobacteria. *Biotechnol. Adv.* 11, 219-277.
- Ren, F. B. and Hong, M.** (1986). [Cucurbitacins in the treatment of hepatitis and primary liver cancer. Current status of pharmacological and clinical research]. *Zhong. Xi. Yi. Jie. He. Za Zhi.* 6, 633-635.
- Ren, X. D. and Schwartz, M. A.** (2000). Determination of GTP loading on Rho. *Methods Enzymol.* 325, 264-272.
- Reymann, A. C.** (2011). Dynamique des réseaux d'actine d'architecture contrôlée.

- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J. and Paganga, G.** (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic. Biol. Med.* 20, 933-956.
- Ridley, A. J. and Hall, A.** (1992). The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell* 70, 389-399.
- Riento, K. and Ridley, A. J.** (2003). Rocks: multifunctional kinases in cell behaviour. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 446-456.
- Robbins, W. W., Harrington, J. P. and Freire-Marreco, B.** (1916). *Ethnobotany of the Tewa Indians.*
- Robinson, D. N. and Spudich, J. A.** (2000). Towards a molecular understanding of cytokinesis. *Trends Cell Biol.* 10, 228-237.
- Ross-Macdonald, P., de, S. H., Guo, Q., Xiao, H., Hung, C. Y., Penhallow, B., Markwalder, J., He, L., Attar, R. M., Lin, T. A. et al.** (2008). Identification of a nonkinase target mediating cytotoxicity of novel kinase inhibitors. *Mol. Cancer Ther.* 7, 3490-3498.
- Rould, M. A., Wan, Q., Joel, P. B., Lowey, S. and Trybus, K. M.** (2006). Crystal structures of expressed non-polymerizable monomeric actin in the ADP and ATP states. *J. Biol. Chem.* 281, 31909-31919.
- Saade, M., Magdalou, J., Ouaini, N. and Greige-Gerges, H.** (2009). Stability of cucurbitacin E in human plasma: chemical hydrolysis and role of plasma esterases. *Biopharm. Drug Dispos.* 30, 389-397.
- Sagot, I., Klee, S. K. and Pellman, D.** (2002). Yeast formins regulate cell polarity by controlling the assembly of actin cables. *Nat. Cell Biol.* 4, 42-50.
- Sahai, E. and Marshall, C. J.** (2003). Differing modes of tumour cell invasion have distinct requirements for Rho/ROCK signalling and extracellular proteolysis. *Nat. Cell Biol.* 5, 711-719.
- Sahoo, N., Manchikanti, P. and Dey, S.** (2010). Herbal drugs: standards and regulation. *Fitoterapia* 81, 462-471.
- Saito, S., Watabe, S., Ozaki, H., Fusetani, N. and Karaki, H.** (1994). Mycalolide B, a novel actin depolymerizing agent. *J. Biol. Chem.* 269, 29710-29714.
- Sanders, L. C., Matsumura, F., Bokoch, G. M. and de, L. P.** (1999). Inhibition of myosin light chain kinase by p21-activated kinase. *Science* 283, 2083-2085.
- Saoudi, Y., Rousseau, B., Doussiere, J., Charrasse, S., Gauthier-Rouviere, C., Morin, N., Sautet-Laugier, C., Denarier, E., Scaife, R., Mioskowski, C. et al.** (2004). Calcium-independent cytoskeleton disassembly induced by BAPTA. *Eur. J. Biochem.* 271, 3255-3264.

- Schabort, J. C. and Potgieter, D. J.** (1968). Cucurbitacin B delta 23-reductase from *Cucurbita maxima*. II. Cofactor requirements, enzyme kinetics, substrate specificity and other characteristics. *Biochim. Biophys. Acta* 151, 47-53.
- Schabort, J. C., Potgieter, D. J. and de, V., V.** (1968). Cucurbitacin B delta 23-reductase from *Cucurbita maxima*. I. Assay methods, isolation and purification. *Biochim. Biophys. Acta* 151, 33-46.
- Schafer, D. A., Jennings, P. B. and Cooper, J. A.** (1996). Dynamics of capping protein and actin assembly in vitro: uncapping barbed ends by polyphosphoinositides. *J. Cell Biol.* 135, 169-179.
- Schirenbeck, A., Arasada, R., Bretschneider, T., Schleicher, M. and Faix, J.** (2005). Formins and VASPs may co-operate in the formation of filopodia. *Biochem. Soc. Trans.* 33, 1256-1259.
- Schultes, R. E.** (1967). The place of ethnobotany in the ethnopharmacologic search for psychomimetic drugs. In *Public Health Service Publication no. 1645. Washington, D.C.* (eds. Efron D.H., Holmstedt B. and Kline N.S.), pp. 33-57.
- Schutt, C. E., Myslik, J. C., Rozycki, M. D., Goonesekere, N. C. and Lindberg, U.** (1993). The structure of crystalline profilin-beta-actin. *Nature* 365, 810-816.
- Scott, R. W. and Olson, M. F.** (2007). LIM kinases: function, regulation and association with human disease. *J. Mol. Med. (Berl)* 85, 555-568.
- Sebbagh, N., Cruciani-Guglielmacci, C., Ouali, F., Berthault, M. F., Rouch, C., Sari, D. C. and Magnan, C.** (2009). Comparative effects of *Citrullus colocynthis*, sunflower and olive oil-enriched diet in streptozotocin-induced diabetes in rats. *Diabetes Metab* 35, 178-184.
- Seger, C., Sturm, S., Mair, M. E., Ellmerer, E. P. and Stuppner, H.** (2005). ¹H and ¹³C NMR signal assignment of cucurbitacin derivatives from *Citrullus colocynthis* (L.) Schrader and *Ecballium elaterium* L. (Cucurbitaceae). *Magn Reson. Chem.* 43, 489-491.
- Sellers, J. R.** (1991). Regulation of cytoplasmic and smooth muscle myosin. *Curr. Opin. Cell Biol.* 3, 98-104.
- Sellers, J. R.** (2000). Myosins: a diverse superfamily. *Biochim. Biophys. Acta* 1496, 3-22.
- Sells, M. A.** (1999). Pictures in cell biology. Pak1 kinase activity affects the character of cell morphology and movement. *Trends Cell Biol.* 9, 355.
- Shaw, J. T. and Hummel, H. E.** (2003). A monitoring trap for *Diabrotica virgifera virgifera* and *D. barberi* adults lured with a poisoned cucurbitacin bait. *Commun. Agric. Appl. Biol. Sci.* 68, 67-71.
- Shi, X., Franko, B., Frantz, C., Amin, H. M. and Lai, R.** (2006). JSI-124 (cucurbitacin I) inhibits Janus kinase-3/signal transducer and activator of transcription-3 signalling, downregulates nucleophosmin-anaplastic lymphoma kinase (ALK), and induces

- apoptosis in ALK-positive anaplastic large cell lymphoma cells. *Br. J. Haematol.* 135, 26-32.
- Shibuya, M., Adachi, S. and Ebizuka, Y.** (2004). Cucurbitadienol synthase, the first committed enzyme for cucurbitacin biosynthesis, is a distinct enzyme from cycloartenol synthase for phytosterol biosynthesis. *Tetrahedron* 60, 6995-7003.
- Shohat, B., Gitter, S. and Lavie, D.** (1962). Antitumor activity of cucurbitacins: metabolic aspects. *Cancer Chemother. Rep.* 23, 19-24.
- Silvestre, F. and Tosti, E.** (2010). Impact of marine drugs on cytoskeleton-mediated reproductive events. *Mar. Drugs* 8, 881-915.
- Singh, P. P., Chandra, A., Mahdi, F., Roy, A. and Sharma, P.** (2010). Reconvene and reconnect the antioxidant hypothesis in human health and disease. *Indian J. Clin. Biochem.* 25, 225-243.
- Siqueira, J. M., Jr., Peters, R. R., Gazola, A. C., Krepsky, P. B., Farias, M. R., Rae, G. A., de Brum-Fernandes, A. J. and Ribeiro-do-Valle, R. M.** (2007). Anti-inflammatory effects of a triterpenoid isolated from *Wilbrandia ebracteata* Cogn. *Life Sci.* 80, 1382-1387.
- Skau, C. T. and Kovar, D. R.** (2010). Fimbrin and tropomyosin competition regulates endocytosis and cytokinesis kinetics in fission yeast. *Curr. Biol.* 20, 1415-1422.
- Slee, E. A., O'Connor, D. J. and Lu, X.** (2004). To die or not to die: how does p53 decide? *Oncogene* 23, 2809-2818.
- Solinet, S., Akpovi, C. D., Garcia, C. J., Barry, A. and Vitale, M. L.** (2011). Myosin IIB deficiency in embryonic fibroblasts affects regulators and core members of the par polarity complex. *Histochem. Cell Biol.* 136, 245-266.
- Sorensen, P. M., Iacob, R. E., Fritzsche, M., Engen, J. R., Briehner, W. M., Charras, G. and Eggert, U. S.** (2012). The natural product cucurbitacin E inhibits depolymerization of actin filaments. *ACS Chem. Biol.* 7, 1502-1508.
- Spector, I., Braet, F., Shochet, N. R. and Bubb, M. R.** (1999). New anti-actin drugs in the study of the organization and function of the actin cytoskeleton. *Microsc. Res. Tech.* 47, 18-37.
- Spector, I., Shochet, N. R., Kashman, Y. and Groweiss, A.** (1983). Latrunculins: novel marine toxins that disrupt microfilament organization in cultured cells. *Science* 219, 493-495.
- Spedding, M. and Paoletti, R.** (1992). Classification of calcium channels and calcium antagonists: progress report. *Cardiovasc. Drugs Ther.* 6, 35-39.
- Spudich, J. A.** (2001). The myosin swinging cross-bridge model. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 387-392.

- Straight, A. F., Cheung, A., Limouze, J., Chen, I., Westwood, N. J., Sellers, J. R. and Mitchison, T. J.** (2003). Dissecting temporal and spatial control of cytokinesis with a myosin II Inhibitor. *Science* 299, 1743-1747.
- Strehler, E. E., Filoteo, A. G., Penniston, J. T. and Caride, A. J.** (2007). Plasma-membrane Ca(2+) pumps: structural diversity as the basis for functional versatility. *Biochem. Soc. Trans.* 35, 919-922.
- Stuehr, D. J.** (2004). Enzymes of the L-arginine to nitric oxide pathway. *J. Nutr.* 134, 2748S-2751S.
- Sturm, S. and Stuppner, H.** (2000). Analysis of cucurbitacins in medicinal plants by high pressure chromatography-mass spectrometry. *Phytochem. Anal.*, 121-127.
- Su, Y., Li, G., Zhang, X., Gu, J., Zhang, C., Tian, Z. and Zhang, J.** (2008). JSI-124 inhibits glioblastoma multiforme cell proliferation through G(2)/M cell cycle arrest and apoptosis augment. *Cancer Biol. Ther.* 7, 1243-1249.
- Sumi, T., Matsumoto, K. and Nakamura, T.** (2001a). Specific activation of LIM kinase 2 via phosphorylation of threonine 505 by ROCK, a Rho-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* 276, 670-676.
- Sumi, T., Matsumoto, K., Shibuya, A. and Nakamura, T.** (2001b). Activation of LIM kinases by myotonic dystrophy kinase-related Cdc42-binding kinase alpha. *J. Biol. Chem.* 276, 23092-23096.
- Sumi, T., Matsumoto, K., Takai, Y. and Nakamura, T.** (1999). Cofilin phosphorylation and actin cytoskeletal dynamics regulated by rho- and Cdc42-activated LIM-kinase 2. *J. Cell Biol.* 147, 1519-1532.
- Sun, C., Zhang, M., Shan, X., Zhou, X., Yang, J., Wang, Y., Li-Ling, J. and Deng, Y.** (2010). Inhibitory effect of cucurbitacin E on pancreatic cancer cells growth via STAT3 signaling. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 136, 603-610.
- Sun, H. Q., Yamamoto, M., Mejillano, M. and Yin, H. L.** (1999). Gelsolin, a multifunctional actin regulatory protein. *J. Biol. Chem.* 274, 33179-33182.
- Sun, J., Blaskovich, M. A., Jove, R., Livingston, S. K., Coppola, D. and Sebti, S. M.** (2005). Cucurbitacin Q: a selective STAT3 activation inhibitor with potent antitumor activity. *Oncogene* 24, 3236-3245.
- Sutoh, K.** (1982). Identification of myosin-binding sites on the actin sequence. *Biochemistry* 21, 3654-3661.
- Suyama, E., Wadhwa, R., Kawasaki, H., Yaguchi, T., Kaul, S. C., Nakajima, M. and Taira, K.** (2004). LIM kinase-2 targeting as a possible anti-metastasis therapy. *J. Gene Med.* 6, 357-363.
- Svitkina, T. M. and Borisy, G. G.** (1999). Arp2/3 complex and actin depolymerizing factor/cofilin in dendritic organization and treadmilling of actin filament array in lamellipodia. *J. Cell Biol.* 145, 1009-1026.

- Tafari, S. R., Rushforth, A. M., Kuczarski, E. R. and Chisholm, R. L.** (1989). Dictyostelium discoideum myosin: isolation and characterization of cDNAs encoding the regulatory light chain. *Mol. Cell Biol.* 9, 3073-3080.
- Tahraoui, A., El-Hilaly, J., Israili, Z. H. and Lyoussi, B.** (2007). Ethnopharmacological survey of plants used in the traditional treatment of hypertension and diabetes in south-eastern Morocco (Errachidia province). *J. Ethnopharmacol.* 110, 105-117.
- Tan, J. L., Ravid, S. and Spudich, J. A.** (1992). Control of nonmuscle myosins by phosphorylation. *Annu. Rev. Biochem.* 61, 721-759.
- Tan, Z. and Boss, W. F.** (1992). Association of Phosphatidylinositol Kinase, Phosphatidylinositol Monophosphate Kinase, and Diacylglycerol Kinase with the Cytoskeleton and F-Actin Fractions of Carrot (*Daucus carota* L.) Cells Grown in Suspension Culture : Response to Cell Wall-Degrading Enzymes. *Plant Physiol* 100, 2116-2120.
- Tannin-Spitz, T., Bergman, M. and Grossman, S.** (2007a). Cucurbitacin glucosides: antioxidant and free-radical scavenging activities. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 364, 181-186.
- Tannin-Spitz, T., Grossman, S., Dovrat, S., Gottlieb, H. E. and Bergman, M.** (2007b). Growth inhibitory activity of cucurbitacin glucosides isolated from *Citrullus colocynthis* on human breast cancer cells. *Biochem. Pharmacol.* 73, 56-67.
- Thoennissen, N. H., Iwanski, G. B., Doan, N. B., Okamoto, R., Lin, P., Abbassi, S., Song, J. H., Yin, D., Toh, M., Xie, W. D. et al.** (2009). Cucurbitacin B induces apoptosis by inhibition of the JAK/STAT pathway and potentiates antiproliferative effects of gemcitabine on pancreatic cancer cells. *Cancer Res.* 69, 5876-5884.
- Tobacman, L. S. and Korn, E. D.** (1982). The regulation of actin polymerization and the inhibition of monomeric actin ATPase activity by *Acanthamoeba* profilin. *J. Biol. Chem.* 257, 4166-4170.
- Toshima, J., Toshima, J. Y., Amano, T., Yang, N., Narumiya, S. and Mizuno, K.** (2001a). Cofilin phosphorylation by protein kinase testicular protein kinase 1 and its role in integrin-mediated actin reorganization and focal adhesion formation. *Mol. Biol. Cell* 12, 1131-1145.
- Toshima, J., Toshima, J. Y., Takeuchi, K., Mori, R. and Mizuno, K.** (2001b). Cofilin phosphorylation and actin reorganization activities of testicular protein kinase 2 and its predominant expression in testicular Sertoli cells. *J. Biol. Chem.* 276, 31449-31458.
- Tsapara, A., Kardassis, D., Moustakas, A., Gravanis, A. and Stournaras, C.** (1999). Expression and characterization of Cys374 mutated human beta-actin in two different mammalian cell lines: impaired microfilament organization and stability. *FEBS Lett.* 455, 117-122.
- Usmanova, A., Astier, C., Mejean, C., Hubert, F., Feinberg, J., Benyamin, Y. and Roustan, C.** (1998). Coevolution of actin and associated proteins: an alpha-actinin-like protein in a cyanobacterium (*Spirulina platensis*). *Comp Biochem. Physiol B Biochem. Mol. Biol.* 120, 693-700.

- Valiron, O., Caudron, N. and Job, D.** (2001). Microtubule dynamics. *Cell Mol. Life Sci.* 58, 2069-2084.
- van Kester, M. S., Out-Luiting, J. J., von dem Borne, P. A., Willemze, R., Tensen, C. P. and Vermeer, M. H.** (2008). Cucurbitacin I inhibits Stat3 and induces apoptosis in Sezary cells. *J. Invest Dermatol.* 128, 1691-1695.
- van Leeuwen, F. N., van, D. S., Kain, H. E., van der Kammen, R. A. and Collard, J. G.** (1999). Rac regulates phosphorylation of the myosin-II heavy chain, actinomyosin disassembly and cell spreading. *Nat. Cell Biol.* 1, 242-248.
- Van, G. G., Mathieu, V., Lefranc, F., Kornienko, A., Evidente, A. and Kiss, R.** (2013). Narciclasine as well as other Amaryllidaceae isocarboxystyryls are promising GTP-ase targeting agents against brain cancers. *Med. Res. Rev.* 33, 439-455.
- van, R. J., Song, X., van, R. W., Cammer, M., Chen, X., Desmarais, V., Yip, S. C., Backer, J. M., Eddy, R. J. and Condeelis, J. S.** (2007). EGF-induced PIP2 hydrolysis releases and activates cofilin locally in carcinoma cells. *J. Cell Biol.* 179, 1247-1259.
- Van, T. M., Dewitte, D., Verschelde, J. L., Goethals, M., Vandekerckhove, J. and Ampe, C.** (2000). The competitive interaction of actin and PIP2 with actophorin is based on overlapping target sites: design of a gain-of-function mutant. *Biochemistry* 39, 12181-12189.
- Van, T. M., Huyck, L., Leyman, S., Dhaese, S., Vandekerckhove, J. and Ampe, C.** (2008). Ins and outs of ADF/cofilin activity and regulation. *Eur. J. Cell Biol.* 87, 649-667.
- Vandekerckhove, J. and Weber, K.** (1978). At least six different actins are expressed in a higher mammal: an analysis based on the amino acid sequence of the amino-terminal tryptic peptide. *J. Mol. Biol.* 126, 783-802.
- Vartiainen, M. K., Mustonen, T., Mattila, P. K., Ojala, P. J., Thesleff, I., Partanen, J. and Lappalainen, P.** (2002). The three mouse actin-depolymerizing factor/cofilins evolved to fulfill cell-type-specific requirements for actin dynamics. *Mol. Biol. Cell* 13, 183-194.
- Vaysse, J., Balayssac, S., Gilard, V., Desoubdizanne, D., Malet-Martino, M. and Martino, R.** (2010). Analysis of adulterated herbal medicines and dietary supplements marketed for weight loss by DOSY 1H-NMR. *Food Addit. Contam Part A Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess.* 27, 903-916.
- Verchier, Y., Lardy, B., Nguyen, M. V., Morel, F., Arbault, S. and Amatore, C.** (2007). Concerted activities of nitric oxide synthases and NADPH oxidases in PLB-985 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 361, 493-498.
- Verpoorte, R., Choi, Y. H., Mustafa, N. R. and Kim, H. K.** (2008). Metabolomics: back to basics. *Phytochem Rev*, 525-537.
- Vicente-Manzanares, M., Ma, X., Adelstein, R. S. and Horwitz, A. R.** (2009). Non-muscle myosin II takes centre stage in cell adhesion and migration. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 778-790.

