



**Universitat de les
Illes Balears**



DOCTORAL THESIS

2015

***Characterization of the anti-tumor activity of
plants extracts from North Africa: Morocco***

Lamiae BELAYACHI



**Universitat de les
Illes Balears**



***DOCTORAL THESIS
2015***

Biotechnology, Genetics and Cellular Biology

***Characterization of the anti-tumor activity of
plants extracts from North Africa: Morocco***

Lamiae BELAYACHI

Thesis Supervisor: Pr. Priam Villalonga Smith

Thesis Supervisor: Pr. Saaid Amzazi

Thesis tutor: Pr. Regina Alemany



«ولسوف يعطيك ربك فترضى»

«ولسوف تعطيك ربك فترضى»



Dédicaces

Merci à mère qui n'a jamais cessé de croire en moi, même aux pires moments de ma vie pour son soutien quotidien indéfectible et son enthousiasme contagieux à l'égard de mes travaux comme de la vie en général.

Merci à mon père, sa présence et ses encouragements sont pour moi les piliers fondateurs de ce que je suis et de ce que je fais.

A mes sœurs Hanae et Safae, pour leur soutien et leur affection sans réserves. Je vous aime du fond du cœur.

A la mémoire de mes grands-parents.

A tous ceux qui m'ont chers ...

Je vous dédie ce modeste travail.

Avant-propos

Cette thèse a été réalisée dans le cadre d'une cotutelle entre le Laboratoire de Biochimie Immunologie de la Faculté des Science de l'Université Mohammed V-Rabat et le groupe « Cancer Cell Biology », Institut Universitari d'Investigació en Ciències de la Salut "IUNICS" de l'Université des Iles Baléars-Majorque-Espagne. Ce travail a été agréablement réalisé sous l'encadrement scientifique conjoint du Pr. Saaïd Amzazi, Dr. Priam Villalonga Smith et Pr. Youssef Bakri.

*Ce projet de recherche a été soutenu par le **Programme de mobilité Averroès (Commission Européenne)**.*

*A Monsieur le professeur **Saaïd Amzazi**, je tiens à vous exprimer toute ma reconnaissance et ma profonde gratitude pour votre rigueur, et vos compétences scientifiques, qui m'ont été très précieuses. Pour le temps que vous avez su m'accorder avec générosité, la formation scientifique et critique que vous m'avez apporté, je tiens à vous exprimer mon profond respect et ma très haute considération.*

*A Monsieur le professeur **Priam Villalonga Smith**, je tiens à vous exprimer ma plus profonde gratitude et ma reconnaissance pour m'avoir accueilli au sein de votre actif laboratoire. Veuillez trouver ici l'assurance de mon profond respect et le témoignage de ma sincère reconnaissance*

*A Monsieur le professeur **Youssef Bakri**, pour la formation scientifique qu'il m'a apportée, pour ses encouragements et ses qualités humaines. Qu'il trouve ici l'expression de ma sincère gratitude et de mon profond respect.*

*J'exprime toute ma gratitude au professeur **Abdelaziz Benjouad**, pour m'avoir fait l'honneur d'examiner mon travail de thèse malgré tous ses engagements.*

*Je remercie vivement le professeur **Nadia Dakka**, d'avoir aimablement accepté d'examiner ce travail et faire partie du jury.*

*Je remercie également le professeur **Zoubida Charrouf**, de m'avoir fait l'honneur de lire mon manuscrit et d'être rapporteur de ma thèse.*

*J'exprime tous mes remerciements au professeur **Katim Alaoui**, pour avoir accepté d'être rapporteur de cette thèse et aussi pour juger ce travail.*

*Mes plus vifs remerciements vont à Madame le professeur **Silvia Fernandez de Mattos**, pour sa compétence, sa bonté, sa rigueur et sa simplicité qui ont énormément contribué à ma formation.*

*A mes amies et collègues **Clara Aceves Luquero, Nawel Merghoub, Ruth Villalonga, Guillem Ramis et Margalida Serra Sitjar** (Cancer Cell Biology Group, Institut Universitari d'Investigació en Ciències de la Salut "IUNICS") pour leur aide, leurs précieux conseils, leur soutien, leur gentillesse et leur bonne humeur. Qu'ils trouvent ici l'expression de mon grand remerciement et ma sincère amitié.*

Thèse présentée par Mlle
Lamiae Belayachi
pour décrocher le diplôme de docteur en
Biotechnologie, génétique et biologie cellulaire (à l'Université des îles Baléares)
et en biologie (à l'Université Mohamed V-Rabat)

Production scientifique

Articles publiés :

Belayachi, L., Aceves-Luquero, C., Merghoub, N., Bakri, Y., de Mattos, S. F., Amzazi, S., & Villalonga, P. (2014). *Retama monosperma* n-hexane extract induces cell cycle arrest and extrinsic pathway-dependent apoptosis in Jurkat cells. *BMC complementary and alternative medicine*, 14(1), 38.

Belayachi, L., Aceves-Luquero, C., Merghoub, N., Bakri, Y., de Mattos, S. F., Amzazi, Villalonga S. P. (2013). *Screening of North African Medicinal Plant Extracts for Cytotoxic Activity against Tumor Cell Lines*. *European Journal of Medicinal Plants*, 3(3), 310-332.

Zakham, F., **Belayachi, L.,** Ussery, D., Akrim, M., Benjouad, A., El Aouad, R., & Ennaji, M. (2011). *Mycobacterial species as case-study of comparative genome analysis*. *Cell Mol Biol*, 57(supp), 1462-1469.

Articles soumis :

Belayachi, L., Aceves-Luquero, C., Merghoub, N., Bakri, Y., de Mattos, S. F., Amzazi, Villalonga S. P. (2014). *Analysis of the biological activity of Marrubium vulgare extracts reveals cytotoxicity of the dichloromethane fraction against leukemia and lymphoma cell lines*.

Belayachi, L., Aceves-Luquero, C., Merghoub, N., Bakri, Y., de Mattos, S. F., Amzazi, Villalonga S. P. (2014). *Induction of cell cycle arrest and apoptosis by Ormenis eriopalis a Moroccan endemic plant in various human cancer cell lines*.

Resumen

El valor medicinal de las plantas es conocido desde siglos, este ha permitido el desarrollo de un gran número de fármacos antitumorales de alta eficacia. En Marruecos, las plantas son importantes para la medicina tradicional, ya que son consideradas una potencial fuente de moléculas bioactivas.

El trabajo presentado en esta tesis coincide con la estrategia nacional de promover las plantas medicinales de Marruecos, desarrollando así el conocimiento ancestral y específico de las distintas especies de plantas.

Cuatro plantas medicinales fueron seleccionadas, en base a un estudio etnobotánica y de acuerdo con sus usos tradicional en medicina. Diez y seis extractos de plantas fueron ensayadas en un panel de líneas celulares humanas, incluyendo líneas celulares de tumores sólidos y hematológicos, así como fibroblastos no transformados.

Los ensayos de viabilidad revelaron que al menos uno de los extractos de planta mostró actividad citotóxica en la mayoría de las líneas celulares testadas, siendo los valores de IC₅₀ para la mayoría de los extractos cercanos a 30 ug/mL.

Posteriormente, nos enfocamos en los efectos anti apoptóticos y anti-leucemia de Rm-HE, el cual mostro un efecto marcado en las células Jurkat promoviendo el arresto de ciclo celular y un apoptosis dependiente de JNK, lo cual fue evidenciado por el aumento de los niveles de Fas-L y la activación de las caspases 8,3,7 y 9.

También se llevo a cabo un estudio detallado del mecanismo de acción de Mv-DF, determinándose la distribución del ciclo celular y la inducción de apoptosis mediante citometría de flujo para las líneas celulares Jurkat y Jeko-1. Después de 48h de tratamiento se detectó un aumento de la caspases 3 y 7, una disminución de la expresión de la proteína antiapoptótica Bcl-2 y la inactivación de PARP.

En relación a Ormenis Erioplepis, la medición de la viabilidad celular nos permitió calcular los valores de IC₅₀ para los extractos más prometedores, específicamente Oe-DF y Oe-HE. El análisis de citometría de flujo junto con la monitorización de los niveles de p-H2A.X mostró que tanto las fracciones de diclorometano como las de hexano indujeron quiebres dobles en el ADN (doble strands brakes) junto con arresto en G1 (Jurkat, Jeko-1 and LN229), y G2/M (PC-3) lo que concuerda con datos obtenidos para la actividad de las caspasas.

Además se llevo a cabo un estudio de la composición química y de los compuestos bioactivos mediante GC-MS para Rm-HE, Mv-DF Oe-DF y Oe-HE.

Finalmente los datos obtenidos en este estudio deberían honrar al conocimiento ancestral y proporcionar un soporte científico al uso de estas plantas por herbolarios y curadores tradicionales, además de promover futuros estudios.

Palabras claves: plantas medicinales, farmacopea de Marruecos, *Inula viscosa*, *Retama monosperma*, *Marrubium vulgare*, *Ormenis erioplepis*, citotoxicidad, cancer, apoptosis.

Résumé

L'exploitation des pharmacopées traditionnelles, notamment l'utilisation des plantes connues souvent depuis des siècles pour leur valeur médicinale; a permis depuis toujours, la mise en place d'un très grand nombre de médicaments anticancéreux, d'une très grande efficacité.

Au Maroc, les plantes occupent un rôle très important dans la médecine traditionnelle qui constitue l'une des sources importantes pour le criblage de nouvelles molécules potentiellement bioactives à visée thérapeutique.

Le travail présenté dans cette thèse s'inscrit dans le cadre de la stratégie nationale visant à valoriser les plantes médicinales marocaines, et cela, par le développement du savoir ancestral et les connaissances spécifiques des espèces végétales.

Ainsi, Quatre plantes médicinales ont été sélectionnées, sur la base d'une étude ethnobotanique et en fonction de leurs utilisations en médecine traditionnelle, et ensuite, évaluées pour leurs effets cytotoxiques vis-à-vis d'un large panel de lignées cellulaires cancéreuses de différentes origines.

Les résultats de viabilité cellulaire ont révélé qu'au moins un des extraits de chacune des plantes : *Inula viscosa*, *ormenis erioplepis* (asteracées), *Retama monosperma* (fabacées) et *Marrubium vulgare* (lamiacées) a été en mesure d'exercer une forte activité cytotoxique contre la majorité des lignées cellulaires testées. Les valeurs d'IC₅₀ enregistrées ont été dans la plupart des cas $\leq 30\mu\text{g/ml}$.

Par la suite, nous montrons l'effet anti-leucémique spécifique que présente l'extrait hexanique de *Retama monosperma* sur la lignée cellulaire « Jurkat ». Rm-HE a montré une cytotoxicité significative contre ces cellules, alors qu'il s'est avéré essentiellement inefficace contre les fibroblastes normaux de souris (NIH3T3) et les lymphocytes normaux (TK-6). L'apoptose induite par ce dernier, était partiellement dépendante de JNK et caractérisée par une surexpression du Fas-L ainsi qu'une activation des caspases 8, 3, 7 et 9.

Une étude détaillée du mécanisme d'action de Mv-DF a également été réalisée, ses effets sur la distribution du cycle cellulaire et l'induction de l'apoptose ont été mis évidence par une analyse cytométrique montrant des arrêts en G1 pour les deux lignées (Jurkat et Jeko-1), accompagnés par une forte augmentation de l'activité des caspases effectrices 3 et 7, une inhibition des protéines anti-apoptotique (Bcl-2 et Mcl-1), ainsi qu'une inactivation du PARP, après 48h du traitement.

Concernant *Ormenis erioplepis*, les mesures de viabilité cellulaires, nous ont permis de calculer les valeurs d'IC₅₀ pour les extraits les plus prometteurs, notamment, Oe-DF et Oe-HE sur les lignées les plus sensibles. L'analyse de la distribution du cycle cellulaire et le taux d'expression de la p_{H2A.X} a montré qu'ils induisaient une cassure des doubles brins d'ADN accompagnée par un arrêt du cycle en phase G1 chez les cellules : Jurkat, Jeko-1 et LN229, et en G2/M chez les cellules PC-3. Ces données sont en accord parfait avec l'augmentation de l'activité caspases observée après 48h du traitement.

Enfin, à titre qualitatif, une étude de la composition chimique ainsi qu'une identification des composés bioactifs majeurs, des extraits Rm-HE, Mv-DF, Oe-DF et Oe-HE ont été réalisées par CG-MS.

Ainsi, les données obtenues dans cette étude honorent le savoir-faire ancestral et apportent un vrai support scientifique à l'utilisation de ces plantes par les herboristes et les guérisseurs traditionnels, tout en offrant un point de départ imminent à plusieurs études à venir.

Mots clés: plantes médicinales, pharmacopée marocaine, *Inula viscosa*, *Retama monosperma*, *Marrubium vulgare*, *Ormenis eriolepis*, cytotoxicité, cancer, apoptose.

Abstract

Plants are known for centuries for their medicinal value; that allowed the establishment of a large number of anticancer drugs with a very high efficiency. In Morocco, they play a very important role in traditional medicine, which is one of the major sources for new potentially bioactive molecules.

The work presented in this thesis is a part of the national strategy, promoting Moroccan medicinal plants by developing ancestral knowledge and specific knowledge of plant species.

Four medicinal plants were selected, on basis of the ethnobotanical study and according to their uses in traditional medicine. Sixteen plant extracts were screened on a panel of human cancer cell lines including cell types from solid and haematological cancers origins as well as non-transformed murine fibroblasts. Cell viability assays revealed that at least one extract from each plant was able to exert cytotoxic activity against the majority of cell lines tested, the IC₅₀ values of the active extracts were in most cases ≤ 30 $\mu\text{g/ml}$.

Next we focused on the anti-leukemic and apoptotic-inducing effects of Rm-HE, who exhibited a dramatic effect on Jurkat cells by promoting cell cycle arrest and partially JNK-dependent apoptosis characterized by an increase in Fas-L levels together with activation of caspases 8, 3, 7 and 9.

A detailed study of Mv-DF mechanism of action was also carried out, its effects on the distribution of cell cycle and induction of apoptosis were detected by flow cytometric analysis for both (Jurkat and Jeko-1) lines, accompanied by a sharp increase in the activity of the effector caspases 3 and 7 and a significant inhibition of anti-apoptotic proteins (Bcl-2 and Mcl-1) as well as the PARP inactivation after 48 hours of treatment.

Regarding *Ormenis erioplepis*, cell viability measurements, have allowed us to calculate the IC₅₀ values for the most promising extracts, particularly Oe-DF and Oe-HE on the most sensitive lines. Cytometry analysis accompanied by p-H2A.X levels monitoring, showed that both the Dichloromethane Fraction and Hexanic Extract induce DNA double stranded breaks (DSBs) accompanied by cell cycle arrest in G1 (Jurkat, Jeko-1 and LN229) and G2/M (PC-3) phases which is agreed with the caspase activity observed.

A qualitative study of the chemical composition and the major bioactive compounds of Rm-HE, Mv-DF Oe-DF and Oe-HE were performed by GC-MS.

Finally, the data obtained in this study should honor the ancestral knowledge and provide a real scientific support for the use of these plants by herbalists and traditional healers, while providing an immediate starting point for many future studies.

Keywords: medicinal plants, Moroccan pharmacopoeia, *Inula viscosa*, *Retama monosperma*, *Marrubium vulgare*, *Ormenis erioplepis*, cytotoxicity, cancer, apoptosis.

Sommaire

Liste des figures	1
Liste des tableaux	4
Liste d'abréviations	5
Introduction	7
Synthèse bibliographique	10
I- Recherche de nouvelles molécules anticancéreuses d'origine naturelle	11
1- Critères de sélection des plantes	11
1-1 une origine géographique commune: Le Maroc	11
1-2 utilisation des plantes en médecine traditionnelle.....	11
2- Importance thérapeutique des molécules d'origine naturelle	12
3- Biologie des molécules d'origine végétales.....	13
4- Criblage pharmacologique et nouvelles substances anticancéreuses.....	14
5- Description et propriétés pharmacologiques des plantes sélectionnées	16
5-1 <i>Inula viscosa</i> L. (Ait).....	16
5-2 <i>Retama monosperma</i> L. (Boiss.).....	17
5-3 <i>Marrubium vulgare</i>	18
5-4 <i>Ormenis erirolepis</i>	19
II- Les cancers	19
1- Généralités et origines.....	19
2- Epidémiologie.....	20
3- Traitements	21
3-1 La chirurgie	21
3-2 La radiothérapie	22
3-3 La chimiothérapie.....	23
3-3-1 Les agents alkylants.....	23
3-3-2 Les antimétabolites	24
3-3-3 Les agents du fuseau.....	24
3-3-4 Les inhibiteurs des topoisomérases	24
3-3-5 Les inhibiteurs du protéasome.....	24
4- La cellule cancéreuse	25
4-1 La génétique.....	25

4-2	<i>La signalisation cellulaire</i>	26
4-3	<i>Le microenvironnement tumoral</i>	27
5-	<i>Les hémopathies malignes</i>	29
5-1	<i>Les leucémies</i>	29
5-1-1	<i>La leucémie lymphoïde aiguë</i>	29
5-2	<i>Les lymphomes</i>	30
5-2-1	<i>Les lymphomes non-hodgkiniens</i>	30
5-2-2	<i>Le lymphome à cellules du manteau</i>	31
III-	<i>Le cycle cellulaire</i>	31
1-	<i>Description</i>	31
2-	<i>Régulation</i>	32
3-	<i>Points de surveillance (Checkpoint)</i>	34
3-1	<i>Détection de lésions (DNA Damage)</i>	34
4-	<i>Arrêt du cycle cellulaire</i>	35
4-1	<i>Le checkpoint en G1</i>	35
4-2	<i>Le checkpoint en S</i>	36
4-3	<i>Le checkpoint en G2/M</i>	36
IV-	<i>La mort cellulaire</i>	39
1-	<i>L'autophagie et la paraptose</i>	39
2-	<i>La nécrose</i>	40
3-	<i>La nécrose programmée</i>	40
4-	<i>L'apoptose : Thérapie de choix en cancérologie</i>	41
4-1	<i>Caractéristiques</i>	41
4-2	<i>les modulateurs de l'apoptose</i>	42
4-2-1	<i>Les caspases</i>	42
4-2-2	<i>La famille des protéines Bcl-2</i>	44
4-2-2-1	<i>Les membres antiapoptotiques</i>	46
4-2-2-2	<i>Les membres pro-apoptotiques</i>	46
4-2-3	<i>La mitochondrie</i>	47
4-2-4	<i>Les récepteurs de mort cellulaire</i>	47
4-2-2-2	<i>CD95 (Fas) et CD95L (FasL)</i>	48
4-3	<i>Les voies de signalisation de l'apoptose</i>	50
4-3-1	<i>La voie intrinsèque, ou mitochondriale</i>	50

4-3-2	<i>La voie extrinsèque</i>	53
4-3-3	<i>Dialogue entre les 2 voies</i>	55
4-3-4	<i>Relations entre les voies de survie et apoptose</i>	57
4-3-4-1	<i>La voie JNK</i>	57
4-3-4-2	<i>La voie Ras/MAPK</i>	58
4-3-4-3	<i>La voie Rho/ROCK</i>	58
4-3-4-4	<i>La voie Jak/STAT</i>	59
V-	<i>Objectifs de la thèse</i>	60
	<i>Matériels et méthodes</i>	62
1-	<i>Préparation des extraits de Plantes</i>	63
1-1	<i>Extraction par macération</i>	63
1-2	<i>Extraction par soxhlet</i>	63
2-	<i>Effecteurs pharmacologiques</i>	66
3-	<i>Culture cellulaire</i>	68
3-1	<i>Lignées cellulaires tumorales</i>	68
3-2	<i>Lignées cellulaires de contrôle</i>	70
3-3	<i>Conditions de culture et viabilité cellulaire</i>	70
3-4	<i>Conservation des cellules</i>	71
4-	<i>Évaluation de la cytotoxicité des extraits in vitro</i>	71
4-1	<i>Test de viabilité</i>	71
4-2	<i>Détermination de l'IC50</i>	72
5-	<i>Étude du mécanisme d'action des extraits bioactifs</i>	72
5-1	<i>La morphologie cellulaire par colorants d'exclusion et microscopie optique</i>	72
5-2	<i>Cytométrie en flux</i>	73
5-2-1	<i>Marquage à l'iodure de propidium et étude du cycle cellulaire</i>	73
5-2-2	<i>Double marquage à l'Annexine V/Iodure de Propidium</i>	74
5-3	<i>Mesure de l'activité caspases 3-7</i>	74
5-4	<i>Analyse de l'expression des protéines relatives à l'apoptose</i>	75
6-	<i>Caractérisation des composés chimiques des extraits bioactifs</i>	76
6-1	<i>Dérivation au TMS</i>	77
6-2	<i>Conditions chromatographiques</i>	77
6-3	<i>Détection par spectrométrie de masse et analyse quantitative</i>	77
	<i>Résultats</i>	78

<i>Chapitre I</i>	79
<i>Chapitre II</i>	111
<i>Chapitre III</i>	140
<i>Chapitre IV</i>	166
<i>Conclusions et perspectives</i>	197
<i>Annexes</i>	207
<i>Références bibliographiques</i>	

Liste des figures

Figure-1 : Biosynthèse des substances originaires du métabolisme secondaire.....	14
Figure-2 : Nouveaux médicaments anticancéreux mis sur le marché durant la période 1981-2010.....	15
Figure-3 : La Cancérogenèse	20
Figure-4 : Les six propriétés fondamentales d'une cellule tumorale	25
Figure-5 : signalisation cellulaire et cancer	27
Figure-6 : Les cellules du microenvironnement	28
Figure-7 : Vue générale du cycle de vie de la cellule.....	32
Figure-8 : Complexes CDK-Cycline durant le cycle cellulaire.	33
Figure-9 : Détection des dommages d'ADN.	35
Figure-10 : Exemples de signalisations en aval des kinases ATM et ATR	38
Figure-11 : Structure, classification et fonctions des caspases.	43
Figure-12 : Les protéines de la famille Bcl-2	45
Figure-13 : Structure du récepteur Fas	48
Figure-14 : Structure de Fas Ligand	49
Figure-15 : Voie intrinsèque de l'apoptose	52
Figure-16 : Voie extrinsèque de l'apoptose	54
Figure-17 : Les deux voies de signalisation apoptotique	56
Figure 18 : Protocole d'extraction par soxhlet des plantes de l'étude	65
Figure 19 : Structure chimique de la Doxorubicine.....	66
Figure 20 : Structure chimique de l'Etoposide	66
Figure 21 : Cellule de comptage sous microscope optique.....	72
Figure 22 : Cell viability analysis of Glioblastoma cell lines	98
Figure 23 : Cell viability analysis of Acute T-cell Leukemia and Mantle Cell Lymphoma cell lines	99
Figure 24 : Cell viability analysis of colon cancer cell lines	101

Figure 25: Cell viability analysis of Prostate cancer and Osteosarcoma cell lines.	102
Figure 26: Cell viability analysis of Mouse embryonic fibroblast cell line	103
Figure 27: Cellular effects analysis of the most active extracts on LN229 glioblastoma cell line	105
Figure 28: Cellular effects analysis of the active extracts on SW620 colon cancer cells	107
Figure 29: Cellular effects analysis of the active extracts on PC-3 prostate cancer cells ...	109
Figure 30: Cytotoxic activity of RetamamonospermaHexanic Extract (Rm-HE)	131
Figure 31: Analysis of cell cycle effects and cell apoptosis of Rm-HE in Jurkat cells.....	132
Figure 32: Effects of Rm-HE on apoptosis and caspases activation in Jurkat cells	134
Figure 33: Characterizion of the effects of Rm-HE on apoptotic signaling mediators.....	136
Figure 34: Chemical structures of the major bioactive compounds ofRm-HE	137
Figure 35: Cytotoxicity of Marrubium vulgare extracts and fractions against Jurkat and Jeko-1 cell lines	157
Figure 36: Analysis of Mv-DF cell cycle distribution and apoptosis induction in Jurkat and Jeko-1 cells	158
Figure 37: Effect of Marrubium vulgare on caspase activation and cleavage in Jurkat and Jeko-1 cells	160
Figure 38: Characterization of the effects of the Mv-DF on apoptotic signaling mediators in Jurkat and Jeko-1 cells.....	162
Figure 39: Chromatograph and chemical structures of the major bioactive compounds ofRm-HE.....	163
Figure 40: Cytotoxic activity of Ormenis eriolepis organic extracts and fractions in a panel of cancer and non-transformed cell lines	183
Figure 41: Dose-response analysis of (Oe-DF) and (Oe-HE)	184
Figure 42: Cell cycle distribution analysis of Jurkat, Jeko-1, LN229 and PC-3 under Ormenis eriolepis treatement	185
Figure 43: Effect of (Oe-DF) and (Oe-HE) on p-H2AX expression levels	187
Figure 44: Effect of (Oe-DF) and (Oe-HE) on apoptosis induction	188
Figure 45: Effect of (Oe-DF) and (Oe-HE) on caspase activity induction	190

Figure 46: <i>Effect of (Oe-DF) and (Oe-HE) in presence of a panel of signaling pathways inhibitors</i>	191
Figure 47: <i>Chromatographs of (Oe-DF) and (Oe-HE)</i>	192
Figure 48: <i>Chemical structures of (Oe-DF) and (Oe-HE) bioactive compounds</i>	193

Liste des tableaux

Tableau-1: Critères morphologiques pour l'identification des cellules apoptotiques et nécrotiques	73
Tableau-2: Liste et caractéristiques des anticorps primaires et secondaires employés	76
Table-3: Ethnobotanical data and some reported pharmacological activities of plants species used in this study	86
Table-4: Cell lines used in the study related to the cells type and diseases	87
Table-5: IC ₅₀ values of extracts (ME, HE) and fractions (DF, AF) of <i>Inulaviscosa</i> (Iv), <i>Retamamonosperma</i> (Rm), <i>Ormeniseiriolepis</i> (Oe) and <i>Marrubiumvulgare</i> (Mv) against selected cell lines	93
Table-6: Compounds in hexanic extract of <i>Retama monosperma</i> identified by CG/MS	138
Table-7: Compounds present in dichloromethane fraction of <i>Marrubium vulgare</i> identified by CG/MS	164
Table-8: Compounds present in dichloromethane fraction of <i>Ormenis eiriolepis</i> identified by CG/MS	192
Table-9: Compounds present in the hexanic extarct of <i>Ormenis eiriolepis</i> identified by CG/MS	195

Liste d'abréviations

BAD: Bcl-2-associated death promoter

BAX: Bcl-2-associated X protein

Bcl-xl: B-cell lymphoma-extra large

Bcl-2: B-cell lymphoma 2

BIM: Bcl-2-like protein 11

B-NHL: B-cell Non-Hodgkin's Lymphoma

Caspase: Cystéinyl ASpartic acid-Protease

cFlip : Cellular FLICE-like inhibitory protein

CG/MS: chromatographie phase gazeuse couplée à la spectroscopie de masse

DMSO: DiMéthylSulfOxyde

DNA: Deoxyribonucleic acid

ERK: extracellular-signal-regulated kinase

FACS: Fluorescence Activated Cell Sorter

H2AFX: H2A histone family, member X

Hdm2: Human double minute 2 homolog

Hif-1 : Hypoxia-inducible factors 1

IC50 : Concentration Inhibitrice de 50% de l'activité

IV-HE: *Inula viscosa* Hexanic extract

IV-DF: *Inula viscosa* Dichloromethane Fraction

IV-ME: *Inula viscosa* Methanolic Extract

IV-AF: *Inula viscosa* Ethyl acetate Fraction

JAK3: Janus kinase 3

JNK: c-Jun N-terminal kinases

Mcl-1: Induced myeloid leukemia cell differentiation protein

MEK: Mitogen-activated protein kinase kinase

Mv-HE: *Marrubium vulgare* Hexanic Extract
Mv-ME: *Marrubium vulgare* Methanolic Extract
Mv-DF: *Marrubium vulgare* Dichloromethane Fraction
Mv-AF: *Marrubium vulgare* Ethyl Acetate Fraction
Oe-HE: *Ormenis eiriolapis* Hexanic Extract
Oe-ME: *Ormenis eiriolapis* Methanolic Extract
Oe-DF: *Ormenis eiriolapis* Dichloromethane Fraction
Oe-AF: *Marrubium vulgare* Ethyl Acetate Fraction
PARP: Poly (ADP-Ribose) Polymérase
PBS: Phosphate Buffered Saline
PS: PhosphatidylSérine
Rm-HE: *Retama monosperma* Hexanic Extract
Rm-ME: *Retama monosperma* Methanolic Extract
Rm-DF: *Retama monosperma* Dichloromethane Fraction
Rm-AF: *Retama monosperma* Ethyl Acetate Fraction
T-ALL: T-cell acute lymphoblastic leukemia
TNRF: Tumor necrosis factor receptor
TRAIL: TNF-related apoptosis-inducing ligand

Introduction

L'étiologie des cancers n'est pas la même au sein des pays développés et des pays en voie de développement. Dans ces derniers, le cancer est un problème de santé publique émergent. Le nombre de nouveaux cas de cancer entre les années 2000 et 2020 est estimé à 150 millions (Magrath, 2007). En Afrique plus particulièrement, les prévisions de l'incidence annuelle du cancer en 2020 sont estimées à 804.000 cas et le nombre de morts suite à un cancer, à 626.000 (OMS, 2007). Au Maroc, et en l'absence d'un registre national de cancer, les données sont limitées aux cas enregistrés dans certains établissements de santé, et qui concordent pour le qualifier en tant que problème majeur de santé publique.

La pratique de la médecine traditionnelle, est basée sur l'expérience ancestrale, généralement transmise par le compagnonnage. Reléguée au second plan dans les sociétés occidentales, cette médecine n'a plus de frontières de nos jours, devenant même de plus en plus une alternative thérapeutique dans les pays développés (Stewart *et al* ; 1998). Au Maroc, les plantes occupent une place importante et jouent un rôle très important dans la médecine traditionnelle, qui elle-même est largement employée dans divers problèmes de santé.

Au plan historique, bien qu'on ait constaté durant une certaine période, plus précisément de 1864 au début de ce siècle, une tendance à vouloir bannir la médecine par les plantes, leur utilisation comme source de médicaments et de nouvelles molécules actives a beaucoup gagné en popularité depuis quelques années. Aujourd'hui nous assistons au retour de l'utilisation des plantes médicinales pour favoriser la santé. Chaque plante médicinale a une définition qui lui est propre et une utilisation spécifique. (Kansole, 2009). Par ailleurs, de nombreux médicaments doivent leur existence à la biodiversité du milieu naturel qui constitue une source importante de substances actives. De nombreux médicaments anticancéreux d'origine naturelle ou dérivés de composés naturels, sont actuellement utilisés en chimiothérapie anticancéreuse. L'exploitation des pharmacopées traditionnelles, notamment l'utilisation des plantes connues souvent depuis des siècles pour leur valeur médicinale ; a permis la mise en place d'un très grand nombre de médicaments anticancéreux d'une très grande efficacité.

Le travail présenté dans cette thèse s'inscrit dans le cadre de la stratégie nationale visant à valoriser les plantes médicinales Marocaines, et cela, par le développement du savoir ancestral et les connaissances spécifiques des espèces végétales.