- Vinson, V. K., De La Cruz, E. M., Higgs, H. N. and Pollard, T. D.** (1998). Interactions of Acanthamoeba profilin with actin and nucleotides bound to actin. *Biochemistry* 37, 10871-10880.
- Wakimoto, N., Yin, D., O'Kelly, J., Haritunians, T., Karlan, B., Said, J., Xing, H. and Koeffler, H. P.** (2008). Cucurbitacin B has a potent antiproliferative effect on breast cancer cells in vitro and in vivo. *Cancer Sci.* 99, 1793-1797.
- Walker, R. A., O'Brien, E. T., Pryer, N. K., Soboeiro, M. F., Voter, W. A., Erickson, H. P. and Salmon, E. D.** (1988). Dynamic instability of individual microtubules analyzed by video light microscopy: rate constants and transition frequencies. *J. Cell Biol.* 107, 1437-1448.
- Wang, H. H., Tanaka, H., Qin, X., Zhao, T., Ye, L. H., Okagaki, T., Katayama, T., Nakamura, A., Ishikawa, R., Thatcher, S. E. et al.** (2008). Blebbistatin inhibits the chemotaxis of vascular smooth muscle cells by disrupting the myosin II-actin interaction. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* 294, H2060-H2068.
- Wani, M. C., Taylor, H. L., Wall, M. E., Coggon, P. and McPhail, A. T.** (1971). Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *J. Am. Chem. Soc.* 93, 2325-2327.
- Warrick, H. M., De, L. A., Leinwand, L. A. and Spudich, J. A.** (1986). Conserved protein domains in a myosin heavy chain gene from *Dictyostelium discoideum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 83, 9433-9437.
- Warrick, H. M. and Spudich, J. A.** (1987). Myosin structure and function in cell motility. *Annu. Rev. Cell Biol.* 3, 379-421.
- Whitehouse, M. W. and Doskotch, R. W.** (1969). Selective inhibition of thymidine incorporation into lymphocytes by cucurbitacins B and D. *Biochem. Pharmacol.* 18, 1790-1793.
- Wiggin, O., Shaw, A. E., DeLuca, J. G. and Bamburg, J. R.** (2012). ADF/cofilin regulates actomyosin assembly through competitive inhibition of myosin II binding to F-actin. *Dev. Cell* 22, 530-543.
- Wildenberg, G. A., Dohn, M. R., Carnahan, R. H., Davis, M. A., Lobdell, N. A., Settleman, J. and Reynolds, A. B.** (2006). p120-catenin and p190RhoGAP regulate cell-cell adhesion by coordinating antagonism between Rac and Rho. *Cell* 127, 1027-1039.
- Witke, W., Hofmann, A., Koppel, B., Schleicher, M. and Noegel, A. A.** (1993). The Ca(2+)-binding domains in non-muscle type alpha-actinin: biochemical and genetic analysis. *J. Cell Biol.* 121, 599-606.
- Woychik, R. P., Maas, R. L., Zeller, R., Vogt, T. F. and Leder, P.** (1990). 'Formins': proteins deduced from the alternative transcripts of the limb deformity gene. *Nature* 346, 850-853.

- Wriggers, W., Tang, J. X., Azuma, T., Marks, P. W. and Janmey, P. A.** (1998). Cofilin and gelsolin segment-1: molecular dynamics simulation and biochemical analysis predict a similar actin binding mode. *J. Mol. Biol.* 282, 921-932.
- Xiao, L., Eto, M. and Kazanietz, M. G.** (2009). ROCK mediates phorbol ester-induced apoptosis in prostate cancer cells via p21Cip1 up-regulation and JNK. *J. Biol. Chem.* 284, 29365-29375.
- Yamamoto, K., Pardee, J. D., Reidler, J., Stryer, L. and Spudich, J. A.** (1982). Mechanism of interaction of Dictyostelium severin with actin filaments. *J. Cell Biol.* 95, 711-719.
- Yan, Y., Wei, C. L., Zhang, W. R., Cheng, H. P. and Liu, J.** (2006). Cross-talk between calcium and reactive oxygen species signaling. *Acta Pharmacol. Sin.* 27, 821-826.
- Yang, S. J., Chang, Y. Q., Zheng, L. H., Qu, H. G. and Cao, S. G.** (2005). Protective effects of cucurbitacin B on the acute liver injury induced by CCl₄. *Food Sci* 26, 524-526.
- Yarmola, E. G., Somasundaram, T., Boring, T. A., Spector, I. and Bubb, M. R.** (2000). Actin-latrunculin A structure and function. Differential modulation of actin-binding protein function by latrunculin A. *J. Biol. Chem.* 275, 28120-28127.
- Yasuda, S., Yogosawa, S., Izutani, Y., Nakamura, Y., Watanabe, H. and Sakai, T.** (2010). Cucurbitacin B induces G2 arrest and apoptosis via a reactive oxygen species-dependent mechanism in human colon adenocarcinoma SW480 cells. *Mol. Nutr. Food Res.* 54, 559-565.
- Yin, D., Wakimoto, N., Xing, H., Lu, D., Huynh, T., Wang, X., Black, K. L. and Koeffler, H. P.** (2008). Cucurbitacin B markedly inhibits growth and rapidly affects the cytoskeleton in glioblastoma multiforme. *Int. J. Cancer* 123, 1364-1375.
- Yonezawa, N., Nishida, E., Iida, K., Yahara, I. and Sakai, H.** (1990). Inhibition of the interactions of cofilin, destrin, and deoxyribonuclease I with actin by phosphoinositides. *J. Biol. Chem.* 265, 8382-8386.
- Yoshida, K. and Soldati, T.** (2006). Dissection of amoeboid movement into two mechanically distinct modes. *J. Cell Sci.* 119, 3833-3844.
- Yoshioka, K., Foletta, V., Bernard, O. and Itoh, K.** (2003). A role for LIM kinase in cancer invasion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100, 7247-7252.
- Yu, H. and Jove, R.** (2004). The STATs of cancer--new molecular targets come of age. *Nat. Rev. Cancer* 4, 97-105.
- Yu, H., Pardoll, D. and Jove, R.** (2009). STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. *Nat. Rev. Cancer* 9, 798-809.
- Yuan, G., Yan, S. F., Xue, H., Zhang, P., Sun, J. T. and Li, G.** (2014). Cucurbitacin I induces protective autophagy in glioblastoma in vitro and in vivo. *J. Biol. Chem.* 289, 10607-10619.

- Zafarullah, M., Li, W. Q., Sylvester, J. and Ahmad, M.** (2003). Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions. *Cell Mol. Life Sci.* 60, 6-20.
- Zebda, N., Bernard, O., Bailly, M., Welti, S., Lawrence, D. S. and Condeelis, J. S.** (2000). Phosphorylation of ADF/cofilin abolishes EGF-induced actin nucleation at the leading edge and subsequent lamellipod extension. *J. Cell Biol.* 151, 1119-1128.
- Zhang, M., Sun, C., Shan, X., Yang, X., Li-Ling, J. and Deng, Y.** (2010). Inhibition of pancreatic cancer cell growth by cucurbitacin B through modulation of signal transducer and activator of transcription 3 signaling. *Pancreas* 39, 923-929.
- Zhang, M., Zhang, H., Sun, C., Shan, X., Yang, X., Li-Ling, J. and Deng, Y.** (2009). Targeted constitutive activation of signal transducer and activator of transcription 3 in human hepatocellular carcinoma cells by cucurbitacin B. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 63, 635-642.
- Zhang, T., Li, Y., Park, K. A., Byun, H. S., Won, M., Jeon, J., Lee, Y., Seok, J. H., Choi, S. W., Lee, S. H. et al.** (2012). Cucurbitacin induces autophagy through mitochondrial ROS production which counteracts to limit caspase-dependent apoptosis. *Autophagy*. 8, 559-576.
- Zhang, Y., Ouyang, D., Xu, L., Ji, Y., Zha, Q., Cai, J. and He, X.** (2011). Cucurbitacin B induces rapid depletion of the G-actin pool through reactive oxygen species-dependent actin aggregation in melanoma cells. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)* 43, 556-567.
- Zhang, Y. T., Ouyang, D. Y., Xu, L. H., Zha, Q. B. and He, X. H.** (2013a). Formation of cofilin-actin rods following cucurbitacin-B-induced actin aggregation depends on Slingshot homolog 1-mediated cofilin hyperactivation. *J. Cell Biochem.* 114, 2415-2429.
- Zhang, Y. T., Ouyang, D. Y., Xu, L. H., Zha, Q. B. and He, X. H.** (2013b). Formation of cofilin-actin rods following cucurbitacin-B-induced actin aggregation depends on Slingshot homolog 1-mediated cofilin hyperactivation. *J. Cell Biochem.* 114, 2415-2429.
- Ziyyat, A., Legssyer, A., Mekhfi, H., Dassouli, A., Serhrouchni, M. and Benjelloun, W.** (1997). Phytotherapy of hypertension and diabetes in oriental Morocco. *J. Ethnopharmacol.* 58, 45-54.

ANNEXES

ANNEXE 1

ARTICLE ACCEPTE



Cucurbitacin I elicits the formation of actin/phospho-myosin II co-aggregates by stimulation of the RhoA/ROCK pathway and inhibition of LIM-kinase

Meryem Sari-Hassoun^{a,c}, Marie-Jeanne Clement^a, Imane Hamdi^a, Guillaume Bollot^b, Cyril Bauvais^b, Vandana Joshi^a, Flavio Toma^a, Andrea Burgo^a, Michel Cailleret^{a,1}, Martha Cecilia Rosales-hernández^d, Martha Edith Macias Pérez^d, Daoudi Chabane-Sari^c, Patrick A. Curmi^{a,*}

^a Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, UMR1204, Laboratoire Structure-Activité des Biomolécules Normales et Pathologiques, Université d'Evry-Val d'Essonne, Evry 91025, France

^b Synsight, 86 Rue de Paris, 91400 Orsay, France

^c Laboratoire des Produits Naturels, LAPRONA, Université Abou Bekr Belkaid, Tlemcen 13000, Algeria

^d Laboratorio de Biofísica y Biocatálisis, Sección de Estudios de Posgrado e Investigación de la Escuela Superior de Medicina del Instituto Politécnico Nacional, Plan de San Luis y Díaz Mirón s/n, Casco de Santo Tomás, México D.F. 11340, México

ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 October 2015

Accepted 15 December 2015

Available online 18 December 2015

Chemical compounds used in this article:

Cucurbitacin I (PubChem CID: 5281321)

Cucurbitacin E (PubChem CID: 5281319)

Cucurbitacin I 2-O-glucoside (PubChem CID: 44201985)

Cucurbitacin E 2-O-glucoside (PubChem CID: 5459275)

BMS3 (PubChem CID: 644328)

(±)-Blebbistatin (PubChem CID: 3476986)

Y27632 (PubChem CID: 448042)

NAC (PubChem CID: 12035)

GSH (PubChem CID: 7048684)

SMIFH2 (PubChem CID: 2258538, SID: 252158028)

Keywords:

Cucurbitacin

Actin

Myosin II

LIMK

ROCK

ABSTRACT

Cucurbitacins are cytotoxic triterpenoid sterols isolated from plants. One of their earliest cellular effect is the aggregation of actin associated with blockage of cell migration and division that eventually lead to apoptosis. We unravel here that cucurbitacin I actually induces the co-aggregation of actin with phospho-myosin II. This co-aggregation most probably results from the stimulation of the Rho/ROCK pathway and the direct inhibition of the LIMKinase. We further provide data that suggest that the formation of these co-aggregates is independent of a putative pro-oxidant status of cucurbitacin I. The results help to understand the impact of cucurbitacins on signal transduction and actin dynamics and open novel perspectives to use it as drug candidates for cancer research.

© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

Abbreviations: Cul or E, cucurbitacin I or E; Cul_g or E_g, glycosylated cucurbitacin I or E; JAK2, Janus kinase 2; STAT3, signal transducer and activator of transcription 3; ROS, reactive oxygen species; LIMK, LIM kinase; ROCK, rho-associated protein kinase; MyoII, myosin IIA; p-MLC, phospho-myosin light chain; MYPT1, myosin phosphatases target subunit 1; mDia1, diaphanous-related formin-1; Arp2/3, actin related proteins 2/3; p21-Arc, subunit of the actin nucleator multiprotein complex Arp2/3; NAC, N-acetyl-L-cysteine; βME, β-mercaptoethanol; Vit C, vitamin C; Vit E, vitamin E; L-NAME, Nω-nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride; DPI, diphenyleneiodonium chloride; H2DCF-DA, 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate; PBN, α-phenyl-N-tertbutyl nitron; BMS3, [N-(5-(1-(2,6-dichlorophenyl)-3-(difluoromethyl)-1H-pyrazol-5-yl)thiazol-2-yl)cyclopropanecarboxamide]; MTT, bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium; SMIFH2, 1-(3-bromophenyl)-5-(2-furanylmethylene)dihydro-2-thioxo-4,6(1H,5H)-pyrimidinedione.

* Corresponding author.

E-mail address: pcurmi@univ-evry.fr (P.A. Curmi).

¹ Present address: INSERM, UMR861, I-Stem, AFM, Université d'Evry-Val d'Essonne, Evry 91030, France.

1. Introduction

Cucurbitacins are triterpenoid sterols isolated from a variety of plant families, particularly Cucurbitaceae [1]. They have been studied since the 1960s because they are cytotoxic and for their putative interest as drug candidates to fight cancer [1,2]. Twelve categories of cucurbitacins have been described with respect to their chemical structures. All possess a tetracyclic cucurbitane skeleton with different degrees of oxygen substitution on the cucurbitane nucleus [1]. In addition to this variability, cucurbitacins can be extracted from plants either in glycosylated or non-glycosylated forms [1,3–5].

At the cell and molecular levels, cucurbitacins provoke major alterations of the cell morphology associated with the formation of massive actin aggregates in the cytosol [6–11] which are accompanied by an inhibition of cell motility and cytokinesis [7,10]. Interestingly, the actin cytoskeleton appears to be targeted very early after cucurbitacin addition with a consecutive blebbing, cell shrinkage and eventually blockade of cytokinesis. However, the actual molecular mechanism(s) of action of cucurbitacins that underlie this aggregation of actin still remains controversial. Various hypotheses have been proposed as to why this happens. For example, it has been reported that cucurbitacins inhibit the phosphorylation of JAK2 and STAT3 which can also lead to apoptosis. However this inhibition may not be direct but secondary to actin aggregation or of other events such as the activation of the NF- κ B pathway [12]. Indeed the actin cytoskeleton dysfunctions follow within minutes the addition of cucurbitacins to cells, but neither cucurbitacin I, B nor E can inhibit JAK or STAT3 phosphorylation early after their addition to cell and at low nanomolar concentration, *i.e.* in a concentration range where cucurbitacins trigger the aggregation of actin and can be cytotoxic [13–17] (see Table 1 for a synthetic view of previous works on that matter). Other works also suggests that cucurbitacins can trigger an oxidative stress which may contribute to their cellular effects [18–20]. More recently, using affinity pull down experiments based on the use of a biotin-modified cucurbitacin E, Nakashima et al. pointed out cofilin-1 as a partner of this cucurbitacin and showed that, at a concentration compatible with their cytotoxic effect, cucurbitacin E and I inhibit cofilin's phosphorylation with a resulting increased actin severing activity [21]. In contradiction with this, Gabrielsen et al. proposed that cucurbitacin E makes a covalent bond with the cysteine residues of cofilin-1 which could inhibit its filamentous actin severing activity [22]. In line with Gabrielsen, other authors also suggest that cucurbitacins act through broad protein thiol modifications that could modulate the function of various protein targets [23].

In the present work, we focused our research on the understanding of the molecular mechanism of action of cucurbitacins that contribute to actin aggregation. We first studied, using a combination of approaches, whether cucurbitacin I actually triggers a sustained oxidative stress or behaves as a pro-oxidant molecule. We also examined if the disruption of the actin network by cucurbitacin I is counteracted by different antioxidants or linked to an oxidative modification of the sulfhydryl groups of specific cysteine residues from actin. We then investigated the role of cucurbitacin I and E on the LIM-Kinase/cofilin or on the Rho/ROCK phosphorylation pathways. Finally we compared the activities of glycosylated cucurbitacin I and E extracted from *Citrillus colocynthis* to their aglycone counterparts on HeLa cell proliferation and their distribution throughout the cell cycle.

The results show that the action of cucurbitacin I on the actin cytoskeleton is most probably independent of a putative direct or indirect pro-oxidant activity of this molecule. We also found that cucurbitacin I modulates the LIMK/cofilin-1 and Rho/ROCK/myosin II cascades and that this is probably at the origin of its ability to

promote actin aggregation. Moreover, we discovered that cucurbitacin I not only induces aggregation of actin but rather leads to the formation of actin/phospho-myosin II co-aggregates. Finally, we demonstrated that the impact of cucurbitacin I and E on the morphology of cells, on the actin cytoskeleton and the Rho/ROCK and JAK2/STAT3 pathways are seriously diminished when these cucurbitacins are glycosylated.

Together the results reveal novel molecular mechanisms that force us to reconsider the current view on how cucurbitacins trigger the aggregation of actin (actually actin/phospho-myosin II co-aggregates). In addition, by providing a rational view on the molecular mechanisms of this global phenomenon, the results also renew the interest for cucurbitacins for research and future drug discovery purposes.

2. Materials and methods

2.1. Reagents and antibodies

Cucurbitacin I and E (Cul and CuE), *N*-acetyl-L-cysteine (NAC), reduced L-glutathione (GSH), β -mercaptoethanol (β ME), vitamin C (Vit C), vitamin E (Vit E), Quercetin, $N\omega$ -nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride (L-NAME), diphenyleneiodonium chloride (DPI), 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H2DCF-DA), α -phenyl-N-tertbutylnitrone (PBN), Blebbistatin (myosin II ATPase inhibitor), Y27632 (ROCK inhibitor) and SMIFH2 (formin FH2 domain inhibitor) were from Sigma–Aldrich (USA). BMS3 [N-(5-(1-(2,6-dichlorophenyl)-3-(difluoromethyl)-1H-pyrazol-5-yl)thiazol-2-yl) cyclopropanecarboxamide] (LIMKinase inhibitor) [24] was from SYNKinase (China). Human cofilin-1 was from Cytoskeleton inc (Denver, CO, USA). LIM Kinase 1 (LIMK 1), active, was purchased from Merck Millipore (UK). Antibodies against α -actinin, p21-Arc, mDia1, pCofilin-1S3, pJAK2Y1007/Y1008, STAT3, JAK2 and GAPDH were purchased from Santa Cruz Biotechnologies (USA) and that against Myosin IIA, p-MLCS19 and pSTAT3Y705 were from Cell Signaling Technology (USA).

2.2. Conjugation of Cul with NAC and β ME

Cul (0.5 mM) was incubated with NAC (500 mM) or β ME (500 mM) in DMSO-d6 for different period of time up to 72 h at 20 °C and protected from light. Post-incubation, the samples were analyzed by NMR spectroscopy. NMR spectra were recorded at 20 °C on a Bruker Avance 600 MHz NMR spectrometer equipped with a cryoprobe. ^1H and ^{13}C resonance assignments were performed using 2D COSY, HSQC and HMBC experiments. 2,2-Dimethyl-2-silapentane-5-sulfonic acid was added as an external reference in D₂O for proton chemical shifts. Data were processed and analyzed using the Topspin 3.1 software (Bruker).

2.3. Probing a putative conjugation of Cul with cofilin-1

Attempts to conjugate Cul to cofilin-1 was realized by incubating cofilin-1 with Cul at varying concentration (from 100 μM to 500 μM) solubilized in 100% DMSO in non-reducing condition at 4 °C for different period of time up to 72 h. An equivalent volume of DMSO served as a negative control. Cul binding to cofilin-1 was analyzed by ^1H NMR as described in experimental procedures.