Le but de cette étude était le criblage cytotoxique des extraits organiques de quatre plantes médicinales, traditionnellement utilisées dans la médecine populaire marocaine, sur un large panel de lignées cellulaires cancéreuses liquides et solides de différentes origines. Ainsi

qu'une étude détaillée de leurs mécanismes d'action sur les lignées cellulaires les plus sensibles, accompagnée par une identification de leurs compositions chimiques.

De ce fait, et après une étude bibliographique faisant état des dernières connaissances sur les plantes médicinales et leur utilisation comme source d'agents anticancéreux, nous avons introduit le cancer comme étant une pathologie à plusieurs facettes. D'abord, nous avons fait le tour de ces origines, en mettant l'accent sur la cellule cancéreuse, notamment, sa biologie, ses caractéristiques génétiques et son microenvironnement tumoral, en passant par la distribution du cycle cellulaire et les différentes voies de signalisation impliquées dans la survie ou dans l'induction de la mort cellulaire programmée, et spécialement l'apoptose induite à visée thérapeutique.

Notre approche expérimentale a été axée dans un premier temps sur l'étude de la cytotoxicité, *in vitro*, en criblant les extraits organiques des plantes : *Inula viscosa*, *Retama monosperma L*, *Marrubium vulgare* et *ormenis eriolepis* Coss. sur un large panel de lignées cellulaires cancéreuses.

La deuxième partie de ce travail concerne l'étude des mécanismes d'action des extraits des plantes *Retama monosperma L*, *Marrubium vulgare* et *ormenis eriolepis* Coss, ayant montré des activités cytotoxiques importantes ainsi que l'identification de leurs compositions chimiques.

Les résultats obtenus ont été regroupés sous formes de publications scientifiques ainsi, les chapitres s'articulent:

- I. : le criblage cytotoxique *in vitro* et la détermination des extraits et fractions prometteurs.
- II. : l'analyse de l'effet anti-leucémique spécifique que présente l'extrait hexanique de *Rétama monosperma L* sur la lignée cellulaire « Jurkat ».
- III. : l'étude du mécanisme d'action de la fraction dichlorométhane de *Marrubium vulgare* sur les lignées « Jurkat et Jeko-1 ».
- IV. : la caractérisation de l'effet anti-tumoral de la fraction dichlorométhane et de l'extrait hexanique d'*ormenis eriolepis* Coss sur les lignées « Jurkat, Jeko-1, LN229 et PC-3 ».

En plus des quatre articles rédigés dans le cadre de ma recherche, la présente thèse comprend une discussion générale et une conclusion générale qui placent dans un contexte plus global, les résultats communs aux trois plantes.

Synthèse bibliographique

I- Recherche de nouvelles molécules anticancéreuses d'origine naturelle :

1- Critères de sélection des plantes:

Une sélection soignée des plantes à étudier, permet un meilleur isolement des substances nouvelles ainsi qu'une rigoureuse mise en place des nouvelles voies d'applications dans les différents domaines, précisément pharmaceutiques. Dans cette optique, un certain nombre de critères ont été pris en compte lors de notre étude.

1-1 une origine géographique commune: Le Maroc

Le continent africain regorge de plantes médicinales extraordinairement variées. Sa flore présente un intérêt scientifique tout particulier en raison de sa diversité, de son ancienneté et de sa très grande richesse (Sofowora A; 1993).

La position géographique du Maroc à l'extrême nord-ouest de l'Afrique ainsi que la grande diversité de son écologie, notamment des montagnes, du littoral et des zones désertiques, ont favorisé le développement d'une flore très riche qui est estimée à 4200 plantes et 1500 espèces introduites (Hmamouchi M., 2001).

Le Maroc occupe une place non négligeable sur le marché international des productions de plantes médicinales et aromatiques. Cette production repose principalement sur une biomasse spontanée constituée d'une flore riche et variée à endémisme très marqué et l'existence d'écosystèmes qui offrent des conditions écologiques favorables (Bellakhdar J., 1997).

Tous ces facteurs contribuent à faire du Maroc l'une des zones de choix pour la mise en lumière de nouvelles molécules. Sa flore constituant un des vastes réservoirs d'espèces capable de fournir un point de départ pour le développement de nouveaux médicaments. Cette existence de matériel thérapeutique non découvert est une des raisons les plus importantes qui militent en faveur de la protection de la biodiversité.

En travaillant sur des plantes endémiques, aux caractéristiques potentiellement uniques, la probabilité est plus grande de mettre en évidence des nouvelles voies thérapeutiques, élargissant ainsi la connaissance de la biodiversité du pays.

1-2 utilisation des plantes en médecine traditionnelle :

La pratique de la médecine traditionnelle, qui remonte à la nuit des temps dans les différentes peuplades, est basée sur l'expérience ancestrale, généralement transmise par le compagnonnage. Reléguée au second plan dans les sociétés occidentales, cette médecine n'a plus de frontières.

es de nos jours, devenant même de plus en plus une alternative thérapeutique dans les pays développés (Stewart *et al* ; 1998).

Au Maroc, les plantes occupent une place importante et jouent un rôle très important dans la médecine traditionnelle, qui elle-même est largement employée dans divers problèmes de santé. Les tradipraticiens ont leur base propre de diagnostic, le plus souvent symptomatique mais déclarent traiter diverses maladies. La médecine traditionnelle échappe à plusieurs égards à l'approche rationnelle, l'empirisme étant prédominant. Hormis les pratiques mystico magiques, la médecine traditionnelle utilise des remèdes à base de plantes mais aussi de produits minéraux et animaux. Les enquêtes ethno pharmacologiques menées dans les différentes régions marocaines ont permis d'inventorier plusieurs recettes utilisées pour soigner différentes pathologies (Hseini S. *et al.*, 2007; Jouad H. *et al.*, 2001; Salhi S. *et al.*, 2010).

L'usage empirique des différentes préparations traditionnelles est donc extrêmement important pour une sélection efficace de plantes puisque la plupart des métabolites secondaires de plantes employées en médecine moderne ont été découverts par l'intermédiaire d'investigations ethnobotaniques (Gurib-Fakim, 2006).

L'augmentation accrue de la demande mondiale ainsi que le nombre croissant d'utilisateurs dans les différents domaines d'application, ont pu susciter la mise en œuvre d'un plan d'action national et d'une stratégie de développement du secteur des plantes aromatiques et médicinales (USAID, 2008), et cela, par la valorisation des plantes médicinales accompagné du développement du savoir ancestrale et des connaissances spécifiques des espèces végétales.

2- Importance thérapeutique des molécules d'origine naturelle:

Au plan historique, bien qu'on ait constaté durant une certaine période, plus précisément de 1864 au début de ce siècle, une tendance à vouloir bannir la médecine par les plantes, leur utilisation comme source de médicaments et de nouvelles molécules actives a beaucoup gagné en popularité depuis quelques années. Aujourd'hui nous assistons au retour de l'utilisation des plantes médicinales pour favoriser la santé. Chaque plante médicinale a une définition qui lui est propre et une utilisation spécifique (Kansole, 2009).

La plupart des espèces végétales qui poussent dans le monde entier possèdent des vertus thérapeutiques, car elles contiennent des principes qui agissent directement sur l'organisme. On les utilise aussi bien en médecine classique qu'en phytothérapie : elles présentent, en effet, des avantages dont les médicaments sont souvent dépourvus. Le criblage à haut débit de

nouveaux principes actifs d'origine naturelle, la maîtrise des tests biochimiques appropriés et le développement de méthodes de synthèse efficaces, ont permis le développement de substances d'intérêt médical dans de nombreux domaines thérapeutiques.

Le nombre d'études sur l'élucidation des phénomènes physiologiques et biochimiques reliés aux plantes a également connu une hausse importante. Cela s'explique principalement par deux causes: d'abord, la perspective pour les pays en voie de développement de pouvoir utiliser de façon « scientifiquement validée» les plantes médicinales connues depuis plusieurs générations; puis, la « révolution verte» mondiale, qui tend à véhiculer la croyance voulant que les remèdes d'origine naturelle sont plus sécuritaires et moins dangereux pour le corps humain que les drogues synthétiques (Rates, 2001).

3- Biologie des molécules d'origine végétales :

Aujourd'hui, les plantes sont utilisées pour l'extraction de principes actifs, ce travail a particulièrement commencé avec l'isolation au début du 19^{ème} siècle de la morphine. En effet, l'utilisation du potentiel bioactif d'extraits de certaines plantes a commencé avec la production de drogues, ou l'isolation de toxines (Heinrich and Gibbons, 2001).

Sur le plan biologique, il est intéressant de constater que les molécules végétales ayant donné origine aux produits synthétiques, ou étant elles-mêmes des produits actifs de plantes médicinales, proviennent de diverses voies métaboliques. Ces molécules peuvent être soit communes à plusieurs organismes vivants, soit très spécifiques au niveau du métabolisme végétal. La base principale de ce métabolisme est la production par photosynthèse des hydrates de carbone de faible masse moléculaire, les «oses». C'est à partir de ces «oses» que le métabolisme végétal peut suivre deux voies: le métabolisme primaire, qui donne origine aux métabolites nécessaires à la survie de la plante (hydrates de carbones, lipides, protéines et acides nucléiques), et le métabolisme secondaire, qui donne naissance à une variété infinie de substances dont les rôles dans la plante sont assez variés. Toutefois, à l'image même de la grande biodiversité végétale, plusieurs de ces substances présentent différentes activités biologiques qui peuvent varier entre les familles de plantes ou entre les espèces de la même famille. Outre leurs fonctions pour les végétaux, un grand nombre de ces métabolites présentent des propriétés pharmacologiques extrêmement prometteuses, justifiant par là les grands efforts de recherche dirigés vers les substances médicinales dans les plantes (Santos, 1999) (Figure 1).

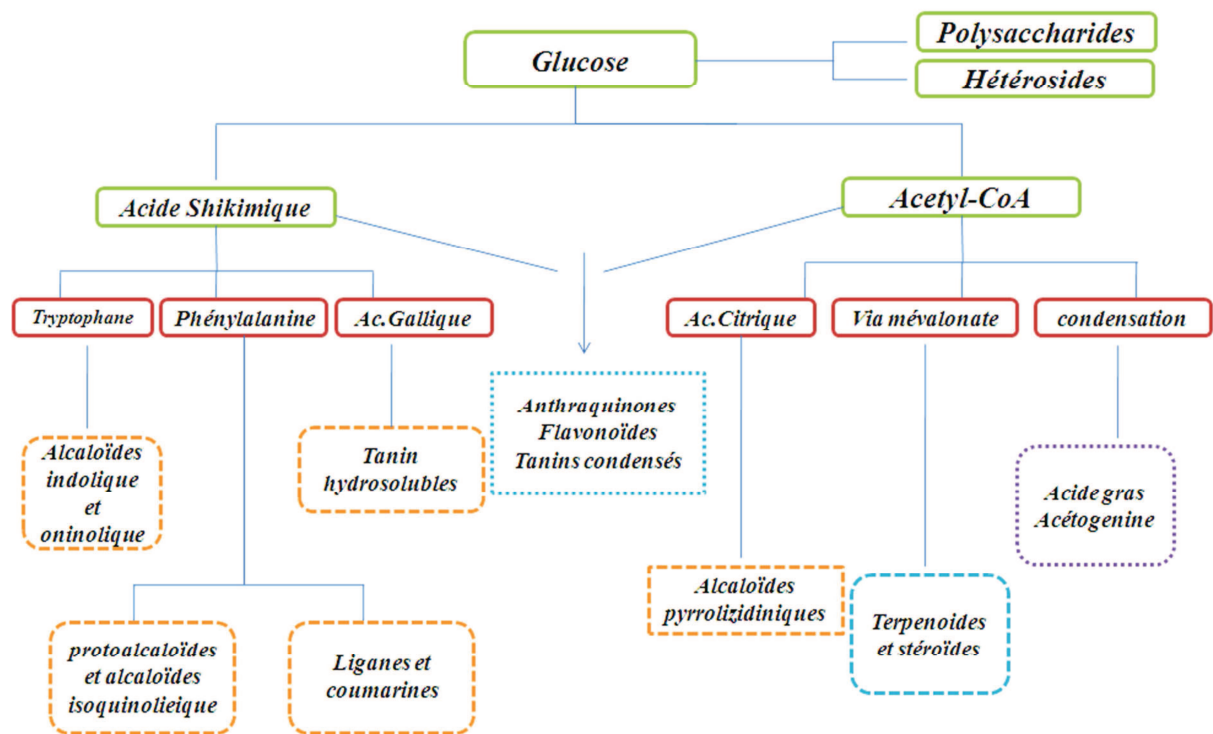


Figure-1 : Biosynthèse des substances originaires du métabolisme secondaire Adapté d'après (Santos., 1999).

4- Criblage pharmacologique et nouvelles substances anticancéreuses

Depuis plus de 40 ans, de nombreux médicaments provenant de milieu naturel sont actuellement utilisés en chimiothérapie anticancéreuse (Kinghorn A.D. *et al.*, 2009). Une récente étude, a montré que parmi les produits pharmaceutiques mis sur le marché durant la période 1981-2010, 55,79% des médicaments actuels sont constitués ou dérivés de produits naturels et seulement 44,21% des médicaments sont totalement synthétiques (Newman D.J. and Cragg G.M., 2012) (Figure 2).

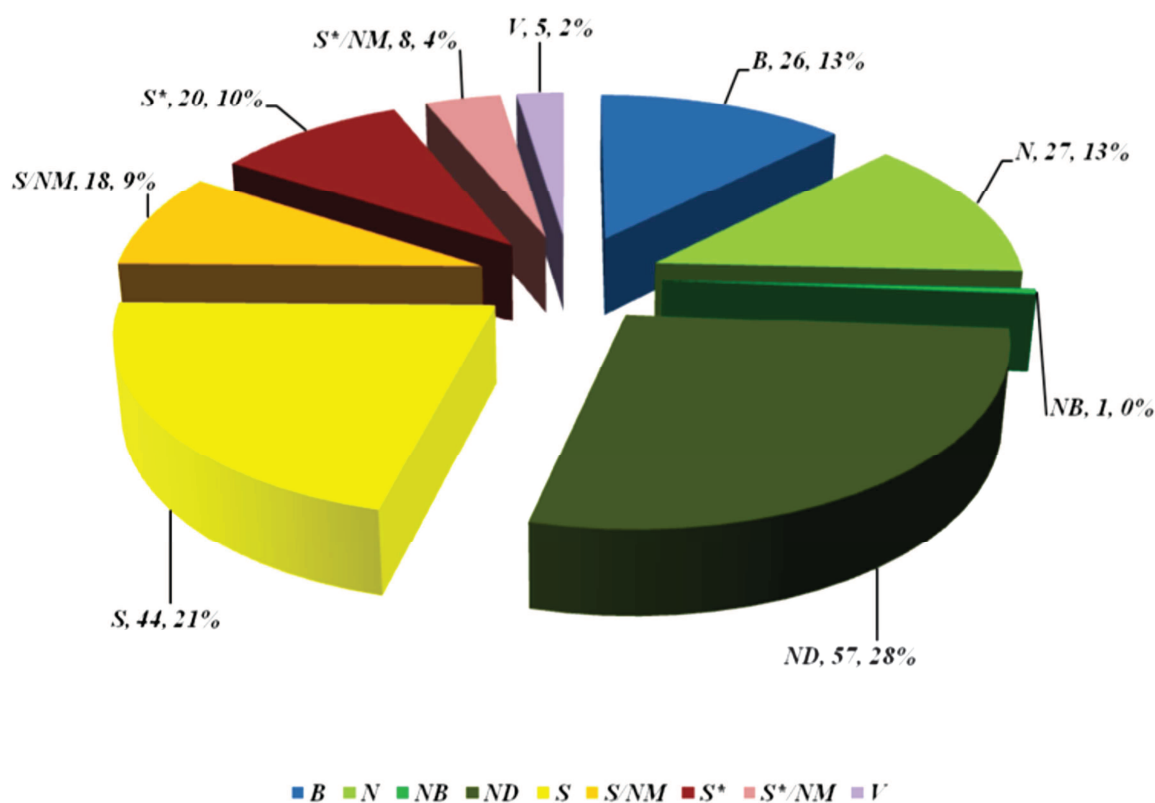


Figure-2 : Nouveaux médicaments anticancéreux mis sur le marché durant la période 1981-2010. S: médicaments totalement synthétiques; S*: médicaments synthétiques inspirés d'un pharmacophore naturel; V: vaccins; B: médicaments d'origine biologique (peptides, protéines); N: produits d'origine naturelle; ND: dérivés de produits naturels (hémi-synthétiques); NM: produits naturels mimés. D'après (Newman D.J. and Cragg G.M., 2012).

L'utilisation des substances naturelles en tant qu'agents anticancéreux a commencé par l'isolement de la podophyllotoxine à partir d'une plante de la famille des Berbéridée (*Podophyllum peltatum*) ; étant extrêmement toxique, des modifications structurales ont eu lieu pour donner naissance à deux composés antitumoraux (le teniposide et l'étoposide) puissants inhibiteurs de la topo-isomérase II (Lv M. and Xu H., 2011).

La recherche de substance actives d'origine végétale a permis la découverte de plusieurs classes de molécules tels que, les vinca-alcaloïdes comme la vinblastine et la vincristine, inhibiteurs de l'assemblage de la tubuline isolées de *Catharanthus roseus*, les taxoides comme le taxol et le paclitaxel, qui sont des inhibiteurs du désassemblage des microtubules découvert aux états unis et isolées de l'if du pacifique *Taxus brevifolia* et le docetaxel, préparé par hémisynthèse à partir d'un diterpène isolé de l'if européen *Taxus baccata*. Un autre type de molécules, qui sont dérivées de la camptothécine comme le topotecan et l'irinotecan, sont des inhibiteurs de la topo-isomérase I et proviennent de l'étude chimique d'un arbre ornemental

chinois *Camptotheca acuminat*. Ainsi plusieurs produits naturels à effet anticancéreux ont pu voir le jour et sont actuellement en phase clinique I et II (Zhou D.C. *et al.*, 1995 ; Li Y. *et al.*, 2011; Nobili S. *et al.*, 2009).

Il existe d'autres sources biologiques fournissant des principes actifs originaux comme les micro-organismes et le milieu marin. Certains antibiotiques produits par différentes souches de streptomycètes jugés toxiques pour une utilisation antibactérienne, sont dotés d'admirables propriétés anti-tumorales. Les anthracyclines (doxorubicine, daunomycine, etc.) sont des agents intercalant de l'ADN qui empêchant sa réplication et sa transcription, en inhibant la topo-isomérase II (Binaschi M. *et al.*, 2001; Hortobagyi G.N., 1997). Les bléomycines, comportant 13 peptides différents extraits de streptomycètes *verticillus*, s'intercalent dans l'ADN, puis entraînent des cassures de l'ADN après liaison avec un ion métallique et production de radicaux libres oxygénés (Colombo P. *et al.*, 2001). Dans le domaine marin, les substances nouvelles ayant une activité biologique potentiellement intéressante seraient au moins 100 fois plus nombreuses que celle des organismes terrestres. Ainsi, la description de quelques 3000 à 4000 substances nouvelles synthétisées par des organismes marins (Mayer and Hamann, 2004; Mayer and Gustafson, 2004), algues, invertébrés ou microorganismes, a permis de caractériser près de 500 nouvelles substances actives : anti-tumorales, antivirales, immunomodulatrices, antibiotiques, antifongiques, etc... . Actuellement, trois médicaments d'origine marine sont commercialisés : un antibiotique (la céphalosporine®), un antiviral (la vidarabine®) et un antitumoral (la cytarabine®).

5- Description et propriétés pharmacologiques des plantes sélectionnées

5-1 *Inula viscosa* L. (Ait).

Inula viscosa (L.) Ait. = (syn. *Dittrichia viscosa* L. W. Greuter ou *Cupularia viscosa* G.) est une plante pérenne appartenant à la famille des Astéracées, connu sous le nom d'Aunée visqueuse, et a pour nom vernaculaire Magramane-Terhala.

Dans la région méditerranéenne, *Inula viscosa* est utilisée dans la médecine populaire depuis des décennies pour ces propriétés anti-inflammatoire, antipyrétique, antiseptique, balsamiques, ainsi que pour le traitement des troubles gastro-duodénaux (Lauro et Rolih, 1990; Fontana *et al.*, 2007; Çelik and Aslantürk, 2010; Musthaba *et al.*, 2011).

Dans la médecine traditionnelle gréco-arabe, les racines de *Inula viscosa* "Tayon" sont également utilisés contre la toux comme agent antiseptique et expectorant, qui desserre le flegme et soutient les muqueuses (Saad and Said, 2011).

Elle est utilisée dans la médecine populaire marocaine comme vermifuge, diurétique, anti-anémique et comme cataplasme pour la douleur rhumatismale et la tuberculose, ainsi qu'expectorant pour le traitement de bronchite (Hmamouchi, 2001). Dans la région du Sud-Est du Maroc, des décoctions de feuilles et de racines ont été utilisés pour traiter l'hypertension (Tahraoui *et al.*, 2007), tandis que la décoction de feuilles et fleurs de *Inula viscosa* ensemble avec *Inula helenium* et *Inula conyza* ont été inclus dans la liste des plantes médicinales utilisées traditionnellement pour traiter le diabète au Maroc (Eddouks *et al.*, 2007). En Jordanie, la médecine traditionnelle attribue plusieurs utilisations à *Inula viscosa*, comme le traitement du cancer (Afifi-Yazar *et al.*, 2011), autant que antihelminthic (Afifi-Yazar *et al.*, 2011; Talib and Mahasneh, 2010a), myorelaxant (Hudaib *et al.*, 2008; Talib and Mahasneh, 2010a). En Palestine, les feuilles de *Inula viscosa* sont utilisées pour la relaxation musculaire et pour traiter l'infertilité (Kaileh *et al.*, 2007). Dans certaines régions de la Calabre (sud de l'Italie), décoction des racines d'*Inula viscosa* a été rapporté pour être utilisé dans le traitement de la peau et des irritations d'origine allergique (Passalacqua *et al.*, 2007). Elle est également inclus dans la large palette d'herbes utilisées contre psoriasis (Musthaba *et al.*, 2011).

Inula viscosa L. a fait l'objet de plusieurs études démontrant les multiples activités biologiques et pharmacologiques de cette plante ; telle que l'activité anti-inflammatoire (Hernandez V. *et al.*, 2007 and Manez S. *et al.*, 2007), l'activité antimicrobienne (Ali-Shtayeh M.S. *et al.*, 1998; Bssaibis F. *et al.*, 2009; Maoz M. and Neeman I., 1998), antifongique (Cafarchia C. *et al.*, 2002; Maoz M. and Neeman I., 2000; Qasem J.R. *et al.*, 1995), hypoglycémiant et hypolipidémiant (Zeggwagh *et al.*, 2006), antiulcérogénique (Alkofahi A. and Atta A.H., 1999), antioxydante (Schinella G.R. *et al.*, 2002) antivirale (Sassi A.B. *et al.*, 2008) et l'activité antitumorale (Merghoub. *et al.*, 2009).

5-2 *Retama monosperma* L. (Boiss.)

Les espèces du genre *Retama* poussent spontanément au sud de l'Europe et sur le pourtour du bassin méditerranéen : Maroc, Algérie, Égypte, Espagne (Andalousie), Portugal, Italie, et dans le désert sud asiatique. *Retama monosperma* L. Boiss. (Synonyme : *Genista monosperma* est également connu sous le nom de genêt blanc, nom vernaculaire : R'tam) est une plante appartenant à la famille des Fabacées. C'est une fabacée ligneuse, arbustive qui colonise les sables dunaires. Elle est aussi connue pour ses fleurs ornementales et son rôle dans la fixation des dunes. Au Maroc, elle est commune dans les vallées, les régions sableuses

des hauts plateaux et sur les versants des zones internes du grand Atlas, là où le climat est semi-aride (Maghrani M. *et al.*, 2005a).

En médecine traditionnelle marocaine, les espèces *Retama monosperma* (L.) Boiss. et *Retama raetam* (Forsk.) Webb. Dénom local « *Rtem* » sont utilisées comme vomitif, purgatif, vermifuge, cicatrisant, vulnérable, sédatif, antihelminthique et antiseptique (Bellakhdar J., 1997 ; Benrahmoune I.Z., 2003).

Les plantes du genre *Retama* ont fait l'objet de plusieurs études démontrant les multiples activités biologiques et pharmacologiques de cette plante ; telle que l'activité antihypertensive and diurétique (Eddouks *et al.*, 2007; Maghrani M. *et al.*, 2005b), l'activité antimicrobienne (Awen B.Z. *et al.*, 2011; Edziri H. *et al.*, 2007), cytotoxique (Conforti F. *et al.*, 2004; Edziri H. *et al.*, 2007), hypoglycémiant (Algandaby *et al.*, 2010; Maghrani M. *et al.*, 2005a), antioxydante, antivirale (Edziri H. *et al.*, 2010) et anti tumoral (Merghoub *et al.*, 2009).

5-3 *Marrubium vulgare*

Marrubium vulgare [synonyme: *Marrubium album* (Cariot et Saintlarge)] est une plante de la famille des Lamiacées, d'aspect blanchâtre à odeur forte et désagréable, de 30 à 80cm de hauteur (Kaabeche M., 1990). C'est une plante vivace, à tiges épaisses, cotonneuses, très feuillées, qui se perpétue et se multiplie par des bourgeons nés sur la tige souterraine. Au Maroc elle est connue sous le nom vernaculaire de Merrîwt, elle pousse dans toute l'Afrique du nord et presque dans toute l'Europe ainsi qu'au centre et Sud-ouest de l'Asie. Au Maroc la décoction de la plante est employée comme antidiabétique, elle est prescrite également comme anti-typhoïdique, anti-diarrhéique, fébrifuge, anti-ictérique, expectorant, tonique et stimulant (pour les malades alités). En usage externe, la plante hachée et couramment utilisée en cataplasmes sur le front et les tempes contre les fièvres, et sur les abcès. En médecine traditionnelle Tunisienne on reconnaît au Marrube un certain nombre de propriétés : le décocté préparé à partir de la plante entière est utilisé dans l'hypertension, les hémorroïdes et aussi antirhumatismal, analeptique cardiaque, antiseptique pulmonaire. Il est réputé pour purifier le lait des femmes qui allaitent. Il est utilisé en bain de bouche et en usage externe dans le traitement des brûlures (Bellakhdar, J., 1997).

Un grand nombre des propriétés traditionnellement attribué à *Marrubiumvulgare* , ont été confirmées par une intensive recherche moderne couplée à différents essais cliniques, tels que les effets : antispasmodique (Schlemper *et al.*, 1996), antinociceptif (De Jesus *et al.*, 2000), analgésique (Meyre-silva *et al.*, 2005), antioxydant, anti cholestérol (Berrougui *et al.*, 2006), anti oedematogene (Stulzer *et al.*, 2006) et antidiabétique (Erdogan Orhan *et al.*, 2010a ;

Elberry *et al.*, 2011 ; Boudjelal *et al.*, 2012 ; Pukalskas *et al.*, 2012). Par ailleurs, des extraits organiques de cette plante ont également montré une activité antitumorale (Belayachi *et al.*, 2013) ainsi qu'un certain effet sur les troubles neurologiques (Erdogan Orhan *et al.*, 2010b).

5-4 *Ormenis erirolepis* Maire.

Ormenis erirolepis Maire., également connu sous le nom vernaculaire (gartofa ou jartofa ou Hellala), est une plante bisannuelle appartenant à la famille des Astéracées, connu sous le nom de camomille marocaine et appartenant à la famille des Astéracées. Cette plante est une endémique du Maroc, elle est employée comme tonique gastro-intestinal, sudorifique et antidiabétique. Utilisée en décoction comme stomachique, emménagogue et vermifuge. Peu d'étude ethnopharmacologique ont été consacrée à cette espèce, quelques études démontrant ces activités tels que l'activité antibactérienne (El Hanbali F. *et al.*, 2004), activité antileishmania (El Hanbali F. *et al.*, 2005) et activité antifongique (Amani H. *et al.*, 2008) ont pu voir le jour.

II- Les cancers:

1- Généralités et origines:

Les cancers sont des maladies connues depuis l'Antiquité, Celsus (28 av. J.-C. - 50 ap. J.-C.), médecin romain, traduit le mot grec "carcinos" en "cancer" (crabe, écrevisse) et introduit par contre, tel quel, le mot grec "carcinoma" dans le langage latin. Le terme "cancer" désignait alors plutôt des ulcères d'allure maligne avec pénétration profonde tandis que le terme "carcinoma" désignait plutôt des lésions pré-malignes et malignes de type plus superficiel.

De nos jours, le cancer est définie comme étant une pathologie maligne, qui implique trois étapes distinctes mais interconnectées qui sont : l'initiation (cellule normale qui se transforme en cellule initiée), la promotion (cellule initiée qui devient une cellule pré-néoplasique) et la progression (cellule pré-néoplasique qui devient une cellule néoplasique) (Thangapazham *et al.*, 2006).

Les cellules atteintes par ces altérations (cellules malignes) ne suivent plus le processus normal de mort cellulaire programmée, l'apoptose, et deviennent immortelles. Elles se nourrissent par formation de nouveaux vaisseaux sanguins ; on appelle ce processus l'angiogenèse. Ces cellules ont la capacité d'envahir et de coloniser les tissus environnants. Le développement d'un cancer est le résultat d'une combinaison entre, d'une part, l'activation de

la prolifération cellulaire et, d'autre part, l'inhibition de signaux restreignant le potentiel prolifératif des cellules.

Tout cancer a une étape d'initiation, cette étape met en cause différents agents conduisant à leur développement. Classiquement, on distingue les agents initiateurs et les agents promoteurs. Les agents initiateurs sont des agents génotoxiques qui induisent une lésion définitive de l'ADN. Par contre, les agents promoteurs n'induisent pas de lésions de l'ADN mais favorisent l'expression d'une lésion, préalablement induite par un agent initiateur (Colditz *et al.*, 2006) (Figure 3).

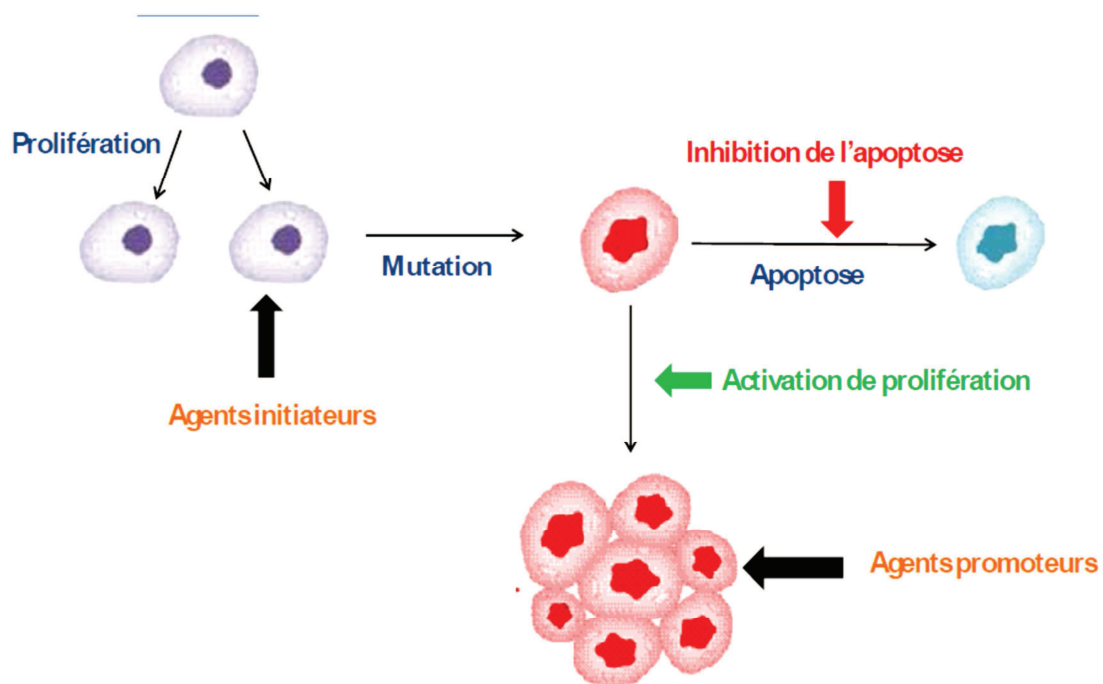


Figure-3 : cancérogenèse : activation de la prolifération cellulaire et inhibition de l'apoptose : rôle des agents initiateurs et promoteurs.

2- Épidémiologie:

L'étiologie des cancers n'est pas la même au sein des pays développés et des pays en voie de développement. Dans les pays développés les cancers les plus fréquents reflètent les profils hormonaux et diététiques de leur population, on note une forte incidence pour les cancers du sein, colorectal et de la prostate. Par contre dans les pays en voie de développement l'origine est surtout infectieuse et une forte prévalence est enregistrée pour les cancers du cerveau, du foie, et de l'estomac (Mellstedt, 2006).

L'*American Cancer Society* (ACS) estime à 1,5 millions le nombre de nouveaux cas de dépistés en 2009, et à 560.000 le nombre de malades mort de leur cancer en 2009 (Jemal *et al.*, 2009). En Europe, le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC) a estimé, en

2005, le nombre de nouveaux cas de cancer à 2,9 millions de personnes par an, et à 1,7 millions, le nombre de décès par le cancer (Boyle and Ferlay, 2005).

Dans les pays en voie de développement le cancer est un problème de santé publique émergent. Le nombre de nouveaux cas de cancer entre les années 2000 et 2020 est estimé à 150 millions (Magrath, 2007), d'où la nécessité pour ces pays d'avoir des plans de contrôle du cancer (Lingwood *et al.*, 2008).

En Afrique plus particulièrement, les prévisions de l'incidence annuelle du cancer en 2020 sont évaluées à 804.000 cas et le nombre de morts suite à un cancer, à 626.000 (OMS, 2007). Face à cette situation l'OMS a initié et encouragé la mise en place de registres de cancer dans ces pays, afin de mieux en contrôler l'expansion (Valsecchi and Steliarova-Foucher, 2008). Malgré l'existence de ces registres de cancer en Afrique, l'enregistrement des cas de cancer reste très peu développé; ce qui a un impact sur la fiabilité des données collectées. Il existe donc très peu d'études épidémiologiques sur le cancer dans les pays en voie de développement (Gondos *et al.*, 2008). La survie à long terme, la première détection et de bonnes données sur le traitement efficace sont annoncés comme des défis à relever dans la plupart des études africaines (Alatise *et al.*, 2007).

Toutefois on note une grande variabilité des taux de survie au niveau mondial, l'étude CONCORD, qui a concerné 1,9 millions de malades vivant sur les 5 continents, rapporte un taux de survie à 5 ans très élevé et de l'ordre de 80%, en Amérique du nord, en Australie, au Japon et en Europe de l'Ouest. En Amérique du Sud, en Europe de l'Est et en Afrique ce taux varie entre 40 et 60% avec une survie nettement plus faible en Afrique comparé aux autres pays en voie de développement (Coleman *et al.*, 2008).

Le contrôle du cancer apparait donc comme une nécessité mondiale. L'OMS estime qu'en 2020 le nombre de nouveaux cas de cancer par an sera de 16 millions, dont 60% surviendront dans les pays en développement (Lingwood *et al.*, 2008). Les changements démographiques à eux seuls engendreront une augmentation de la prévalence actuelle du cancer de 50% en 2020 (Ngoma ; 2006).

3- Traitements:

3-1 La chirurgie :

La chirurgie reste le traitement de référence pour beaucoup de cancers dans les pays en voie de développement où la radiothérapie et la chimiothérapie ne sont souvent pas disponibles ou accessibles (Sanogo *et al.*, 2004). Elle correspond à un traitement de première intention pour

guérir les patients souffrant de tumeur solide. Toutefois, même dans le cas d'une tumeur bien localisée et délimitée, le seul traitement par chirurgie reste souvent bien insuffisant. Malheureusement près de 50 % de ces patients développent un cancer sur d'autres sites après l'intervention : foie, poumons, etc. Cette seconde atteinte survient dans 90% des cas endéans les 5 années post opératoires (Tjandra *et al.*, 2007).

Auparavant, la chirurgie curative était synonyme de chirurgie mutilante pour le patient atteint d'une tumeur solide. Aujourd'hui avec la chirurgie laparoscopique et de la microchirurgie endoscopique transanale tel n'est plus le cas pour le patient (Kahnamoui *et al.*, 2007; Bemelman, 2005). Ainsi, en fonction du type d'intervention chirurgicale réalisée (résection partielle, résection totale avec transplantation/ablation, ablation), il semble que la survie à 5 ans soit améliorée. Cependant, une étude comparative entre la chirurgie ouverte et la chirurgie laparoscopique n'a montré aucune différence statistiquement significative en termes de survie (Buunen *et al.*, 2009).

Certes le progrès en terme de techniques chirurgicales a permis une diminution du nombre de récidives locales, mais la chirurgie reste insuffisantes et très limitée dans le cas des cancers ayant déjà développé des métastases. C'est pourquoi dans bien des cas, on adjoint la radiothérapie et/ou la chimiothérapie à la chirurgie.

3-2 La radiothérapie:

La radiothérapie est une technique qui consiste à traiter le cancer et d'autres maladies au moyen de rayonnements ionisants. Ces derniers détruisent les cellules de la zone traitée (le « tissu cible »), qu'elles soient cancéreuses ou normales, en endommageant leur matériel génétique, l'empêchant ainsi de proliférer. La nécessité de préserver l'ADN des cellules normales a conduit au développement de techniques plus performantes regroupées sous l'appellation IGRT (Image Guided Radiation Therapy) et radiothérapie adaptative (ART) (Lefkopoulos *et al.*, 2007).

Toutefois et malgré les effets bénéfiques de la radiothérapie, tous les patients n'ont pas la même sensibilité aux radiations ce qui limitent leur utilisation (Pollard and Gatti, 2009; Birgisson *et al.*, 2007).

Plus d'un million de patients par an sont traités par radiothérapie dans les pays industrialisés, seule ou combinée avec d'autres types de traitement (Tubiana, 2009).

Elle reste le traitement de choix des pathologies urologiques malignes et offre des opportunités de combinaison avec la chirurgie pour le traitement des tumeurs à un stade

avancé (Coleman *et al.*, 1996). Au niveau des tumeurs inopérables, elle est le seul traitement de choix associée ou pas à une chimiothérapie (Corvo, 2007).

3-3 La chimiothérapie:

Avec la chirurgie et la radiothérapie, la chimiothérapie “cytotoxique” dite aussi “conventionnelle” ou “à large spectre”, constitue la médication phare dans le traitement du cancer. Son objectif est de détruire ou de stopper, de façon la plus spécifique possible, la multiplication des cellules malignes de l’organisme inaccessibles aux autres méthodes. Elle est prescrite au cas par cas, différents protocoles ont été établis, variant selon le type de tumeur (localisation, taille, disséminations éventuelles) et divers paramètres liés au malade (surface corporelle, poids, âge, état clinique), conférant à ce volet thérapeutique une grande malléabilité. Il est possible de distinguer diverses applications concrètes à la chimiothérapie :

- **Combinée** (ou polychimiothérapie), qui se caractérise par une association entre différentes molécules dans le but d’anticiper les résistances au traitement.
- **Néoadjuvante** (ou préopératoire), se pratiquant avant la chirurgie ou la radiothérapie afin de réduire le volume tumoral initial (facilite le geste opératoire).
- **Adjuvante** (ou postopératoire), intervenant après la chirurgie ou la radiothérapie pour atteindre les cellules indécélables ou ayant migré hors de la tumeur initiale
- **Palliative** pour une stabilisation d’une maladie chronique.
- **Concomitante** (coopération spatiale, additivité des effets anti tumoraux, potentialisation d’un des traitements par l’autre).

3-3-1 Les agents alkylants:

Ce sont des composés électrophiles, interagissant avec les bases de l’ADN (adénine, thymine, guanine et cytosine) par le transfert d’un radical alkyle en un ou deux sites. Ces alkylations n’étant pas réparables par les processus naturels de correction, elles provoquent irrémédiablement la mort cellulaire. Ils ciblent, de façon peu spécifique, les cellules tumorales, entraînant des effets secondaires agressifs par toxicité envers les cellules saines. On distingue plusieurs catégories comme :

- ✓ Les moutardes azotées (le Melphalan, le Cyclophosphamide et l’Ifosfamide).
- ✓ Les nitroso-urées (la Carmustine, la Lomustine et la Streptozocine).
- ✓ Les dérivés du platine : organoplatinés (la Carboplatine, la Cisplatine et l’Oxaliplatine).

3-3-2 Les antimétabolites :

Les antimétabolites sont des analogues des composés nécessaires à la synthèse de novo des acides nucléiques. Ils inhibent la synthèse de l'ADN et plus accessoirement de l'ARN, en se substituant à eux ou en inhibant les enzymes essentielles à leur synthèse. Cette classe médicamenteuse regroupe trois familles d'antagonistes : les puriques (ou antipuriques), les pyrimidiques (ou antiprimidiques) et les foliques (ou antifoliques).

3-3-3 Les agents du fuseau:

Les agents du fuseau interagissent avec le cytosquelette cellulaire. Ces puissants composés agissent sur les fuseaux de microtubules, issus de la polymérisation de tubulines, en empêchant soit leur construction, soit leur déconstruction. Il s'agit respectivement de poisons et de stabilisants du fuseau, (ou vinca-alcaloïdes), extraits initialement de la pervenche de Madagascar, et de l'autre, les stabilisants du fuseau (ou taxanes), extraits de l'if européen.

3-3-4 Les inhibiteurs des topoisomérases:

Il existe deux topoisomérases complémentaires aux structures et aux mécanismes d'action différents. La première est un monomère capable d'agir sur un seul brin de la double hélice, tandis que la deuxième est constituée de plusieurs unités d'homodimères aptes à opérer sur les deux brins de l'ADN. Les inhibiteurs de la topoisomérase I et II, empêchent la reconstitution de l'ADN après formation de complexes de clivage, ce qui aboutit à l'arrêt de la réplication et l'apoptose cellulaire. Parmi les anti-topoisomérases II se retrouvent en grande partie des antibiotiques tels que : l'Irinotécan, le Topotécan, la Doxorubicine, la Daunorubicine et la Étoposide.

3-3-5 Les inhibiteurs du protéasome:

Pour cette classe médicamenteuse, il n'existe qu'un seul représentant : le bortézomib (Velcade®). Cette molécule est spécialement conçue pour inhiber le protéasome 26S, un large complexe protéique qui joue un rôle essentiel dans le métabolisme des protéines spécifiques. Cette machinerie protéolytique reconnaît et dégrade les protéines dont la conformation, la structure ou la raison d'être n'est pas conforme aux besoins cellulaires.

D'autres cytotoxiques sont disponibles : la bléomycine, la dactinomycine, l'hydroxycarbamide, l'asparaginase, le mitotane et l'anagrélide. Toutefois leurs mécanismes d'action biochimique et moléculaire restent bien inconnus. Pour revue voir (Vuillet-A-Ciles *et al.*, 2014)

4- La cellule cancéreuse :

4-1 La génétique:

Les cellules cancéreuses partagent des caractéristiques qui permettent de les identifier, malgré la grande diversité des cancers (Figure 4). C'est une cellule génétiquement instable, capable d'explorer les fonctions de l'ensemble du génome et de mettre à profit tout avantage prolifératif ou migratoire pour le sélectionner et le transmettre à sa descendance. Les gènes considérés comme ayant une implication significative dans la mise en place du processus tumoral sont les proto-oncogènes, les gènes suppresseurs de tumeurs et les gènes de réparation de l'ADN (Weinberg RA 1994, Hanahan D et Weinberg RA 2000).

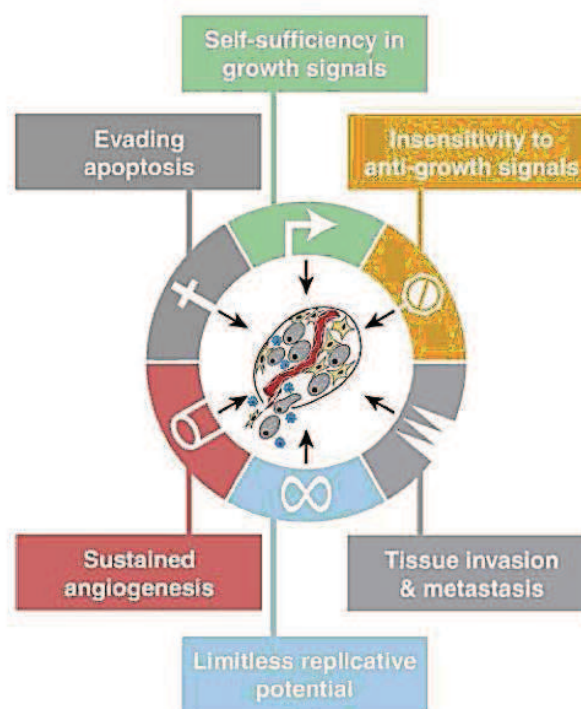


Figure-4 : Les Six Propriétés Fondamentales d'une cellule tumorale. Adaptée d'après (hanahan and weinberg 2011).

Les proto-oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeur coordonnent l'ensemble des réactions biochimiques du cycle cellulaire, du développement, de la prolifération et de la division des cellules ; les proto-oncogènes codent pour des facteurs de croissance, des récepteurs aux facteurs de croissance, des molécules intervenant dans la transduction des signaux mitotiques, des protéines kinases, des phosphatases, des molécules anti-apoptotiques ou des facteurs de transcription.

L'activation de ces oncogènes est un mécanisme dominant qui conduit à favoriser un état permissif pour la prolifération, à permettre la production par la cellule cancéreuse des facteurs

de croissance dont elle a besoin ou à modifier un récepteur de telle sorte qu'il se comporte comme s'il était stimulé en permanence. Alors que les gènes suppresseurs codent pour des protéines inhibitrices de la division cellulaire, ou régulant la différenciation post-mitotique et l'orientation irréversible vers la voie de l'apoptose. La mutation de ces gènes, est principalement liée à la perte de fonction, entraînant ainsi, l'arrêt du contrôle du cycle cellulaire. Les anti-oncogènes p53 et RB sont des gènes très fréquemment altérés dans de nombreux cas de cancers. (Weinberg RA; 1994). Une autre catégorie de gènes majoritairement impliqués dans le développement tumoral est constituée par les gènes de réparation de l'ADN. Ceux-ci codent pour des protéines dont la fonction normale est de corriger les erreurs survenant lors de la réplication de l'ADN au cours de la division cellulaire ou d'éliminer les adduits à l'ADN induits par les cancérigènes chimiques par exemple. Chacun des systèmes de réparation de l'ADN est donc constitué de complexes multiprotéiques qui sont chargés de repérer les séquences comprenant des erreurs et de les éliminer. L'action de ces systèmes de réparation se produit avant la transition G1/S qui constitue l'une des étapes critiques du cycle cellulaire, puisqu'il correspond au moment de la réplication de l'ADN (Kastan MB *et al.*, 1991) et avant la mitose. La combinaison de l'activation d'oncogènes, l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeur et l'échec du système de réparation de l'ADN, sont responsables de la prolifération cellulaire incontrôlée à l'origine des cancers.

4-2 La signalisation cellulaire:

Une tumeur est une néoformation nécessitant une multiplication cellulaire toujours active ; le support de la malignité des cancers est lié à leur aptitude à se disséminer dans l'organisme ; la capacité de survie est une nécessité pour les cellules tumorales. Toutes les voies de signalisation impliquées dans la prolifération et la différenciation, dans l'adhésion et la migration, dans la survie et la mort, pourront servir de support à des altérations oncogéniques. Les voies de signalisation sont constituées de protéines interagissant les unes avec les autres en séquences ordonnées. Certaines de ces protéines ont des fonctions catalytiques (en particulier des phosphorylations et des déphosphorylations, assurées respectivement par des kinases et des phosphatases). Elles sont redondantes et interconnectées; il arrive qu'un message que l'on empêche d'aboutir en bloquant une voie donnée puisse quand même être transmis par l'intermédiaire d'une autre voie où en empruntant un chemin détourné. C'est là l'une des principales causes de la résistance aux thérapies ciblées, l'autre étant représentée par les mutations survenant au niveau des cibles thérapeutiques. Ce circuit complexe est résumé

dans la figure 5, ainsi on peut dire que le cancer est principalement une maladie de la signalisation cellulaire.

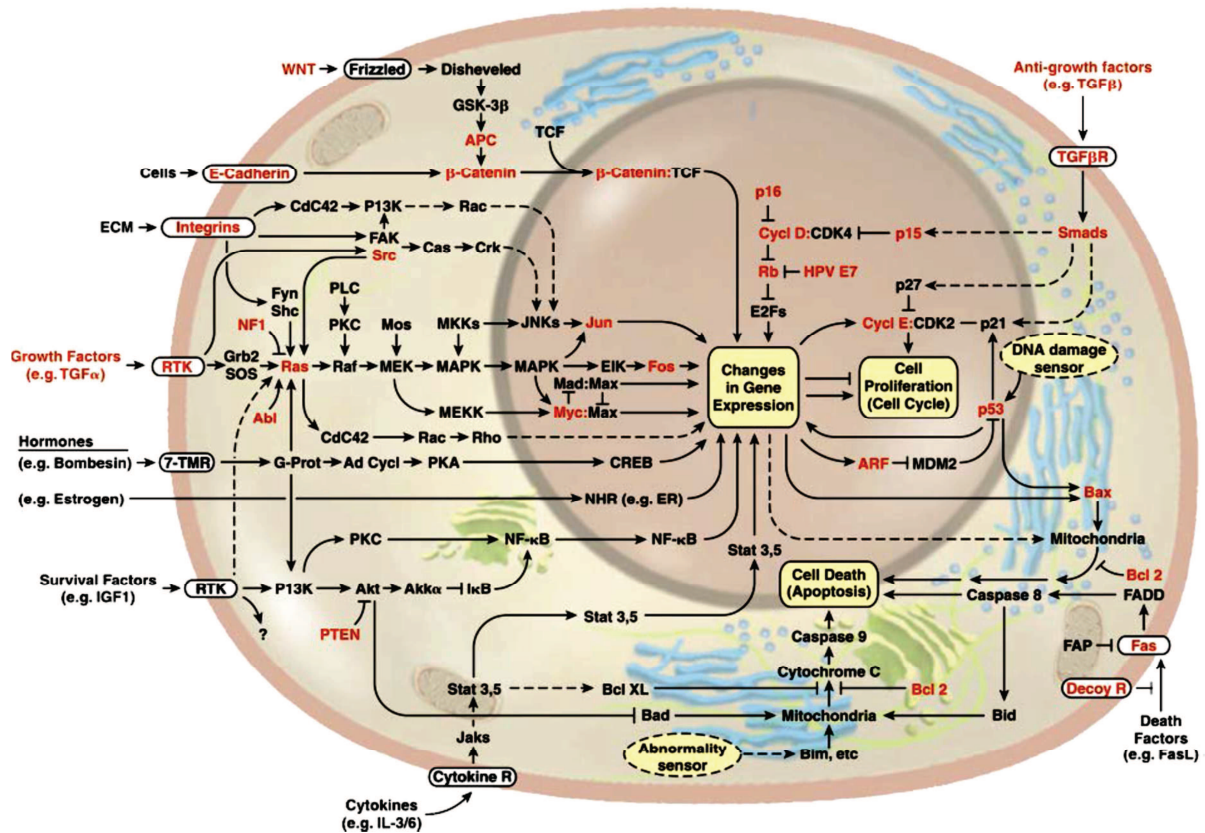


Figure-5 : signalisation cellulaire et cancer, les gènes reconnus pour être altérés dans les cellules cancéreuses sont marqués en rouge (hanahan and weinberg 2000).

4-3 Le microenvironnement tumoral:

Longtemps limitée au domaine de l'immunologie, l'étude du microenvironnement tumoral prend aujourd'hui en considération les différents éléments entourant la cellule tumorale et les interactions structurales et fonctionnelles entre ces partenaires. Le microenvironnement « normal » est complexe et dynamique. Sa composante cellulaire englobe toutes les cellules avoisinantes : les cellules adjacentes appartenant au même tissu et les cellules résidant dans leur environnement direct (fibroblastes, cellules vasculaires, cellules dendritiques, cellules du système immunitaire, etc.). Ces cellules baignent dans la matrice extracellulaire (MEC), qui est un élément déterminant du microenvironnement. C'est en interagissant avec les composants de la MEC que la cellule peut s'ancrer à une localisation particulière ou au contraire, migrer et se déplacer. Le microenvironnement des cellules tumorales est connu sous le nom de stroma tumoral (Figure 6).

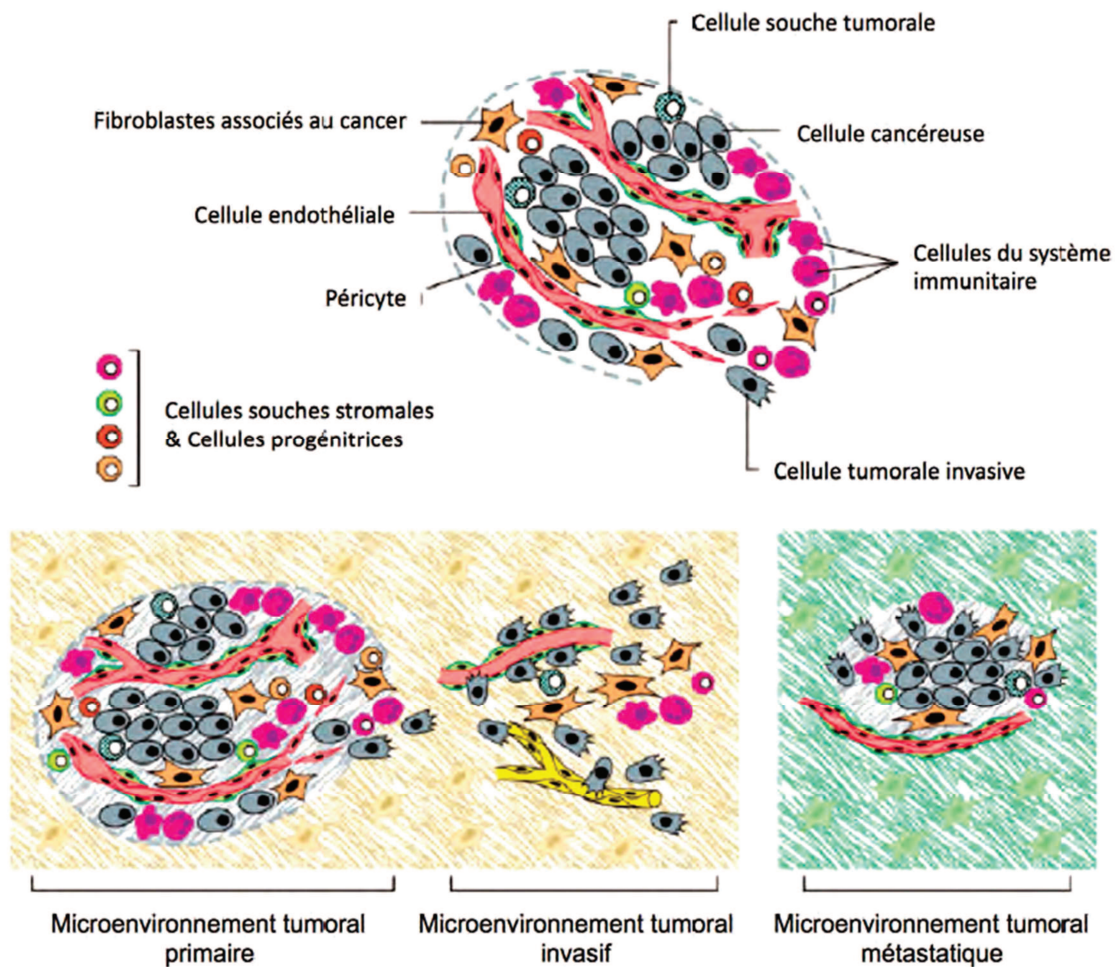


Figure-6 : Les cellules du microenvironnement (adaptée de Hanahan and Weinberg, 2011).

Il diffère « normal » par la composition biochimique de la MEC et surtout par le fait que les populations cellulaires du stroma (fibroblastes, cellules endothéliales, cellules immunes, etc.), bien que non transformées, sont subverties et contrôlées par les cellules tumorales pour répondre à leurs propres besoins. En particulier, les fibroblastes peuvent être activés par des facteurs de croissance tels que le TGF β (transforming growth factor β), des chimiokines telles que MCP1 (monocyte chemotactic protein 1) et/ou des protéases dégradant la MEC, ce qui conduit à une augmentation de leur potentiel de prolifération et à une sécrétion accrue de protéines de la MEC comme les collagènes de type I, la ténascine C et la fibronectine. Ces fibroblastes activés sont appelés CAF, pour « fibroblastes associés aux cancers » (cancer-associated fibroblasts). Les deux processus, cancérisation et perturbation du microenvironnement, sont intimement liés : l'un participant au développement et au maintien de l'autre, et vice versa.

5- Les hémopathies malignes:

Ce sont des néoplasies développés à partir de cellules hématopoïétiques de la moelle osseuse et du système lymphoïde. Elles peuvent se présenter cliniquement sous la forme de leucémies (présence de nombreuses cellules néoplasiques dans le sang circulant et la moelle osseuse) ou de tumeurs solides appelées sarcomes pour les cellules de la moelle osseuse (sarcome myéloïde, sarcome histiocytaire, etc.) ou lymphomes pour les cellules lymphoïdes.

5-1 Les leucémies :

Le terme de leucémie a été proposé par le médecin allemand R. Virchow en 1845, pour désigner des maladies où le sang était constitué en grande partie d'une purée blanche (du grec leukos, blanc et haima, sang) lui donnant un aspect laiteux. Aujourd'hui, les leucémies sont caractérisées par l'accumulation ou la prolifération incontrôlée de cellules hématopoïétiques (précurseurs des cellules sanguines) dans la moelle osseuse et le sang. Elles présentent des aspects différents selon deux caractères principaux : le type de globules concernés et l'évolution, aiguë ou chronique.

En raison des divers types de cellules concernées et de l'évolution de la maladie, les leucémies sont donc définies en quatre grandes catégories:

- ✓ La leucémie myéloïde chronique (LMC)
- ✓ La leucémie lymphoïde chronique (LLC)
- ✓ La leucémie myéloïde aiguë (LMA)
- ✓ La leucémie lymphoïde aiguë (LLA)

Pour la suite de cette évocation bibliographique, c'est La leucémie lymphoïde aiguë (LLA-T) qui nous intéressera particulièrement.

5-1-1 La leucémie lymphoïde aiguë:

Les leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL) sont des proliférations clonales développées à partir d'une cellule lymphoïde bloquée à un stade précoce de sa maturation. Ce sont des cellules anormales histologiquement et inefficaces fonctionnellement. L'immunophénotypage permet de déterminer le type de marqueurs de surface des blastes, c'est-à-dire s'il s'agit de cellules lymphocytaires B ou T. La leucémie lymphoblastique aiguë de type B, ou LLA-B, est la prolifération non régulée de cellules progénitrices engagées dans la lignée lymphocytaire B. La leucémie lymphoblastique aiguë de type T, ou LLA-T, est la prolifération non régulée de cellules progénitrices engagées dans la lignée lymphocytaire T.

Selon la classification de l'OMS de 2008, les LLAs-T ne sont pas divisées selon les facteurs génétiques car ceux-ci ne sont pas clairement associés à des caractéristiques biologiques uniques des LLAs-T. L'immunophénotype identifie et classe alors les blastes dans la lignée lymphocytaire T.

Les anomalies les plus récurrentes dans ce groupe sont les translocations impliquant les locus α et δ des récepteurs des cellules T (TCR) en 14q11.2, le locus β en 7q35 et le locus γ en 7p14-15 avec une liste étendue de partenaires. Ces translocations entraînent la surexpression des gènes partenaires, majoritairement des facteurs de transcription. Cependant, dans les dernières années, la survie à 5 ans des patients atteints de LLA-T s'est considérablement amélioré grâce, en partie, à la mise en évidence d'anomalies chromosomiques impliquant des gènes de tyrosines kinases. Ces patients sont aujourd'hui traités avec des inhibiteurs de tyrosine kinases (Cools; 2010).

5-2 Les lymphomes :

Ce sont des néoplasies se développant à partir de cellules souches donnant les lignées B ou NK/T. Deux grands groupes sont distingués : les lymphomes (ou maladies) de Hodgkin et les lymphomes non hodgkiniens. Les hématologues ont souhaité conserver cette distinction ancienne en raison des différences existant entre ces deux groupes, dans leur présentation clinique, leur évolution, leur pronostic et la stratégie thérapeutique à leur appliquer.

Le lymphome hodgkinien (ou maladie de Hodgkin) se distingue des autres types de lymphome en partie par la présence de cellules de Reed-Sternberg, des cellules malignes géantes découvertes par les scientifiques Reed et Sternberg, d'où le nom donné à ces cellules. Le lymphome non hodgkinien constitue un groupe diversifié de lymphomes, chacun ayant des caractéristiques uniques (Diebold *et al.*, 2008).

Nous nous intéresserons dans cette évocation bibliographique aux lymphomes non hodgkinien, particulièrement le lymphome à cellules du manteau.

5-2-1 Les lymphomes non-hodgkiniens :

Ces néoplasies peuvent réaliser tantôt des leucémies, tantôt des tumeurs solides, les deux présentations pouvant coexister ou se succéder chez un même patient. Trois groupes de lymphomes sont à distinguer selon la morphologie des cellules néoplasiques, en particulier leur taille, et selon leur immunophénotype.

On peut distinguer en fonction de la taille des cellules comparée au noyau d'un macrophage :

- ✓ Les lymphomes de type précurseur : constitués de cellules moyennes, responsables de leucémies aiguës dites lymphoblastiques et parfois de tumeurs (lymphome lymphoblastique) survenant avec une plus grande fréquence chez le sujet jeune, mais avec un 2^e pic après 60-70 ans. Leur phénotype peut ressembler à des éléments précurseurs soit présents au cours de la maturation B (L. lymphoblastique B), soit présents lors de la maturation des cellules T (L. lymphoblastique T).
- ✓ Les lymphomes périphériques à cellules B : Environ 40 % se développent en dehors leur immunophénotype ressemble à celui des différentes populations B des tissus lymphoïdes périphériques.
- ✓ Les lymphomes périphériques à cellules NK/T : Ils sont développés à partir de cellules exprimant un phénotype ressemblant plus ou moins à celui de lymphocytes T périphériques ou de cellules « natural killer » (NK). Chaque entité présente un immunophénotype ressemblant à celui des populations NK/T des tissus lymphoïdes périphériques et du sang. Ils sont aussi souvent appelés « matures » pour cette raison. Il s'agit habituellement de lymphomes agressifs, représentant environ 10 à 15 % de l'ensemble des lymphomes en Occident (Diebold *et al.*, 2008).