2.4. Hydroxyl free-radical assay

The Fenton reaction, a well-known and defined generator of $^{\bullet}\text{OH}$, was utilized to examine whether Cul may scavenge $^{\bullet}\text{OH}$. Hydroxyl radical detection was based on the specific reaction between $^{\bullet}\text{OH}$ and PBN, which forms a stable PBN-OH adduct detectable by electronic

Table 1

The inhibition of the JAK2/STAT3 phosphorylation is probably not an early event that participates to actin aggregation upon cucurbitacin administration to cells.

Class	Concentration	Duration of exposure	Effect on pJAK2 and cell type	Effect on pSTAT3 and cell type	Ref.
CuB	30 μ M	4, 8, 24h	nd	No effect BEL-7402 HCC cells	[1]
	50 nM	4h & Overnight	Inhibition Panc-1 cells	Inhibition Panc-1 cells	[2]
	0.1, 1, 10 μ M	24h	nd	Inhibition for 1 μ M HepG2 cells	[3]
	100, 350 nM	8, 24, 48h	nd	Inhibition Depends on dose and time of exposure H1299 cells	[4]
	50, 100, 200 nM	24h	nd	No effect A549 cells	[5]
	30, 300 nM, 3 μ M	2, 4, 8, 24 h (1 μ M)	nd	Inhibition From 8h at 1 μ M/ or 24h at 300 nM PANC-1 cells	[6]
	40 nM	24h	nd	No effect SW480 cells	[7]
DHCuB CuI	290 nM		nd	No effect HCT116 and HKe-3 cells	[8]
CuE	200 nM	24h	nd	Inhibition MDA-MB-468 cells	[9]
	10, 100 nM 1, 10 μ M	24h	nd	Inhibition From 100 nM ES-2 cells	[10]
	10, 100 μ M	24h	nd	Inhibition At 100 μ M U937 cells	[11]
CuE & B glycoside	20 μ M	4h and 24h	nd	Stimulation of STAT3 phosphorylation MCF7 & MDA-MB-231 cells	[12]
Culla	50 μ g/mL	16h	No effect 22Rv-1, H1299 cells	No effect 22Rv-1, H1299 cells	[13]
CuI, CuE, CuB	10 μ M	4h	Inhibition A549 Cells	Inhibition A549 cells	[14]
CuI	10 μ M	4h	Inhibition NIH 3T3 cells, A549, MDA-MB-468,	Inhibition NIH 3T3, A549, MDA-MB-231, MDA-MB-468, Panc-1 cells	[15]
	5 μ M	Min 4h	nd	Inhibition SU-DHL-1 & Karpas 299 cells	[16]
	25, 50, 100, 200 nM	48 h	Inhibition min 100 nM GBM cells	Inhibition from 100 nM GBM cells	[17]
CuI	25, 50, 100, 200 nM	24 h	nd	Inhibition From 100 nM, & min 6h	[18]
	100 nM to 10 μ M		Inhibition at 1 μ M after 8h in resting U251-MG cells and at 500 nM after 2h in OSM stimulated U251-MG cells	Inhibition at 1 μ M after 4h in resting U251-MG cells and between 100 and 500 nM after 2h in OSM stimulated U251-MG cells	[19]

The impact of various cucurbitacins has been investigated by many authors and in various cellular systems. An inhibition of the phosphorylation of both JAK2 and STAT3 was observed but never within the minutes of cucurbitacin's administration and at low nanomolar concentrations. In many cases no impact was reported and for one study, an activation of the phosphorylation of STAT3 was observed [12].

paramagnetic resonance (EPR) detectable PBN–OH adduct. The reaction mixture was prepared at room temperature in a controlled atmosphere chamber by mixing 3 mM of the spin trap *N*-tertbutyl- α -phenylnitron (PBN, Sigma–Aldrich, USA) dissolved in DMSO, 200 μ M FeCl₂ and 100 μ M hydrogen peroxide in the absence or presence of CuI. The reaction mixture was immediately transferred to capillary tubes (KIMEX, 0.08 \times 0.1 mm) to be measured by EPR. The EPR measurements were carried out at room temperature at X-band with a frequency of 9.73 GHz on a Bruker Biospin's e-scan spectrometer, operating at 86 kHz field modulation.

2.5. Cucurbitacin extraction and isolation procedures from *C. colocynthis*; elucidation of the atomic structures

Cucurbitacins were extracted from *C. colocynthis* seeds by 1 h maceration in water (1 g/2.5 mL) at 60 °C under agitation. The extract was then purified by reversed-phase HPLC on a 5 μ m, 250 \times 4.6 mm diameter C18 column. After loading, the fraction were eluted with a 15–75% methanol/water gradient at 1.0 mL/min flow rate and molecules detected at 238 nm. Major fractions obtained were further fractionated on the same column but using a linear 20–60% acetonitrile/water gradient. The structure of the purified compounds was determined by solution NMR spectroscopy. The total content of cucurbitacin in the aqueous extract and in the purified fractions was quantified by NMR spectroscopy using commercial cucurbitacin I as a standard.

2.6. Plasmid constructs and mutagenesis

To generate the plasmid coding for green fluorescent protein (GFP)-tagged β -actin wild type, the β -actin cDNA was amplified by PCR using the 5'CGCAAGCTTATGGATGATGATATCGCCGCG3' 5' primer and the 5' CGCGGATCCTTAGAAGCATTTCGCGTGAGAC3' 3' primer. The PCR product was then digested with BamHI and HindIII, and subcloned into the BamHI and HindIII sites of the pEGFP-C3 vector (Clontech, USA). The C374A mutation where Cys374 was substituted to Ala was generated by site-directed mutagenesis using PCR.

The C272A and C257A mutants were produced according to the Stratagene QuikChange procedure using the following oligonucleotides purchased from Sigma–Aldrich: 5' primers were: 5'GGCATGGAGTCCGCTGGCATCCACGAAAC3' and 5'GAGCGTTCCGCGCCCTGAGGCACTC3' respectively, and the 3' primers were 5'GTTTCGTGGATGCCAGCGGACTCCATGCC3' and 5'CTCGCAAGGCGGGGTCTCCGTGAG3' respectively. All mutations were verified by sequencing.

2.7. Cell cultures and related procedures

2.7.1. Cell lines and transfection

Human epithelial HeLa cells (ATCC[®] Manassas, VA, USA) were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Life Technologies, UK) supplemented with 5% (v/v) fetal calf serum (FCS, Life Technologies, USA), 2 mM L-glutamine (Life Technologies, USA), and 1% antibiotics (penicillin and streptomycin, Life Technologies, USA) in a 5% CO₂ humidified atmosphere at 37 °C. Transfections of HeLa cells were performed with Lipofectamine[®] 2000 (Invitrogen, USA) according to the manufacturer's protocols.

2.7.2. Measurement of intracellular reactive oxygen species (ROS) production

To determine intracellular ROS production in living HeLa cells, the cells were trypsinized, washed with PBS and resuspended in DMEM without serum and phenol. HeLa cells were treated either

with DMSO (0.01%, negative control), H₂O₂ (1 mM, positive control) for 5 min, or CuI (100 nM) for different time (1, 5, 10, 30 and 60 min), H₂DCFDA was then added at a final concentration of 5 μ M and the cells were incubated in the dark for 30 min. H₂DCFDA is a water-soluble compound which can freely cross the cell membrane. After the removal of acetate groups by intracellular esterases, H₂DCFDA can become fluorescent if oxidized by cellular ROS. The fluorescence of at least 3 \times 10³ cells per sample was analyzed using flow cytometry (FACS Calibur BD). For each data point the measures were performed in triplicate.

2.7.3. Cell proliferation assay

HeLa cells were seeded at 1.5 \times 10⁵ mL⁻¹ per well in 24-well plates. The next day, cells were rinsed and fresh medium was added with DMSO or the indicated compounds for 24 h or 48 h. Cell viability was quantified by the MTT assay kit (Sigma–Aldrich, USA) [25].

2.7.4. Cell cycle analysis

HeLa cells (3 \times 10⁵ mL⁻¹) were incubated with 100 nM cucurbitacin E or I either glycosylated (CuE_g, CuI_g) or not (CuE, CuI) for 24 h or 48 h. The cells were then washed with PBS (pH 7.4) and fixed overnight with 70% ice-cold ethanol at 4 °C. After fixation, the cells were stained with 50 μ g/mL propidium iodide (Sigma–Aldrich, USA) in the presence of 60 μ g/mL RNase A (Sigma–Aldrich, USA) for 30 min at room temperature. The cells were then analyzed by flow cytometry (FACS Calibur BD, USA).

2.7.5. Fluorescence microscopy

HeLa cells were washed with PBS and fixed with 4% paraformaldehyde (Alfa Aesar, Germany). Cells were permeabilized with 0.5% Triton X-100 and then washed and incubated overnight in blocking solution (50 mM Tris–HCl, 150 mM NaCl, 0.1% Triton X-100, 2% bovine serum albumin, pH 7.5), containing primary antibodies. Cells were washed and incubated with secondary antibodies Alexa Fluor 488 (Invitrogen, USA) and rhodamine-labeled phalloidin (Invitrogen, USA). Cells were counterstained with 4 μ g/mL 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Sigma–Aldrich, USA) and samples were mounted for fluorescence microscopy examination.

2.8. Kinase assays and activities

Kinase reactions were carried out in 15 μ L of kinase buffer containing 1X reaction Buffer (8 mM MOPS–NaOH pH 7.0, 200 μ M EDTA), 2 ng/ μ L LIM Kinase 1 active, 1 mM ATP with 0.167 mg/mL cofilin1 for 30 min at 30 °C. Reactions were stopped by the addition of SDS–PAGE sample buffer, boiled and then loaded on a Phos–Tag[™] (AAL 107 Wako Chemicals, Germany) Polyacrylamide gel for electrophoresis as described [26].

2.8.1. Rho kinase (ROCK) activity

ROCK activity was measured by phosphorylation of the endogenous ROCK substrate MYPT1 in total cell extracts detected using a rabbit anti-pMYPT1^{Thr850} antibody (Cell Signaling Technology, USA) as described [27].

2.8.2. Rho-GTP pull-down assays

Cells growing at low confluence were serum-starved for 48 h and then treated with CuI. RhoA-GTP levels were determined with a pull-down assay using the rhotekin binding domain and detected by Western blotting with an anti-RhoA antibody (Cell Signaling Technology, USA) [28].

2.9. Western blotting

Cells were harvested in Triton X-100 lysis buffer containing a protease inhibitor cocktail (Roche, Germany). Lysates were then analyzed by western blot.

2.10. Statistical analysis

All data are reported as the mean of at least three separate experiments. Group comparisons between control and the different drug treatment were done by a one-way ANOVA using the OriginLab8 software. Significance was considered when a **p* value of <0.05 was reached.

2.11. Docking procedure

The simulations were based on the atomic structure of the LIMK1-Staurosporine complex. Staurosporine is a known ATP-competitive inhibitor (Karaman et al.) and it has been recently co-crystallized with LIMK1 (PDB code 3S95). OpenBabel [29] and the suite of Autodock [30] have been used to set up the systems and to carry out the molecular docking. Staurosporine, BMS3, CuI, and CuI_g were obtained from PubChem with the PubChem CID of 44259, 644328, 5281321, and 44201985, respectively.

3. Results

3.1. The cucurbitacin-dependent aggregation of actin seems desynchronized of a pro-oxidant activity of CuI or independent to the oxidation of specific cysteine residues of actin

A series of data from the literature suggest that the aggregation of actin by cucurbitacins may result from the triggering of an oxidative stress. This comes from the fact that *N*-acetyl-L-cysteine (NAC), a precursor of the glutathione biosynthesis, can prevent cucurbitacin-dependent aggregation of actin [23,29,30]. Others propose that specific oxidation of cysteine residues from actin after cucurbitacin addition are responsible for the formation of disulfide bonds between actin molecules or for the formation of actin-cucurbitacin complexes. Finally, different studies suggest that actin can be a direct target for oxidative modifications that may occur during a cucurbitacin-induced oxidative stress *in vivo* [31,32].

To get a better view on the relationships between cucurbitacins and the oxido-reduction processes, we first studied the effects of cucurbitacin I (CuI) on the intracellular level of reactive oxygen species (ROS) in HeLa cells based on the quantification of the fluorescence intensity of oxidized H2DCFDA. The results showed that CuI does not trigger an early and sustained oxidative stress in HeLa cells. We actually observed a slight ROS burst at 5 min followed by a rapid decrease of H2DCFDA fluorescence (Fig. 1A, left). In parallel to this observation, we noted a significant blebbing within the first 2–3 min of CuI application to cells and a clear actin aggregation at the plasma membrane as visualized by phase and fluorescence microscopy on time-lapse sequences (Fig. 2). It is worthy to note that while the burst of ROS faded, the process of actin aggregation continued (Fig. 1A and B). This suggests that the aggregation process is independent of an actual oxidative stress and that it should stem on the modification of actin or of its partners. We further showed that CuI is able to scavenge hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$) generated by a Fenton type system. This is shown in Fig. 1A (middle and right) where CuI inhibits in a concentration-dependent manner the signal intensity of the electron paramagnetic resonance (EPR) spectrum

of the PBN-OH adduct generated by the Fenton reaction. This result indicates that CuI rather behaves as an anti-oxidant than as a pro-oxidant molecule.

However, we confirmed that thiol anti-oxidants such as NAC or GSH at high concentration (at 10 mM, *i.e.* one hundred or one thousand times the concentration threshold for CuI activity), significantly prevents CuI-induced actin aggregation in HeLa cells (Fig. 1B). To understand this contradiction, we explored the impact of other types of anti-oxidants. Surprisingly, we found that anti-oxidants without thiol function like vit C, vit E, DPI, L-NAME or quercetin, failed to inhibit the CuI-dependent actin aggregation (Fig. 1C).

Previous studies suggested that cucurbitacins bind thiol groups via its α - β -unsaturated ketone moiety [23]. Such thiol conjugation may explain the specific protection conferred by thiol anti-oxidants against the effects of cucurbitacin. We then attempted to quantify such reaction by nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy. To that end, CuI was thus incubated either with NAC or with β ME, and the NMR spectra of the resulting reactions were recorded after different incubation periods. We observed that, in the presence of NAC or β ME, the intensity of the peaks corresponding to the unsaturated H-23 and H-24 protons of CuI (H-23 and H-24 at 6.91 and 7.00 ppm respectively), decreased with time to disappear almost completely after 3 days (Fig. 3A). This observation proves that a modification at the α - β -unsaturated ketone moiety of CuI occurred, and this agrees with a thiol-ene addition reaction. It is worthy to note that with such a reaction, the protons H-23 and H-24 from CuI should shift towards 2.80 ppm. Unfortunately, we could not observe the appearance of the expected peaks around 2.80 ppm due to the superimposition of resonances of the CuI protons with that of NAC or of β ME. Nevertheless, we observed modifications of chemical shifts of protons and carbons around the positions 23 and 24 that are in total agreement with a thiol-ene addition reaction (Table 2).

We then sought to determine whether the CuI-dependent aggregation of actin results from a selective oxidation of either the surface cysteine's of actin that could lead to the formation of large actin multimers/aggregates or to a cysteine proposed to participate to a actin-CuE complex [33]. In order to investigate in cells these two hypotheses, we prepared a series of human GFP-tagged β -actin mutants where the C272 and C374 surface cysteine of actin or the Cys257 residue proposed to interact with CuE were substituted to alanine. In the absence of CuI, all the GFP-tagged β -actin constructs (WT and mutants) participate to the formation of well-organized microfilament structures, including stress fibers (Fig. 3B, controls). For the C374A mutant, the results were in agreement with previous data obtained with a flag-actin-C374A mutant expressed in two other different mammalian cell lines [34]. In addition, in all cases, in the absence of CuI, we found that the overall cell morphology was very similar to that of non-transfected cells. On the other hand, in the presence of CuI, we observed that none of the Cys to Ala mutations prevented actin aggregation (Fig. 3B). Indeed numerous actin puncta appeared whatever the transfected actin form and this occurred at relatively low concentration of cucurbitacin I (10 nM). The results suggest that CuI-dependent actin aggregation does not need the formation of di-sulfide bridges or of other thiol oxides involving these cysteine residues.

Altogether the results show that the effects of thiol anti-oxidant to prevent the CuI-dependent actin aggregation is most likely due to the formation of a direct link between CuI and these compounds and not to a regular reactive oxygen species (ROS) neutralization.

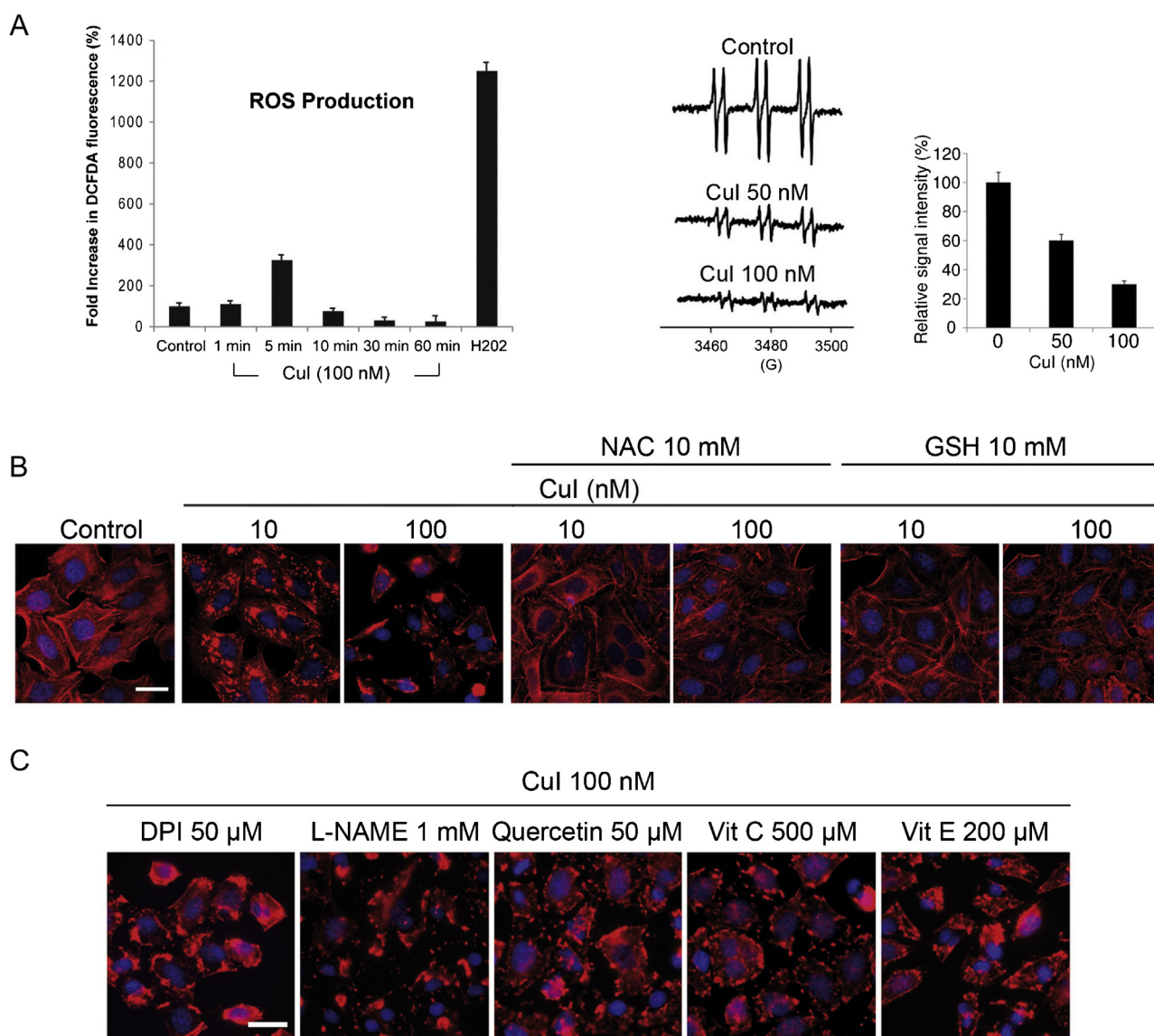


Fig. 1. A: CuI does not trigger an early and significant oxidative stress in HeLa cells. *In vitro*, CuI behaves as a slight anti-oxidant. Left: quantitative analysis of ROS production by flow cytometry. Reactive oxygen species were quantified by monitoring the fluorescent probe DCFH-DA at different times after the addition of CuI to HeLa cells. The cells were treated for 5 min with DMSO 0.01% (negative control), 1 mM H₂O₂ (positive control), or with CuI (100 nM) for 1, 5, 10, 30 and 60 min and then incubated with carboxy-H₂DCFDA. Fluorescence is expressed in percentage versus DMSO-treated HeLa cells. Reported values (means SD) are representative of 3 independent experiments, each performed in triplicate. Middle and right: CuI scavenges the hydroxyl radical ([•]OH) *in vitro*. Middle: effect of CuI on the formation of the PBN-OH adduct. The reaction mixture contained 100 μM H₂O₂ and 3 mM PBN in the presence of 200 μM FeCl₂, and the indicated concentrations of CuI. The EPR spectra were recorded in digital form and an average of three scans was used as a working spectrum. Right: the relative signal intensity percentage was calculated as the number of paramagnetic species contained in each sample obtained by the double integration of the EPR signals using the WINEPR program. B: cells pre-treated (for 1 h) with NAC (10 mM) or GSH (10 mM) and then co-incubated with cucurbitacin I (CuI, 10 or 100 nM) for 2 h. C: cells pre-treated (for 1 h) with either DPI (50 μM), L-NAME (1 mM), quercetin (50 μM), Vit C (500 μM), or Vit E (200 μM) and then co-incubated with 100 nM CuI for 2 h. The cells were labeled with rhodamine-phalloidin to visualize actin (red) and DAPI for DNA (blue). Scale bars: 20 μm.