5-2-2 Le lymphome à cellules du manteau :

Le lymphome à cellule du manteau est une prolifération lymphoïde B maligne très hétérogène mais très bien définie par la présence d'une translocation caractéristique, la translocation t(11 ; 14) (q13 ; q32) dérégulant la cycline D1, protéine majeure du cycle cellulaire de la phase de transition G1-S. Ce lymphome est caractérisé par une évolution clinique rapidement péjorative et une chimiorésistance aux traitements classiques. Les mécanismes moléculaires et génétiques impliqués dans sa physiopathologie associent une dérégulation de la prolifération cellulaire et des signaux de survie cellulaire, ainsi qu'une dérégulation des gènes de chimiorésistance, avec un haut degré d'instabilité génétique semblant lié à un défaut de la réponse aux altérations de l'ADN (Rolland *et al.*, 2010).

III- Le cycle cellulaire:

1- Description :

La division cellulaire a été décrite il y a 150 ans et fait l'objet de très nombreuses études en raison de son caractère fondamental. C'est un processus essentiel au développement embryonnaire mais également pendant toute la vie de l'organisme adulte. Un adulte humain a environ 100.000 milliards de cellules, toutes originaires d'une même cellule,

la cellule œuf fertilisée. Tous les jours près d'un milliard de cellules doivent être renouvelées, ce qui représente 20 millions de divisions cellulaires par seconde. Le cycle cellulaire est composé de l'interphase, durant laquelle la cellule prépare sa division, et de la phase mitotique (phase M) qui aboutit à la formation des deux cellules filles (Nurse ; 1990). L'interphase est constituée de plusieurs étapes, la phase S de synthèse de l'ADN et les phases G1 (Gap 1) et G2 (Gap 2) qui permettent la préparation des phases S et M, respectivement (Figure 7).

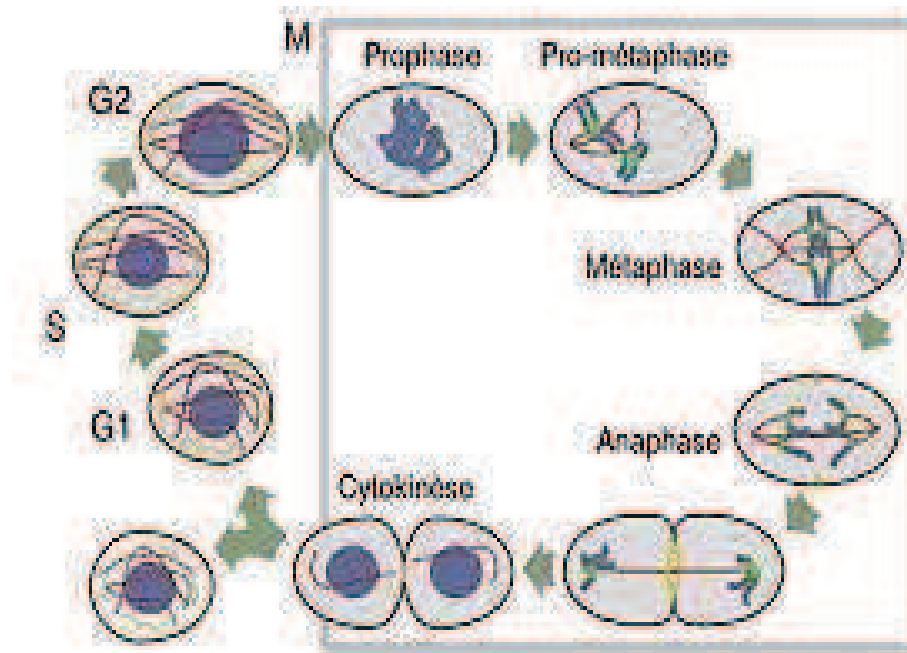


Figure-7 : vue générale du cycle de vie de la cellule comportant quatre phases principales : G1, S, G2 et M (<http://virologie.free.fr>).

2- Régulation:

Le déroulement correct des phases successives du cycle cellulaire est assuré par une famille de kinases sérine-thréonine dites kinases dépendantes des cyclines (CDK). La chronologie de leur activation est déterminée par leurs modifications post-traductionnelles (phosphorylations/déphosphorylations), et par l'association à une cycline, qui constitue la sous-unité régulatrice du complexe enzymatique (Figure 8).

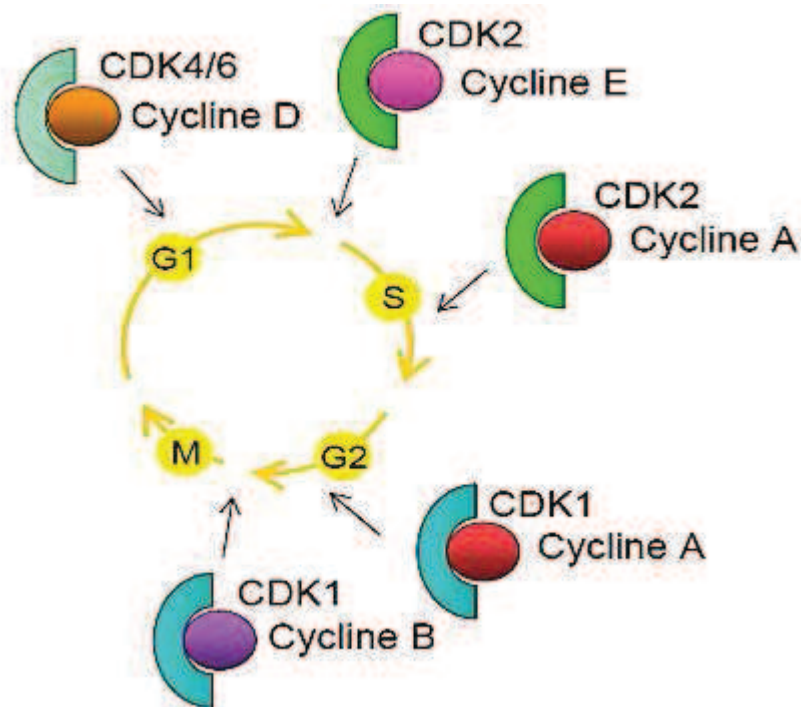


Figure-8 : Complexes CDK-Cycline durant le cycle cellulaire. Les complexes CDK4/6-Cycline D, CDK2-Cycline E et CDK2-Cycline A contrôlent l'interphase alors que les complexes CDK1-Cycline A et CDK1-Cycline B contrôlent la mitose (Viallard; 2001).

On distingue les cyclines dites G1 (cyclines C, D1-3 et E) qui contrôlent la progression en phase G1 et la transition G1/S, et les cyclines dites mitotiques (cyclines A et B) qui interviennent à la transition G2/M et en mitose. Les complexes cycline/CDK activés phosphorylent (et en conséquence inhibent), entre autres, la protéine suppresseur de tumeur pRb qui bloque le passage vers la phase S en réprimant l'activité transcriptionnelle des facteurs de la famille E2F. Les cyclines D et leurs partenaires CDK4 et CDK6 ont des propriétés pro-oncogènes mais leur fonction est régulée par une série d'inhibiteurs qui se lient à eux et inhibent leur activité kinase. On distingue les membres de la famille INK4 (p16INK4A, p15 INK4B, p18INK4C, p19INK4D) qui interagissent spécifiquement avec CDK4 et CDK6, et les membres de la famille CIP/KIP (p21CIP1/WAF1, p27KIP1 et p57KIP2) qui inhibent un grand nombre de CDK. L'interaction entre p16INK4A, cycline D/CDK, et pRb/E2F constitue une unité fonctionnelle connue sous le nom de « voie pRb » (Viallard; 2001).

3- Points de surveillance (*Checkpoint*) :

Lorsque des anomalies interviennent au cours de la division, des points de surveillance sont mobilisés. C'est en particulier le cas lors de l'apparition de dommages de l'ADN qui peuvent

être causés par des agents exogènes mutagènes (produits chimiques, rayons UV ou ionisants), par le métabolisme cellulaire comme la production d'espèces oxygénées réactives au cours de la respiration, ou encore lors d'un mauvais appariement de bases par une polymérase répliquative. Les checkpoints sont des points de décision où des mécanismes de contrôle opèrent et empêchent la progression dans le cycle. Ainsi, en G1, une cellule doit surveiller sa taille, la présence de nutriments et l'intégrité de son ADN avant de commencer le processus d'initiation de la synthèse d'ADN. En G2 il existe un checkpoint qui, dans le cas où l'ADN est endommagé ou non répliqué, empêche la cellule d'entrer en mitose (Viallard; 2001).

3-1 Détection de lésions (DNA Damage) :

Les kinases ATM/ATR (ATM : Ataxia Telangiectasia Mutated et ATR : ATM and Rad3-related) sont les principaux acteurs impliqués dans les premières étapes de la mobilisation des points de surveillance enclenchés lors d'un dommage de l'ADN. L'induction de cassures double brin de l'ADN conduit à la dissociation des dimères d'ATM entraînant son autophosphorylation et aboutissant ainsi à l'activation d'ATM (Bakkenist and Kastan 2003). La protéine ATM ainsi activée, phosphoryle la protéine NBS1 (Nijmegen Breakage Syndrome), qui fait partie du complexe MNR (Mre11/NBS1/Rad50) présent au niveau du dommage. La phosphorylation de NBS1 stabilise le complexe MNR et permet le recrutement de molécules ATM supplémentaires au niveau des foyers de lésions (Zhao *et al.* 2000). Le complexe MNR augmente aussi directement l'activité kinasique d'ATM (Lee and Paull 2004). Un des substrats de la protéine ATM est le variant d'histone γ H2AX (Histone 2AX) qui permet le recrutement de la protéine Mdc1 (Mediator of DNA damage checkpoint 1). La protéine Mdc1 forme ensuite un complexe avec les protéines BRCA1 (Breast Cancer Associated Protein), 53BP1 (p53 Binding Protein 1), le MNR et ATM qui vont ainsi s'accumuler au site de la lésion. ATM peut également phosphoryler c-abl (Abelson murine leukaemia viral oncogen) qui phosphoryle à son tour Rad51 afin de permettre son interaction avec Rad52, impliqué dans la réparation des cassures double brin de l'ADN (Chen *et al.*, 1999; Shangary *et al.*, 2000). Ainsi, la protéine ATM permet le recrutement de protéines de réparation au sein des foyers de réparation (Figure 9).

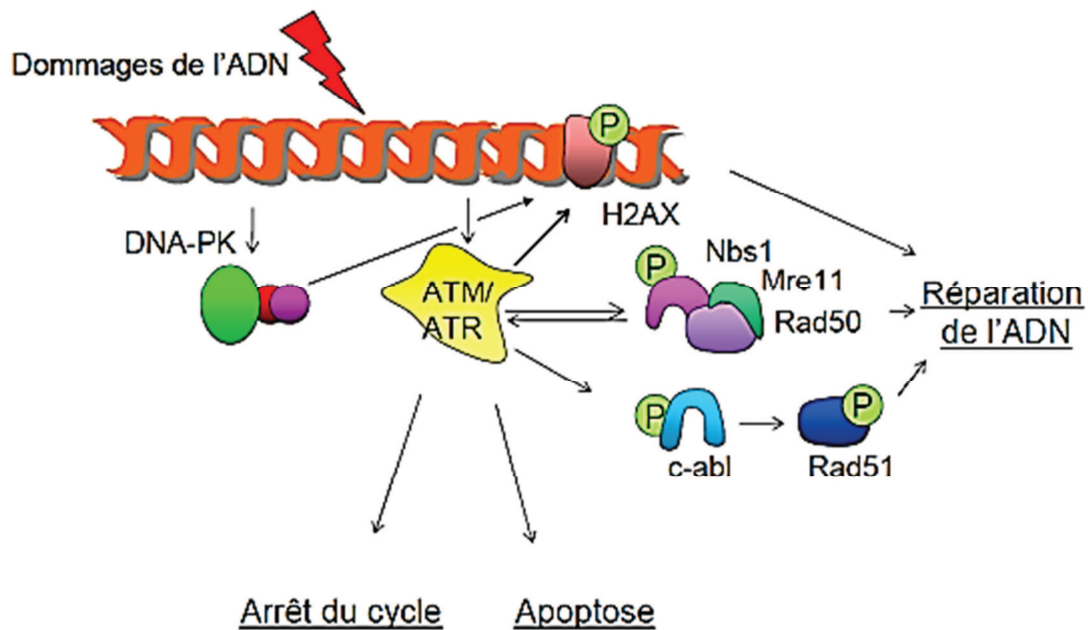


Figure-9 : Détection des dommages d'ADN. Les kinases ATM/ATR (jaunes) et DNA-PK (vert-rouge-rose) sont impliquées avec différents complexes dans la détection des liaisons afin d'induire l'arrêt du cycle, la réparation de l'ADN et l'apoptose (Shangary et al, 2000).

Le DNA-damage checkpoint est le mécanisme qui détecte une altération de l'ADN et génère un signal qui arrête les cellules dans la phase du cycle où elles se trouvent et induit la transcription de gènes réparateurs. La position d'arrêt dans le cycle dépend de la phase à laquelle la lésion de l'ADN a lieu.

4- Arrêt du cycle cellulaire :

4-1 Le checkpoint en G1 :

Le checkpoint en G1 en réponse à une lésion de l'ADN est le mieux connu. Trois gènes le contrôlent : ATM (ataxia telangiectasia mutated, le gène muté dans la maladie ataxie télangiectasie), p53 et p21. Ainsi, les kinases ATM/ATR, activées lors d'un endommagement de l'ADN, phosphorylent la protéine p53 (Vousden and Lane 2007), soit directement, soit par le biais des kinases CHK1/CHK2 (Checkpoint protein 1 et 2). Le facteur de transcription p53 contrôle la transcription du gène codant pour p21Cip1/Waf1 et inhibe le complexe CDK2-Cycline E, responsable de la transition G1/S (Ekholm and Reed 2000; Child and Mann 2006) une fois activée par ATM, CHK2 phosphoryle à son tour p53 ce qui entraîne sa dissociation de Mdm2 (Sérine 20). Ainsi, les niveaux et l'activité de p53 deviennent suffisants pour activer

la transcription de ses gènes cibles tel que p21, inhibiteur des complexes Cdk4-6/CyclineD et Cdk2/CyclineE. De manière intéressante, le suppresseur de tumeur BRCA1 joue un rôle de protéine d'assemblage facilitant la phosphorylation de p53 par ATM en réponse à l'induction de DSB (Bekker-Jensen and Mailand, 2010; Deckbar *et al.*, 2011; Warmerdam and Kanaar, 2010) en se fixant sur la CDK. La protéine p21Cip1/Waf1 est également capable de bloquer la réplication en se fixant sur le facteur de processivité PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen), nécessaire à l'activité de l'ADN polymérase et donc à la réplication, empêchant ainsi l'entrée en phase S (Luo *et al.*, 1995). Le point de surveillance G1/S implique également la phosphatase Cdc25A. Lorsque Cdc25A est phosphorylée par CHK1 ou CHK2, elles même activées par ATM ou ATR, elle est ubiquitinylée puis dégradée par le protéasome et ne peut donc plus activer le complexe CDK2-Cycline E (Busino *et al.*, 2004).

4-2 Le checkpoint en S:

Le mécanisme du point de surveillance de la phase S est le moins bien caractérisé. La phosphatase Cdc25A joue un rôle très important dans la régulation de ce point de surveillance. En effet, à la suite d'une erreur de réplication ou de l'induction de dommages de l'ADN, la kinase ATM phosphoryle CHK2 entraînant l'inhibition par phosphorylation de Cdc25A qui est alors incapable de déphosphoryler la kinase CDK2 (Falck *et al.*, 2001). La kinase CDK2 ne peut donc plus activer l'initiation de la réplication (Nyberg *et al.*, 2002).

4-3 Le checkpoint en G2/M:

La transition G2/M se réalise grâce au complexe Cdk1/CyclineB1 (Deckbar et al, 2011). Lors de l'activation du checkpoint G2/M, CHK2 et ChK1, activés respectivement par ATM et ATR, phosphorylent CDC25C (Sérine 216) ce qui entraîne son export nucléaire et sa séquestration dans le cytoplasme par la protéine 14-3-3. Cela entraîne l'inhibition du complexe Cdk1/CyclineB et donc un arrêt lors de la transition G2/M. Une voie p53-dépendante permettant l'activation de protéines inhibitrices des Cdk lors de la transition G2/M a été identifiée. Ses fonctions exactes dans ce processus sont encore mal comprises (Bekker-Jensen and Mailand, 2010; Deckbar *et al.*, 2011; Warmerdam and Kanaar, 2010). Cependant, par exemple, il a déjà été montré que p21, cible de p53, est impliqué dans le maintien du blocage des cellules en G2 suite aux dommages à l'ADN via l'inhibition du complexe Cdk1/CyclineB (Deckbar *et al.*, 2011). Même si le mécanisme moléculaire est encore largement incompris, BRCA1 participe à la mise en place du checkpoint G2/M via l'activation de ChK1. BRCA1 participe à ce processus via les trois complexes BRCA1 A, B et

C (Yarden Pardo-Reoyo *et al.*, 2002; Yu Chini *et al.*, 2003; Matsuoka *et al.*, 2007). Le complexe BRCA1/BACH1 participe à la prolongation du checkpoint G2/M alors que le complexe BRCA1/CtIP participe à une activation transitoire du checkpoint G2/M (Yarden Pardo-Reoyo *et al.*, 2002; Yu Chini *et al.*, 2003). De plus, la phosphorylation de BRCA1 par ATM sur la sérine 1423 est requise à l'activation du checkpoint G2/M. De manière intéressante, la phosphorylation de BRCA1 par ATM sur la serine 1387 est requise pour le checkpoint actif en phase S suite à l'induction de dommages par IR. Ainsi, cela suggère que les différentes phosphorylations que peut subir BRCA1 par ATM régulent probablement son interaction avec différents partenaires permettant alors l'activation du checkpoint intra-S et/ou G2/M (Figure 10) (Xu *et al.*, 2001).

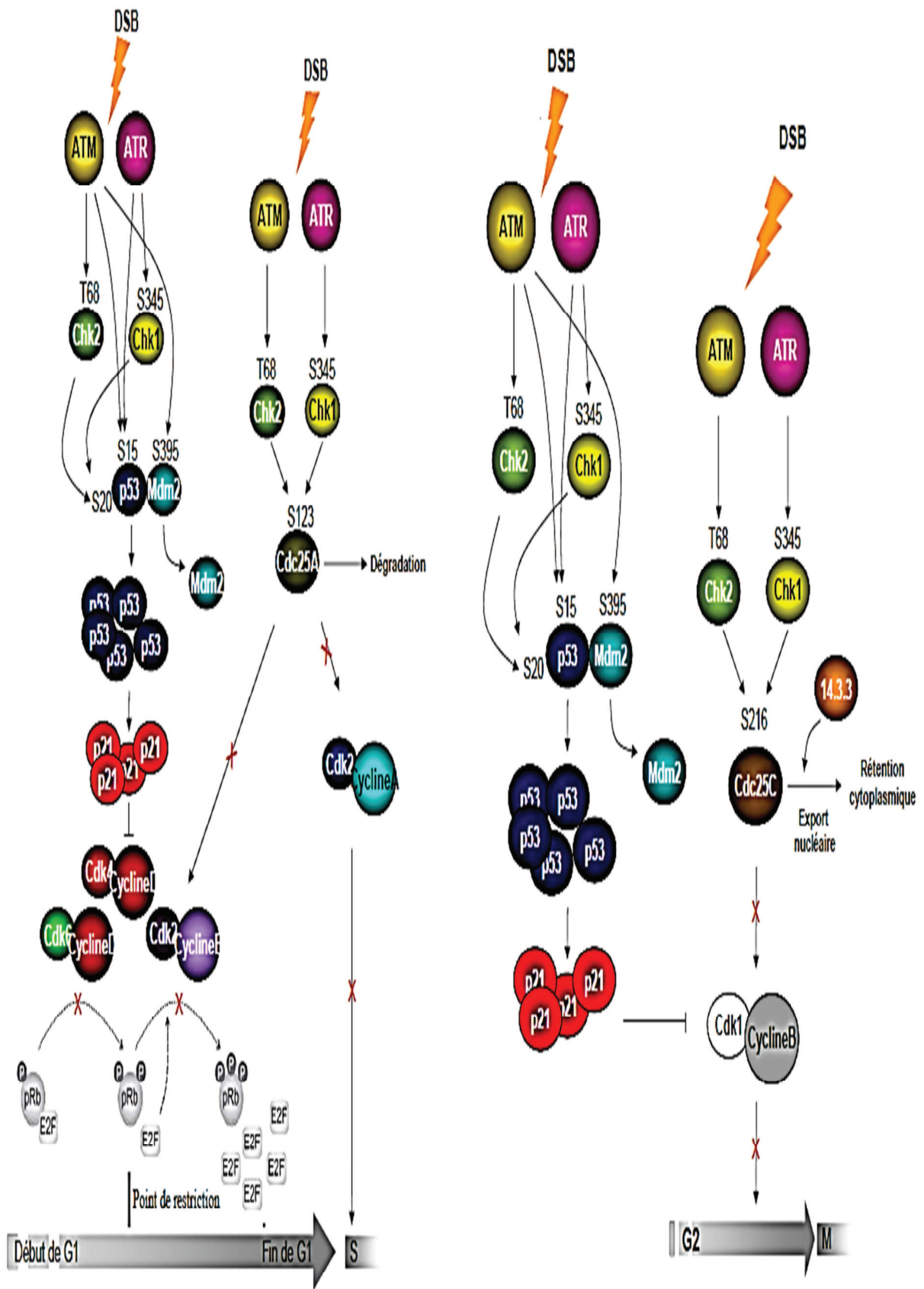


Figure-10 : Exemples de signalisations en aval des kinases ATM et ATR aboutissant au blocage du cycle aux transitions G1/S et G2/M (Xu et al, 2001).

IV- La mort cellulaire:

Il existe plusieurs processus de mort cellulaire qui sont induits de façon programmée ou qui sont activés par les stimuli de stress extracellulaire, Chez les organismes pluricellulaires des plus simples comme le nématode *Caenorhabditis elegans* jusqu'aux mammifères. On peut regrouper quatre mécanismes de mort cellulaire : l'autophagie, la nécrose, la nécrose programmée et l'apoptose.

Les différents types de mort cellulaire peuvent être classés en fonction de leur aspect morphologique (apoptotique, nécrotique, autophagique ou associé à la mitose), de critères enzymologiques (implication de nucléases ou de différents types de protéases telles que caspases, calpaïnes, cathepsines et transglutaminases), d'aspects fonctionnels (mort programmée ou accidentelle, physiologique ou pathologique) ou encore de caractéristiques immunologiques (immunogènes ou non) (Melino *et al.*, 2001 ; Kroemer *et al.*, 2009).

Les cellules subissant un processus de mort cellulaire sont engagées dans un mécanisme réversible jusqu'à ce qu'une première phase, appelée « point de non retour », soit dépassée. En l'absence d'événements biochimiques clairement identifiés comme des points de non retour, le NCCD (Nomenclature Committee on Cell Death) considère une cellule comme étant morte dès lors qu'elle présente l'un des critères moléculaires ou morphologiques suivants :

- ✓ La cellule a perdu l'intégrité de sa membrane plasmique, et ceci est mis en évidence par l'incorporation de colorants vitaux (par exemple l'iodure de propidium) *in vitro*.
- ✓ La cellule, de même que son noyau, a subi une fragmentation complète pour former des corps apoptotiques.
- ✓ La cellule, ou des fragments de cette cellule, a été ingérée par des cellules adjacentes *in vivo*.

1- L'autophagie et la paraptose:

L'autophagie, ou mort cellulaire programmée de type II, est un processus catabolique intracellulaire indispensable à la dégradation et au recyclage de protéines, de ribosomes, mais également d'organites tels que le RE, les mitochondries ou encore l'appareil de Golgi (Klionski *et al.*, 2000). Ce phénomène peut se déclencher en condition physiologique, dans des cellules normales privées de nutriments ou de facteurs de croissance, mais également en réponse à différents stress cellulaires, tels que l'hypoxie, l'exposition à des radiations ionisantes, ou encore à des drogues cytotoxiques (Klionsky *et al.*, 2000; Meijer *et al.*, 2004).

Chez l'homme on observe fréquemment des cellules autophagiques dans les maladies neurodégénératives tels que les maladies d'Alzheimer et de Parkinson. Il faut noter que les neurones présentent une forme de mort cellulaire nonapoptotique proche de l'autophagie. Cette mort nommée paraptose qui est insensible aux inhibiteurs de caspase et à Bcl-xL, requiert la synthèse protéique. La paraptose n'entraîne pas de dégradation de l'ADN ni de formation de corps apoptotique. Comme l'autophagie, la paraptose est caractérisée par une vacuolisation du cytoplasme qui provient d'un gonflement des mitochondries et du réticulum endoplasmique.

2- La nécrose:

La mort cellulaire par nécrose est le résultat d'une catastrophe bioénergétique provenant de l'épuisement de l'ATP à un niveau incompatible avec la survie des cellules. La nécrose est induite principalement par des agressions extracellulaires comme le stress toxique ou par les dommages physiques. La nécrose est caractérisée morphologiquement par la vacuolisation du cytoplasme et la perméabilisation de la membrane plasmique qui conduit à la perte du contenu cellulaire. La libération des protéines intracellulaires active le système immunitaire et entraîne une réaction inflammatoire autour de la cellule morte. De nombreux médiateurs, organites et processus cellulaires ont été impliqués dans la mort cellulaire nécrotique, mais leur mode d'action est encore mal connu. Il en est de même pour les éléments déclencheurs de la nécrose. Ces phénomènes incluent des altérations mitochondriales, des changements au niveau des lysosomes et du noyau, une dégradation des lipides, une augmentation de la concentration intracellulaire de calcium ainsi qu'une activation de protéases telles que les calpaïnes et les cathepsines. Cependant, à l'heure actuelle, il n'existe pas de consensus concernant les changements biochimiques qui permettraient de caractériser la nécrose sans équivoque. En l'absence d'un dénominateur biochimique commun, la mort cellulaire nécrotique est le plus souvent définie par l'absence de marqueurs apoptotiques ou autophagiques (Kroemer *et al.*, 2009).

3- La nécrose programmée:

La nécrose a longtemps été considérée comme une forme de mort cellulaire accidentelle et non contrôlée, mais on considère de plus en plus qu'elle serait finement régulée par un ensemble de voies de signalisation et de processus cataboliques (Golstein *et al.*, 2007 ; Festjens *et al.*, 2006). En effet, il a été démontré que des récepteurs à domaine de mort (TNFR1, Fas/CD95 et TRAILR) ainsi que des récepteurs Toll-like (TLR3 et TLR4) étaient

impliqués dans le phénomène nécrotique. La mort cellulaire médiée par les récepteurs TNFR1, Fas/CD95, TRAILR et TLR3 dépendrait de la kinase RIP1. Ceci a été démontré par différentes techniques de KO ou de régulation négative de cette kinase, mais également par une inhibition chimique de RIP1 par la nécrostatine-1 (Degterev *et al.*, 2008).

4- L'apoptose : Thérapie de choix en cancérologie

L'expression « apoptose » a été introduite par Kerr *et al.* afin de décrire une mort cellulaire à l'aspect morphologique spécifique (Kerr *et al.*, 1972). Le terme même d'apoptose est dérivé du Grec, faisant référence à la perte des pétales des fleurs, voire des feuilles des arbres (Khan *et al.*, 2010). C'est un processus physiologique normal, intervenant dans le développement des organismes pluricellulaires, l'homéostasie tissulaire chez l'adulte et la défense contre des agents pathogènes. Elle constitue un mécanisme hautement conservé au sein des organismes multicellulaires (Khan *et al.*, 2010), et peut être activée par des stimuli divers, tels que : la stimulation de récepteurs de mort ; la carence en facteurs trophiques ; l'action d'agents génotoxiques (les radiations ionisantes, par exemple) ; des chocs thermiques ou osmotiques ; le détachement de la matrice extracellulaire (anoïkis) ; l'exposition à des drogues cytotoxiques ; ou encore l'infection par des virus ou des bactéries.

4-1 Caractéristiques:

Parmi les caractéristiques morphologiques des cellules apoptotiques on cite:

- ✓ un arrondissement de la cellule.
- ✓ une rétractation des pseudopodes.
- ✓ une réduction du volume cellulaire (pycnose).
- ✓ une condensation de la chromatine.
- ✓ une fragmentation nucléaire (caryorrhexis).
- ✓ peu ou pas de modification des organites intracellulaires.
- ✓ un bourgeonnement de la membrane plasmique (celle-ci garde son intégrité jusqu'au stade final de l'apoptose).
- ✓ une phagocytose des cellules apoptotiques (in vivo).

La perte de l'asymétrie membranaire est une des caractéristiques biochimiques de l'apoptose. Elle consiste en le passage des phosphatidyl-sérines (PS) de la bicouche lipidique, normalement face vers l'intérieur, vers la couche externe de la membrane plasmique (Bratton *et al.*, 1997). Ceci permet d'exposer la phosphatidyl-sérine comme ligand de reconnaissance

pour les phagocytes qui vont éliminer les cellules apoptotiques. (Gardai *et al.*, 2006). La fragmentation de l'ADN nucléaire est une autre caractéristique de l'apoptose. Ce processus est effectué par des endonucléases dépendantes du Ca^{2+} et du Mg^{2+} baptisées CAD (Caspaseactivated DNase) donnant des fragments d'ADN de 180 à 200 paires de bases dans un stade précoce de l'apoptose (Bortner *et al.*, 1995; Sakahira *et al.*, 1998). Ces endonucléases sont souvent localisées dans le cytoplasme sous forme latente inactive et sont spécifiquement activées par la caspase 3 active. En effet, dans les cellules prolifératives, CAD est complexé par son inhibiteur ICAD. En revanche, dans les cellules apoptotiques, du fait d'une forte activation de la caspase 3 (suite à plusieurs types de stress cellulaire), ICAD est clivé pour libérer CAD (Sakahira *et al.*, 1998) qui va migrer vers le noyau pour dégrader l'ADN chromosomique causant une condensation de la chromatine.

4-2 les modulateurs de l'apoptose:

4-2-1 Les caspases:

Les caspases (pour cysteinyl-dependent aspartate specific proteases) sont une famille d'endopeptidases présentes dans tous les organismes multicellulaires. Elles furent nommées ainsi car elles clivent leurs substrats après un résidu aspartate et possèdent une cystéine au sein de leur site catalytique (Alnemri *et al.*, 1996). Les caspases reconnaissent spécifiquement 4 acides aminés contigus nommés P1-P2-P3 et P4 au sein de leurs substrats et clivent ces derniers en C-terminal du résidu P1, qui est toujours un résidu aspartate (Thornberry *et al.*, 1997 ; Fuentes-Prior and Salvesen, 2004).

On connaît actuellement 15 caspases chez les mammifères, 11 (ou 12) chez l'Homme (Figure 11), regroupées fonctionnellement en trois sous-groupes différents : les caspases inflammatoires ou impliquées dans la différenciation appelées caspases du groupe I (caspases 1, 4, 5, 12 et 14), les caspases apoptotiques initiatrices ou caspases du groupe II (caspases 2, 8, 9 et 10) et les caspases apoptotiques effectrices (ou exécutrices) ou caspases du groupe III (caspases 3, 6 et 7). Ces protéases sont majoritairement présentes au sein de la cellule sous forme de pro-caspases, zymogènes catalytiquement peu actifs, voire inactifs. Les pro-caspases possèdent une masse moléculaire de 32 à 55 kDa. Elles sont composées de 3 domaines différents : (i) un pro-domaine N-terminal, de 3 à 24 kDa, (ii) un domaine central de 17 à 20 kDa, qui comporte le site catalytique, appelé grande sous-unité p20, et (iii) un domaine C-terminal, de 10 à 12 kDa, la petite sous unité p10.

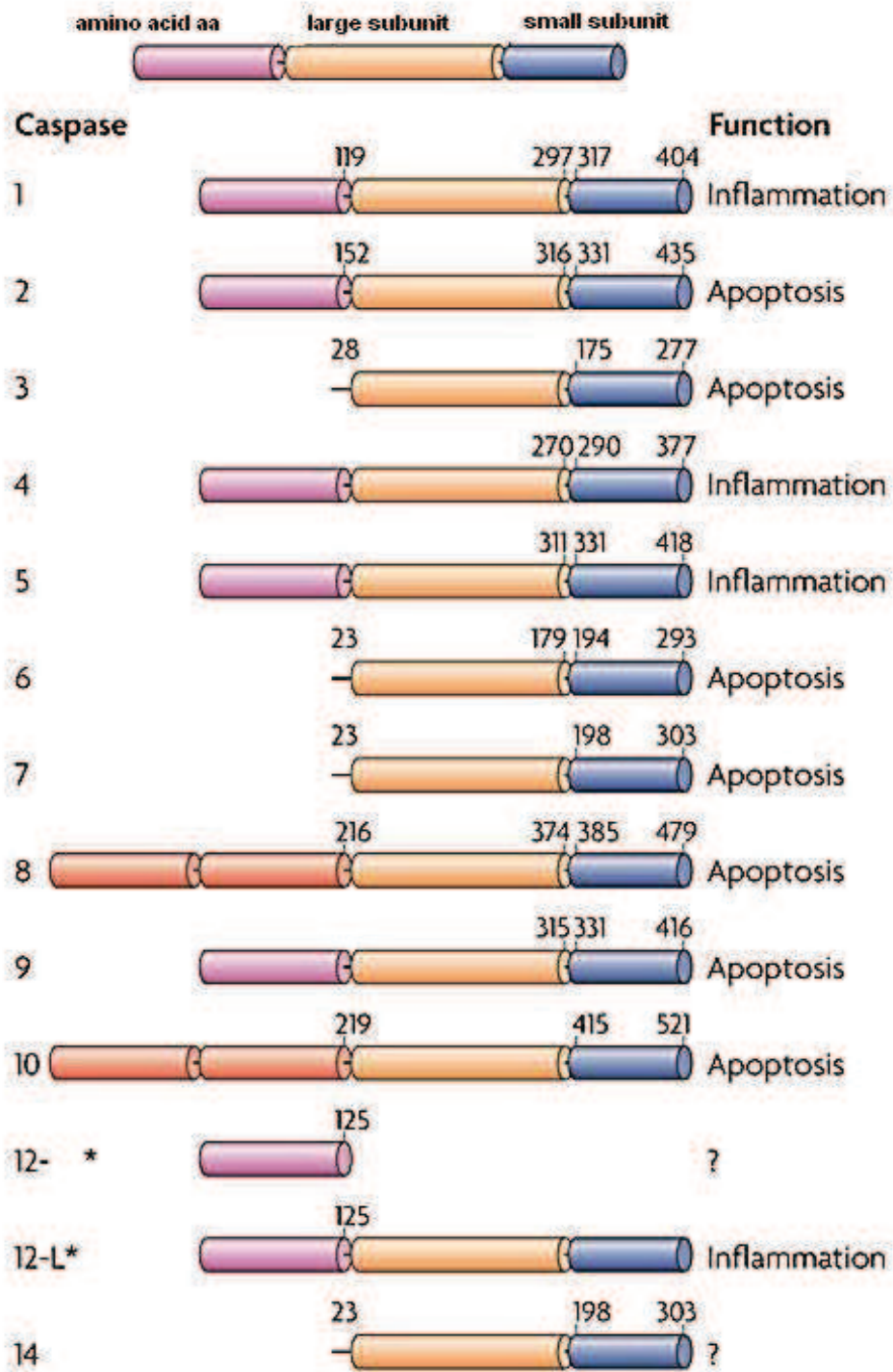


Figure-11 : Structure, classification et fonctions des caspases. Adaptée de (*Nature reviews molecular cell biology*).

4-2-2 La famille des protéines Bcl-2:

Le gène Bcl-2 (B cell lymphoma 2) est le prototype d'une famille de gènes qui contrôle la mort cellulaire. Cette famille peut-être séparée en deux catégories (Figure 12):

- ✓ Le premier groupe rassemble les membres antiapoptotiques en particulier, Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w. Ils contiennent les domaines BH1, -2, -3 et -4. Ces protéines sont présentes dans la membrane mitochondriale externe et exercent un effet inhibiteur sur la perméabilisation de la membrane.
- ✓ Le deuxième groupe rassemble une partie des membres pro-apoptotiques caractérisés par l'absence du domaine BH4 dans la séquence des protéines, en particulier Bax, Bak et Bcl-2. Elles sont présentes dans le cytosol. En réponse à un signal apoptotique elles s'insèrent dans la membrane mitochondriale externe en formant des oligomères et inactivent les protéines anti-apoptotiques. Ainsi que des membres pro-apoptotiques possédant uniquement le domaine BH3 et présents dans le cytosol, telles que : Bad, Bid, Bik, Bim, Noxa et Puma. Ces protéines agissent sur Bcl2 pour lancer l'apoptose.

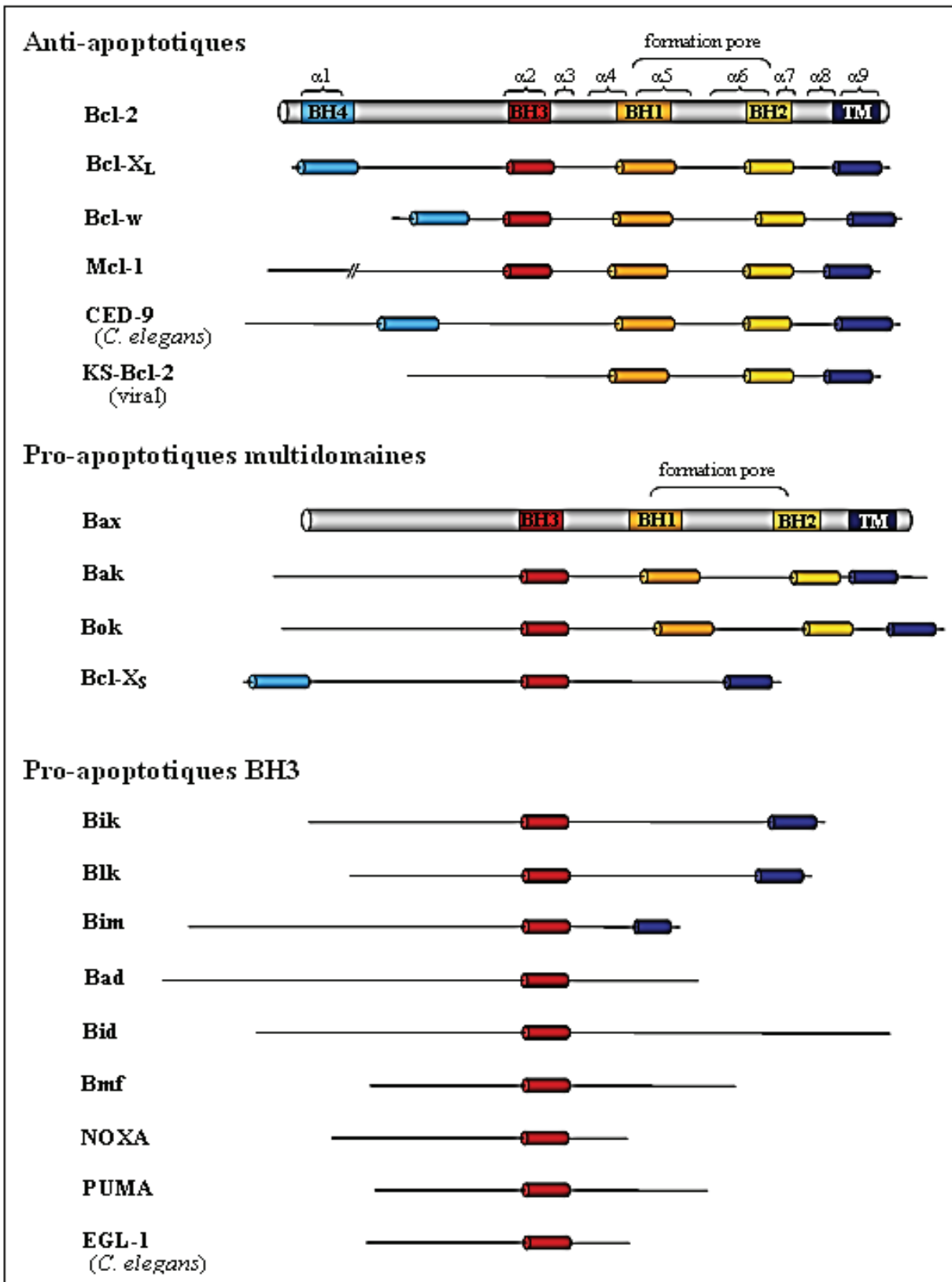


Figure-12 : Les protéines de la famille Bcl-2 (Llambi et al. 2011).

Les protéines Bax et Bak sont les protéines effectrices de cette famille Bcl-2. En effet quand elles sont activées, elles changent de conformation et s'insèrent dans la membrane mitochondriale, s'oligomérisent et entraînent la perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie (*Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization* : MOMP) (Llambi *et al.* 2011).

4-2-2-1 Les membres antiapoptotiques:

Ils ont pour rôle la protection de la cellule de l'apoptose en empêchant l'action des effecteurs de la famille Bcl-2: Bax et Bak. La surexpression de Bcl-2 dans des lignées hématopoïétiques entraîne une augmentation de la survie des cellules progénitrices (Ogilvy *et al.*, 1999) et son inactivation augmente l'apoptose (Veis *et al.*, 1993). Ils ont une structure globalement proche des toxines bactériennes avec leurs deux hélices hydrophobes centrales, leurs 6 à 7 hélices amphipatiques et leur boucle non structurée. Ces protéines peuvent être régulées dans la cellule au niveau transcriptionnel. Par exemple, la transcription de Bcl-xl peut être induite par les facteurs de croissance via la voie JAK/STAT et ainsi entraîner la survie cellulaire (Richard J Youle and Andreas Strasser 2008). Le niveau d'expression de Bcl-2 peut être régulé par les mi-ARN et son activité par phosphorylation. Mcl-1 a un turn-over important et son expression est fortement diminuée en cas d'activation du protéasome (J M Adams and Cory 2007).

4-2-2-2 Les membres pro-apoptotiques:

Les BH3-only sont des régulateurs clés de l'activation de Bax et Bak. Ils interagissent avec les autres membres de la famille Bcl-2, certains BH3-only pouvant interagir à la fois avec des membres pro-apoptotiques et des membres anti-apoptotiques et d'autres ne liant que certains membres anti-apoptotiques seulement: Les BH3-only ont un domaine homologue à Bcl-2 qui leur permet de lier et de réguler les membres de la famille Bcl-2. Néanmoins, mis à part Bid, toutes les BH3-only sont non structurées et seul leur motif BH3 se structure lors de la liaison avec leurs partenaires. Ainsi, Bid a, de façon surprenante, une structure très similaire à celles de Bcl-2, Bcl-xl et aussi avec Bax (Shamas-Din *et al.*, 2011).

Ces BH3-only fonctionnent comme des capteurs des signaux pro-apoptotiques et leurs activations sont finement régulées dans la cellule selon différentes stratégies. Noxa et Puma sont induits par p53 en réponse à un dommage à l'ADN. Bim est exprimé via l'activation de Foxo3A (*class O Forkhead box transcription factor-3A*) en réponse à une privation de facteurs de croissance et par CEBP en réponse à un stress du réticulum endoplasmique

(Richard J Youle and Andreas Strasser ; 2008). Elles peuvent être régulées de façon post-traductionnelle. Par exemple, Bad est phosphorylé par différentes kinases de survie ce qui entraîne son inactivation. En effet, la capacité de Bad à lier ses partenaires anti-apoptotiques, Bcl-2, Bcl-xl et Bcl-w est inhibée par phosphorylation. Ces phosphorylations relient Bad aux voies PI3K/Akt, MAPK et Pim qui sont toutes des voies de survie cellulaire. Par ailleurs, certaines phosphatases (PP2A, PP1) sont capables de déphosphoryler Bad et ainsi de l'activer. Un autre exemple de cette régulation post traductionnelle est le clivage de Bid. Bid peut être clivé par la caspase 8 lors de l'apoptose dépendante des récepteurs de mort mais aussi par la granzyme B, d'autres caspases que la caspase 8 et de multiples protéases (calpaïnes et cathepsines). Ce clivage en t-Bid entraîne sa migration vers la mitochondrie et la perméabilisation de cette dernière via l'activation de Bax et Bak (Billen *et al.*, 2008).

4-2-3 La mitochondrie:

La mitochondrie, organite producteur d'énergie (ATP), occupe une place centrale dans le mécanisme de l'apoptose. Son implication au cours du processus apoptotique est associée à une transition de la perméabilité membranaire (MTP; *Membrane transition permeability*) et l'effondrement du potentiel trans-membranaire mitochondrial ($\Delta\Psi_m$), résultant de l'ouverture de mégapores mitochondriaux. La MPT peut en effet être induite directement par de nombreux facteurs apoptotiques tels que le calcium, les ROS, un changement de pH et Bax, une protéine pro-apoptotique de la famille des Bcl (*B cell lymphoma*)-2, mais également de façon indirecte par des Caspases, des céramides et la protéine p53, capables de moduler l'activité de protéines de la famille des Bcl-2.

4-2-4 Les récepteurs de mort cellulaire:

Ces récepteurs font partie de la super-famille des récepteurs TNF et leurs parties intracellulaires sont caractérisées par la présence d'un domaine d'interaction protéine-protéine appelé domaine de mort. Deux types de récepteurs à domaine de mort existent : les récepteurs dont l'activation par leur ligand entraîne le recrutement de FADD (FAS-Associated Death Domain) et les récepteurs dont l'activation entraîne le recrutement de TRADD (Tumors necrosis factor Receptor type 1-Associated Death Domain).

Dans cette évocation bibliographique nous nous intéresserons qu'au premier groupe et spécialement le récepteur CD95 (Fas ou APO-1) et son ligand.

4-2-2-2 CD95 (Fas) et CD95L (FasL):

Le récepteur CD95 (Fas ou APO-1), glycoprotéine transmembranaire de 335 acides aminés et 45 kDa, a été découvert en 1989 comme cible d'IgM ou d'IgG3 induisant l'apoptose de cellules lymphocytaires cancéreuses, ou non, in vitro et in vivo. Le gène codant pour ce récepteur fut cloné deux ans après. Les récepteurs CD95 sont constitutivement pré associés sous forme de trimères à la surface cellulaire via leur domaine PLAD. Cette pré-association est nécessaire à l'induction du signal apoptotique par CD95L, dont la liaison induirait une agrégation massive de plusieurs de ces trimères (Muppidi and Siegel, 2004). CD95 présente 3 domaines extracellulaires CRD. CRD1 constitue une partie du domaine PLAD et CRD 2 et 3 constituent le LBD (pour Ligand Binding Domain), c'est-à-dire le domaine de liaison au ligand CD95L. Dans sa partie intracellulaire C-terminale (Figure 13), CD95 contient un domaine de mort qui est indispensable pour le recrutement de la protéine adaptatrice FADD et l'induction d'apoptose après interaction avec son ligand ou des anticorps agonistes (Itoh and Nagata, 1993).

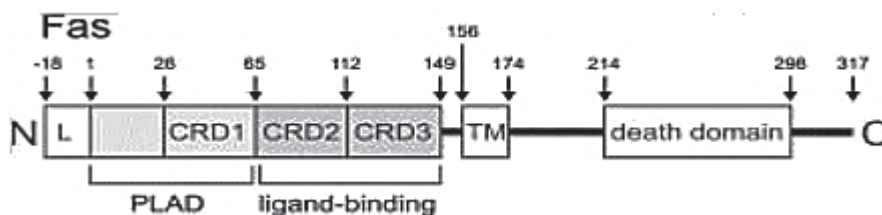


Figure-13 : Structure du récepteur Fas. Le récepteur Fas est une protéine transmembranaire de type I, avec l'extrémité N-terminale extracellulaire et l'extrémité C-terminale cytoplasmique. L : séquence signal (clivée au cours de la traduction), CRD : Cystein Rich Domain, PLAD : Pre-Ligand Association Domain, TM : TransMembrane domain, Ligand-Binding : domaine de liaison au ligand, Death domain : domaine de mort (Wajant, Pfizenmaier, and Scheurich 2003).

Le gène codant pour CD95L (ou FasL), une glycoprotéine transmembranaire de type II de 40 kDa appartenant à la famille du TNF, fut identifié en 1993. La partie extracellulaire de CD95L présente de fortes homologies avec les parties extracellulaires des autres ligands de la famille du TNF. En plus de sa forme membranaire, CD95L peut également être retrouvé sous forme soluble après clivage par des métalloprotéases telles que MMP-3, MMP-7 et ADAM10. La forme soluble de CD95L est trimérique, grâce à l'existence d'un domaine de trimérisation présent dans la partie extracellulaire C-terminale (Figure 14) (Schulte *et al.*, 2007).

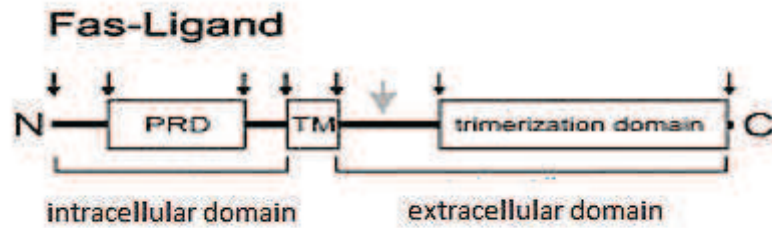


Figure-14 : Structure de Fas Ligand. FasL possède un domaine riche en proline (PRD, pour Proline Rich Domain) en intracellulaire et un domaine de trimérisation en extracellulaire. La flèche en gris désigne le site de clivage potentiel par les métalloprotéases. TM : domaine transmembranaire (Schulte et al., 2007).

L'expression de CD95 est ubiquitaire. Elle est particulièrement élevée dans les lymphocytes T et peut être augmentée au niveau transcriptionnel, par exemple en réponse à certaines cytokines au cours de l'activation lymphocytaire (Klas *et al.*, 1993). L'expression de CD95 est plus restreinte que celle de son récepteur puisqu'on le retrouve principalement exprimé par les cellules tueuses NK (Natural Killer) et les lymphocytes T activés. Son expression est essentiellement régulée au niveau transcriptionnel. Elle est augmentée par l'infection par certains virus dont le VIH (Westendorp *et al.*, 1995). Cette augmentation d'expression de CD95 et CD95L pourrait jouer un rôle dans la réponse à certains traitements de chimiothérapie, tels que l'étoposide, la doxorubicine, ou le 5-Fluorouracile, ou aux UV, par élévation de la transcription de CD95L (Kasibhatla et al., 1998). Certains groupes ont d'ailleurs proposé que l'action de certaines chimiothérapies pouvait être en partie liée à une mise en jeu de la signalisation émanant de CD95, phénomène toutefois type-cellulaire dépendant (Fulda, 2004). Par ailleurs, une partie de la signalisation cytotoxique des LDL oxydées implique le système CD95/CD95L (Alcouffe *et al.*, 2003). Tout comme le couple perforine et granzyme B, deux autres molécules effectrices des lymphocytes T inductrices d'apoptose, certains auteurs ont mis en évidence que CD95L serait également présent au sein des granules des lymphocytes T et sa présence à la surface cellulaire pourrait donc aussi être régulée par exocytose (Bossi and Griffiths, 1999).

4-3 Les voies de signalisation de l'apoptose:

Différentes voies de signalisation aboutissent à la mort cellulaire par apoptose. Principalement nous distinguerons (1) la voie intrinsèque, ou mitochondriale, et (2) la voie extrinsèque, ou voie médiée par des récepteurs de mort (Khan *et al.*, 2010; Ziegler and Kung, 2008).

4-3-1 La voie intrinsèque, ou mitochondriale:

La voie intrinsèque est activée par une variété de stimuli intrinsèques tels que l'absence de cytokine, des lésions de l'ADN (acide désoxyribonucléique), les rayonnements γ et les radicaux libres. Au cours de celle-ci, la plupart des signaux vont converger vers la mitochondrie. Suite à un stimulus de stress qui fait basculer la balance mort / survie vers une issue fatale, de nombreux changements interviennent sur la mitochondrie, à la fois au niveau de sa structure mais aussi sur sa physiologie (Ulivieri, 2010). Selon l'intensité et la persistance du stimulus, ces modifications mitochondriales peuvent conduire la cellule à un point de non-retour dans son chemin de mort, pour aboutir finalement à la libération de divers facteurs pro-apoptotiques, comme le cytochrome c, AIF (apoptosis inducing factor), l'endonucléase G et Smac/Diablo (Rasola and Bernardi, 2007). Les mécanismes de libération de ces différents facteurs passent par une perméabilisation de la membrane mitochondriale, qui peut être expliquée par deux mécanismes distincts. Le premier, implique un phénomène appelé transition de perméabilité (TP) et s'accompagne d'anomalies fonctionnelles mitochondriales telles qu'une réduction du potentiel de membrane mitochondrial, un découplage de la chaîne respiratoire et la production d'anions superoxydes. Le second mécanisme, implique directement les membres de la famille de Bcl-2. Lors d'un stimulus apoptotique, les protéines proapoptotiques telles que Bax et/ou Bak sont relocalisées au niveau de la MME pour former un canal capable de libérer le cytochrome c. Ce processus est régulé par les autres membres de la famille de Bcl-2. D'une part, la séquestration des protéines pro-apoptotiques par les protéines antiapoptotiques empêche celles-ci de perméabiliser la mitochondrie. Ainsi cette voie peut être à fois stimulée et réprimée par des protéines de la superfamille Bcl-2, superfamille protéique constituée d'antagonistes (Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W, Bfl-1, et Mcl-1) et d'agonistes (Bax, Bak, Bcl-Xs, Bad, Bid, Bik, Bim, et Hrk) de mort cellulaire à l'issue d'un stress cellulaire, Bax et Bak oligomérisent et s'intègrent dans la membrane mitochondriale, augmentant ainsi la porosité membranaire et réduisant le potentiel membranaire mitochondrial. Il y a relargage du cytochrome c et de Smac/DIABLO (second mitochondria-derived activator of caspase/direct inhibitor of apoptosis binding protein with low pI). Après relargage, le cytochrome c se lie à Apaf-1 (apoptosis-inducing factor 1) et à la pro-caspase 9

formant ainsi l'apoptosome. Smac/DIABLO interfère avec les protéines inhibitrices d'apoptose (IAPs : XIAP, cIAP1, cIAP2, NAIP, ML-IAP, ILP2, livin, apollon, and survivin) (Reuter *et al.*, 2008). Il en résulte l'activation des caspases-9 et caspases-3, -6 et -7, exécutrices d'apoptose (Figure 15)

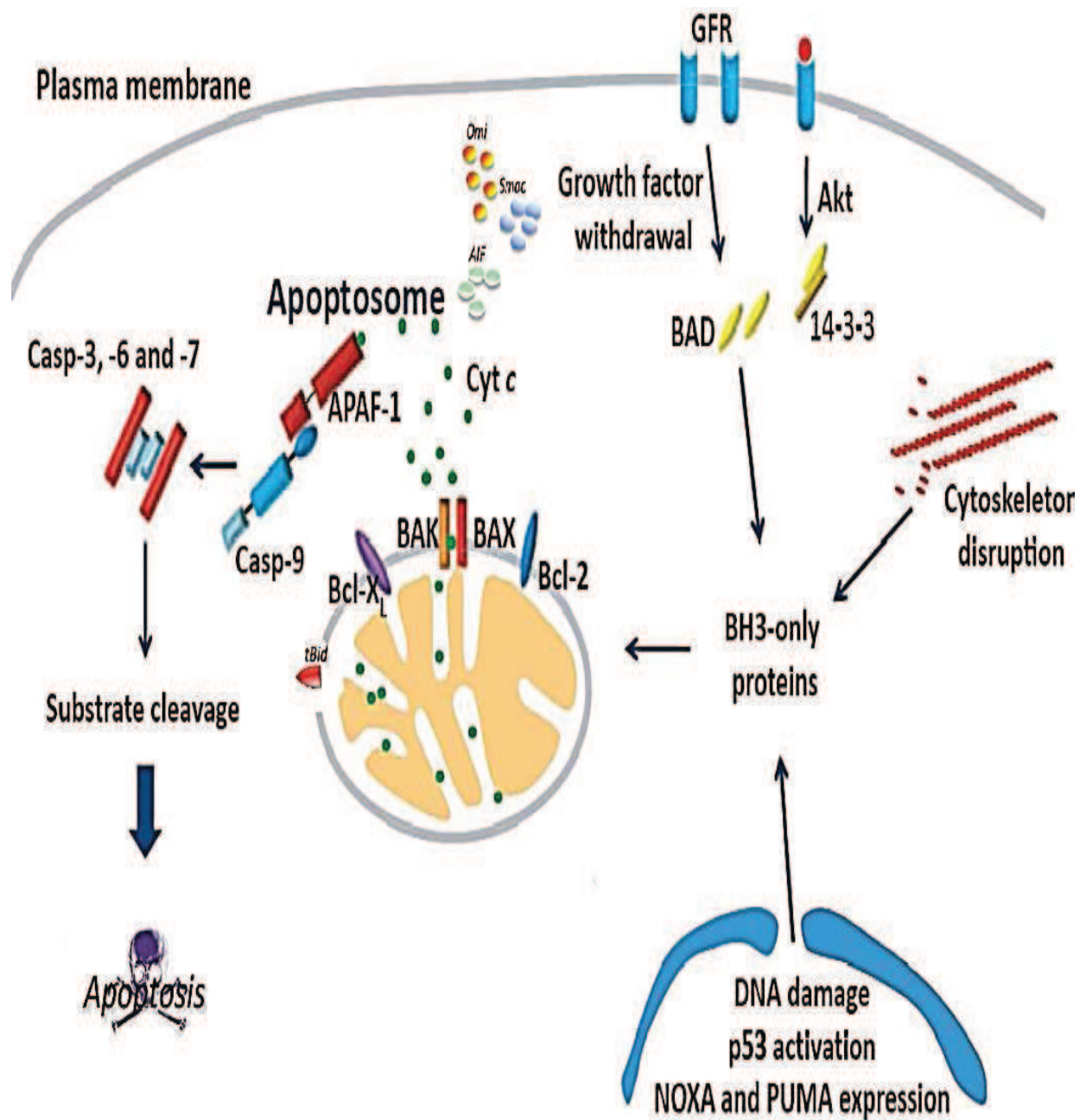


Figure-15 : Voie intrinsèque de l'apoptose. Adapté d'après (Pereira W.O. et al., 2011).

4-3-2 La voie extrinsèque:

Une deuxième voie apoptotique induite par les récepteurs membranaires DR (death receptors) appartenant à la superfamille des TNF-R (tumor necrosis factor receptor). Les voies de signalisation apoptotique des récepteurs de mort conduisent à l'activation des Caspases et en sont directement dépendantes. Cette voie de signalisation, ou voie des récepteurs de mort, est particulièrement importante dans les phénomènes apoptotiques physiologiques, en particulier dans le développement et le fonctionnement du système immunitaire (Strasser *et al.*, 2009) ou dans la régulation du cycle cellulaire (Shinohara *et al.*, 2000). Elle intervient également dans l'élimination de cellules infectées par un virus (Lu *et al.*, 2011) ou de cellules tumorales (Wajant, 2006). Le récepteur Fas ou CD95, est activé après liaison avec son ligand spécifique FasL ou CD178, conduisant à son oligomérisation. Cette activation permet alors le recrutement cytoplasmique d'une protéine dite "adaptatrice" (FADD pour Fas-Associated Death Domain), qui contient à la fois un domaine DD et un domaine DED (Death Effector Domain). Le domaine DD est responsable de l'association homéotypique de la protéine adaptatrice avec le récepteur de mort. Le domaine DED quant à lui, conduit au recrutement d'une pro-caspase initiatrice (pro-caspase 8 ou 10), pour former le DISC (Death Inducing Signaling Complex). La pro-caspase initiatrice est alors activée au sein de ce complexe par autoprotéolyse, et pourra à son tour activer les caspases effectrices 3, 6 et 7. L'activation de ces caspases aboutit à l'apoptose de la cellule lors de la phase G1 du cycle cellulaire. Les cellules en mitose semblent quant à elles être résistantes à l'apoptose médiée par Fas (Hashimoto *et al.*, 2012). En effet, la phosphorylation de FADD se produisant lors de la mitose, permet sa séquestration dans le noyau, empêchant ainsi la formation du DISC dans le cytosol (Figure 16).