3.2. Cucurbitacins I and E inhibit the phosphorylation of JAK2 and STAT3 in HeLa cells but only in the micromolar range and not within the minute of their application to cells

The JAK/STAT signal transduction pathway plays a prominent role in the control of cell proliferation, differentiation or death, and dysfunctions of this pathway have been implicated in the process of metastasis for many human cancers [35,36]. Many data from the literature show that the phosphorylation of JAK2 and of STAT3 appeared negatively regulated by cucurbitacins and in some cases from nanomolar concentration. These reports also indicate that the inhibition varied depending on the class of

cucurbitacin considered (see Table 1). We here examined the effect of CuI, and of CuE on JAK2 and STAT3 phosphorylation in HeLa cells. After 4 h exposure to the compounds, the proteins from cell lysates were subjected to western blotting and probed with the pY1007/Y1008-JAK2 and anti-pY705-STAT3 antibodies. The results showed a significant decrease of JAK2 and STAT3 phosphorylation when CuE, and CuI were given in the micromolar range (Fig. 4A) but no inhibition was observed when CuI or CuE were applied at nanomolar concentration (10 or 100 nM) for 2 or 4 h and no effect was observed at early times (Fig. 4B) while the impact of cucurbitacin on blebbing and actin aggregation is obvious within the minute of CuI application in the nanomolar range (see Fig. 2). In

addition, both CuI and CuE did not modify the total STAT3 and JAK2 expression levels (Fig. 4A and B). The results agree with most of the data from the literature and suggest that the inhibition of the JAK2/STAT3 pathway is not upstream in the cascades that lead to cucurbitacin-dependent actin aggregation.

3.3. Cucurbitacin I inhibits the phosphorylation of cofilin-1 by a direct interaction with LIMK *in vitro*. However the inhibition of LIMK in HeLa cells does not prevent the CuI-dependent actin aggregation

A few years ago, Nakashima et al. proposed cofilin as a cucurbitacin E-interacting protein [21]. Interestingly, cofilin is a substrate of the LIM kinase (LIMK), a kinase that regulates the dynamics of the actin cytoskeleton through the phosphorylation of cofilin. Cofilin's phosphorylation by LIMK inactivates its actin-severing activity [37–41]. We thus examined whether CuI may influence cofilin-1 phosphorylation in HeLa cells and found that indeed, it does inhibit cofilin phosphorylation in a dose-dependent manner (Fig. 4C). Next, we evaluated the possibility that cucurbitacin could directly inhibit the ability of LIMK to phosphorylate cofilin-1 *in vitro*. The results show that while LIMK1 efficiently phosphorylates cofilin-1 *in vitro*, CuI inhibits remarkably this activity (as the known BMS3 LIMK1/2 inhibitor) (Fig. 4D). To understand the mechanism of this inhibition, we searched for a putative non-specific binding between CuI and cofilin by the formation of a thioether bond as the reported for cucurbitacins D, E or I [22]. We probed such possibility *in vitro* again using solution ^1H NMR spectroscopy in a non-reducing environment. The results showed that CuI does not bind to cofilin-1 even at very low CuI:cofilin-1 molar ratio (1:100) (Fig. 5A). In addition, we showed that the subcellular localization of cofilin-1 did not change in the presence of 10 nM CuI for 2 h (Fig. 5B).

The data indicate that CuI is a direct LIMK1 inhibitor. As BMS3 is known as such, we tested whether BMS3 may reproduce, in living cells, the cucurbitacin-dependent actin aggregation. When applied alone to HeLa cells, BMS3 had no obvious effect on the cell morphology or on the architecture of the actin cytoskeleton. However, surprisingly, when combined to 10 nM CuI for 2 h, we observed a clear decrease of the size of the actin puncta compared to what was observed in cells treated with CuI only (Fig. 4E). These results strongly suggest that either CuI or BMS3 have other targets than LIMK which have to be investigated to tackle the contradiction between the fact that CuI and BMS3 have an opposite action on actin aggregation in living cells while they both inhibit the LIMK activity *in vitro*.

3.4. Cucurbitacin I docks in the nucleotide pocket of LIMK1

In order to document the mechanism by which CuI and BMS3 both inhibit LIMK1, we modeled the interaction between LIMK1 and BMS3, and that between LIMK1 and CuI by molecular docking using the Autodock program which docks the small molecules on LIMK1 considered as a rigid body.

To that end, we used the recent structure of the LIMK1-staurosporin complex (PDB 3S95). Remarkably, staurosporine fills the LIMK1's ATP pocket and appears with a plate-like shape. Its binding to LIMK1 involves two hydrogen bonds between the five-membered ring N—H and O atoms on the staurosporine side and the O and N—H backbone atoms from G414 and I416 on the LIMK1 side located in the hinge region of LIMK1 (Fig. 6A).

Fig. 6B displays the best-docked position of BMS3, which also occupies the ATP binding pocket of LIMK1. According to this model, the spatial organization of BMS3 shows hydrophobic interactions combined with fluoride bonds between the CF_2 group of BMS3 and backbone atoms of the LIMK1 hinge region [42].

CuI also docks in the ATP pocket of LIMK1 (Fig. 6C) and, interestingly, one of the key hydrogen bond involved in the interaction between staurosporine and LIMK1 is preserved for all staurosporine, BMS3 and CuI (bond with I416 in the hinge region). Molecular docking thus shows that the hydrogen bond (I416) is among the key interactions between these three molecules and the hinge region of LIMK1. In addition, the occupation of the ATP pocket close to the hinge region by these small molecules strongly suggests that CuI and cucurbitacins in general may behave as competitive inhibitors of ATP binding to the LIMK nucleotide pocket.

3.5. Nanomolar concentration of cucurbitacin I provokes the co-aggregation of phospho-myosin II with actin in HeLa cells

To go further into the investigation of the effects of cucurbitacin on the LIMK pathway, we examined the impact of CuI on the distribution of non-muscle myosin II. Indeed, Wiggan and coworkers recently reported that LIMK, through cofilin phosphorylation, can regulate the interaction of non-muscle myosin II with F-actin [43]. The mechanism being that phosphorylated cofilin could block the myosin II binding to F-actin through a direct competition. Thus the phospho-inactivation of cofilin can promote an increased actomyosin contractility and intracellular tension. In the absence of CuI, the distribution of non-muscle myosin IIA (myoIIA), in HeLa cells appears as puncta distributed throughout the cytoplasm with a slight reinforcement along stress fibers and at the cell cortex (Fig. 7A). Surprisingly, upon the addition of CuI at

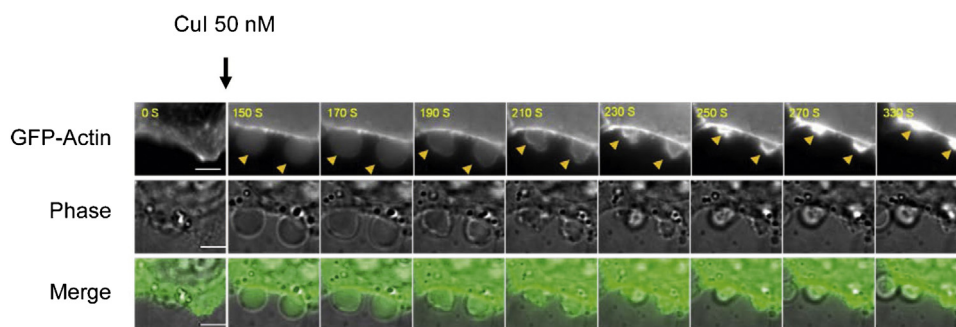
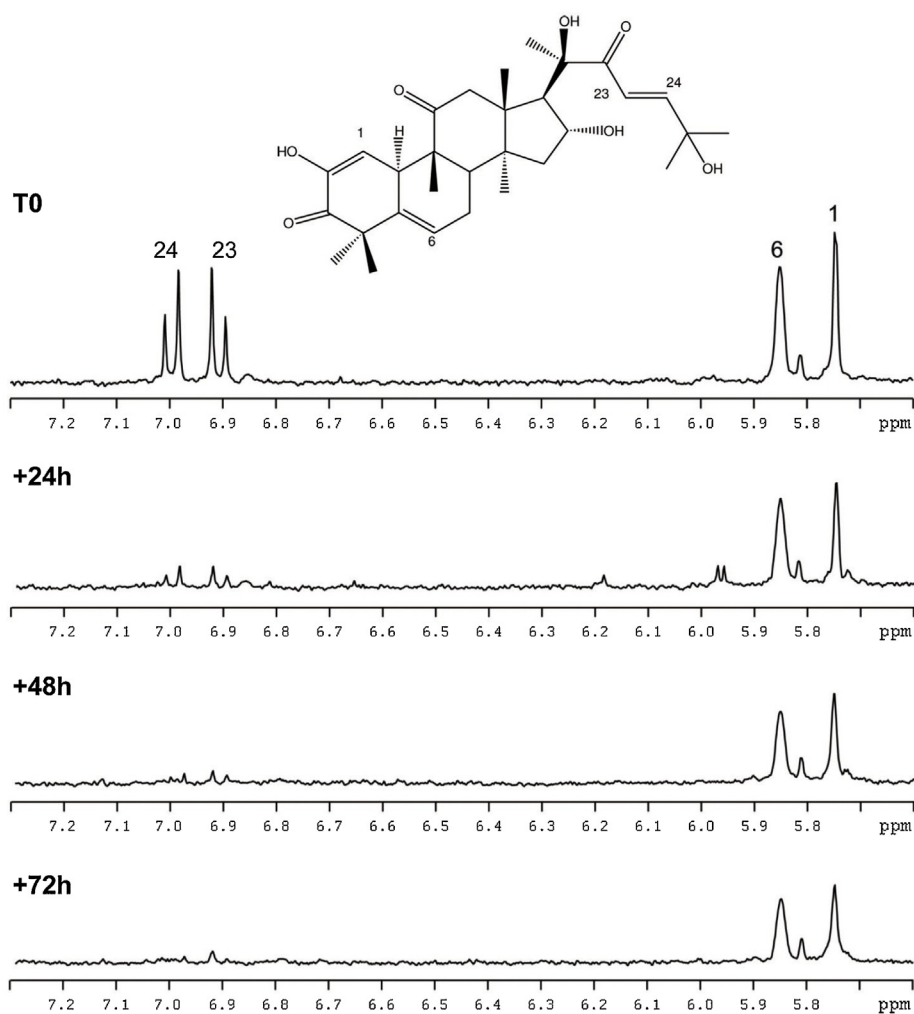


Fig. 2. CuI induces an early blebbing associated with actin aggregation close to the cell membrane. HeLa were grown as described in the experimental section and transfected with the GFP-actin-WT plasmid. 12 h after transfection the cells were examined under a fluorescence video microscope. The results show the triggering by CuI of an early and intense blebbing as visualized on fluorescence and phase microscopy images (arrows on the upper image) and accompanied by the parallel formation of actin aggregates close to the plasma membrane.

A



B

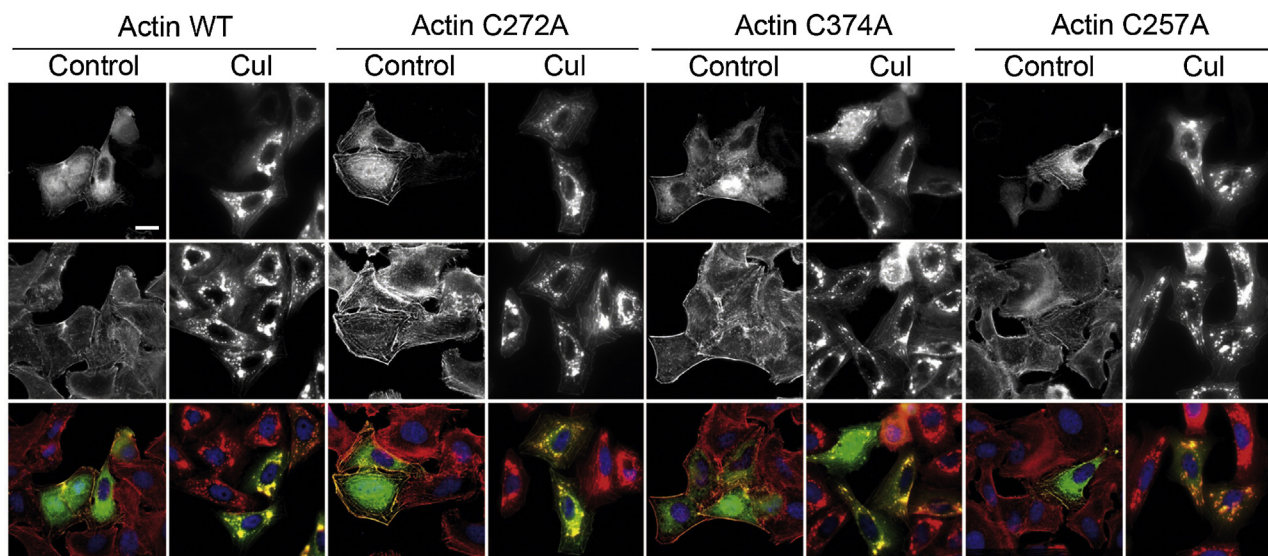


Fig. 3. A: Cul reacts with thiol-rich anti-oxidant. 1D ^1H spectra of 500 μM Cul in presence of 500 mM βME (upper panel) at $t=0$, $t=24$ h, $t=48$ h and after 72 h lower panel. The structure of Cul is represented above the NMR spectra with labels which correspond to Cul carbon numbering. B: the cucurbitacin-dependent aggregation of actin is most probably not related to the oxidation of specific cysteine residues of actin. The mutation to of surface cysteine (C272 and C374) or of C257 of β -actin does not prevent the formation of actin aggregates in HeLa cells when treated by Cul. Cells were transfected either with wild type EGFP β -actin (actin WT) or with the EGFP β -actin C257A, C272A or C374A mutants, then treated with 10 nM Cul for 2 h, and finally fixed and stained with rhodamine-phalloidin. Upper row: GFP; middle row: rhodamine-phalloidin actin; lower row: merge image (green, GFP; red, actin). Scale bar 20 μm .

Table 2

Experimental (exp) and predicted (pred) chemical shifts^a of protons and carbons of Cul before and after thiol-ene addition reaction with β ME.

	Cul exp		Cul- β ME exp		Cul pred		Cul- β ME pred	
	¹ H	¹³ C	¹ H	¹³ C	¹ H	¹³ C	¹ H	¹³ C
22	–	206	–	211	–	201	–	211
23	6.91	121	nd ^b	nd	6.34	126	2.78	30
24	7.00	156	nd	54	7.01	147	2.82	54
25	–	72	–	74	–	71	–	75
26/27	1.37	31	1.37	28	1.36	30	1.26	27

^a ¹H and ¹³C chemical shifts measured in ppm with an accuracy of ± 0.01 and ± 1 ppm, respectively.

^b Not determined due to superposition with β ME resonances.

nanomolar concentrations, we observed the formation of myosin IIA aggregates, which obviously co-localize with the actin aggregates. Interestingly, the formation of myosin IIA-actin co-aggregates under the addition of Cul is not associated with an increase of the total myosin IIA protein level (Fig. 7B). As myosin II is more prone to interact with actin structures when phosphorylated, we searched for the presence of phospho-myosin light chain in the actin/myosin II co-aggregates. Using a specific antibody directed against the serine residue # 19 of myosin light chain, we observed a clear and significant presence of phospho-myosin light chain in the actin aggregates (Fig. 7C). These results strongly suggest that it is probably mainly the phosphorylated form of myosin that co-aggregates with actin structures.

Moreover, we also determined in HeLa cells the impact of Cul on the distribution of three actin-binding proteins implicated either in the formation of stress fibers (α -actinin), lamellipodia (Arp2/3) or filopodia (mDia1). We found that the subcellular localization of α -actinin (that cross-links filaments into parallel bundles in contractile actomyosine structure) appeared to co-aggregate with actin structures upon addition of Cul. By contrast, p21-Arc (subunit of the actin nucleator multiprotein complex Arp2/3) or of mDia1 did not change with Cul (Fig. 8). These results indicate that Cul perturbs actin stress fibers structures. Next, to further assess the mechanism by which the activity of myosin II contributes to the defects of the actin cytoskeleton following Cul treatment, we simultaneously treated HeLa cells with Cul and blebbistatin. Blebbistatin is known to inhibit the ATPase cycle of type II myosins and to sequester them in a weak F-actin binding state [44,45]. Remarkably when cells were treated with low Cul concentration (10 nM) for 2 h, blebbistatin caused a significant reduction of the actin puncta otherwise formed in its absence (Fig. 9A). A similar observation was made when cells were pretreated with Y27632 a ROCK/Rho-kinase inhibitor (ROCK is known to phosphorylate the regulatory myosin light chain (MLC) [46] (Fig. 9A). Remarkably, the inhibition of myosin II activity by the simultaneous use of blebbistatin and Y27632 led to a dramatic reduction of actin aggregation in HeLa cells treated by Cul even at 100 nM (Fig. 9A). Together the results indicate that the abnormal actin aggregation in the Cul-treated cells is also linked to a modification of the signaling cascades that control myosin II. This agrees totally with the formation of actin/phospho-myosin aggregates by Cul.

Furthermore, in order to determine whether the aggregation of actin involved the participation of specific nucleation machinery (like formins, proposed to induce actin assembly during contractile actomyosine bundles formation [47,48]), we simultaneously treated HeLa cells with Cul and SMIFH2, an inhibitor of formin-mediated actin nucleation and barbed end elongation [49]. As shown in Fig. 9A, SMIFH2 failed to prevent the Cul-dependent actin aggregation.