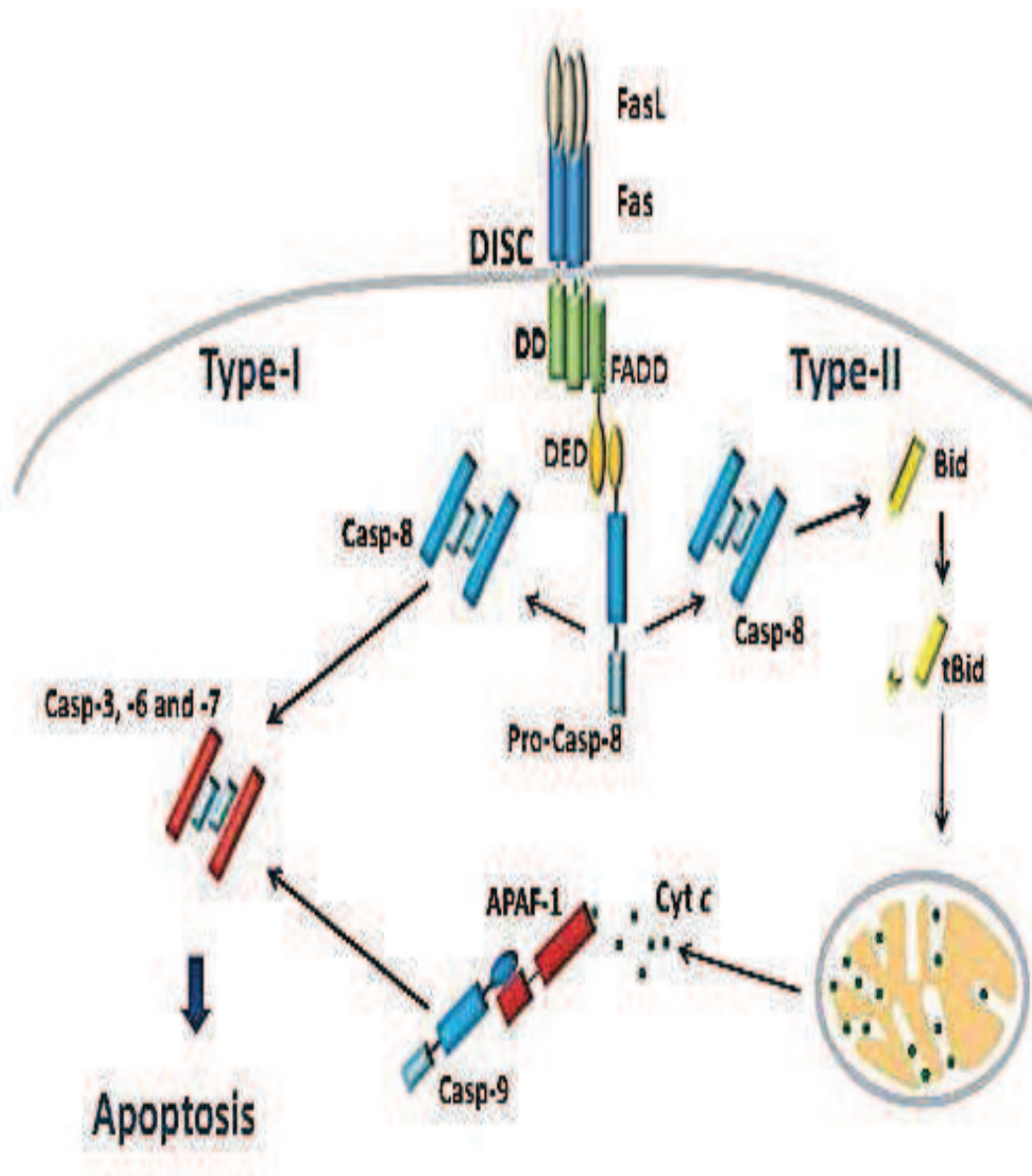


Figure-16 : Voie extrinsèque de l'apoptose. Adapté d'après (Pereira W.O. et al., 2011).

4-3-3 Dialogue entre les 2 voies:

Les deux voies de signalisation apoptotique ont un certain nombre d'intervenants communs. La plupart des signaux de mort convergent vers la mitochondrie qui tient le rôle d'un centre intégrateur et exécuteur pour l'apoptose. Ainsi, il a été montré que l'activation de la caspase 8 par la voie des récepteurs de mort induit le clivage de la protéine Bid, membre pro-apoptotique de la famille Bcl-2 (Li *et al.*, 1998; Luo *et al.*, 1998). Une fois tronquée, cette protéine est activée et migre à la mitochondrie pour favoriser la libération du « cocktail mitochondrial ». La protéine Bid, membre de la famille Bcl-2, constitue un des liens entre la voie du récepteur Fas et la voie mitochondriale. Un fragment de la protéine Bid, issu du clivage par la Caspase-8, est transféré du cytoplasme à la mitochondrie. Bid tronqué (tBid) se lie à Bax (protéine pro-apoptotique de la famille Bcl-2) et induit son oligomérisation et son intégration dans la membrane externe mitochondriale entraînant l'ouverture de mégapores mitochondriaux à l'origine de la chute du potentiel transmembranaire mitochondriale et la libération du cytochrome c. A l'inverse, la voie mitochondriale peut mener à l'activation de la caspase 8, via la caspase 3 activée (Wieder *et al.*, 2001). Une boucle d'amplification de la cascade des caspases est alors constituée (von Haefen *et al.*, 2003). De plus, Maas *et al.* ont récemment rapporté que la voie mitochondriale est essentielle dans l'induction de l'apoptose déclenchée par les récepteurs de mort par l'intermédiaire de la libération de Smac/Diablo. Les auteurs prouvent qu'après stimulation du récepteur TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand), dans des cellules ne nécessitant pas la voie mitochondriale pour l'induction de l'apoptose, la présence de Smac/Diablo est toutefois indispensable (Maas *et al.*, 2010). Ainsi, la coopération entre les deux voies permet au final d'accomplir le programme apoptotique de façon optimale. La mitochondrie apparaît comme un acteur primordial de la signalisation apoptotique quelle que soit la voie empruntée (Figure 17).

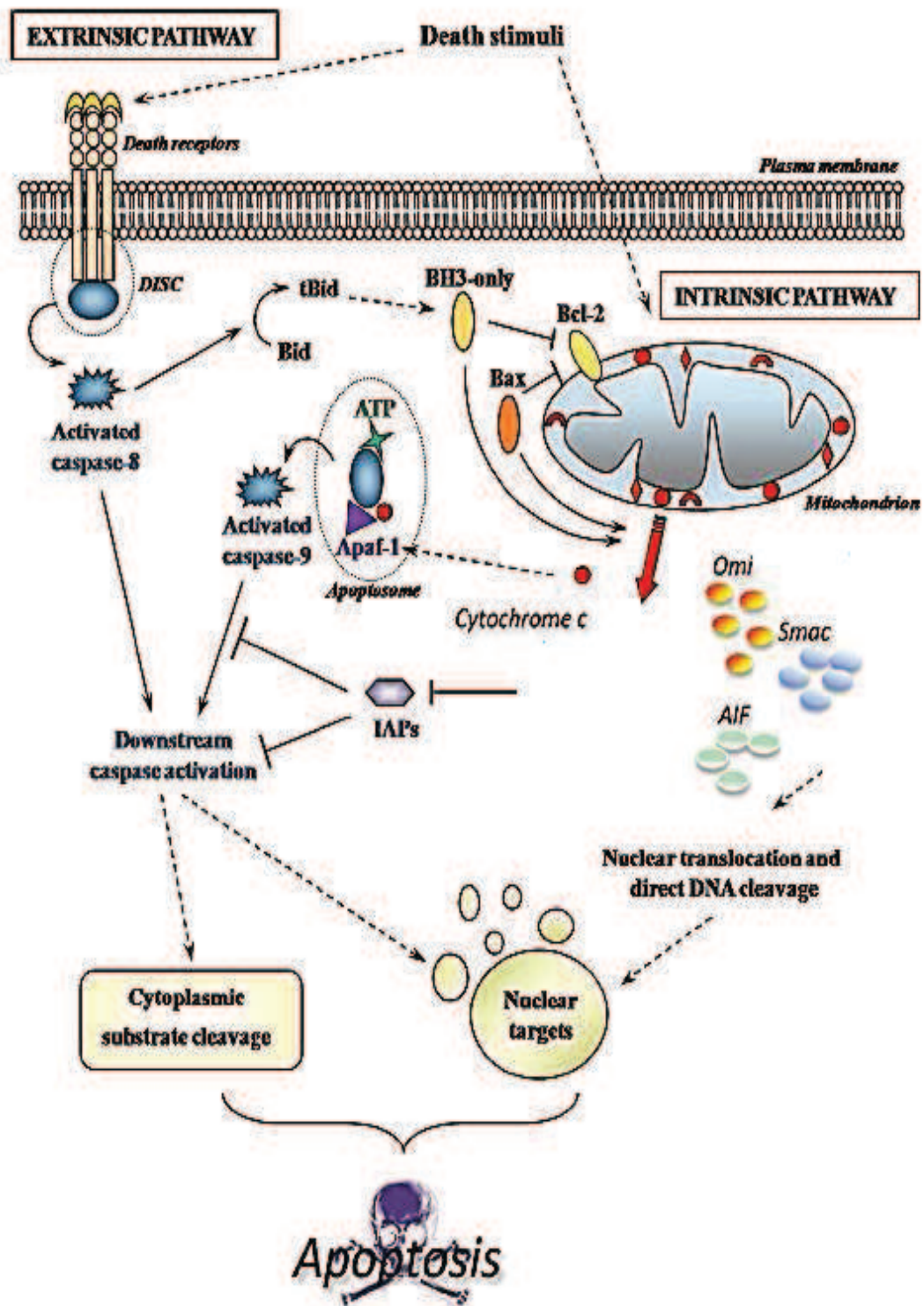


Figure-17 : Les deux voies de signalisation apoptotique Adapté d'après (Estève et al., 2007).

4-3-4 Relations entre les voies de survie et apoptose:

Les cellules perçoivent les changements de leur environnement par l'intermédiaire de récepteurs, le plus souvent membranaires. Ces récepteurs vont transmettre le signal extracellulaire à l'intérieur de la cellule en activant une série de modifications protéiques ou « cascade de signalisation » qui va permettre à la cellule de réagir.

Les voies de signalisation permettent l'engagement rapide d'un programme d'expression génique en réponse à un stimulus. Ces voies ont été extrêmement bien conservées au cours de l'évolution et sont constituées de protéines qui s'activent en cascade et transmettent le signal par une suite d'interaction entre protéines. Les voies de signalisation, comme celles de JNK, Ras/MAPK, ROCK et JAK/STAT jouent un rôle important dans le contrôle de la mort cellulaire (Hanahan RA, 2000).

4-3-4-1 La voie JNK:

La voie JNK (pour c-Jun NH₂-terminal Kinase) est activée par les stimuli de stress comme le choc thermique ou osmotique, les cytokines inflammatoires comme le TNF α , les rayons ionisants et les inhibiteurs de la synthèse protéique. Il existe trois isoformes de la kinase JNK: JNK1(MAPK8), JNK2(MAPK9) et JNK3(MAPK10), et chacune est exprimée sous deux formes, une longue de 55KDa et une courte de 46KDa. Les kinases JNK sont activées par phosphorylation des résidus thréonine et tyrosine de leur boucle d'activation (motif TPY) par les MAPK Kinases MKK4 et 7, qui sont elles-mêmes activées par plusieurs MAPKK Kinases comme MEKK1/2/3/4, MLK (pour mixed lineage kinase), MUK (pour MAPK Upstream Kinase) /DLK/ ZPK, TAK (pour TGF β Activated Kinase), Tpl2 (pour Tumor progression locus) ou encore ASK1 (pour Apoptotic Signal regulated Kinase). Une fois activées, les kinases JNK transloquent dans le noyau pour y activer (ATF2) ou inhiber (c-jun) des facteurs de transcription par phosphorylation. La voie JNK joue un rôle important lors de l'inflammation en induisant le TNF α ou en stabilisant les ARNm d'IL2, d'IL3 et du VEGF-A. La voie JNK est activée par de nombreux stimuli proapoptotiques comme les UV, l'activation de Fas ou les céramides. Elle joue un rôle important dans l'induction de la mort cellulaire, en particulier dans les neurones : l'inactivation de jnk1 et jnk2 diminue l'apoptose des neurones durant le développement et l'inactivation de jnk3 diminue l'apoptose neuronale suite au traitement au kaïnate. L'une des fonctions de la voie JNK serait d'activer la kinase proapoptotique ASK1. (Liu et al., 2005).

4-3-4-2 La voie RAS/MAPK:

La voie des MAP kinases (Mitogen-Activated Protein kinases) est un autre système important dans l'intégration des stimuli extérieurs, leur transduction dans la cellule et la mise en place de réponses appropriées telles que la prolifération, la différenciation et la survie. La cascade des MAP kinases est une voie de signalisation impliquant de nombreuses protéines. La stimulation de récepteurs tyrosine kinase, couplés à cette voie par leur ligand induit leur dimérisation et leur autophosphorylation sur des résidus tyrosine. Cela crée des sites de liaison pour des protéines adaptatrices telle que Grb2 (Growth factor receptor-bound protein 2) et le recrutement de la protéine SOS (Son Of Sevenless) à la membrane plasmique. SOS va activer Ras, qui est lié à la membrane, en catalysant l'échange GDP en GTP. Lorsqu'il est lié au GTP, Ras peut se combiner avec Raf. Raf a un rôle de MAP kinase kinase et va activer MEK1/2 par phosphorylation. La cascade de phosphorylation continue avec les kinases ERK1/2 qui, une fois phosphorylées, peuvent activer un grand nombre de substrats cytoplasmiques et nucléaires (Santarpia *et al.*, 2012).

La voie RAS/MAPK régule l'activité de plusieurs protéines impliquées dans l'apoptose. ERK phosphoryle des facteurs de transcription impliqués dans l'activation de la transcription de membres de la famille Bcl-2 et d'autres gènes important dans l'apoptose. ERK est également capable de phosphoryler directement certaines molécules pro-apoptotiques telles que Bcl-2, Mcl-1, Bad et Bim. Ce dernier est une molécule clé de la cascade des MAPK. L'activité de Bim est régulée par phosphorylation sur différents sites par ERK mais également par Akt. Lorsqu'il est phosphorylé, Bim est adressé au protéasome pour y être dégradé, ainsi il ne peut plus interagir avec Bax : il y a inhibition de l'apoptose (Steelman *et al.*, 2011).

4-3-4-3 La voie RHO/ROCK:

Une fois activées et adressées au compartiment membranaire cible, les petites GTPases Rho peuvent alors interagir avec leurs effecteurs et entraîner les cascades de signalisation. Les Rho sont surtout connues pour leur rôle prépondérant dans la réorganisation du cytosquelette d'actine, en réponse à une grande variété de stimuli extracellulaires. Elles permettent l'assemblage des filaments d'acto-myosine par deux principaux groupes d'effecteurs : les ROCK et les Dia (Jaffe and Hall, 2005). Durant l'apoptose, les cellules subissent des changements morphologiques et biochimiques. Dans un premier temps leur volume diminue, les contacts avec les cellules voisines sont abolis et leur membrane plasmique se déforme. Ensuite ces «bourgeons » cellulaires se détachent et se fragmentent, formant les corps apoptotiques qui seront phagocytés par les macrophages (Ndozangue-Touriguine, et al, 2008).

La réorganisation du cytosquelette d'actine dépendante des ROCK est nécessaire à la formation des bourgeonnements membranaires. ROCKI contient dans sa séquence le site conservé DEDT1113/G de reconnaissance de la Caspase-3, qui permet le clivage du domaine d'auto-inhibition et qui conduit à l'activation constitutive de la kinase (Sebbagh *et al.*, 2001). Cette activation apparaît nécessaire et suffisante aux déformations membranaires et à la relocalisation des fragments d'ADN générés au cours de l'apoptose (Coleman *et al.*, 2001). (ROCKII peut, elle aussi, être activée par clivage au cours de ce processus, de façon indépendante des caspases, par la protéase granzyme B (Sebbagh *et al.*, 2005). Elle peut aussi participer au relargage de microparticules sous le contrôle de la thrombine dans les cellules endothéliales par une activation par clivage dépendant de la caspase-2 (Sapet *et al.*, 2006). Ainsi les deux isoformes permettent de conduire à un même résultat biologique par le même type d'activation, mais sous la dépendance de cascades de signalisation différentes.

4-3-4-4 La voie JAK/STAT:

La famille de protéine JAK est composée de 4 tyrosines kinases cytoplasmiques chez les mammifères : JAK1, JAK2, JAK3 et TYK2. Ces protéines JAK sont recrutées et activées par des récepteurs membranaires aux cytokines tels que les récepteurs à GM-CSF, IL-3, IL-6, érythropoïétine, aux interférons. Elles jouent ainsi un rôle important dans l'hématopoïèse normale et pathologique. Lorsqu'elles sont activées, les JAKs phosphorylent des activateurs de la transcription nommés STAT (Signal Transducers and Activators of Transcription, famille composée de 7 membres : STAT-1, STAT-2, STAT-3, STAT-4, STAT-5A, STAT-5B et STAT-6) induisant leur changement de conformation, leur dimérisation en homodimères ou hétérodimères et leur translocation au noyau où ils peuvent modifier l'expression de certains gènes. Cette voie de signalisation joue un rôle critique dans la prolifération et la résistance à l'apoptose médiées par de multiples cytokines (Steensma *et al.*, 2006). Des phosphorylations activatrices de STAT3 et STAT5 sont observées dans plusieurs lignées cellulaires et dans une large proportion d'échantillons LAM (de 44% à 76% des échantillons selon les études) (Steensma *et al.* 2006). Cette activation aberrante pourrait participer à la résistance à l'apoptose, à l'indépendance vis-à-vis des facteurs de croissance et à la prolifération accrue caractérisant les LAM (Steensma *et al.*, 2006). Cependant, les mécanismes d'activation de cette voie restent inconnus.

V- Objectifs de la thèse:

La lutte contre le cancer porte sur la recherche de nouveaux agents anticancéreux de plus en plus spécifiques et efficaces, en provenance de toutes les sources aussi bien naturelles que synthétiques. Faisant ainsi, l'objet d'un gigantesque effort de recherche et d'investigation.

Le travail présenté dans cette thèse s'inscrit dans le cadre de la valorisation des plantes médicinales Marocaines et la recherche de nouvelles molécules anticancéreuses. Le but de cette étude était le criblage cytotoxique des extraits organiques de quatre plantes médicinales traditionnellement utilisées dans la médecine populaire marocaine, sur un large panel de lignées cellulaires cancéreuses liquides et solides de différentes origines. Ainsi qu'une étude plus détaillée du mécanisme d'action et de la composition chimique des extraits les plus prometteurs sur les lignées cellulaires les plus sensibles.

Nous avons donc étudié l'activité cytotoxique *in vitro*, des extraits organiques des plantes : *Inula viscosa*, *Retama monosperma L*, *Marrubium vulgare* et *ormenis eriolepis* Coss issus de l'extractothèque du Laboratoire de Biochimie-Immunologie de la faculté des sciences de Rabat.

Le mécanisme d'action des extraits des trois plantes *Retama monosperma L*, *Marrubium vulgare* et *ormenis eriolepis* Coss, ayant montré des activités cytotoxiques importantes, ont été exploré. Ainsi nous avons étudié les effets anti-leucémiques spécifiques que présente l'extrait hexanique de *Rétama monosperma L* sur la lignée cellulaire « Jurkat » et la fraction dichlorométhane *Marrubium vulgare* sur les lignées « Jurkat et Jeko-1 » ainsi que l'effet anti-tumoral que présente la fraction dichlorométhane et l'extrait hénanique d'*ormenis eriolepis* Coss sur les lignées « Jurkat, Jeko-1, LN229 et PC-3 ». Ces investigations ont été réalisées grâce à plusieurs techniques dont la cytométrie en flux, la microscopie optique et le western blot.

Parallèlement, nous nous sommes intéressés à la cytotoxicité des extraits les plus actifs vis-à-vis des cellules normales. Ainsi leurs effets a été évalué sur des lignées cellulaires de control comme les fibroblastes de souris NIH3T3 et les lymphocytes normales TK-6.

Enfin, l'analyse de la composition chimique des extraits a été réalisée par chromatographie en phase gazeuse, la spectrométrie de masse a permis quant à elle l'identification des composés bioactifs majoritaires.

Matériels et méthodes

1- Préparation des extraits de Plantes :

1-1 Extraction par macération :

Les 4 plantes sélectionnées pour cette étude ont été collectées dans leur habitat naturel à différents endroits durant la période 2007-2011 (voir Tableau). La détermination botanique des espèces a été réalisée par le Pr. M. FENNANE de l'Institut Scientifique de Rabat. Les parties récoltées ont ensuite été séchées à l'abri de la lumière du soleil. Les poudres des différentes plantes ont été soumises à l'extraction par macération dans du méthanol. Les extraits récupérés sont évaporés à sec sous pression réduite, obtenant ainsi des résidus sirupeux.

1-2 Extraction par soxhlet :

- Préparation des extraits d'*Inula viscosa* L.

La poudre sèche d'*Inula viscosa* L. (180 g) a été extraite au soxhlet en utilisant des solvants de polarité croissante, successivement au n-hexane (1,3 L) et au méthanol (1,3 L). Les extraits obtenus sont évaporés à sec sous pression réduite à l'aide d'un rotavapeur. L'extrait méthanolique (IV-ME, 23.2g) a été soumis ensuite à des partitions liquide-liquide successives en présence de dichlorométhane et d'acétate d'éthyle (Figure 22). Après séchage sous pression réduite, l'extrait hexanique (IV-HE, 22g), dichlorométhane (IV-DF, 10,7g) et l'extrait acétate d'éthyle (IV-AF, 8,3g) sont obtenus et conservés à – 20°C jusqu'à leur utilisation.

- Préparation des extraits de *Retama monosperma* L.

La poudre sèche de *Retama monosperma* L. (200 g) a été extraite au soxhlet, en utilisant des solvants à différentes polarités, successivement au n-hexane (1,3 L) et au méthanol (1,3 L). Les extraits obtenus sont évaporés à sec sous pression réduite à l'aide d'un rotavapeur. L'extrait méthanolique Rm-ME (14,3g) a été soumis ensuite à des partitions liquide-liquide successives en présence de dichlorométhane et d'acétate d'éthyle (Figure 18). Après séchage sous pression réduite, les extraits hexanique (Rm-HE, 5g), dichlorométhane (Rm-DF, 6,6g) et l'extrait acétate d'éthyle (Rm-AF, 2,6g) sont obtenus et conservés à – 20°C jusqu'à leur utilisation.

- Préparation des extraits d'*Ormenis erirolepis* Coss.

La poudre sèche d'*Ormenis erirolepis* Coss(120g) a été extraite successivement avec au n-hexane et au méthanol à l'aide d'un Soxhlet pour obtenir l'extrait hexanique (Oe-HE, 3,91 g) et l'extrait méthanolique (Oe-ME, 10,94 g). Les extraits obtenus sont ensuite évaporés à sec sous pression réduite à l'aide d'un rotavapeur. L'extrait méthanolique a été successivement fractionné avec le dichlorométhane et l'acétate d'éthyle pour obtenir la fraction de dichlorométhane (Oe-DF, 3,28 g) et de la fraction d'acétate d'éthyle (Oe-AF, 3,16 g). Tous les extraits ont été évaporés et conservés à -20 ° C jusqu'à leur utilisation.

- Préparation des extraits de *Marrubium vulgare*.

La poudre sèche d'*Marrubium vulgare*. (g) a été extraite successivement avec au n-hexane et au méthanol par Soxhlet afin d'obtenir l'extrait hexanique (Mv-HE, g) et l'extrait méthanolique (Mv-ME, g). Les extraits obtenus sont ensuite évaporés à sec sous pression réduite par rotavapeur. L'extrait méthanolique a été successivement fractionné avec le dichlorométhane et l'acétate d'éthyle pour obtenir la fraction de dichlorométhane (Mv-DF, g) et de la fraction d'acétate d'éthyle (Mv-AF, g). L'extrait aqueux Mv-AQ a été extrait par un processus d'infusion pendant 15 min dans de l'eau (100 ° C). L'extrait a été filtré à travers un papier filtre Whatman, suivie par une lyophilisation. Tous les extraits ont été évaporés et conservés à -20 ° C jusqu'à leur utilisation.

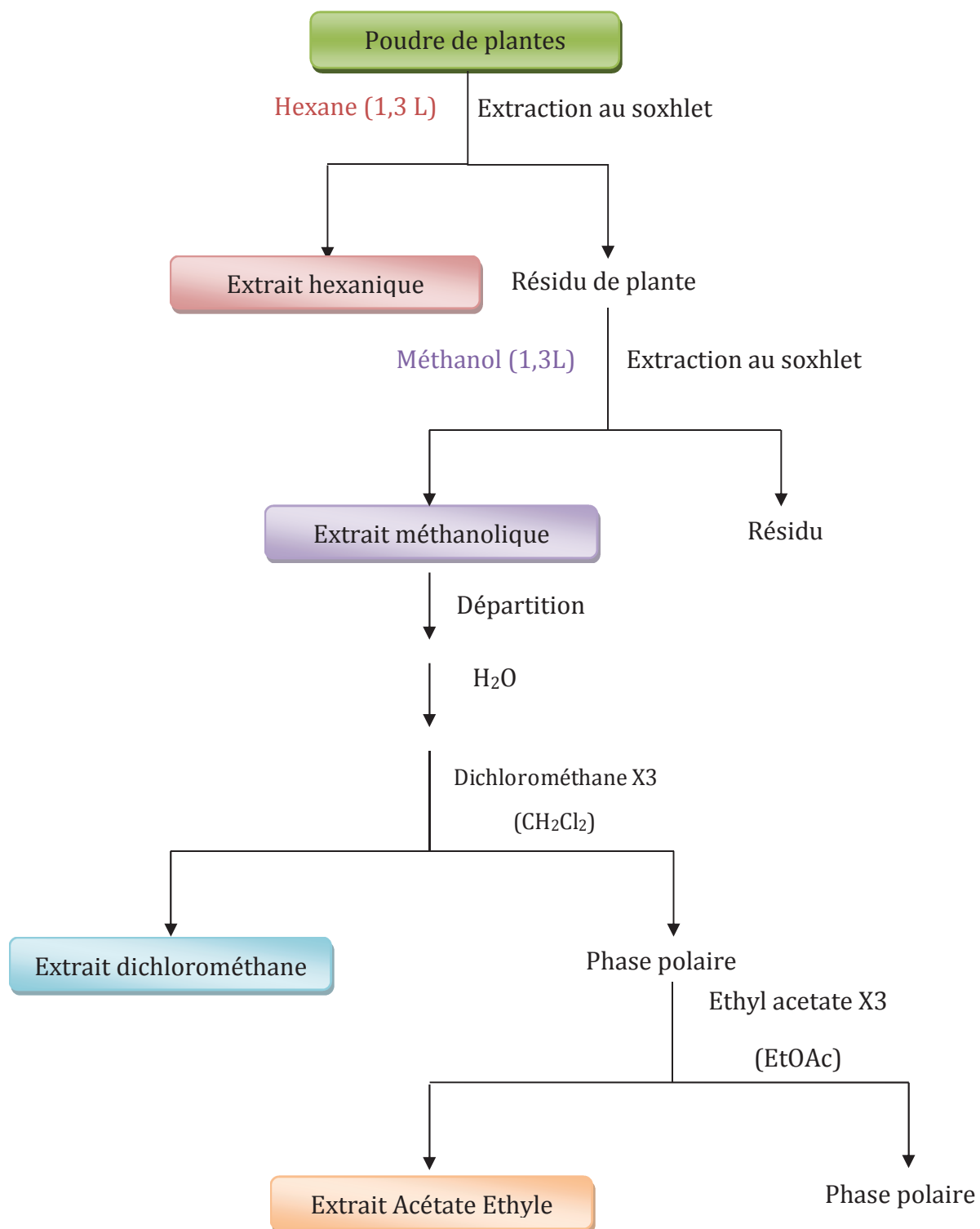


Figure 18 : Protocole d'extraction par soxhlet des plantes de l'étude Adaptée d'après (Merghoub et al. 2012).

2- Effecteurs pharmacologiques :

- Doxorubicine

La doxorubicine (Figure 19) ou adriamycine est un antibiotique de la famille des anthracyclines qui est obtenu par fermentation chez différents micro-organismes appartenant au genre *Streptomyces* (Arcamone *et al.*, 1997). Elle est considérée comme étant un inhibiteur de la topoisomérase II grâce à sa capacité de former un complexe avec celle-ci et l'ADN afin de créer une hélice compacte torsadé, menant à une éventuelle cassure de l'ADN (Burden and Osheroff 1998).

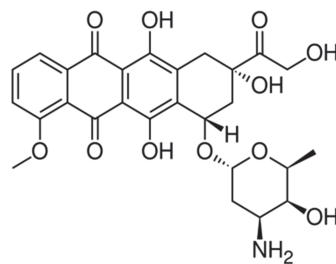


Figure 19 : Structure chimique de la Doxorubicine

- L'étoposide :

L'étoposide (Figure 20) est un dérivé hémisynthétique de la podophyllotoxine, molécule naturelle extraite de la racine de mangarodier (*Podophyllum peltatum*). Il inhibe l'entrée en mitose des cellules tumorales (phases S et G₂) par action sur la topoisomérase II et induit des cassures d'ADN. Il n'inhibe pas l'assemblage des microtubules. Il possède une activité anti tumorale à large spectre, à la fois sur les tumeurs d'origine hématopoïétique et sur les tumeurs solides de différentes origines. (Baldwin E.L. *et al.*, 2005).

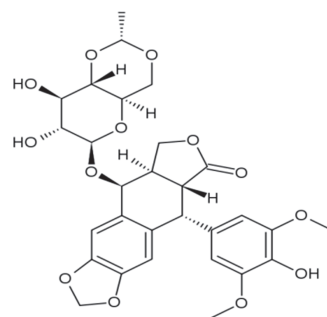


Figure 20 : Structure chimique de l'Etoposide

- Q-VD-OPh

Q-VD-OPh (Quinolyl-valyl-O-methylaspartyl-[2,6-difluorophenoxy]-methyl ketone) est un puissant inhibiteur de caspases recombinée 1, 3,8, et 9. Il prévient l'apoptose médiée par les trois grandes voies de signalisation des caspases, 9/3, caspases 8/10, et de la caspase 12 (Caserta *et al.*, 2003).

- SP600125

Un inhibiteur sélectif et réversible de la Jun N-terminal kinase (JNK) 1 qui inhibe de façon dose-dépendante la phosphorylation (Bennett *et al.*, 2001).

- U0126

C'est un inhibiteur hautement sélectif des protéines MEK1 et MEK2 de la famille des MAPK/ERK kinases. Il a été jugé fonctionnellement antagoniste à l'activité transcriptionnelle de l'AP-1 par inhibition non compétitive des MEK 1 et 2 kinases (Duncia *et al.*, 1998).

- H1152

H1152 est un inhibiteur puissant, spécifique et perméable de ROCK (Rho kinase) qui agit en compétition avec l'ATP. Il est utilisé pour examiner le rôle de ROCK dans divers processus tels que l'assemblage de fibres de stress, la vasoconstriction, ainsi que le développement neuronal (Johnson *et al.*, 2009).

- Pifithrin α

C'est un inhibiteur réversible de l'apoptose et de la transcription des gènes dépendant de la p53, tels que la Cycline G, p21/waf1 et le mdm2. Il est aussi capable d'améliorer la survie des souris après un stress génotoxique, comme l'irradiation UV et le traitement avec des composés cytotoxiques, y compris, Etoposide et le Taxol (Komarova *et al.*, 2003).

- JAK3 Inhibitor I (calbiochem)

C'est un inhibiteur réversible spécifique de JAK3 (Janus kinase de la famille 3; IC50 = 78 μ M) qui n'a aucun effet sur JAK1, JAK2 kinases ou ZAP / Src tyrosine kinase.

3- Culture cellulaire:

Toutes les lignées cellulaires de cancers humains utilisées dans cette étude ont été obtenues à l'American Type Culture Collection (Manassas, Etats-Unis).

3-1 Lignées cellulaires tumorales:

- LN229

La lignée cellulaire **LN229** (ATCC® CRL-2611) est une lignée de glioblastome qui a été établie en 1979 à partir de cellules prélevées du lobe fronto- pariéto-occipital droit d'une patiente de 60 ans ; ces cellules présentent une p53 mutée, ainsi que d'éventuelles suppressions homozygotes des gènes suppresseurs de tumeurs p16 et p14 ARF.

- T98G

T98G (ATCC® CRL-1690) est une lignée cellulaire de glioblastome multiforme dérivée d'une tumeur d'un homme de 61 ans de race blanche. Elle est caractérisée par une durée de vie indéfinie ainsi qu'un nombre de chromosomes hyperpentaploïde. Lorsqu'elles sont privées de sérum ou entassées, les cellules entrent dans un état viable d'arrêt en G1.

- U-87MG

U-87MG (ATCC® HTB-14) est une lignée cellulaire humaine hypodiploïde avec un nombre de chromosomes de 44. Elle est dérivée d'un gliome malin de grade IV (astrocytoma) d'une patiente de 44 ans de race blanche, en utilisant la technique d'explantation.

- Jurkat

La lignée cellulaire **Jurkat** appelée aussi J45.01 (ATCC CRL-1990) a été établie à partir du sang périphérique d'un jeune garçon de 14 ans présentant une leucémie aigüe lymphoïde T. (Schneider, *et al.*, 1977). Ce sont des lymphocytes T déficientes en CD45 et exprimants le CD2, CD3 et CD28, elles peuvent produire de l'IL2 en réponse à une stimulation aux ionophores de calcium et les esters de phorbol.

- Jeko-1

Jeko-1 (ATCC CRL-3006) est une lignée de lymphome à cellules de manteau (MCL= Mantle Cell Lymphoma). Elle a été établie à partir de cellules mononuclées du sang périphérique

d'une patiente de 78 ans présentant une variante à cellules plus larges accompagné d'une conversion leucémique. Ces lymphoblastes sur expriment les protéines Cycline D1, Bcl-2, c-Myc et Rb.

- SW620

Etablie à partir d'un ganglion lymphatique d'un homme de 51 ans, **SW620**(ATCC® CCL-227) est une lignée cellulaire caractérisée par de petites cellules sphériques et bipolaires, une synthèse de quantités minimales de CEA ainsi qu'une haute tumorigenicité chez la souris.

- SW480

SW480 (ATCC® CCL-228) est dérivée d'un adénocarcinome du côlon grade 3-4 d'un homme de 51 ans. Les cultures initiales contenaient un mélange de cellules épithéliales et bipolaires, mais les cellules épithéliales ont prédominé par la suite. Les cellules produisent CEA.

- U2OS

C'est lignée cellulaire d'ostéosarcome humain fortement altérée avec un nombre de chromosomes hypertriploïde. **U2OS**(ATCC® HTB-96) expriment les protéines p53 et Rb. Elle a été connue sous le nom de 2T et a été cultivée à partir du tissu osseux d'une jeune fille de quinze ans souffrant d'ostéosarcome en 1964. Les cellules d'origine ont été prises à partir d'un sarcome modérément différencié du tibia.

- PC-3

PC-3(ATCC® CRL-1435) a été initiée à partir d'une métastase osseuse d'un adénocarcinome de la prostate de stade IV d'un homme de 62 ans. Elle est quasi-triploïde avec un nombre modal de 62 chromosomes.

3-2 Lignées cellulaires de contrôle :

- NIH/3T3

C'est une lignée de fibroblastes embryonnaires de souris (ATCC® CRL-1658), qui proviennent d'une lignée préconçue en 1962. 3T3 désigne le protocole de transfert et d'inoculation, qui en le suivant les cellules commencent à prospérer et à se stabiliser en culture après environ 25 générations de croissance *in vitro*.

- TK6

La lignée cellulaire hétérozygote de la thymidine kinase **TK6** (ATCC® CRL-8015) a été isolée à partir de la ligne lymphoblastoïde HH4. HH4 a été dérivée à partir de la lignée cellulaire AIT-2. Cellules TK6 sont CD19 positive, 50% de la population de cellules expriment le CD20 et une petite sous-population a été testé positif pour CD22.

3-3 Conditions de culture et viabilité cellulaire:

Chaque lignée a été cultivée dans le milieu de culture approprié. Les manipulations se sont déroulées sous une hotte à flux laminaire vertical. Les lignées adhérentes LN229, T98G, U87MG, SW620, SW480, U2OS, PC-3 et NIH3T3 ont été cultivées dans un milieu DMEM à haute teneur en glucose (4.5 g/l) supplémenté en L-glutamine (Invitrogen, Carlsbad, CA). Les lignées en suspension Jurkat, Jeko-1 et TK6 ont été cultivées en présence de RPMI (Invitrogen, Carlsbad, CA). Chaque milieu est complémenté par 10% de sérum de veau foetal (SVF) préalablement décomplémenté (30 min à 56°C) et 100 unité/ml de pénicilline/streptomycine. Les lignées cellulaires sont maintenues à 37°C dans une atmosphère saturée en humidité et contenant 5% de CO₂.

Toutes les lignées cellulaires ont été cultivées, repiquées et soumises au dépistage systématique de contamination aux mycoplasmes et ont été traitées à une concentration prophylactique de 5 ug / ml avec Plasmocin™ (InvivoGen, San Diego, CA). Une analyse de courbe de croissance ainsi que des tests fréquents de morphologie ont été performé. Les cellules ont été énumérées à l'aide d'un hématimètre de Malassez ou cellules de Kova (Kova® Glasstic® slide, Hycor Biomedical Inc.). Leur viabilité a été évaluée par la méthode d'exclusion au bleu trypanbasé sur la capacité des cellules vivantes à exclure les colorants de haut poids moléculaire. Le bleu trypan (0,4% en PBS) (Sigma-Aldrich) est ajouté à la suspension cellulaire. La numération est effectuée sur des lames de comptage : lame de Malassez ou bien lame de Kova. Le bleu Trypan est activement exclu des cellules vivantes alors qu'il pénètre dans le cytoplasme des cellules mortes. En microscopie optique, les cellules mortes sont colorées en bleu alors que les cellules vivantes restent incolores (Bhuyan *et al.*, 1976).

3-4 Conservation des cellules:

Les cellules en phase exponentielle de croissance sont détachées par de la trypsine –EDTA, lavées au PBS et centrifugées à 1700 rpm pendant 8 min à 4°C. Le culot cellulaire obtenu est remis en suspension dans du milieu froid contenant : 90% de SVF et 10% de DMSO stérile, à

raison de 1.10^6 cellules/ml. Les cellules sont distribuées dans des cryotubes de 1ml mis dans une boîte de congélation progressive à -80°C . Après 24 h, les tubes sont stockés soit directement à -80°C , soit dans l'azote liquide.

4- Évaluation de la cytotoxicité des extraits *in vitro*:

Les extraits obtenus sont solubilisés dans le diméthyl sulfonide (DMSO) avant d'être incorporés dans le milieu complet. La concentration finale du DMSO dans les différentes solutions est inférieure à 0.01%. Une série de dilutions des extraits est effectuée avec le milieu de culture, afin d'évaluer les différents extraits à des concentrations croissantes comprises entre $1\mu\text{g/ml}$ et $50\mu\text{g/ml}$.

4-1 Test de viabilité:

L'une des méthodes les plus utilisées pour la mesure de la prolifération et de la viabilité cellulaire, dans le cadre d'un criblage anti-tumoral de nouvelles drogues, est celle utilisant la réaction de la luciférase pour déterminer le nombre de cellules viables en culture. Lors de cette étude, nous avons opté pour le Cell Titer-Glo Luminiscent Assay Kit de (Promega, Madison, WI, USA). La mesure est basée sur la quantification d'ATP présente dans les cellules, ce marqueur de l'activité métabolique étant directement lié à la viabilité. Les propriétés uniques de la luciférase permettent une excellente proportionnalité et linéarité entre la luminescence mesurée et le nombre de cellules viables. Brièvement, les cellules ont été étalées et traitées dans des plaques de 96 puits, ensuite $100\mu\text{l}$ du réactif Cell Titer-Glo ont été ajoutés après 24h ou 48h du traitement. La détection de la luminescence était au moyen du spectrophotomètre (multi-well Synergy Mx scanning spectrophotometer, Biotek, Winooski, VT). Les cellules non traitées sont considérées comme témoin avec un pourcentage de viabilité de 100%.

4-2 Détermination de l'IC₅₀:

A l'ordre de déterminer les valeurs des IC₅₀, les lignées sensibles aux extraits les plus actifs sont ensemencés lors de leur phase exponentielle de croissance dans des plaques de 96 puits à une densité de 5000 cellules par puits dans un volume de $100\mu\text{l}$. Les cellules sont exposées ensuite à différentes concentrations des produits à tester allant de $1\mu\text{g/ml}$ à $50\mu\text{g/ml}$ et remises en culture à 37°C pendant 48h. Ultérieurement, un test de viabilité « Cell Titer-Glo » est réalisé afin de déterminer la cytotoxicité des extraits de plantes. Des courbes d'inhibition

de croissance sont tracées (% de viabilité cellulaire en fonction des concentrations des produits). Ainsi la concentration qui induit 50% d'inhibition de croissance (IC50) peut être déterminée avec le logiciel GraphPadPrism (version 3.0) grâce à une régression non linéaire.

5- Étude du mécanisme d'action des extraits bioactifs:

5-1 Analyse de la morphologie cellulaire par colorants d'exclusion et microscopie optique:

Le bleu Trypan est un colorant d'exclusion qui permet de détecter les cellules nécrotiques et apoptotiques tardives dont la membrane plasmique a été altérée. Cette technique utilisée en microscopie optique permet le comptage des cellules en utilisant une cellule de Thoma ou de Bürker par exemple (Figure 21).



Figure 21 : cellule de comptage sous microscope optique

La microscopie optique est utilisée principalement comme méthode de détermination qualitative des changements morphologiques, telles que la diminution de taille ou la condensation du noyau et de la chromatine, permettent de détecter les cellules apoptotiques par microscopie optique. On peut également observer les organelles tels que les mitochondries, gonflant durant la nécrose (*Tableau 1*) (Darzynkiewicz *et al.*, 1992).

Tableau 1 : Critères morphologiques pour l'identification des cellules apoptotiques et nécrotiques (Al-Rubeai ; 1998)

Apoptose	Nécrose
✓ Taille réduite, forme complexe	✓ Gonflement de la cellule
✓ Bourgeonnement de la membrane plasmique	✓ Gonflement du noyau
✓ Condensation de la chromatine	✓ Condensation de la chromatine
✓ Perte de structure du noyau	✓ Gonflement de la mitochondrie
✓ Presence de corps apoptotique	✓ Vacuolisation du cytoplasme
✓ Dilatation du réticulum cytoplasmique	✓ Rupture de la membrane plasmique
✓ Organelles peu modifiées	✓ Dissolution de l'ADN (Caryolyse)

Pour notre étude, les cellules ont été étalées dans des plaques à 6 puits et traitées avec 50 µg / ml de l'extrait indiquée pendant 24 heures et 48h. Des images représentatives des changements morphologiques ont été recueillies sous un microscope optique lumière (Leica Microsystems, Wetzlar, Allemagne).

5-2 Cryométrie en flux:

5-2-1 Marquage à l'iodure de propidium et étude du cycle cellulaire :

L'inhibition de la prolifération cellulaire peut s'expliquer par la mise en œuvre de deux phénomènes qui sont, soit un ralentissement ou un arrêt du cycle cellulaire, soit le déclenchement du processus de mort cellulaire programmée. Pour ce faire, La cytométrie en flux, une technique qui permet l'analyse multiparamétrique de plusieurs milliers de cellules isolées a été utilisée. Les cellules traitées ont été récupéré 24h ou 48h après ajout des extraits de plantes les plus actifs afin d'étudier leur contenu en ADN. Elles ont été récoltées après traitement à la trypsine et lavées en DMEM 10% SVF, centrifugées (600 g, 8 min) et reprises dans 300 µl PBS pour $5 \cdot 10^5$ cellules. Elles ont ensuite été ajoutées goutte à goutte dans 700 µl d'éthanol absolu froid maintenu en agitation. Le mélange a été incubé pendant au moins 2 h à -20°C afin de fixer les cellules et de les perméabiliser. Après centrifugation (600 g, 5 min), elles ont été réhydratées pendant 15 min à température ambiante en PBS. Après une nouvelle centrifugation, elles ont été reprises en tampon de marquage à l'iodure de propidium (100 mM Tris pH 7,4, 150 mM NaCl, 1 mM CaCl₂, 0,5 mM MgCl₂, 0,1% NP-40) et marquées avec 50 µg d'iodure de propidium pendant 5 min en présence de 50 µg /ml RNase A (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO) à température ambiante.

Les cellules ont ensuite été immédiatement analysées en cytométrie en flux sur la base de leur fluorescence en iodure de propidium. Les résultats ont été acquis sur un cytomètre FACS EPIC Coulter puis analysés à l'aide du logiciel WinMDI.

5-2-2 Double marquage à l'Annexine V/Iodure de Propidium:

Les annexines sont une famille de molécules impliquée dans la signalisation cellulaire et ayant la capacité de se fixer spécifiquement aux phosphatidylsérines. Lors de l'induction de l'apoptose, des phénomènes d'inversion de type « flip-flop » surviennent entre les couches phospholipidiques internes et externes de la membrane plasmique, entraînant l'exposition des phosphatidylsérines au milieu extracellulaire. Ce test fait également intervenir l'iodure de propidium (IP), qui est un agent fluorescent intercalant des acides nucléiques. En cytométrie en flux, l'IP permet de distinguer facilement les cellules vivantes des cellules mortes. Pour cela, un double marquage est réalisé afin de distinguer dans les populations de cellules mortes, les sous-populations de cellules nécrotiques (marquées avec l'annexine et marquées avec l'IP) et de cellules apoptiques (marquées seulement à l'annexine V) (Moore *et al.*, 1998). Cette analyse a été réalisée avec le Kit Annexin-V-FITC (Invitrogen, Carlsbad, CA) selon les recommandations du fabricant. Les cellules cancéreuses sont traitées aux différents temps d'analyse souhaités par l'extrait d'intérêt. Après ces traitements, les cellules préalablement lavées deux fois au PBS ; sont ensuite centrifugées et suspendues dans 100 µl de tampon de liaison du kit auquel 5µL d'Annexin-V-FITC et 10µL d'Iodure de propidium ont été ajoutés. La suspension cellulaire est incubée pendant 15 minutes à température ambiante à l'obscurité. Une analyse est aussitôt faite à l'aide du cytomètre de flux FACScan (Coulter Epics XL-MSL; Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA).

5-3 Mesure de l'activité caspases 3-7:

Caspase-Glo® 3/7 Assay (Promega) est un dosage luminescent qui mesure spécialement l'activité des caspase-3 et 7. Ce sont des protéases caractérisées par la présence d'une cystéine au niveau de leur site actif et leur capacité d'hydrolyser des chaînes polypeptidiques au niveau d'un acide aspartique ce qui est à l'origine de leurs noms. Il existe plusieurs classes de caspases, celles dites de classe II sont les caspases effectrices de l'apoptose (e.g caspases 3 et 7) qui jouent un rôle clé dans les cellules mammifères. La luminescence qui est fournie par un substrat contenant la séquence de DEVD térapeptide, est proportionnelle à la quantité d'activité de la caspase présente. Il repose sur les propriétés d'une luciférase thermostable (Ultra-Glo™), qui est formulée pour améliorer les performances sur une large gamme de

conditions de dosage. Pour notre étude, les cellules ont été étalées et traitées dans des plaques de 96 puits, ensuite 100 μ l du réactif ont été ajouté après 24h ou 48h du traitement. La détection de la luminescence était au moyen du spectrophotomètre (multi-well Synergy Mx scanning spectrophotometer, Biotek, Winooski, VT).

5-4 Analyse de l'expression des protéines relatives à l'apoptose:

La technique du western blot permet la détection et éventuellement une analyse semi quantitative du taux d'expression d'une protéine dans un échantillon cellulaire. Tout d'abord, les extraits protéiques sont obtenus en lysant les cellules qui sont traitées, scrapées et récupérées dans du PBS 1X et centrifugées 5 min à 1500 rpm. Le culot est lavé une fois dans du PBS puis repris dans 500 μ L de tampon de lyse contenant des inhibiteurs de protéases et (50 mM Tris- HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA and 1% (v/v) Triton X-100). Les cellules sont lysées pendant une 15 min à 4°C. Après une centrifugation de 5 minutes à 14000 rpm à 4°C, les débris cellulaires sont sédimentés. Le surnageant contenant les protéines est ensuite récupéré et les protéines sont ensuite dosées par la méthode de Bradford. Les échantillons protéiques sont aliquotés et conservés à -20°C. Lorsque la teneur en protéine est quantifiée, 10 à 40 μ g d'échantillon protéique est déposé dans un gel d'électrophorèse, en présence de SDS (*sodium dodecyl sulfate*) qui dénature les protéines et leur confère une charge négative. La concentration en polyacrylamide du gel varie de 5 à 15% en fonction du poids moléculaire de la protéine d'intérêt. Dans chaque puits du gel, on charge la même quantité de protéines. Celles-ci sont au préalable mélangées à un tampon de charge (500 mM Tris-HCl à pH 6.8, 30% glycérol, 10% SDS, 0.012% bleu de bromophénol) et dénaturées en les chauffant à 95°C durant 5 minutes. Un marqueur de poids moléculaire, composé de différentes protéines de poids moléculaire connu, est placé dans un puits en parallèle ce qui permet d'identifier la protéine d'intérêt. Sous l'influence d'un courant électrique, les protéines chargées vont migrer dans le gel vers l'anode et sont ainsi séparées en fonction de leur poids moléculaire. La migration, réalisée sous une tension de 100 Volts, se fait dans un tampon de migration composé de 25 mM de Tris HCl, 192 mM de glycine et 0.1% de SDS. Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane de polyvinylidène difluoride (PVDF) sous une tension de 60 Volts à 4°C pendant 120 minutes dans un tampon de transfert composé de 25 mM de Tris HCl, 192 mM de glycine et 20% de méthanol. Afin de limiter les liaisons aspécifiques des anticorps, la membrane est incubée pendant 1 heure sous agitation dans un tampon de blocage contenant une solution de TBS (20 mM Tris-HCl à pH 7.5, 150 mM NaCl), 0.05% de Tween 20 (Sigma-Aldrich) et 5% de lait en poudre ou 5% de BSA. La

membrane est ensuite incubée une nuit à 4°C sous agitation en présence de l'anticorps primaire spécifique de la protéine d'intérêt dilué dans le tampon de blocage utilisé. Après plusieurs rinçages avec le tampon TBS contenant 0.05% de Tween, la membrane est incubée 1 heure à température ambiante avec un anticorps secondaire, couplé à une peroxydase, reconnaissant l'anticorps primaire. Les différents anticorps, leur spécificité, leur concentration et le temps d'incubation sont présentées dans le Tableau 2. Le complexe [protéine-anticorps primaire-anticorps secondaire] est révélé par le kit ECL (ECL Western blotting detection reagents ; Millipore, Billerica, MA).

Tableau 2: Liste et caractéristiques des anticorps primaires et secondaires employés.

Anticorps	Dilutions		References
pH2AX	1/1000	#9718	Cell signaling (beverly,MA)
Cleaved Caspase-3	1/1000	#9464	Cell signaling (beverly,MA)
Cleaved Caspase-7	1/1000	#8438	Cell signaling (beverly,MA)
Cleaved Caspase-9	1/1000	#7237	Cell signaling (beverly,MA)
Caspase-8	1/1000	#9746	Cell signaling (beverly,MA)
Bcl-2	1/1000	#2870	Cell signaling (beverly,MA)
Bcl-XL	1/1000	#2764	Cell signaling (beverly,MA)
Mcl-1	1/1000	#5453	Cell signaling (beverly,MA)
Bim	1/1000	22-40	Millipore, Billarica, MA
Bax	1/1000	BD610391	Transductions laboratories™ California, USA
Bad	1/1000	BD610982	Transductions laboratories™ California, USA
Fas-L	1/1000	SC-6237	Santa Cruz, CA
JNK	1/1000	SC-137018	Santa Cruz, CA
pJNK	1/1000	SC-135642	Santa Cruz, CA
PARP	1/1000	#9242	Cell signaling (beverly,MA)
β-tubiline	1/4000	T0198	Sigma-Aldrich

6- Caractérisation des composés chimiques des extraits bioactifs:

La spectrométrie de masse désigne une méthode d'analyse qui repose sur la détermination des masses des espèces atomiques ou moléculaires individuelles de l'analyte, ce qui permet de recueillir des informations sur sa nature, sa composition et sur sa structure. Le spectromètre de masse est constitué de trois parties ; la source d'ionisation, l'analyseur et le détecteur. Les analyses relatives à l'identification des composés chimiques des extraits bioactifs ont été effectuées au niveau du service instrumental et technique de la « Estacion Experimental del Zaidin » (CSIC, Grenade, Espagne).

Un chromatographe « Varian 450 » a été couplé à un spectromètre de masse « 240 Ion Trap ». Les conditions du couplage GC/MS habituellement utilisées dans le cadre de l'analyse des extraits de plantes ont été employées après vérification de leur compatibilité sur un standard.

6-1 Dérivation au TMS:

Avant d'être injectés en GC/MS ; 100 µl de l'extrait ont été d'abord prélevés et séchés avec de l'Azote (N₂), ensuite mélangés à 100 µl d'agent de dérivation (N, O-bis (triméthylsilyl) trifluoroacétamide avec 1% de triméthylchlorosilane) puis chauffés pendant 10 min à 60°C, pour former des dérivés TMS (triméthylsilylés), plus faciles à vaporiser et ayant une meilleure réponse en spectrométrie de masse, comparée à celle de leurs analogues non dérivés.

6-2 Conditions chromatographiques :

La colonne utilisée est une colonne capillaire Varian Factor Four VF-5MS de 30 m avec un diamètre interne de 0,25 mm et une épaisseur de film de 0,25 µm. Le débit d'hélium est autorégulé à 1 mL/min. La température de l'injecteur est de 280 °C, ce dernier est utilisé en mode splitless. 1 µL d'échantillon est automatiquement injecté. L'interface entre le chromatogramme et le spectromètre de masse est maintenue à 240 °C. Le chromatographe est utilisé en gradient de température.

6-3 Détection par spectrométrie de masse et analyse quantitative:

Le spectromètre de masse est utilisé avec une source à ionisation électronique. Le délai de solvant est fixé à 4 min. Le balayage du quadripôle est effectué en mode Scan entre 50 et 500 m/z à la fréquence de 1,27 scan/s.

L'analyse qualitative des composés a été basée sur la comparaison de leur spectre de masse et leur temps de rétention par rapport à celles des bases de données NIST 08 et Kovats RI sur les chromatogrammes enregistrés en mode SIM en utilisant les ions caractéristiques. Quant à l'analyse quantitative, elle a été réalisée par intégration des pics et calculée en pourcentage en fonction de la superficie totale identifiée sur les chromatogrammes TIC.

Résultats

Chapitre I

Chapitre I

Premier Article

Avant propos

“Screening of North African medicinal plant extracts reveals significant cytotoxic effect on different cancer cell line models” par Lamiae Belayachi, Clara Aceves-Luquero, Nawel Merghoub, Youssef Bakri, Silvia Fernández de Mattos, Saaïd Amzazi et Priam Villalonga.

Le but de cette étude était l'évaluation de l'activité cytotoxique des extraits organiques de quatre plantes médicinales traditionnellement utilisées dans la médecine populaire marocaine. Les plantes : *Inula viscosa*, *Ornithoglossum arabicum* (asteracées), *Retama monosperma* (fabacées) et *Marrubium vulgare* (lamiacées) ont été d'abord extraites en utilisant des solvants organiques à polarité ascendante et ultérieurement testées sur un panel de lignées cellulaires cancéreuses d'origine humaine. Les mesures de viabilité cellulaire ont été effectuées en criblant les seize extraits obtenus. Les lignées cellulaires les plus sensibles ont ensuite été exposées à des concentrations croissantes des extraits les plus actifs afin de calculer les valeurs de IC_{50} . Les résultats de la viabilité cellulaire ont révélé qu'au moins un extrait de chaque plante étudiée, a été en mesure d'exercer une forte activité cytotoxique contre la majorité des lignées cellulaires testées. Les valeurs de IC_{50} enregistrées ont été dans la plupart des cas $\leq 30 \mu\text{g/ml}$. Des analyses additionnelles, de microscopie optique et de cytométrie en flux, ainsi qu'un dosage enzymatique des caspases effectrices 3 et 7 ont été réalisées sur les lignées LN229, SW620 et PC-3 pour élucider les effets cellulaires de certains extraits actifs et ainsi montrer leur capacité à promouvoir l'arrêt du cycle cellulaire et l'induction de l'apoptose.

Ainsi, les données obtenues dans cette étude honorent le savoir-faire ancestral et apportent un vrai support scientifique à l'utilisation de ces plantes par les herboristes et les guérisseurs traditionnels, en offrant un point de départ à plusieurs études à venir pour déterminer la base moléculaire de leur activité et identifier les composés chimiques bioactifs responsables de leurs effets antitumoraux.

Les aspects de ce travail, à savoir le design expérimental, les travaux de laboratoire, l'analyse des données, la conception des figures et la rédaction de l'article ont été réalisés au sein d'une

collaboration scientifique entre le Maroc et l'Espagne. Je suis spécialement reconnaissante au Programme de mobilité Averroès (Commission Européenne) pour la bourse de mobilité.

Cet article est publié par le journal « *European Journal of Medicinal Plants* »

Screening of North African medicinal plant extracts reveals significant cytotoxic effect on different cancer cell line models

ABSTRACT

Aims: The aim of this study was to evaluate the in vitro cytotoxic activity and cellular effects of organic extracts and fractions of four plants; *Inula viscosa*, *Ormenis eiriolepis* (Asteraceae), *Retama monosperma* (Fabaceae) and *Marrubium vulgare* (Lamiaceae), all of them used in Moroccan traditional medicine.

Methodology: The four plants were extracted using organic solvents and screened on a panel of human cancer cell lines including cell types from both solid and haematological cancer origin as well as non-transformed murine fibroblasts. Cell viability assays were performed with sixteen plant extracts. Sensitive cell lines were then exposed to increasing concentrations of the most efficient extracts in order to calculate IC₅₀ values. Microscopy, flow cytometry and caspase activity assays were then performed in LN229, SW620 and PC-3 cell lines upon treatment to investigate the cell morphology, cell cycle distribution and cell death.

Results: cell viability assays reveals that at least one extract from each plant was able to exert cytotoxic activity against the majority of cell lines tested, the IC₅₀ values of the active extracts were in most cases ≤ 30 $\mu\text{g/ml}$. the study of the cellular effects of the most active extracts on LN229, SW620 and PC-3 cell lines shows their ability to promote cell cycle arrest and cell death. The data obtained herein support strongly the use of these plants by traditional healers for the treatment of cancer patients and could have some scientific support indicating the presence of bioactive compounds.

Conclusion: The reported biological activity of these four medicinal plants used in traditional Moroccan medicine provides a starting point for forthcoming studies to determine the molecular basis of their activity and to identify the chemical compounds within the most active extracts responsible for their antitumoral effects.

Keywords: *Inula viscosa*, *Retama monosperma*, *Ormenis eriolepis*, *Marrubium vulgare*, Moroccan pharmacopeia, Anticancer agents, Cell Proliferation, Cell cycle; Cell death.

Screening of North African medicinal plant extracts reveals significant cytotoxic effect on different cancer cell line models

Lamiae Belayachi^{a,c}, Clara Aceves-Luquero^a, Nawel Merghoub^c, Youssef Bakri^c, Silvia Fernández de Mattos^{a,b}, Saaïd Amzazi^c, Priam Villalonga^{a,b*}

^a *Cancer Cell Biology Group, Institut Universitari d'Investigació en Ciències de la Salut (IUNICS),* ^b *Departament de Biologia Fonamental, Universitat de les Illes Balears, Illes Balears, Spain, and* ^c *Biochemistry-Immunology Laboratory, Faculty of Sciences, Mohammed V-Agdal University, Rabat, Morocco.*

**Corresponding author. Priam Villalonga. Mailing address: Institut Universitari d'Investigació en Ciències de la Salut (IUNICS), Edifici Científicotècnic, Ctra. Valldemossa Km 7,5, Illes Balears, Spain. Phone: +34 971 259961 Fax: +34 971 259501*

E-mail: priam.villalonga@uib.es

Abstract

Aims: The aim of this study was to evaluate the in vitro cytotoxic activity and cellular effects of organic extracts and fractions of four plants; *Inula viscosa*, *Ormenis eiriolepis* (Asteraceae), *Retama monosperma* (Fabaceae) and *Marrubium vulgare* (Lamiaceae), all of them used in Moroccan traditional medicine.

Methodology: The four plants were extracted using organic solvents and screened on a panel of human cancer cell lines including cell types from solid and haematological cancer origin as well as non-transformed murine fibroblasts. Cell viability assays were performed with sixteen plant extracts. Sensitive cell lines were then exposed to increasing concentrations of the most efficient extracts in order to calculate IC₅₀ values. Microscopy, flow cytometry and caspase activity assays were then performed in LN229, SW620 and PC-3 cell lines upon treatment to investigate the cell morphology, cell cycle distribution and cell death.

Results: cell viability assays reveals that at least one extract from each plant was able to exert cytotoxic activity against the majority of cell lines tested, the IC₅₀ values of the active extracts were in most cases $\leq 30 \mu\text{g/ml}$. the study of the cellular effects of the most active extracts on LN229, SW620 and PC-3 cell lines shows their ability to promote cell cycle arrest and cell death. The data obtained herein support strongly the use of these plants by traditional healers for the treatment of cancer patients and could have some scientific support indicating the presence of bioactive compounds.

Conclusion: The reported biological activity of these four medicinal plants used in traditional Moroccan medicine provides a starting point for forthcoming studies to determine the molecular basis of their activity and to identify the chemical compounds within the most active extracts responsible for their antitumoral effects.

Keywords: *Inula viscosa*, *Retama monosperma*, *Ormenis eiriolepis*, *Marrubium vulgare*, Moroccan pharmacopeia, anticancer agents, Cell Proliferation, Cell cycle; Cell death.

1- Introduction

Numerous plant extracts have been used by several civilizations for their scent and medicinal properties. Active compounds within those extracts constitute the basis of traditional medicine systems that have been in existence for thousands of years and continue to provide mankind with new remedies (G-fakim; 2006). According to the World Health Organization (WHO) about 65–80% of the world's population in developing countries depends essentially on plants for their primary health care due to poverty and lack of access to modern medicine (Calixto; 2005). Medicinal plants have thus a long history of use for almost every group of human diseases including cancer, one of the major causes of mortality throughout the world. Statistics have estimated that cancer will cause 83.2 million deaths between 2005 and 2015 (Kabbaj *et al.*; 2012). Drug discovery from medicinal plants has played an important role in the treatment of cancer and, indeed, most new clinical applications of plant secondary metabolites and their derivatives over the last half century have been applied against cancer (Mark SB; 2004).

Of all available anticancer drugs between 1940 and 2002, 40% were natural products or natural product-derived mimics, including Vinca alkaloids, Taxus diterpenes, Camptotheca alkaloids, and Podophyllum lignans (Newman *et al.*; 1999). Currently, there are 16 new plant derived compounds being tested in clinical trials and 13 of these compounds are being tested in phase I or II, and 3 are in phase III. Among these compounds, flavopiridol, isolated from the Indian tree *Dysoxylum binectariferum* and mesoindigo, isolated from the Chinese plant *Indigo feratinctoria*, have been shown to exhibit anti-cancer effects with lesser toxicity than conventional chemotherapeutic drugs (Saklani and Kutty, 2008). Ethnomedical knowledge is one of the main strategies to select plant species in cancer drug discovery (Lautié *et al.*; 2008). In Morocco, traditional medicine belongs to one of the world's oldest pharmacopoeia; in fact it disposes of a wide arsenal of plants remedies because of the natural diversity of the environment and flora (Jouad *et al.*; 2001).