3.6. Cucurbitacin I stimulates the Rho/ROCK signaling pathway in HeLa cells

The formation of actin/phospho-myosin II co-aggregates by Cul suggests that Cul may favor the activity of ROCK either directly or through the activation of Rho-GTP. Using a rhotekin pull-down assay (rhotekin binds specifically to GTP-bound RhoA, RhoB and RhoC proteins) and a RhoA antibody for western blot detection, we found that Cul at a concentration as low as 10 nM caused a robust and sustained elevation of RhoA-GTP levels in HeLa cells, and that this induction persisted for more than 1 h post Cul addition (Fig. 9C). As BMS3 contributes to reduce the activity of Cul on actin aggregation (Fig. 4E) and because we hypothesized that it may have another target than LIMK1/2, we tested this compound on the RhoA activation by Cul. As suspected, we found that the RhoA activation by Cul is blocked by the pretreatment of HeLa cells with BMS3 (Fig. 9D). We then evaluated the effect of Cul on ROCK activation in HeLa cells by measuring the phosphorylation of the MYPT1 ROCK substrate (MYPT1 is a subunit of myosin phosphatase) using a specific antibody against phospho-Thr850-MYPT1, [Thr850 is a well-established ROCK phosphorylation site [27]. The results show that Cul stimulates, at low nanomolar concentration, a marked MYPT1 phosphorylation (Fig. 9C) which was, here again, prevented by the pretreatment of cells with BMS3 (Fig. 9D). These results demonstrate that Cul and maybe cucurbitacins in general activate Rho proteins and the subsequent Rho-mediated responses.

3.7. The glycosylation of cucurbitacins E and I lowers dramatically their impact on HeLa cells

As cucurbitacins may be extracted from plants as glycosylated, to extent our view on the cellular impacts of these compounds, we successively compared the effects of glycosylated cucurbitacin E or I (CuE_g and Cul_g respectively) to their aglycone counterparts for (i) their ability to aggregate actin, (ii) their impact on the viability of HeLa cells or on the distribution of cells throughout the cell cycle and (iii) on JAK2 and STAT3 phosphorylation in HeLa cells.

The results show that CuE_g or Cul_g at 10 or 100 nM and after 2 or 24 h administration did not change the overall cellular morphology and that normal actin fibers were visible without actin aggregates (Fig. 10A). In addition, these glycosylated cucurbitacins had almost no impact on cell proliferation up to 1 μ M and 48 h (Fig. 10B).

As shown on Fig. 10C, after 24 h, the exposure of cells to CuE or I (100 nM) resulted in a significant increase of the number of cells in the 4N (G2/M) DNA population compared to the no drug control, and this was more marked after 48 h cucurbitacin exposure. On the contrary, at the same concentration and for the same times of exposure, both CuE_g and Cul_g had no obvious influence on the distribution of cells across the cell cycle.

Finally, the results show that CuE_g and Cul_g did not affect the phosphorylation levels of JAK2 or STAT3 (Data not shown).

4. Discussion

Plants afford an exceptional resource for new drug discovery with broad research and pharmacological interests and notably for cancer [50]. Among these, cucurbitacins attract a particular attention for their marked anti-proliferative activity which may make them candidates of interest for anti-cancer therapy. However nowadays, these compounds are not in clinical use due to their too high toxicity which calls for a clear understanding of their mechanism of action if one wants to ameliorate them. At the cellular level, cucurbitacins have been shown to trigger a massive

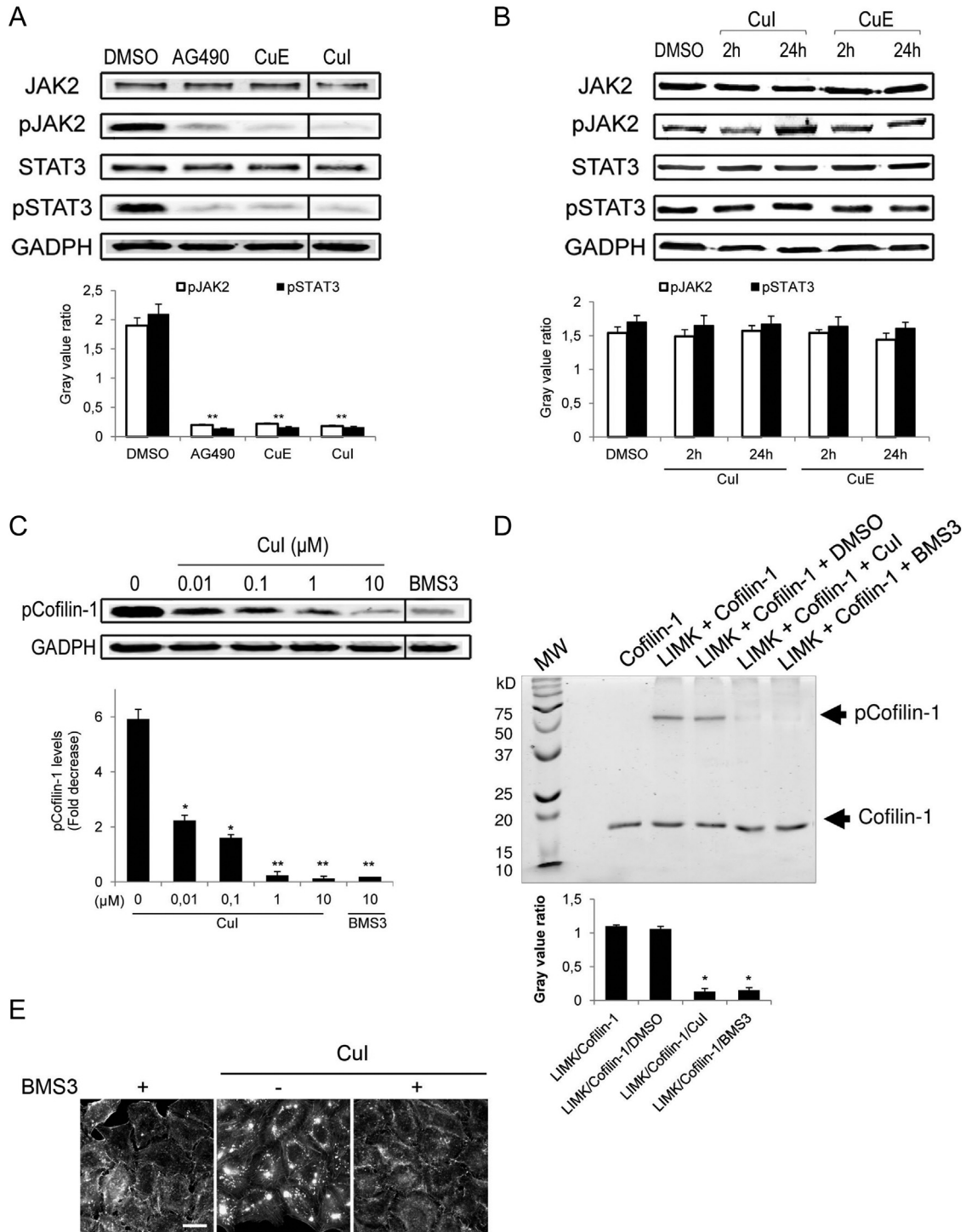


Fig. 4. A: cucurbitacins I and E inhibit the phosphorylation of JAK2 and STAT3 but only in the micromolar range. HeLa cells were treated for 4 h with either DMSO (vehicle control, 0.01%), or with CuE and Cul at 10 μ M, or with the AG490 JAK2/STAT3 inhibitor at 10 μ M. The cell lysates were then submitted to western blotting and probed for JAK2, pJAK2Y1007/Y1008, STAT3, pSTAT3Y705, and GAPDH. B: when treated with 100 nM Cul or CuE for 2 or 24 h, no change was observed on the status of JAK2 and STA3 phosphorylation. C, D and E: Cul and BMS3 inhibit LIMK *in vitro* but BMS opposes the action of Cul on actin aggregation in cells. (C) HeLa cells were treated for 4 h with either DMSO (vehicle control, 0.01%), or with Cul at different concentration (0.01, 0.1, 1 and 10 μ M), or with the BMS3's LIMK1/2 inhibitor at 10 μ M. The cell lysates were then submitted to western blotting and probed for pCofilin-1 and GAPDH. The thin vertical lines in A and C indicate removal of irrelevant lanes and juxtaposition of the two lanes relevant for this study. (D) Cul inhibits the ability of LIMK1 to phosphorylate cofilin-1 *in vitro*. Phos-Tag polyacrylamide gel electrophoresis of 30 min, 30 °C kinase reactions carried out with 2 ng/ μ L LIM Kinase 1 active, 1 mM ATP, 167 ng/ μ L cofilin-1 and incubated either with vehicle only (DMSO), or with 10 μ M Cul, or BMS3. The histograms displayed under the western blots presented on panels (A), (B) and (D) represent the densitometry quantification of the ratio pJAK2/JAK2, pSTAT3/STAT3 and p-cofilin-1/cofilin-1 obtained from the respective western blots. The histogram displayed under the western blot presented on panel (C) represents the evolution of the p-cofilin-1 level with increasing concentration of Cul. (E.) The BMS3's LIMK1/2 inhibitor reduces the size of the cucurbitacin-dependent actin aggregates in HeLa cells. Cells were pretreated by BMS3 (10 nM, 1 h) and then treated by Cul (10 nM, 2 h) in the presence of BMS3. Cells were fixed and stained with rhodamine-phalloidin (red) and DAPI (blue). Scale bar 20 μ m.

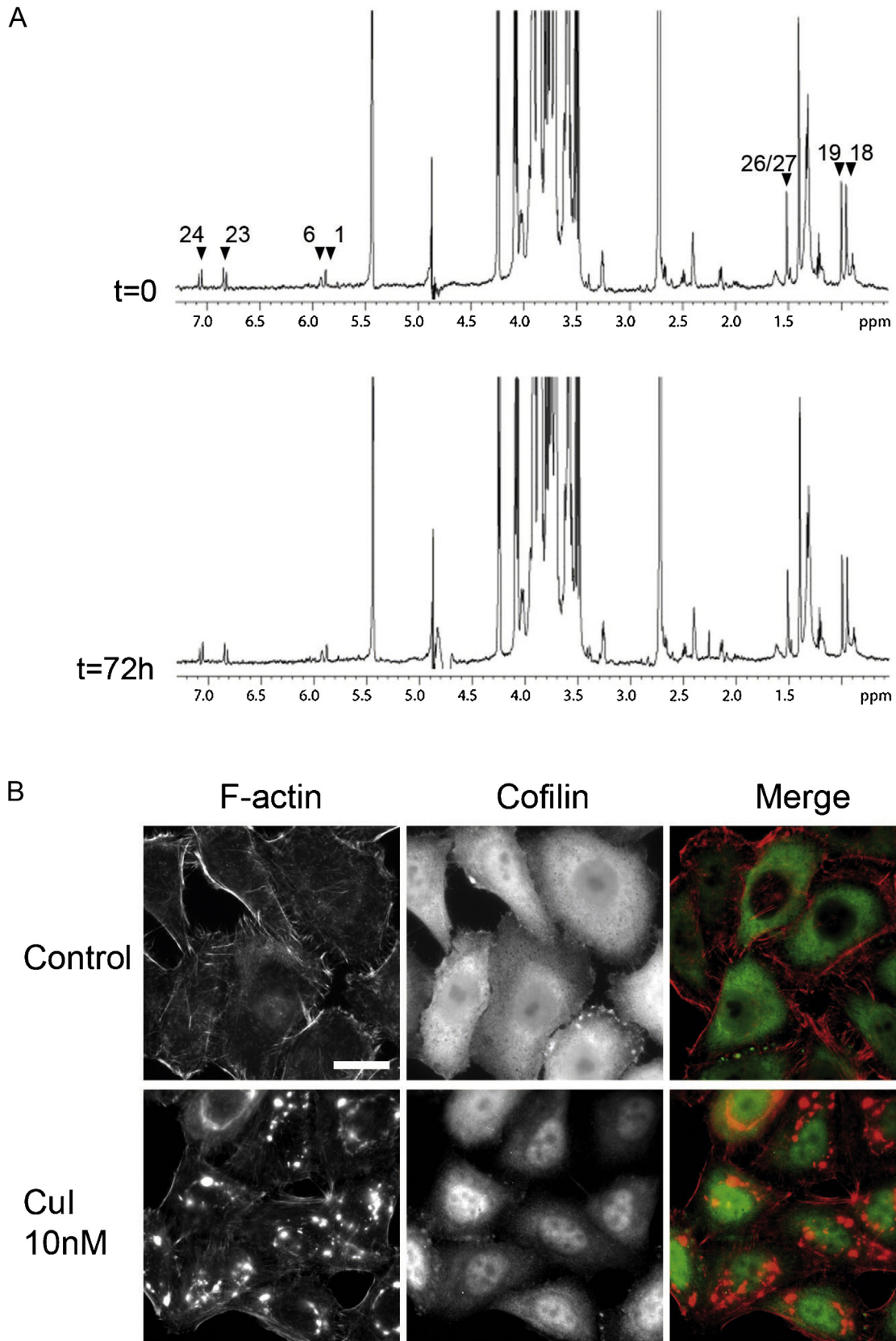


Fig. 5. Cul does not react with cofilin-1 *in vitro*. A: 1D ^1H spectra of Cul in the presence of cofilin-1 (Cul:cofilin-1 ratio = 1:100) at $t=0$ and after 72 h. Labels correspond to Cul protons numbering. B: actin aggregates do not co-localize with cofilin-1 in HeLa cells. Cells were untreated (control) or treated by Cul (10 nM for 2 h). Actin was detected by rhodamine-labeled phalloidin (red) and cofilin-1 was immuno-detected (green). Scale bar, 20 μm .

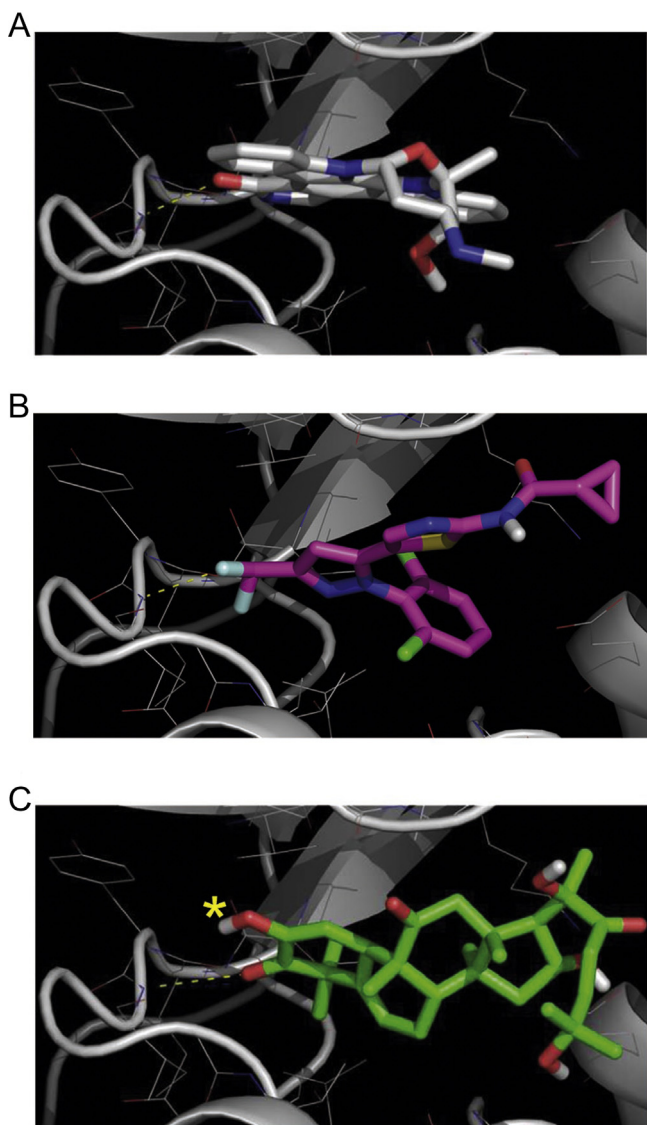


Fig. 6. Cul docks in the nucleotide pocket of LIMK1. The staurosporine (PDB code: 3S95) and BMS3 LIMK1 inhibitors dock in the LIMK1's nucleotide pocket. Staurosporine (A) and BMS3 (B) are shown in sticks and colored in white and magenta, respectively. LIMK1 is displayed in cartoon and its active site appears as white wires. C: Cul (green) also docks into the LIMK1's nucleotide pocket with the main hydrogen bond conserved. The yellow star indicated the HO function which is substituted by a glucose moiety in glycosylated Cul. The fact that the cycle of Cul that can be glycosylated is buried into the hinge region of LIMK suggests that the interaction of glycosylated-Cul with LIMK1 is impeded by the presence of glucose due to steric hindrance.

actin aggregation accompanied with several actin-dependent cell alterations as blebbing, cell retraction, disturbance of migration and multi-nucleation. Different mechanisms of action have been advanced to account for it, but the multiplicity of the proposals is adding to the confusion rather than bringing clarity. In this context, it is worthy to note that a better understanding of the mechanism of action of cucurbitacins will benefit fundamental pharmacology and should help us to improve in the future, the structure of specific cucurbitacins for a better selectivity while preserving their anti-proliferative activity and reducing their side effects. Here, based on cellular and molecular investigations, we have tackled a series of questions related to the ability of cucurbitacins to

aggregate actin as this phenomenon is one of the earliest events under cucurbitacin's control.

4.1. The cucurbitacin-dependent aggregation of actin does not seem to be associated with the triggering by cucurbitacins of an oxidative stress

One of the most striking sub-cellular abnormalities induced by cucurbitacins is the formation of actin aggregates (that we show to be actually constituted of actin and phospho-myosin II). Different molecular mechanisms have been proposed for the aggregation of actin, but yet the results are controversial and the underlying bases are not clear in particular when considering that the impacts of cucurbitacins on this cytoskeleton are obvious within the first few minutes after cucurbitacin application and from nanomolar concentrations (Figs. 1 and 2). An intriguing observation is the complete protection of cells from the biological effects of cucurbitacins by thiol-rich anti-oxidants like NAC or GSH [19,20,23]. Thus, it was deduced that the cucurbitacin-dependent actin aggregation results from an oxidative stress triggered by these molecules [19]. In the present work, we confirmed the protection of cells by both NAC and GSH to the effects of Cul, but surprisingly, we found that non-thiol anti-oxidants of different classes do not protect the cells from the morphological changes nor for the formation of massive actin aggregates upon Cul addition. These results clearly argue against a pro-oxidant role of cucurbitacins.

We accumulated a series of additional arguments that favor the view that the aggregation of actin is not the result of an oxidative stress and that the effect of NAC and GSH is rather due to a complexation of cucurbitacins than to the anti-oxidant potential of NAC and GSH:

- i) We quantified, based on the DCFH-DA assay, the production of ROS in HeLa cells in the presence of 100 nM Cul. The results showed only a slight and transient burst of ROS which appeared offset from the very early appearance of blebbing and actin aggregation at the cellular membrane. Furthermore the actin aggregation process continued for tens of minutes while the ROS production rapidly returned to normal and even below the control level.
- ii) A direct measurement of the pro-oxidant potential of Cul by EPR indicates that this molecule is not able to oxidize the partner but rather able to scavenge the hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$).
- iii) When HeLa cells received 100 nM Cul after pre-incubation or in the presence of VitC, VitE, DPI, L-NAME, or quercetin, the effects of Cul on the cell morphology and on the aggregation of actin were unchanged,
- iv) When Cul was mixed with either NAC or βME *in vitro*, we observed by solution NMR spectroscopy the formation of a direct complex between Cul and these molecules which most probably explains the inactivation of Cul and of cucurbitacins in general by these thiol-rich anti-oxidants,
- v) Cucurbitacins possess an electrophilic Michael acceptor group, which can form a covalent bond with a nucleophile, for example, a cysteine residue in proteins. Kausar et al. speculate that the effects of CuB could result from the formation of a covalent link between CuB and some functional nucleophilic groups of target proteins [23]. We thus examined such a possibility for actin and consequently mutated specific cysteine residues on actin (C374A, C257A, and C272A) that are known to participate to disulfide bridge formation under oxidative conditions [51], but the results show that all these actin mutants are still aggregated in the presence of Cul.

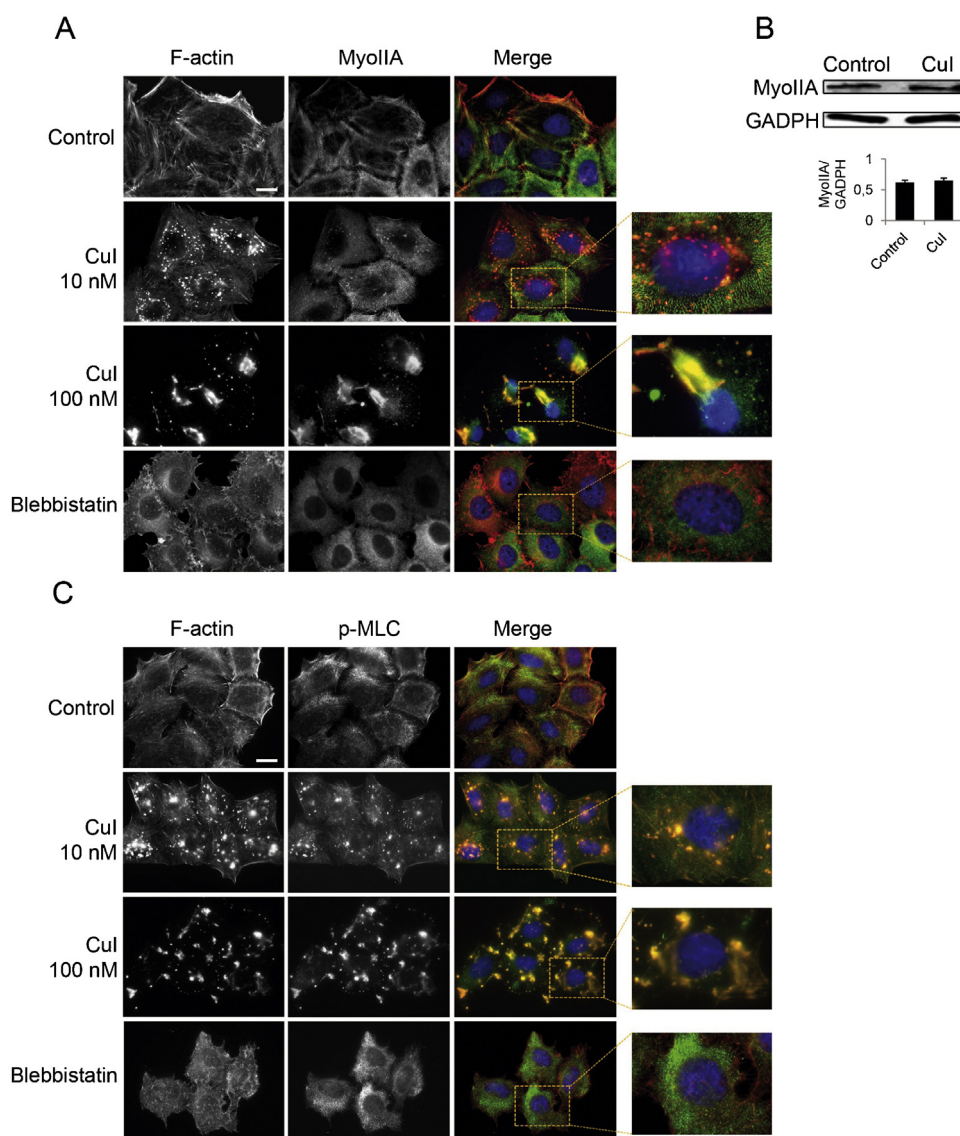


Fig. 7. Cul triggers the formation of actin/phospho-myosin II co-aggregates. **A:** myosin IIA co-aggregates with actin upon Cul administration in HeLa cells. Cells were treated with either DMSO (vehicle control, 0.01%), Cul (10 nM or 100 nM for 2 h), or with blebbistatin (100 μ M, for 30 min). In the merge image: actin (red), myosin IIA (green), DNA (blue). **B:** Cul does not modify the total myosin IIA protein level in HeLa cells. Immunoblots of HeLa cell extracts after Cul administration (100 nM, for 2 h) with antibodies against total Myosin IIA and GAPDH (used as a loading control). **C:** phospho-MLC co-aggregates with actin. Cells were treated with either DMSO (vehicle control, 0.01%), Cul alone (10 nM or 100 nM for 2 h), or with blebbistatin (100 μ M, for 30 min). In the merge image: actin (red), pMyosin IIS19 (green), DNA (blue). Scale bar, 20 μ m.

Together, these facts strongly suggest that the cucurbitacin-dependent aggregation of actin is due to other(s) mechanism(s) than a pro-oxidant activity. This led us to explore a series of alternate hypotheses.

4.2. When applied at nanomolar concentrations for short periods of time, cucurbitacin I does not influence the JAK2/STAT3 pathway but rather modulates the LIMK and Rho/ROCK pathways

Some cucurbitacins were reported to inhibit the JAK2/STAT3 pathway and eventually to provoke apoptosis. Signal transducer and activator of transcription (STAT) proteins are a family of transcription factors that mediate gene expression in response to cytokines and growth factors [52,53]. STAT3 regulates a variety of genes involved in cell proliferation, differentiation, apoptosis, angiogenesis, metastasis, inflammation, and immunity

[35,54,55]. In normal cells, the JAK2/STAT3 pathway is transiently activated in response to specific growth factors and cytokines [56]. In cancer cells, the JAK2/STAT3 pathway may be constitutively active in many cases which makes this cascade an interesting target [57,58]. In the present work, we confirmed that Cul and CuE actually inhibited the phosphorylation of JAK2 and STAT3 but only at micromolar concentrations. These results are consistent with a series of previous works on these cucurbitacins (see Table 1) but do not enlighten the link between them and actin aggregation since cucurbitacin I when used in the nanomolar range and for short periods of time does not inhibit these kinases.

A first alternate finding was that Cul inhibits *in vitro* the phosphorylation of cofilin-1 by LIMK. It was previously proposed that the inhibition of cofilin's phosphorylation by cucurbitacin results from the formation of a direct covalent bond between these molecules [22]. The NMR data we obtained here clearly do not

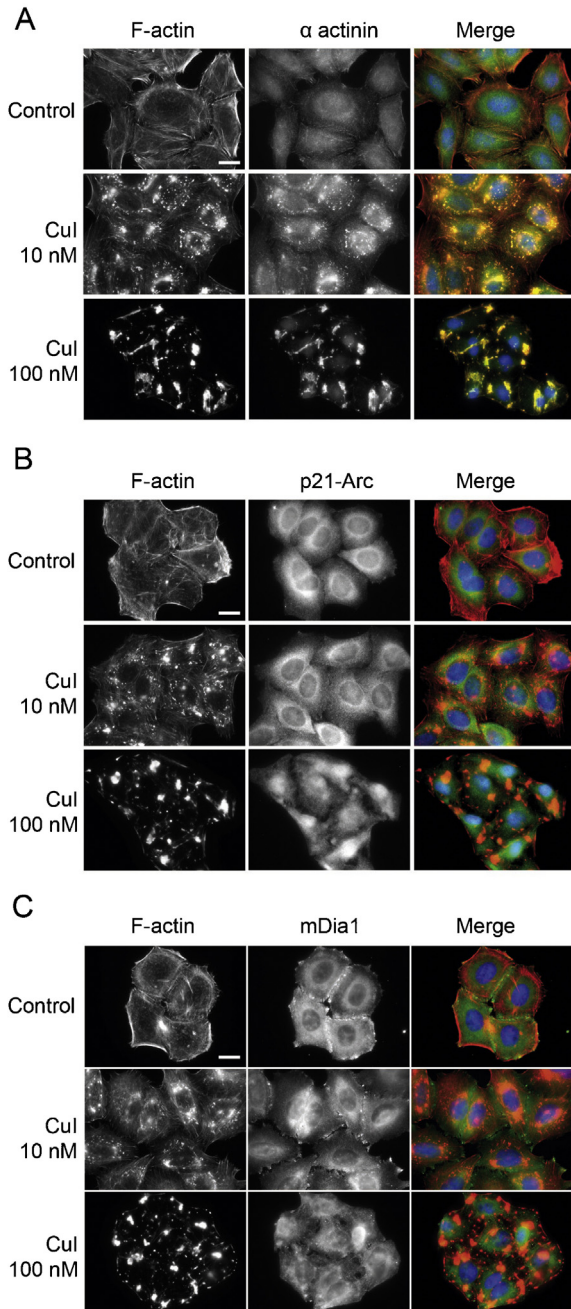


Fig. 8. α -Actinin co-aggregates with actin in HeLa cells treated by CuI. Cells were treated either with DMSO (vehicle control, 0.01%) or CuI (10 nM or 100 nM for 2 h). In the merge image: actin (red), (A) α -actinin, (B) p21-Arc, or (C) mDia1 (green), DNA (blue). Scale bar, 20 μ m.

confirm such a proposal. Rather we show that CuI directly inhibits LIMK1 activity and propose that CuI acts as a competitor for ATP binding to the nucleotide pocket of LIMK. However at first glance, this interesting *in vitro* finding appeared difficult to interpret as BMS3, a known LIMK inhibitor, actually does inhibit the phosphorylation of cofilin-1 by LIMK *in vitro*, but when added simultaneously with CuI to living cells, BMS3 prevents in part the changes induced by CuI. These contradictory results prompted us to hypothesize that either CuI or BMS3 (or both of them) have other targets to be discovered.

We confirmed this hypothesis by the combined observation that CuI clearly stimulates the Rho/ROCK pathway in the nanomolar range, as already shown [20], and that BMS3 blocks the stimulation of the Rho/ROCK pathway induced by CuI. The discovery that BMS3 blocks Rho/ROCK pathway when CuI stimulates it, reconciled the present *in vitro* (simultaneous inhibition of LIMK activity by CuI and BMS3) and *in vivo* (partial blockade of CuI's effects by BMS3) data.

4.3. Cucurbitacin I triggers the formation of actin/phospho-myosin II co-aggregates by a complex mechanism

We discovered that phospho-myosin II and α -actinin (present along stress fibers and which are critical for their contractility [47]) co-aggregates with actin upon nanomolar addition of CuI to cells. In line with this discovery, we show that the inhibition of actomyosin contractile bundles by blocking myosin II activity with blebbistatin or inhibition of ROCK which plays a double role in myosin homeostasis (it phosphorylates MLC [59,60], and it phosphorylates MYPT1, thereby MYPT1 is inactivated) prevented the formation of the abnormal actin/myosin structures, which accumulate when HeLa cells are treated with CuI. Finally, the emergence of the blebbing phenotype following CuI treatment reinforces the fact that CuI alters the homeostasis of the actomyosin cyto-architecture and of the cortical tension by an excessive myosin II activity.

Moreover, different protein classes have been shown to promote the nucleation of actin filaments in cells: the Arp2/3 complex promotes the formation of a branched actin network at the cell cortex [61,62] and formins generate unbranched filament bundles [63]. Indeed, mDia1 formin has previously been implicated in the assembly of stress fibers in cells [48]. Under the effect of CuI, we have shown that inhibition of formins alone is insufficient to block the aggregation of actin in HeLa cells, suggesting that CuI has more targets involved in the formation of different structures of stress fibers.

Together the present results modify the current view on how CuI and most probably of cucurbitacins in general trigger the aggregation of actin (actin/phospho-myosin II co-aggregates). Actually, it now appears that the co-aggregation of actin and phospho-myosin II triggered by CuI results from at least a balance between a strong Rho/ROCK activation and an inhibition of the LIM kinase. The relative intensity of which has to be quantified *in vivo*. This view helps us to understand all the data presented here as exemplified in Fig. 11.

- When CuI is applied alone, it stimulates the Rho/ROCK kinase pathway and inhibits the LIMK pathway. The net result is a burst of phospho-myosin II accompanied by a severing of F-actin by non-phosphorylated cofilin. The increase of the concentration of non-filamentous actin together with that of phospho-myosin II makes them to co-aggregate by a still unknown molecular mechanism,
- When CuI is applied together with BMS3, BMS3 strongly opposes the stimulation by CuI of the Rho/ROCK cascade. The remaining inhibition of LIMK by both CuI and BMS3 is not sufficient to disorganize the actin cytoskeleton,
- When blebbistatin and the Y27632 ROCK inhibitor are applied to the cell, myosin II is no longer available for co-aggregation with actin, the addition of CuI has no effect on the cell morphology and on the actin cytoskeleton.

It thus appears that the presence of phospho-myosin II is mandatory for the formation of stable actin aggregate structures

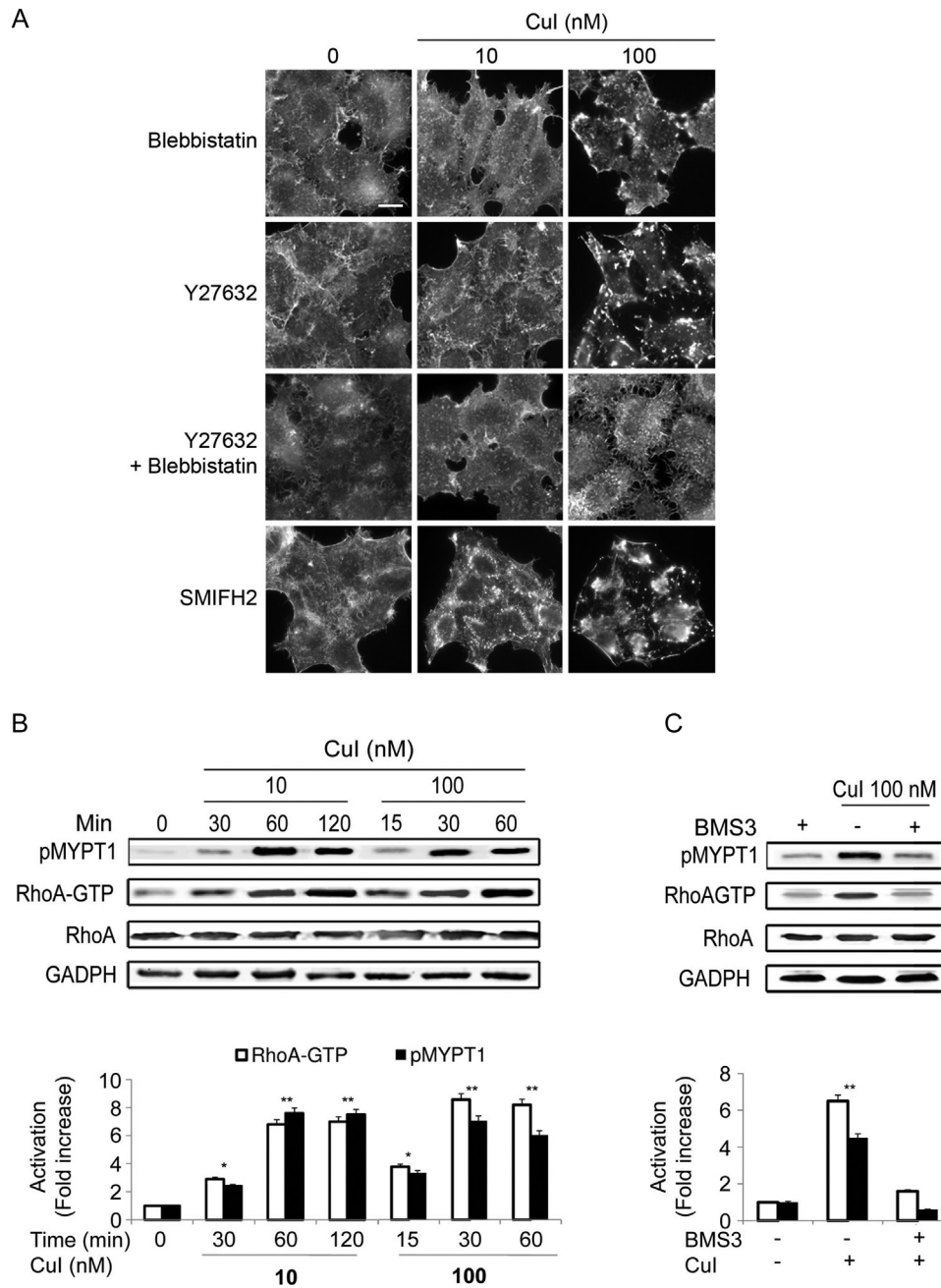


Fig. 9. A: The combination of myosin II ATPase and ROCK inhibitors strongly opposes the effect of Cul on actin aggregation. HeLa cells were pretreated by blebbistatin (myosin II ATPase inhibitors at 100 μ M for 30 min) or by Y27632 (ROCK inhibitor at 50 μ M for 30 min), and then the products were removed before the addition of Cul alone (10 nM or 100 nM for 2 h). Cells were fixed and stained with rhodamine-phalloidin. Scale bar, 20 μ m. Inhibition of formin does not prevent actin aggregates induced by Cul. HeLa cells were pretreated by 25 μ M SMIFH2 for 4 h (a formin FH2 domain inhibitor) and then co-incubated with Cul (10 nM or 100 nM for 2 h). Cells were fixed and stained with rhodamine-phalloidin. Scale bar, 20 μ m. B and C: cucurbitacin I activates Rho GTPase and ROCK. (B) HeLa cells were serum-starved for 48 h, and then treated with Cul (10 and 100 nM) for different periods of time. Cul at low nanomolar concentration induces a marked and persistent activation of Rho proteins (reflected by the increase of RhoA-GTP) and ROCK activity (reflected by the phosphorylation of MYPT1). (C) Upper panel: BMS3 prevents both Rho activation and ROCK activity: HeLa cells were serum-starved for 48 h, and pretreated with BMS3 (1 μ M for 1 h) before the administration of Cul (100 nM, 30 min). Lower panel: densitometry analysis of RhoA activation and MYPT1-Thr853 phosphorylation from the western blots presented on panels (B) and (C).

that lead to the biological effects of Cul and probably cucurbitacins in general.

It remains to understand how cucurbitacin stimulates the RhoA/ROCK pathway. Lopez-Haber and Kazanietz proposed that it results from an oxidative stress triggered by cucurbitacin. The present results do not support such a hypothesis. Cucurbitacins

may thus directly stimulate a specific GPCR or interact with RhoA to stabilize RhoA-GTP. A less probable proposal is that Cul also directly stimulates ROCK. The results we obtained on LIMK open the possibility that cucurbitacin may mimic nucleotide to switch on RhoA. Further work will decipher this latter point.

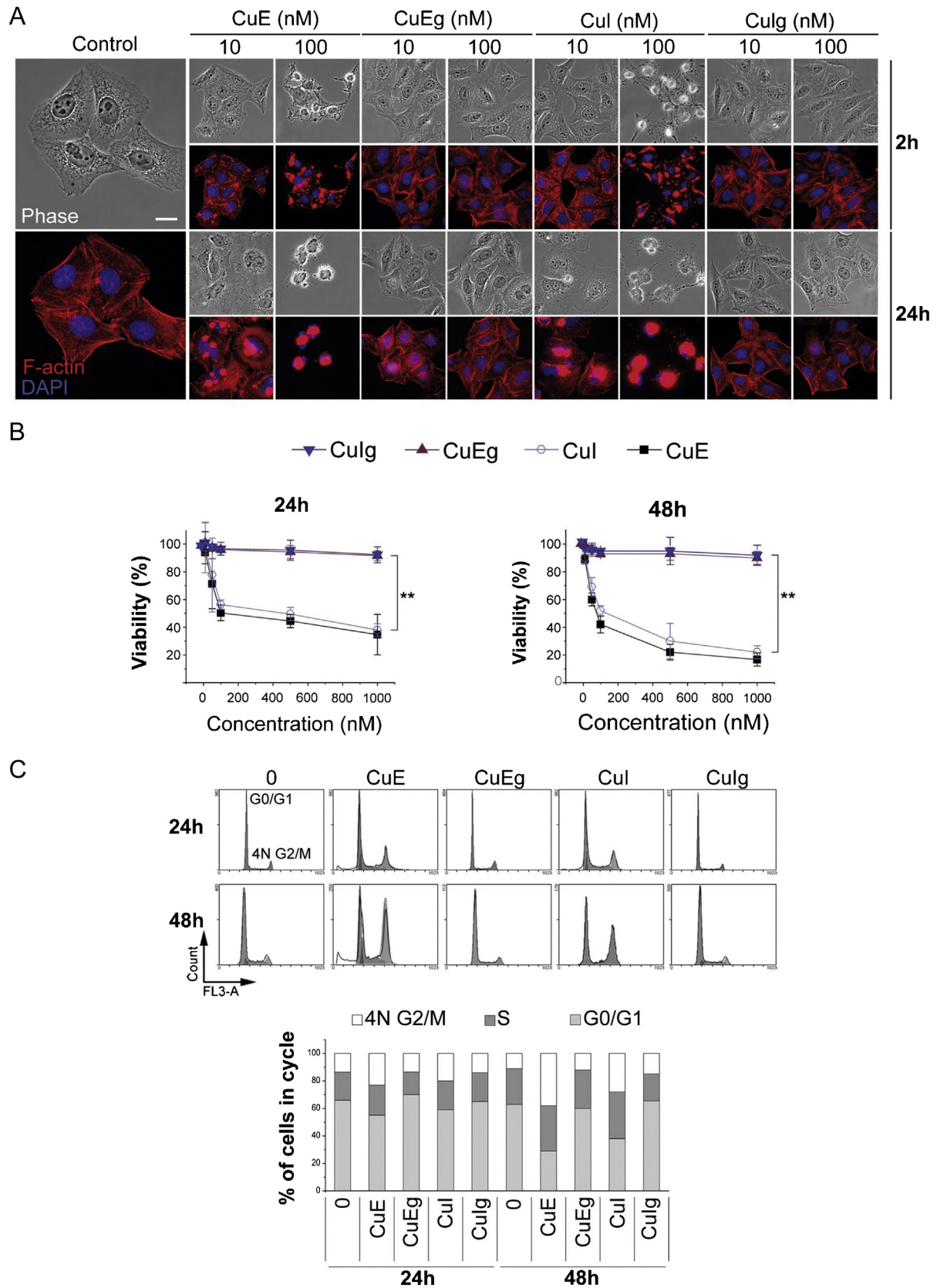


Fig. 10. The glycosylation of cucurbitacins E and I blocks most of their molecular impacts on HeLa cells. A: HeLa cells were incubated with CuE, CuI, CuE_g or CuI_g at the indicated concentrations for 2 or 24 h and then fixed and labeled for actin. Scale bar, 20 μ m. B: HeLa cells were cultured with CuE, CuI, CuE_g, and CuI_g at varying concentration in DMEM containing 5% FCS. After 24 h or 48 h of treatment the viability of cells was determined by the MTT assay. The data represent the mean \pm SEM from three independent experiments. The results show that the glycosylation of CuE or CuI lead to a statistically significant inhibition of their impact on cell viability (** $p < 0.005$). C: the glycosylation of CuE or CuI blocks their ability to increase the number of cells with a 4N (G2/M) DNA content. Cells were treated with 100 nM cucurbitacin for 24 h or 48 h and then harvested and stained with propidium iodide. The analysis of DNA content was performed by flow cytometry. D: HeLa cells were treated for 4 h with either DMSO (vehicle

control, 0.01%), or with CuE_g and CuI_g at 10 μM, or with the AG490 JAK2/STAT3 inhibitor at 10 μM. The cell lysates were then submitted to western blotting and probed for JAK2, pJAK2Y1007/Y1008, STAT3, pSTAT3Y705, and GAPDH.

4.4. The ability of cucurbitacins to aggregate actin/phospho-myosin II is dramatically reduced by glycosylation

We show that when CuE_g and CuI_g are tested at nanomolar concentration (where their aglycone forms are active), they have almost no impact on HeLa cells morphology, on their proliferation or on the actin cytoskeleton. In addition, we demonstrated that even at micromolar concentration CuE_g and CuI_g do not modify the phosphorylation of JAK2 and STAT3 or the phosphorylation of cofilin-1 by LIMK *in vitro*. It was previously reported that the 2-O-glucoside of cucurbitacin D does not reduce the proliferation rate of tumor and immune cells [64]. More recently, it was also shown that a 1:1 combination of cucurbitacin B and E glycosides can inhibit cell growth but with an IC₅₀ value several hundred-fold higher (8 μM) than that of their aglycone counterparts [65]. The data we obtained here further document the fact that the presence of a glucose moiety introduces a severe impediment to the ability of CuE and CuI and most probably of cucurbitacins in general to trigger the co-aggregation of action/phospho-myosin II. To the best of our knowledge, the mechanism by which glycosylation reduces the activity of cucurbitacins is not known. We propose two possibilities to account for it. First the presence of the glucose moiety, which significantly increases the polarity, the hydrophilicity and the volume of glycosylated cucurbitacins can restrict or inhibit their diffusion through the cell membrane. Another possibility is that glucose modifies dramatically the interaction between cucurbitacins and their protein targets by steric

hindrance. The molecular docking simulation performed here with LIMK as a target, favors this last proposal (see Fig. 6).

In conclusion, the data presented here provide a rationale to understand the pathways that lead Cul and most probably cucurbitacins in general to co-aggregate actin with phospho-myosin II. This novel view reactivates the interest one may have for cucurbitacins as these molecules appear of interest for research to study the impact of modifying specific signaling cascades. The data also opens for the future, the possibility to investigate the structure-activity relationships of these molecules to provide novel cucurbitacin derivatives that may be relevant as future drug candidates to fight cancer.

Author contributions

MSH: Designed and performed most of the molecular and cellular experiments. MJC and FT: NMR experiments and analysis of data. IH: Prepared actin WT and mutant plasmids and performed the corresponding experiments. GB and CB: molecular modeling and docking experiments. AB: Performed and analyzed part of the cellular experiments. MCR-H and ME M-P: Designed, performed and analyzed the hydroxyl free-radical assays. DCS: Provided the *C. colocynthis* material from the north-western Sahara desert and co-leaded the job of MSH. MC: Designed the procedure and performed the purification of cucurbitacins from *C. colocynthis* aqueous extracts. VJ: impact on cells of non-purified and purified fractions from aqueous extracts of *C. colocynthis* extracts. PAC: Team Leader.

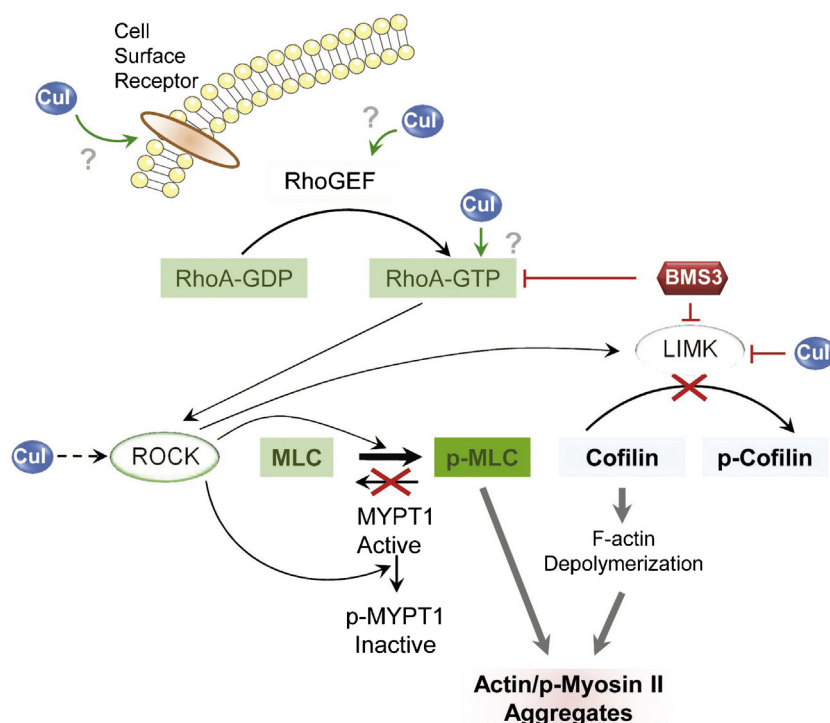


Fig. 11. A model for the impact of Cul on the RhoA/ROCK pathways and LIMK that leads to actin/phospho-myosin II co-aggregates. The formation of actin/phospho-myosin II co-aggregates by Cul results from a combined stimulation of the RhoA/ROCK pathways and inhibition of the LIM Kinase. The stimulation of the RhoA/ROCK cascade may result either from the interaction of Cul with a GPCR (to be discovered) or to a direct stabilization of RhoA-GTP. Another less probable effect may also be a simultaneous activation of the ROCK kinase. On the LIMK side, the present results favor a competition between Cul and ATP in the nucleotide binding pocket of LIMK to account for the inhibition of this kinase by Cul. GEF, guanine nucleotide exchange factor; MLC, myosin light-chain; p-MLC, phospho-myosin light chain; MYPT1, myosin phosphatases target subunit 1.

Steered and organized the global job and brain storming. All authors participated in report preparation and writing.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments

This work was supported by funds from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM); the Genopole, Evry, France and the French Embassy in Algiers, Algeria. We thank Dr Elisabeth ADJADJ (INSERM, France) for fruitful discussion while writing this manuscript.

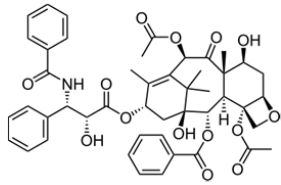
References

- J.C. Chen, M.H. Chiu, R.L. Nie, G.A. Cordell, S.X. Qiu, Cucurbitacins and cucurbitane glycosides: structures and biological activities, *Nat. Prod. Rep.* 22 (2005) 386–399.
- B. Jayaprakasam, N.P. Seeram, M.G. Nair, Anticancer and antiinflammatory activities of cucurbitacins from *Cucurbita andreana*, *Cancer Lett.* 189 (2003) 11–16.
- H. Greige-Gerges, R.A. Khalil, E.A. Mansour, J. Magdalou, R. Chahine, N. Ouaini, Cucurbitacins from *Ecballium elaterium* juice increase the binding of bilirubin and ibuprofen to albumin in human plasma, *Chem. Biol. Interact.* 169 (2007) 53–62.
- H. Greige-Gerges, K.R. Abou, R. Chahine, C. Haddad, W. Harb, N. Ouaini, Effect of cucurbitacins on bilirubin–albumin binding in human plasma, *Life Sci.* 80 (2007) 579–585.
- M. Saade, J. Magdalou, N. Ouaini, H. Greige-Gerges, Stability of cucurbitacin E in human plasma: chemical hydrolysis and role of plasma esterases, *Biopharm. Drug Dispos.* 30 (2009) 389–397.
- Y.T. Zhang, D.Y. Ouyang, L.H. Xu, Q.B. Zha, X.H. He, Formation of cofilin–actin rods following cucurbitacin-B-induced actin aggregation depends on Slingshot homolog 1-mediated cofilin hyperactivation, *J. Cell Biochem.* 114 (2013) 2415–2429.
- Y. Zhang, D. Ouyang, L. Xu, Y. Ji, Q. Zha, J. Cai, X. He, Cucurbitacin B induces rapid depletion of the G-actin pool through reactive oxygen species-dependent actin aggregation in melanoma cells, *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)* 43 (2011) 556–567.
- K.L. Duncan, M.D. Duncan, M.C. Alley, E.A. Sausville, Cucurbitacin E-induced disruption of the actin and vimentin cytoskeleton in prostate carcinoma cells, *Biochem. Pharmacol.* 52 (1996) 1553–1560.
- C. Boykin, G. Zhang, Y.H. Chen, R.W. Zhang, X.E. Fan, W.M. Yang, Q. Lu, Cucurbitacin IIa a novel class of anti-cancer drug inducing non-reversible actin aggregation and inhibiting survivin independent of JAK2/STAT3 phosphorylation, *Br. J. Cancer* 104 (2011) 781–789.
- D.A. Knecht, R.A. LaFleur, A.W. Kahsai, C.E. Argueta, A.B. Beshir, G. Fenteany, Cucurbitacin I inhibits cell motility by indirectly interfering with actin dynamics, *PLoS One* 5 (2010) e14039.
- D. Yin, N. Wakimoto, H. Xing, D. Lu, T. Huynh, X. Wang, K.L. Black, H.P. Koeffler, Cucurbitacin B markedly inhibits growth and rapidly affects the cytoskeleton in glioblastoma multiforme, *Int. J. Cancer* 123 (2008) 1364–1375.
- B.C. McFarland, G.K. Gray, S.E. Nozell, S.W. Hong, E.N. Benveniste, Activation of the NF- κ B pathway by the STAT3 inhibitor JSI-124 in human glioblastoma cells, *Mol. Cancer Res.* 11 (2013) 494–505.
- M.A. Blaskovich, J. Sun, A. Cantor, J. Turkson, R. Jove, S.M. Sebti, Discovery of JSI-124 (cucurbitacin I), a selective Janus kinase/signal transducer and activator of transcription 3 signaling pathway inhibitor with potent antitumor activity against human and murine cancer cells in mice, *Cancer Res.* 63 (2003) 1270–1279.
- C.J. Chang, C.H. Chiang, W.S. Song, S.K. Tsai, L.C. Woung, C.H. Chang, S.Y. Jeng, C. Y. Tsai, C.C. Hsu, H.F. Lee, C.S. Huang, M.C. Yung, J.H. Liu, K.H. Lu, Inhibition of phosphorylated STAT3 by cucurbitacin I enhances chemoradiosensitivity in medulloblastoma-derived cancer stem cells, *Childs Nerv. Syst.* 28 (2012) 363–373.
- X. Shi, B. Franko, C. Frantz, H.M. Amin, R. Lai, JSI-124 (cucurbitacin I) inhibits Janus kinase-3/signal transducer and activator of transcription-3 signalling, downregulates nucleophosmin-anaplastic lymphoma kinase (ALK), and induces apoptosis in ALK-positive anaplastic large cell lymphoma cells, *Br. J. Haematol.* 135 (2006) 26–32.
- Y. Su, G. Li, X. Zhang, J. Gu, C. Zhang, Z. Tian, J. Zhang, JSI-124 inhibits glioblastoma multiforme cell proliferation through G(2)/M cell cycle arrest and apoptosis augment, *Cancer Biol. Ther.* 7 (2008) 1243–1249.
- M.S. van Kester, J.J. Out-Luiting, P.A. van dem Borne, R. Willemze, C.P. Tensen, M.H. Vermeer, Cucurbitacin I inhibits Stat3 and induces apoptosis in Sezary cells, *J. Invest. Dermatol.* 128 (2008) 1691–1695.
- J. Guo, G. Wu, J. Bao, W. Hao, J. Lu, X. Chen, Cucurbitacin B induced ATM-mediated DNA damage causes G2/M cell cycle arrest in a ROS-dependent manner, *PLoS One* 9 (2014) e88140.
- S. Yasuda, S. Yogosawa, Y. Izutani, Y. Nakamura, H. Watanabe, T. Sakai, Cucurbitacin B induces G2 arrest and apoptosis via a reactive oxygen species-dependent mechanism in human colon adenocarcinoma SW480 cells, *Mol. Nutr. Food Res.* 54 (2010) 559–565.
- C. Lopez-Haber, M.G. Kazanietz, Cucurbitacin I inhibits Rac1 activation in breast cancer cells by a reactive oxygen species-mediated mechanism and independently of Janus tyrosine kinase 2 and P-Rex1, *Mol. Pharmacol.* 83 (2013) 1141–1154.
- S. Nakashima, H. Matsuda, A. Kurume, Y. Oda, S. Nakamura, M. Yamashita, M. Yoshikawa, Cucurbitacin E as a new inhibitor of cofilin phosphorylation in human leukemia U937 cells, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 20 (2010) 2994–2997.
- M. Gabrielsen, M. Schuldt, J. Munro, D. Borucka, J. Cameron, M. Baugh, A. Mleczak, S. Lilla, N. Morrice, M.F. Olson, Cucurbitacin covalent bonding to cysteine thiols: the filamentous-actin severing protein Cofilin1 as an exemplary target, *Cell Commun. Signal.* 11 (2013) 58.
- H. Kausar, R. Munagala, S.S. Bansal, F. Aqil, M.V. Vadhanam, R.C. Gupta, Cucurbitacin B potentially suppresses non-small-cell lung cancer growth: identification of intracellular thiols as critical targets, *Cancer Lett.* 332 (2013) 35–45.
- P. Ross-Macdonald, S.H. de, Q. Guo, H. Xiao, C.Y. Hung, B. Penhallow, J. Markwalder, L. He, R.M. Attar, T.A. Lin, S. Seitz, C. Tilford, J. Wardwell-Swanson, D. Jackson, Identification of a nonkinase target mediating cytotoxicity of novel kinase inhibitors, *Mol. Cancer Ther.* 7 (2008) 3490–3498.
- T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Methods* 65 (1983) 55–63.
- E. Kinoshita, E. Kinoshita-Kikuta, K. Takiyama, T. Koike, Phosphate-binding tag, a new tool to visualize phosphorylated proteins, *Mol. Cell Proteomics* 5 (2006) 749–757.
- P.Y. Liu, J.K. Liao, A method for measuring Rho kinase activity in tissues and cells, *Methods Enzymol.* 439 (2008) 181–189.
- L. Xiao, M. Eto, M.G. Kazanietz, ROCK mediates phorbol ester-induced apoptosis in prostate cancer cells via p21Cip1 up-regulation and JNK, *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 29365–29375.
- Y. Zhang, D. Ouyang, L. Xu, Y. Ji, Q. Zha, J. Cai, X. He, Cucurbitacin B induces rapid depletion of the G-actin pool through reactive oxygen species-dependent actin aggregation in melanoma cells, *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)* 43 (2011) 556–567.
- Y.T. Zhang, D.Y. Ouyang, L.H. Xu, Q.B. Zha, X.H. He, Formation of cofilin–actin rods following cucurbitacin-B-induced actin aggregation depends on Slingshot homolog 1-mediated cofilin hyperactivation, *J. Cell Biochem.* 114 (2013) 2415–2429.
- T. Fiaschi, G. Cozzi, G. Raugi, L. Formigli, G. Ramponi, P. Chiarugi, Redox regulation of beta-actin during integrin-mediated cell adhesion, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 22983–22991.
- C. Lind, R. Gerdes, Y. Hamnell, I. Schuppe-Koistinen, H.B. von Lowenhielm, A. Holmgren, I.A. Cotgreave, Identification of S-glutathionylated cellular proteins during oxidative stress and constitutive metabolism by affinity purification and proteomic analysis, *Arch. Biochem. Biophys.* 406 (2002) 229–240.
- P.M. Sorensen, R.E. Jacob, M. Fritzsche, J.R. Engen, W.M. Brieher, G. Charras, U.S. Eggert, The natural product cucurbitacin E inhibits depolymerization of actin filaments, *ACS Chem. Biol.* 7 (2012) 1502–1508.
- A. Tsapara, D. Kardassis, A. Moustakas, A. Gravanis, C. Stourmaras, Expression and characterization of Cys374 mutated human beta-actin in two different mammalian cell lines: impaired microfilament organization and stability, *FEBS Lett.* 455 (1999) 117–122.
- D.E. Levy, G. Inghirami, STAT3: a multifaceted oncogene, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103 (2006) 10151–10152.
- W.X. Li, Canonical and non-canonical JAK-STAT signaling, *Trends Cell Biol.* 18 (2008) 545–551.
- S. Arber, F.A. Barbayannis, H. Hanser, C. Schneider, C.A. Stanyon, O. Bernard, P. Caroni, Regulation of actin dynamics through phosphorylation of cofilin by LIM-kinase, *Nature* 393 (1998) 805–809.
- N. Yang, O. Higuchi, K. Ohashi, K. Nagata, A. Wada, K. Kangawa, E. Nishida, K. Mizuno, Cofilin phosphorylation by LIM-kinase 1 and its role in Rac-mediated actin reorganization, *Nature* 393 (1998) 809–812.
- K. Ohashi, K. Nagata, M. Maekawa, T. Ishizaki, S. Narumiya, K. Mizuno, Rho-associated kinase ROCK activates LIM-kinase 1 by phosphorylation at threonine 508 within the activation loop, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 3577–3582.
- M. Maekawa, T. Ishizaki, S. Boku, N. Watanabe, A. Fujita, A. Iwamatsu, T. Obinata, K. Ohashi, K. Mizuno, S. Narumiya, Signaling from Rho to the actin cytoskeleton through protein kinases ROCK and LIM-kinase, *Science* 285 (1999) 895–898.
- T. Sumi, K. Matsumoto, Y. Takai, T. Nakamura, Cofilin phosphorylation and actin cytoskeletal dynamics regulated by rho- and Cdc42-activated LIM-kinase 2, *J. Cell Biol.* 147 (1999) 1519–1532.
- J. Dunitz, R. Taylor, Organic fluorine hardly ever accepts hydrogen bonds, *Chem. Eur. J.* 3 (1997) 89–98.
- O. Wiggan, A.E. Shaw, J.G. DeLuca, J.R. Bamburg, ADF/cofilin regulates actomyosin assembly through competitive inhibition of myosin II binding to F-actin, *Dev. Cell* 22 (2012) 530–543.
- A.F. Straight, A. Cheung, J. Limouze, I. Chen, N.J. Westwood, J.R. Sellers, T.J. Mitchison, Dissecting temporal and spatial control of cytokinesis with a myosin II inhibitor, *Science* 299 (2003) 1743–1747.
- M. Kovacs, J. Toth, C. Hetenyi, A. Malnasi-Csizmadia, J.R. Sellers, Mechanism of blebbistatin inhibition of myosin II, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 35557–35563.

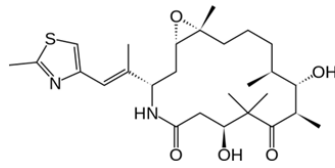
- [46] M. Hirose, T. Ishizaki, N. Watanabe, M. Uehata, O. Kranenburg, W.H. Moolenaar, F. Matsumura, M. Maekawa, H. Bito, S. Narumiya, Molecular dissection of the Rho-associated protein kinase (p160ROCK)-regulated neurite remodeling in neuroblastoma N1E-115 cells, *J. Cell Biol.* 141 (1998) 1625–1636.
- [47] P. Hotulainen, P. Lappalainen, Stress fibers are generated by two distinct actin assembly mechanisms in motile cells, *J. Cell Biol.* 173 (2006) 383–394.
- [48] N. Watanabe, T. Kato, A. Fujita, T. Ishizaki, S. Narumiya, Cooperation between mDia1 and ROCK in Rho-induced actin reorganization, *Nat. Cell Biol.* 1 (1999) 136–143.
- [49] S.A. Rizvi, E.M. Neidt, J. Cui, Z. Feiger, C.T. Skau, M.L. Gardel, S.A. Kozmin, D.R. Kovar, Identification and characterization of a small molecule inhibitor of formin-mediated actin assembly, *Chem. Biol.* 16 (2009) 1158–1168.
- [50] W. Tao, B. Li, S. Gao, Y. Bai, P.A. Shar, W. Zhang, Z. Guo, K. Sun, Y. Fu, C. Huang, C. Zheng, J. Mu, T. Pei, Y. Wang, Y. Li, Y. Wang, CancerHSP: anticancer herbs database of systems pharmacology, *Sci. Rep.* 5 (2015) 11481.
- [51] I. Dalle-Donne, R. Rossi, A. Milzani, S.P. Di, R. Colombo, The actin cytoskeleton response to oxidants: from small heat shock protein phosphorylation to changes in the redox state of actin itself, *Free Radic. Biol. Med.* 31 (2001) 1624–1632.
- [52] L.J. Liu, K.H. Leung, D.S. Chan, Y.T. Wang, D.L. Ma, C.H. Leung, Identification of a natural product-like STAT3 dimerization inhibitor by structure-based virtual screening, *Cell Death Dis.* 5 (2014) e1293.
- [53] P.B. Sehgal, Paradigm shifts in the cell biology of STAT signaling, *Semin. Cell Dev. Biol.* 19 (2008) 329–340.
- [54] B.B. Aggarwal, A.B. Kunnumakkara, K.B. Harikumar, S.R. Gupta, S.T. Tharakan, C. Koca, S. Dey, B. Sung, Signal transducer and activator of transcription-3, inflammation, and cancer: how intimate is the relationship? *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1171 (2009) 59–76.
- [55] D.A. Frank, STAT3 as a central mediator of neoplastic cellular transformation, *Cancer Lett.* 251 (2007) 199–210.
- [56] K. Abubaker, R.B. Luwor, H. Zhu, O. McNally, M.A. Quinn, C.J. Burns, E.W. Thompson, J.K. Findlay, N. Ahmed, Inhibition of the JAK2/STAT3 pathway in ovarian cancer results in the loss of cancer stem cell-like characteristics and a reduced tumor burden, *BMC Cancer* 14 (2014) 317.
- [57] D.G. Rosen, I. Mercado-Urbe, G. Yang, R.C. Bast Jr., H.M. Amin, R. Lai, J. Liu, The role of constitutively active signal transducer and activator of transcription 3 in ovarian tumorigenesis and prognosis, *Cancer* 107 (2006) 2730–2740.
- [58] P. Sansone, J. Bromberg, Targeting the interleukin-6/Jak/stat pathway in human malignancies, *J. Clin. Oncol.* 30 (2012) 1005–1014.
- [59] G. Totsukawa, Y. Yamakita, S. Yamashiro, D.J. Hartshorne, Y. Sasaki, F. Matsumura, Distinct roles of ROCK (Rho-kinase) and MLCK in spatial regulation of MLC phosphorylation for assembly of stress fibers and focal adhesions in 3T3 fibroblasts, *J. Cell Biol.* 150 (2000) 797–806.
- [60] V. Niggli, M. Schmid, A. Nievergelt, Differential roles of Rho-kinase and myosin light chain kinase in regulating shape, adhesion, and migration of HT1080 fibrosarcoma cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 343 (2006) 602–608.
- [61] K.J. Amann, T.D. Pollard, The Arp2/3 complex nucleates actin filament branches from the sides of pre-existing filaments, *Nat. Cell Biol.* 3 (2001) 306–310.
- [62] L. Blanchoin, K.J. Amann, H.N. Higgs, J.B. Marchand, D.A. Kaiser, T.D. Pollard, Direct observation of dendritic actin filament networks nucleated by Arp2/3 complex and WASP/Scar proteins, *Nature* 404 (2000) 1007–1011.
- [63] D. Pruyne, M. Evangelista, C. Yang, E. Bi, S. Zigmund, A. Bretscher, C. Boone, Role of formins in actin assembly: nucleation and barbed-end association, *Science* 297 (2002) 612–615.
- [64] B. Frei, M. Heinrich, D. Herrmann, J.E. Orjala, J. Schmitt, O. Sticher, Phytochemical and biological investigation of *Begonia heracleifolia*, *Planta Med.* 64 (1998) 385–386.
- [65] T. Tannin-Spitz, S. Grossman, S. Dovrat, H.E. Gottlieb, M. Bergman, Growth inhibitory activity of cucurbitacin glucosides isolated from *Citrullus colocynthis* on human breast cancer cells, *Biochem. Pharmacol.* 73 (2007) 56–67.

ANNEXE 2

Agents se liant dans le domaine des Taxanes

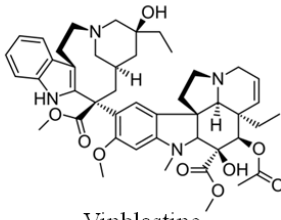


Paclitaxel

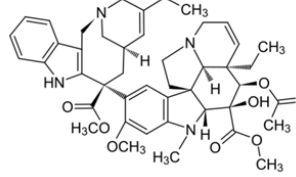


Ixabepilone

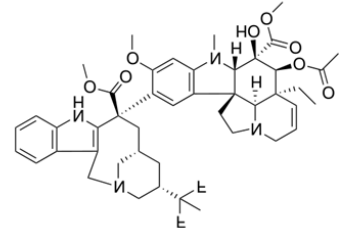
Agents se liant dans le domaine des Vinca-alcaloïdes



Vinblastine

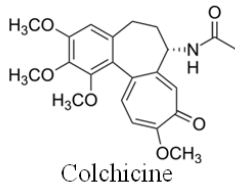


Vinorelbine

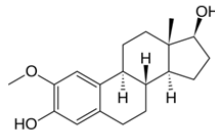


Vinflunine

Agents se liant dans le domaine de Colchicine

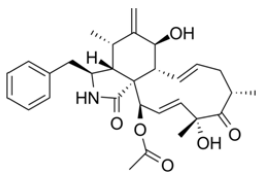


Colchicine

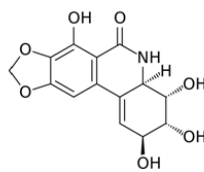


2-Méthoxyoestradiol

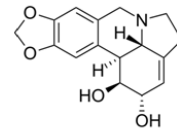
Agents ciblant le cytosquelette d'actine



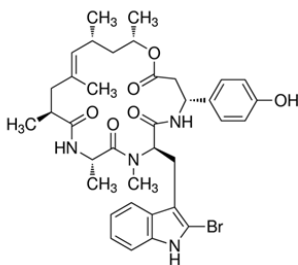
Cytochalasin D



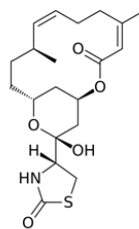
Narciclasine



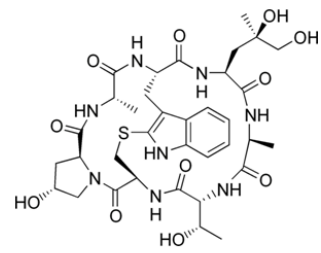
Lycorine



Jasplakinolide



Latrunculine B



Phalloidin

RMN ¹H : Valeurs des déplacements chimiques (δ ppm) des cucurbitacines E, I, L, K et J glycosylées dans D₂O

	E	I	L	K	J
C	δ (¹ H)	δ (¹ H)	δ (¹ H)	δ (¹ H)	δ (¹ H)
1	6,08	6,08	6,08	6,08	6,08
2	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-
6	5,91	5,91	5,91	5,91	5,91
7a	2,37	2,38	2,38	2,40	2,40
7b	2,08	2,08	2,08	2,08	2,08
8	2,12	2,13	2,13	2,13	2,13
9					
10	3,75	3,76	3,76	3,76	3,76
11					
12a	3,48	3,51	3,51	3,49	3,49
12b	2,65	2,68	2,68	2,68	2,68
13	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	-
15a	1,97	1,96	1,96	1,97	1,97
15b	1,47	1,46	1,46	1,47	1,47
16	4,48	4,46	4,44	4,52	4,52
17	2,60	2,63	2,60	2,60	2,60
18	0,89	0,92	0,92	0,92	0,92
19	0,98	0,99	0,99	0,99	0,99
20	-	-	-	-	-
21	1,47	1,48	1,46	1,46	1,44
22	-	-	-	-	-
23a	6,76	6,79	2,89	3,00	3,04
23b	-	-	2,76	2,86	2,89
24	7,08	7,03	1,71	3,94	3,87
25	-	-	-	-	-
26	1,53	1,36	1,22	1,19	1,18
27	1,55	1,36	1,22	1,19	1,18
28	1,29	1,27	1,29	1,28	1,28
29	1,29	1,29	1,30	1,29	1,29
30	1,36	1,36	1,36	1,36	1,36
1'	4,69	4,69	4,69	4,69	4,69
2'	3,56	3,56	3,56	3,56	3,56
3'	3,56	3,56	3,56	3,56	3,56
4'	3,56	3,56	3,56	3,56	3,56
5'	3,51	3,51	3,51	3,51	3,51
6'a	4,03	4,03	4,03	4,03	4,03
6'b	3,88	3,88	3,88	3,88	3,88

RMN ^{13}C : Valeurs des déplacements chimiques (δ ppm) des cucurbitacines E, I, L, K et J glycosylées dans D_2O

	E	I	L	K	J
C	$\delta (^{13}\text{C})$	$\delta (^{13}\text{C})$	$\delta (^{13}\text{C})$	$\delta (^{13}\text{C})$	$\delta (^{13}\text{C})$
1	123,7	123,7	123,7	123,7	123,7
2	145,4	145,9	145,9	145,4	145,4
3	201,5	201,5	201,5	201,5	201,5
4	49,3	49,3	49,3	49,3	49,3
5	134,8	134,8	134,8	134,9	134,9
6	122,3	122,3	122,3	122,3	122,3
7	23,6	23,4	23,4	23,3	23,3
8	41,6	41,6	41,6	41,6	41,6
9	49,8	49,8	49,8	49,8	49,8
10	35,4	35,4	35,4	35,4	35,4
11	220,3	220,4	220,4	220,3	220,3
12	49,1	49,4	49,4	49,2	49,2
13	50,9	50,8	50,8	50,9	50,9
14	48,2	47,9	47,9	48,2	48,2
15	45,0	45,0	45,0	45,0	45,0
16	71,0	70,9	70,8	71,0	71,0
17	58,0	57,6	57,7	57,4	57,4
18	19,9	19,9	19,9	19,9	19,9
19	19,5	19,5	19,5	19,5	19,5
20	80,0	80,0	80,0	80,8	80,8
21	24,0	23,9	24,0	23,9	23,9
22	205,9	205,9	205,9	205,9	205,9
23	121,2	120,1	33,0	40,0	40,3
24	152,5	71,6	36,8	74,0	73,8
25	81,1	155,3	71,4	73,0	72,8
26	26,0	28,0	28,0	24,4	24,4
27	25,9	28,0	28,0	24,4	24,4
28	27,4	27,3	27,4	27,4	27,4
29	19,9	19,9	19,9	19,9	19,9
30	18,2	18,3	18,3	18,3	18,3
1'	99,0	99,0	99,0	99,0	99,0
2'	76,0	76,0	76,0	76,0	76,0
3'	76,0	76,0	76,0	76,0	76,0
4'	69,2	69,2	69,2	69,2	69,2
5'	72,8	72,8	72,8	72,8	72,8
6'	60,3	60,3	60,3	60,3	60,3

RESUME

Citrillus colocynthis, plante de la famille des Cucurbitaceae, est utilisée en médecine traditionnelle en Afrique et en Asie pour traiter diverses affections. Elle contient comme principes actifs majoritaires des cucurbitacines. Sur les cellules mammifères en culture, les cucurbitacines provoquent, à dose nanomolaire, des changements morphologiques spectaculaires dans les minutes qui suivent leur application (blebbing, effondrement du volume cellulaire), accompagnés d'une agrégation massive de l'actine qui conduit dans les 24 heures à un défaut de cytokinèse avec multinucléation. Dans ce contexte, je me suis attachée à apporter des éléments pour mieux comprendre comment les cucurbitacines conduisent à l'agrégation de l'actine. Ce faisant, j'ai découvert que les agrégats formés sous l'effet des cucurbitacines ne sont pas de simples amas d'actine mais en fait des co-agrégats constitués d'un mélange d'actine et de phospho-myosine II. En analysant les voies de signalisation, j'ai pu montrer que la cucurbitacine I :

I - Inhibe la phosphorylation de la cofiline par la LIMkinase, II - Active de façon très forte la voie RhoA/ROCK, III - Ne provoque pas de stress oxydant significatif et présente in vitro une réelle capacité à capturer le radical $\cdot\text{OH}$, IV - Ne peut inhiber dans la cellule en culture la voie JAK2/STAT3 qu'à des concentrations micromolaires, V - Que les effets cyto-morphologiques de la cucurbitacine I ne sont neutralisés que par les antioxydants comportant des fonctions thiol dû à sa capacité à se conjuguer directement avec ces molécules, VI - La glycosylation supprime l'activité de ces molécules. La démonstration que ces molécules n'agissent pas en se couplant à des protéines cibles, ouvrent l'espoir raisonnable de les utiliser dans le futur pour créer des dérivés d'intérêt pour la pharmacologie du cancer.

Mots clés : *Citrillus colocynthis*, cucurbitacine, actine, myosine II, anti-oxydants, cofiline/LIMK

ABSTRACT

Citrillus colocynthis, a plant from the Cucurbitaceae family, is used in traditional medicine in Africa and Asia to treat various diseases. It contains as major active molecules, cucurbitacins. On mammalian cells in culture, cucurbitacins at nanomolar dose, cause dramatic cyto-morphological changes in the minutes of their application (blebbing, collapse of the cell volume), accompanied by a massive aggregation of actin which leads within 24 hours to a defect of cytokinesis with multinucleation. In this context, I committed, to provide data to better understand how cucurbitacins lead to the aggregation of actin. In doing so, I discovered that the aggregates resulting from cucurbitacins are not simple actin clusters but in fact co-aggregates consisting of a mixture of actin and phospho-myosin II.

By analyzing the signaling pathways, I was able to show that cucurbitacin I:

I - Inhibits cofilin phosphorylation by LIMkinase, II - Very strongly activates the RhoA/ROCK pathway, III - Does not cause a significant and sustained oxidative stress in cultured cells, and presents in vitro a real ability to capture the OH radical. IV - Can inhibit in cultured cells the JAK2/STAT3 pathway only at micromolar concentrations, V - That the cyto-morphological effects of cucurbitacin I in mammalian cell are neutralized only by thiol-rich antioxidants, due of to the ability to combine directly with this molecule, VI - Glycosylation suppresses the activity of these molecules.

The demonstration that these molecules do not act by coupling to target proteins, open the reasonable hope of using them to elaborate in the future derivatives of interest for the pharmacology of cancer.

Keywords: *Citrillus colocynthis*, cucurbitacin, actin, myosin II, anti-oxidants, cofilin/LIMK

ملخص

حنظل (*Citrillus colocynthis*)، نبات من العائلة القرعية، يستخدم في الطب التقليدي في أفريقيا وآسيا لعلاج مختلف الظروف. أنه يحتوي على كمكونات رئيسية نشطة كوكوربيتاسين (cucurbitacines). خلايا الثدييات، كوكوربيتاسين تسبب في جرعة نانومولار، تغييرات جذرية المورفولوجية في غضون دقائق بعد التطبيق (blebbing، وانهيار حجم الخلية) ويرافق هذه التغييرات من قبل تراكم الأكتين الذي يؤدي في غضون 24 ساعة إلى خلل في الانقسام السيتوبلازمي مع متعددة التنوي. في هذا السياق، ارتكبت خلال أطروحتي، لجعل العناصر أفضل لكيفية تؤدي كوكوربيتاسين تراكم الأكتين. في القيام بذلك، اكتشفت أن تتشكل جراء كوكوربيتاسين هي مجموعات أكتين يست بسيطة ولكن في الواقع الشريك تتشكل مصنوعة من خليط من الأكتين والميوسين II فسفرته. من خلال تحليل المسارات التأشيرية، وبمكنتني أن أثبت أن كوكوربيتاسين I :

I - يمنع الفسفرة كفلين بواسطة كيناز LMK، II - تفعيل بشدة الطريق RhoA/ROCK، III - لا يسبب الاكسدة ملحوظ في الأنابيب ولديه قدرة حقيقية لالتقاط OH راديكالية، IV - يمكن أن تمنع الطريق JAK2 / STAT3 بتركيزات مكرمولي، V - أن الآثار خلوي الصرفي لاقتراح كوكوربيتاسين يتم تحديد نظري المواد المضادة للاكسدة التي تحتوي على وظائف ثيول نظرا لقدرته على المترافقة مباشرة مع هذه الجزينات، VI - ارتباط بالغليكوزيل يجمع النشاط هذه الجزينات.

مظاهرة أن هذه الجزينات لا تعمل الإزدواج لاستهداف البروتينات، تفتح توقعات معقولة باستخدامها في المستقبل لإنشاء المشتقات تهم الصيدلة من السرطان.

الكلمات المفتاحية : *Citrillus colocynthis*، كوكوربيتاسين، الأكتين، الميوسين II، المواد المضادة للاكسدة، كفلين LIMK