The aim of this study was to evaluate the *in vitro* cytotoxic activity and cellular effects of organic extracts and fractions of four plants; *Inula viscosa*, *Ormenis eirirolepis* (Asteraceae), *Retamamonosperma* (Fabaceae) and *Marrubium vulgare* (Lamiaceae), all of them used in Moroccan traditional medicine. The plant selection was based on their reputation as folk medicines in the treatment of tumors and related diseases and also on their previously reported phytochemical and biological properties (Table 3).

Table 3: Ethnobotanical data and some reported pharmacological activities of plants species used in this study.

Trivial name	Place of collection	Part plant collected	Traditional use	Pharmacological activities & references	
<i>Inula viscosa</i> L. Ait. (Asteraceae)	Magramane-Terhala	Ainatik Temara	Leaves	Skin diseases, treat cutaneous abscesses, wound healing, Tuberculosis, bronchial infections (Bellakhdar <i>et al.</i> ; 1991).	Antimicrobial activity (Maoz and Neeman; 2000). Antifungal activity (Cafarchia <i>et al.</i> ; 2002). Anti-inflammatory effects (Hernandez <i>et al.</i> ; 2007). Antitumoral activity (Rozenblat <i>et al.</i> ; 2008), (Benbacer <i>et al.</i> ; 2012), (Merghoub <i>et al.</i> ; 2009).
<i>Retama monosperma</i> L. Bois (Fabaceae)	R'tm	Sidi-Boughaba Mahdia	Leaves	Purgative, vermifuge, antihelminthic, abortive and Disinfectant (Benrahmoune and Dubruille; 2003).	Antitumoral activity (Benbacer <i>et al.</i> ; 2012), (Merghoub <i>et al.</i> ; 2009).
<i>Ormenis eriopilis</i> Coss. (Asteraceae)	Hellala	Ouarzazat	Aerial part	Stomachic, anthelmintic and antidiabetic (Bellakhdar <i>et al.</i> ; 1991).	Antibacterial activities (El hanbali <i>et al.</i> ; 2004). Antileishmania activities (El hanbali <i>et al.</i> ; 2005). Antifungal activity (Hamani <i>et al.</i> ; 2008).
<i>Marrubium vulgare</i> L. (Lamiaceae)	Merriwut Merriwa	Temara	Aerial part	Antidiabetic, antidiarrheal, febrifuge, expectorant, antiicteric, treat ophthalmia, otitis, abscesses fevers and boils (Bellakhdar <i>et al.</i> ; 1991).	Antispasmodic (Schlemper <i>et al.</i> ; 1996). Antinociceptive (Dz Jesus <i>et al.</i> ; 2000). Analgesic (Meyre-Silva <i>et al.</i> ; 2005). Antioxidant, Anti cholesterol (Berrougui <i>et al.</i> ; 2006). Antioedematogenic (Stulzer <i>et al.</i> ; 2004). Antidiabetic (Elbeny <i>et al.</i> ; 2006, Erdogan <i>et al.</i> ; 2010, Bou djlal <i>et al.</i> ; 2012).

Plant extracts were screened across a panel of human cancer and a non-tumoral mouse fibroblast cell lines from different tumor origin (Table 4) to analyze the cytotoxic activity and determines the IC₅₀ of the most active extracts.

To examine more in details how those extracts can affects cell morphology, cell cycle, cell death and caspases levels, we have analyzed microscopy images, Flow Cytometry analysis and Caspases Activity assays on LN229, SW620 and PC-3 cell lines which are a perfect models of most challenging and resistant cancers.

The data obtained in this study support strongly that this four medicinal plants have an antitumor effects and are able to induce growth inhibition, cell cycle arrest and cell death. However the characterization of the mechanisms underlying their molecular action and the identification of the bioactive compounds present in each active extract still subjects of our future investigations.

Table 4: Cell lines used in the study related to the cells type and diseases.

	Cell lines	Cell type	Disease
Human	LN-229	epithelial	Glioblastoma
	T98G	fibroblast	Glioblastomamultiforme
	U-87 MG	epithelial	Glioblastoma; Astrocytoma grade IV
	Jurkat	T lymphocyte	Acute T cell Leukemia
	JeKo-1	lymphoblast	non-Hodgkin lymphomas
	SW620	epithelial	Colorectal adenocarcinoma
	SW480	epithelial	Colorectal adenocarcinoma
	PC-3	epithelial	Prostate adenocarcinoma
	U2OS	epithelial	Osteosarcoma
Mice	NIH/3T3	Embryonic fibroblast	Normal

2- Materials and methods

2-1 Plant Material

The selected plants were collected in different areas of Morocco during the period 2007-2011 and were identified by Dr. M. Fennane from the Scientific Institute of Rabat (Table 1).

2-2 Experimental Design

Plant extracts were screened across a panel of human cancer and a non-tumoral mouse fibroblast cell lines from different tumor origin (Table 2) to analyze the cytotoxic activity and determine the IC₅₀ of the most active extracts. In order to examine the cellular effects of the

2-3 Preparation of Organic Extract

The collected parts of the selected plants were air-dried and mechanically ground to produce a fine powder. Each plant powder was successively extracted using a Soxhlet apparatus with *n*-hexane and methanol to obtain hexanic extract and methanolic extract the resulting extracts were then evaporated by a Rotavapor to give dried extracts. The methanol concentrated extract was dissolved in distilled water and was successively extracted with dichloromethane and ethyl acetate to obtain dichloromethane fraction and/ ethyl acetate fraction. All extracts were evaporated and kept at -20°C until use.

2-4 Cell culture

Jurkat and Jeko-1 cells were maintained in RPMI1640 with L-Glutamine and HEPES (Invitrogen, Carlsbad, CA). LN229, T98G, U87MG, SW620, SW480, U2OS, PC-3 and NIH3T3 cells were maintained in DMEM High Glucose (4.5 g/l) with L-glutamine (Invitrogen, Carlsbad, CA). All cells were grown in a humidified incubator at 37°C with 5% CO₂. RPMI and DMEM were supplemented with 10% heat inactivated foetal bovine serum and 100 units/ml penicillin/streptomycin (Invitrogen, Carlsbad, CA). All cell lines were subconfluent grown and passaged, routinely tested for mycoplasma contamination and subjected to frequent morphological tests and growth curve analysis as quality-control assessments. All cell lines were treated at a prophylactic concentration of 5 µg/ml with Plasmocin™ (InvivoGen, San Diego, CA).

2-5 Cell viability assays

The number of viable cells in culture was determined based on quantification of ATP, which signals the presence of metabolically active cells, using the Cell Titer-Glo Luminiscent assay kit (Promega, Madison, WI, USA) following the manufacturer's instructions. Briefly, cells were plated in 96-well plates, treated 24 h later with extracts dissolved in DMSO for the indicated times and concentrations followed by addition of Cell Titer-Glo reagent. Luminiscence was detected using a multi-well Synergy Mx scanning spectrophotometer (Biotek, Winooski, VT).

2-6 Cellular morphology analysis

Cells were plated in 6-well plates and treated, as indicated, with the correspondent extract for 24h and 48h. Representative images were collected under a light optic microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).

2-7 Cell cycle analysis

Cell cycle analysis was performed using propidium iodide staining. Briefly, cells were washed in phosphate-buffered saline (PBS) and fixed in 70% ethanol. Fixed cells were then washed twice in PBS and stained in 50 mmol/l propidium iodide (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) containing 5 mg/ml DNase-free RNase, then analysed by flow cytometry using a FACScan (Coulter Epics XL-MSL; Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) and winMDI software.

2-8 Annexin V-FITC/propidium iodide flow cytometric analysis

Analysis of phosphatidylserine externalization in apoptotic cells was determined by an ApoTarget Annexin-V-FITC Apoptosis kit (Invitrogen), according to the manufacturer's instructions. $2 \cdot 10^5$ cells were seeded in 6-well plates and treated with 50 μ g/ml of the extracts for 48h. They were then collected and suspended in 100 μ l of Annexin V binding buffer. 5 μ L of Annexin-V-FITC and 10 μ L of propidium iodide were added and then incubated 15min at room temperature in the dark. Flow cytometry analysis was carried out using a FACScan (Coulter Epics XL-MSL; Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) and winMDI software.

2-9 Caspase Activity Assays

Caspase activity was determined by measurement of caspases 3 and 7 activity in control and treated cells with 50 μ g/ml of indicated extracts plated in 96-well plates for 48h using the

luminometric Caspase-Glo 3/7 assay (Promega) according to the manufacturer's protocol, using a Synergy HT multidetection microplate reader (Bio- Tek, Winooski, VT).

2-10 Statistical Analysis

Data are presented as means \pm SD of at least three different assays performed in triplicate. IC₅₀ values and the statistical significance of differences by Student's t test were assessed using GraphPad Prism (GraphPad Software Inc. La Jolla, CA). Statistically significant differences are indicated by ****P*; 0.001, ***P*; 0.01 and **P*; 0.05.

3- Results and discussion

For this study, four medicinal plants used for various diseases were harvested in different areas of Morocco. Four organic extracts of *Inula viscosa*, *Ormenis eiriolepis* (Asteraceae), *Retama monosperma* (Fabaceae) and *Marrubium vulgare* (Lamiaceae) were prepared. Table 1 summarizes the ethnobotanical data including botanical and local names, ethnomedical uses and the relevant plant parts employed together with their reported pharmacological activity.

The cytotoxic screening was performed on a panel of established human cancer cell lines including Glioblastoma Multiforme, Acute T cell Leukemia, Mantle Cell Lymphoma, Colon cancer, Prostate Cancer and Osteosarcoma cells. The NIH3T3 nontransformed mouse fibroblast cell line was employed as a control cell line to explore the cytotoxic effects of the extracts on non-tumoral cells. Table 4 provides an overview of the characteristics of the cell lines used. In our screening program, all cell lines were initially treated with all sixteen extracts at a starting concentration of 50 μ g/ml to determine the selective activity of the extracts.

3-1 Selected plant extracts show cytotoxicity against human glioblastoma cell lines

The human glioblastoma cell lines LN229, T98G and U87-MG were treated with the complete selection of plants extracts and fractions at 50 μ g/ml for 48h. Figure 22 shows the percentage of cell viability compared to vehicle-treated cells. The results revealed that cell lines responded differently and each one was selectively sensitive to specific extracts. A significant reduction in cell viability was particularly observed in LN229 cells which were sensitive to *Iv-DF* (37.72%), *Iv-HE* (25.93%), *Oe-DF* (35.87%) and *Oe-HE* (17.81%) extracts (Figure 22A), while T98G (Figure 22B) and U87MG cell lines (Figure 22C) were sensitive to

Iv-DF (34.01%) and *Rm-DF* (34.01%). In Glioblastoma cells several key regulatory elements of cell homeostasis and apoptosis are altered at different levels, such as the status of the tumor suppressor p53 (Eisele and Weller; 2013)

Previous characterization of p53 genotype and drug sensitivity of human cancer cell lines has revealed that cells with mutant or absent p53 are less sensitive than cells with wild-type p53 to the majority of clinically-used anticancer agents (Baguley *et al.*; 2002). Interestingly, our results show that p53-mutant LN229 cells are the most sensitive glioblastoma cell line to the tested plant extracts, in comparison with U87MG cells, expressing wild-type p53.

3-2 Acute T-cell leukemia and Mantle Cell Lymphoma cell lines show increased sensitivity to the tested extracts

Jurkat (Acute T-cell leukemia) and Jeko-1 (Mantle Cell Lymphoma) cells were next evaluated with the panel of extracts. Both cell lines were very sensitive to at least one extract of each of the four medicinal plants selected. Figure 23 reveals that, particularly, the dichloromethane fraction and hexanic extract of each plant are very effective on Jurkat (Figure 23A) and Jeko-1 cells (Figure 23B) with a percentage of viability lower than 6%.

Both hematological malignancies are characterized by a deregulated expression of apoptosis-related molecules. Overexpression of anti-apoptotic oncogenes is one of the mechanisms that decrease the efficacy of therapeutic agents (Droin *et al.*; 2013). Our results indicate that both oncohematological cell lines tested were very sensitive to several extracts. More studies are required to elucidate which survival pathways are affected.

3-3 Effects on Colorectal cancer cell lines

The cell viability analysis of colorectal cancer cell lines (Figure 24) indicates that three extracts induced clear significant effects on SW620 cells. *Iv-DF* (28, 35%), *Iv-HE* (35, 38%) and *Mv-DF* (33, 11%) (Figure 24A), whereas *Iv-HE* (22, 63%) and *Oe-HE* (35, 38%) were active against SW480 cells (figure 24B).

Colon cancer becomes resistant to apoptosis as it acquires metastatic potential. SW480 and SW620 colon cancer cells were established from the same patient at different stages of tumor progression. Metastatic SW620 colon cancer cells have undergone multiple gene product modifications resulting in resistance to cell death (Huerta *et al.*; 2007). Interestingly, our data indicate that SW620 cells were more sensitive, suggesting that our extracts may contain molecules with high therapeutic potential for multidrug resistant cell lines.

3-4 Analysis of extract activity against Prostate cancer and Osteosarcoma cells

The effect of the different extracts was also tested in the PC-3 Prostate cancer cell line and in U2OS Osteosarcoma cells, which were exposed to the same conditions described above (Figure 25). Figure 25A illustrates that only *Iv-HE* (1,2%) and *Oe-HE* (8,2%) were active against PC-3 cells, although they both induced a dramatic effect on these cells, that are androgen-insensitive and has been used extensively as a model for androgen-independent prostate cancer. Unfortunately, conventional chemotherapeutic drugs have a discreet effect on androgen-refractory prostate cancers and do not provide a marked survival advantage for patients (Huang *et al*; 2006). In contrast, in the Osteosarcoma cell line U2OS (figure 25B) almost none of the extracts exerted a significant activity at the tested concentration, except *Rm-AF* (42, 3%). This could be explained by the fact that U2OS cell line is chromosomally highly altered.

3-5 Effects on non tumoral cells

The murine fibroblast cell line NIH3T3 was chosen to test the toxicity of all the extracts. Interestingly, all the extracts with the exception of *Iv-AF* (26,32%), *Oe-AF* (52,59%) and *Mv-HE* (65,78%) were non-toxic for these cells at the concentration of 50µg/ml (Figure 26; note the different scale of the y-axis). Taken together, the low cytotoxic profile exerted in both NIH3T3 and U2OS cells indicates that these extracts do not act as indiscriminate cellular poisons, rather reflecting a specific cell type-based mechanism of action.

3-6 Analysis of the IC₅₀ of the most active extracts in sensitive cell lines

According to NCI (National Cancer Institute, U.S.A.) recommendations to consider a crude extract promising for further purification, IC₅₀ values need to be lower than 30µg/mL in order to discover and develop potential anticancer natural compounds (De Mesquita *et al.*; 2009 and Steenkamp and Gouws; 2006). For this purpose increasing concentrations ranging from 1µg/ml to 50µg/ml of selected extracts were then tested and the IC₅₀ values were calculated. All tested extracts were able to reduce cell viability in a dose-response manner after treatment. All determined IC₅₀ values for the most active extracts in sensitive cell lines are included in Table 5. In most cases the IC₅₀ values were under 30µg/ml, and specifically *Iv-DF*, *Iv-HE*, *Rm-DF*; *Rm-HE*; *Oe-DF*; *Oe-HE* and *Mv-DF* showed the most promising activities in this assay.

Table 5: IC₅₀ values of extracts (ME, HE) and fractions (DF, AF) of *Inulaviscosa* (Iv), *Retamamonosperma* (Rm), *Ormeniseiriolepis* (Oe) and *Marrubiumvulgare* (Mv) against selected cell lines.

Organic Extracts	IC ₅₀ (µg/ml) ±SD								
	Jurkat	Jeko-1	LN229	T98	U87	SW620	SW480	U2OS	PC-3
<i>Inulaviscosa</i> L. Ait.									
<i>Iv-ME</i>	25,81±2,92	>50	NA	NA	>50	NA	>50	>50	NA
<i>Iv-DF</i>	11,16±6,95	8,68±3,1	17,66±5,4	20,50±2,21	>50	23,30±6,33	>50	>50	20,15±9,09
<i>Iv-HE</i>	7,52±4,57	<1	5,9±3,57	>50	NA	8,40±3,31	10,36±6,59	>50	6,53±1,42
<i>Iv-AF</i>	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<i>Retama monosperma</i> L. Bois.									
<i>Rm-ME</i>	>50	21,47±3,05	NA	NA	NA	NA	NA	>50	>50
<i>Rm-DF</i>	9,12±4,20	24,77±4,85	>50	>50	47,85±4,08	NA	>50	NA	45,41±4,6
<i>Rm-HE</i>	34,44±3,38	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<i>Rm-AF</i>	20,22±10,51	12,01±5,14	>50	>50	>50	>50	>50	NA	>50
<i>Ormenis eriolepis</i> Coss.									
<i>Oe-ME</i>	27,45±4,03	<1	NA	NA	NA	>50	>50	NA	NA
<i>Oe-DF</i>	11,33±5,37	13,63±1,67	21,70±2,37	>50	>50	>50	>50	>50	>50
<i>Oe-HE</i>	9,81±8,44	<1	41,67±1,98	>50	>50	NA	19,31±4,88	NA	12,59±4,69
<i>Oe-AF</i>	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<i>Marrubium vulgare</i> L.									
<i>Mv-ME</i>	NA	>50	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<i>Mv-DF</i>	11,54±2,83	6,04±2,77	>50	>50	>50	10,58±4,37	NA	>50	>50
<i>Mv-HE</i>	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<i>Mv-AF</i>	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
NA: Not Active	>50: Above 50µg/ml	<1: below 1µg/ml							

3-7 Analysis of cellular effect of the most active extracts on glioblastoma cell line LN229

In glioblastoma cell line LN229 four extracts have exposed a promising activity on growth inhibition. *Iv-DF*, *Iv-HE*, *Oe-DF* and *Oe-HE* were used at 50 µg/ml to treat LN229 cells for 24 and 48 h. We first evaluated morphological changes (Figure 27A). The four tested extracts had clearly induced cell shrinkage, and floating cell formation. These changes clearly indicate cell death.⁷

To investigate which cell death form was occurring, Flow Cytometric analysis were performed initially to quantitate the cell cycle distribution under treatment (Figure 27B). *Iv-DF* causes a cell cycle arrest in G0/G1 phase at 24h with a significant increase (46,17%) of sub G0/G1 population at 48h For the *Iv-HE* a cell cycle arrest in G0/G1 phase was detected at 24h which increase to a sub G0/G1 arrest at 48h showing (43,22%) . However *Oe-DF* and *Oe-HE* seems to have a late action on LN229 cell cycle; The massive changes appears at 48h, a sub G0/G1 population was increased to (24,24%) for *Oe-DF* and (42%) for *Oe-HE* with a sub diploid pick suggesting cell death via apoptosis.

The Annexin V –FITC coupled to Propidium Iodide was then employed to examine the influence of the four selected extracts at 24h and 48h on LN229 cells. Flow cytometry shows that the dots were dispersed and shifted to LR, UR and UL side in time dependent manner (Figure 27C). The cells moved to late apoptosis, early necrosis and necrosis stages which concord with the observed cell cycle distribution.

The sub G0/G1 phases and sub diploid picks observed in cells treated with *Iv-DF*, *Iv-HE* and *Oe-HE* respectively were also accompanied by a cell death percentage higher than 50% .

To make clear if this cell death comes with an increase on caspases activity luminometric Caspase-Glo 3/7 assay was performed. LN229 cells were treated with 50 µg/ml of each extract for 48h and luminescence were measured (Figure 27D). The fold induction has not increased significantly for the four extracts tested.

Previously the viability assay on Glioblastoma cell lines revealed that LN229 cell line were the most sensitive in comparison with T98 and U87MG. The four tested extracts had induced very important cellular effects on LN229 cells during the treatment and lead to cell death and cell cycle distribution alteration.

Several active compounds from *Inula viscosa* and *Ormenis eirirolepis* extracts may be very attractive therapeutic agents; specially in Glioblastoma cells that present multiple alterations at different levels such loss of heterozygoty (LOH), inactivating mutation, methylation or modified proteins expression including bcl-2 protein family, inhibitor of apoptosis (IAP_s) or

receptor tyrosine kinases like the epidermal growth factor receptor (EGFR) and their downstream signaling cascade (Baguley *et al.*;2002).

3-8 Analysis of cellular effect of the most active extracts on colon cancer cell line SW620

Colon cancer cell lines viability assay showed that SW620 cells were especially sensitive to *Iv-DF*, *Iv-HE* and *Mv-DF* exhibiting the most important cytotoxic activity (Figure 28A).

To figure out how those extracts may affect cells morphology, cycle distribution and death, they were used at the same concentration and incubation

Figure 28A shows morphological changes on SW620 cells, cell shrinkage and floating cell formation were observed under treatment suggesting that *Iv-DF*, *Iv-HE* and *Mv-DF* are inducing cell death. Afterward cells were analyzed in flow cytometry to check cell cycle distribution. Figure 28B reveals that *Iv-DF*, *Iv-HE* and *Mv-DF* were able to induce cell cycle arrest in G0/G1 phases at 24h and a clear sub G0/G1 population with an increase of (39%), (12%) and (21%) respectively.

Sub-diploid peaks were also observed at 48h for the three extracts, which correspond to cell death via apoptosis. Annexin V-FITC coupled to propidium iodide analysis was performed to analyze cell death mechanisms. The results in Figure 28C show that cells had moved to UL side at 48h indicating cells population in necrosis stage, early apoptotic and apoptotic stages were not able to be detected. The percentages of necrotic cells were 42%, 79% and 22% for *Iv-DF*, *Iv-HE* and *Mv-DF* respectively. The induction of caspases activity (Figure 28D) does not illustrate significant concordance with the previous findings except for *Iv-HE* where caspase activity was increased 30 times.

Metastatic SW620 cells are more resistant to apoptosis induced by CH-11, cisplatin, and ionizing radiation, respectively. In comparison with their non metastatic counterpart, SW620 cells have acquired genetic defects both in the intrinsic and extrinsic pathways of apoptosis (Huerta *et al.*; 2007). In our study SW620 cells were very responsive to *Inula viscosa* and *Marrubium vulgare* extracts, it's become obvious that those plants may lead to new therapeutic molecules that could challenge the acquired mechanisms leading to tumor cell resistance to current cytotoxic drugs in colon cancer.

3-8 Analysis of cellular effects of the most active extract on Prostate cancer cell line PC-3

The same experiments run previously on LN229 and SW620 cells were also done on PC-3 cells to figure out how the most promising extracts revealed by viability assay can affect morphology, cell cycle and cell death.

Morphological changes were observed in PC-3 cells under treatment with *Iv-DF*, *Iv-HE*, *Rm-DF* and *Oe-HE* extracts for 24h and 48h. Rounding up and shrinks with a clear reduction of cellular and nuclear volume were observed (Figure 29A).

Flow cytometry analysis of cell cycle distribution and cell death had revealed that the four extracts produce a cell cycle arrest in G2/M phase at 24h and 48h of treatment; *Iv-DF*, *Iv-HE*, *Rm-DF* and *Oe-HE* were able to increase G2/M cell population to (41,83%), (53,75%), (48,67%) and (44.11%) respectively (Figure 29B). The results obtained with Annexin V coupled to Propidium iodide seem to concord with cell cycle distribution results. In figure 8C only *Iv-HE* and *Oe-HE* were able to induce cell death in PC-3 cells after 48h of treatment with a percentage of 25% and 29% respectively. Dots movement to LR and UR indicate that cells had progressed gradually to the late apoptotic stage. Indeed these results of caspases assay were in perfect concordance with the previous data. Significant increase of caspases activity in *Iv-HE* and *Oe-HE* treated cells underlines caspases-dependant apoptosis.

PC-3 prostate cancer cells are androgen insensitive and apoptosis-resistant; they survive and eventually develop into androgen-refractory and metastatic clones (Huang *et al.*;2006). Our data suggest that *Inula viscosa* and *Ormenis eirirolepis* extracts exert growth inhibition, cell cycle arrest and apoptosis induction and could contain active compounds with the potential to effectively target apoptosis extrinsic and intrinsic pathways. Therefore, more studies are needed to clarify the observed apoptotic mechanism

4- Conclusions

In agreement with our data, the antitumoral activity of the hexanic extract and the dichloromethane fraction of *Inula viscosa* and *Retama monosperma* were also observed in the cervical cancer cell lines HeLa and SiHa, where they exhibited a high level of cytotoxicity by inducing apoptosis following pro-caspase activation, Bcl-2 expression and PARP cleavage (Benbacer *et al.*;2012). The chemical composition of *Inula viscosa* and *Retamamonosperma* extracts has already been investigated. Numerous studies have revealed the presence of a sesquiterpene acid (isocostic acid) and two sesquiterpenes lactones: tomentosin and

inviscolide, as major compounds in *Inula viscosa* extract (Benbacer *et al.*; 2012). Indeed, this plant is a source of a number of bioactive compounds as well as flavonoids (Hernandez *et al.*; 2007) and sesquiterpene derivatives (Fontana *et al.*; 2007). However, the dichloromethane fraction of *Retamamonosperma* revealed the presence of five known quinolizidine alkaloids together with sparteine, L-methyl cytisine, 17-oxosparteine, lupanine and anagryne (Benbacer *et al.*; 2012). The *Retama* species have been reported to contain alkaloids (Halim *et al.*; 1997) and flavonoids (KAssem *et al.*; 2000). Accordingly, 15 quinolizidine and 3 dipiperidine alkaloids were isolated from the leaves of flowering plants of *R. monosperma* collected from Morocco (Touatiet *et al.*; 1996). The compositional analysis of the aqueous infusion of *Marrubium vulgare* has revealed the presence of fifteen metabolites, all belonging to the class of polyphenols. Particularly, seven flavonoids have been detected, together with 5-caffeoylquinic (chlorogenic) acid in small amounts; the extract is dominated by the presence of a series of complex molecules, characterized as verbascoside (acteoside) derivatives (Boudjlal *et al.*; 2012).

However, the chemical constituents of *Ormenis eiriolepis* still remain to be investigated. The selected species are reported to have both preventive and therapeutic properties. According to our findings, the use of these plants by traditional healers for the treatment of cancer patients could have some scientific support. The most active extracts will be subject of further oncopharmacological studies to elucidate their molecular mechanism of action, investigating to this end their effect on programmed cell death, cell survival and cell cycle regulation on several cancer models cell lines.

Because cancer drug-resistance is a significant health problem, the screening of medicinal plants for new anticancer agents remains a priority in drug discovery programs. The cytotoxic activity and cellular effect on Glioblastoma, colon cancer and prostate cancer cell lines of those traditional medicinal plants from Moroccan origin, provides a starting point for forthcoming studies to determine the molecular basis of their activity and to identify the chemical compounds within the most active extracts responsible for their antitumoral effects.

5- Figures and legends

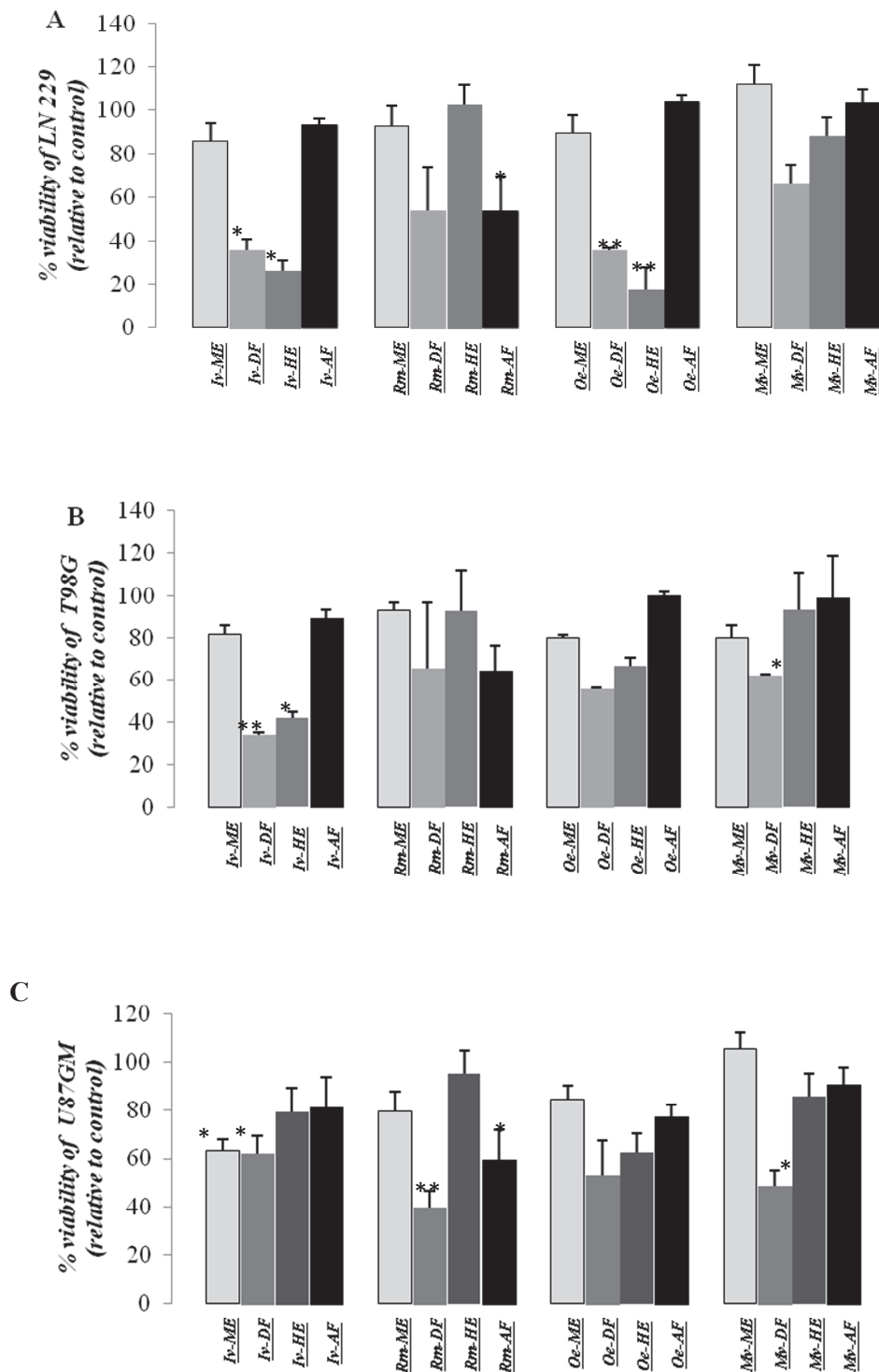


Figure 22. Cell viability analysis of Glioblastoma cell lines. LN229 (A), T98G (B) and U87MG (C) cell lines were treated for 48 h with extracts from *Inula viscosa* (Iv), *Retama*

monosperma (Rm), Ormenis eiriolepis (Oe) and Marrubium vulgare (Mv) with 50µg/ml of methanol (ME) and hexane extracts (HE) and dichloromethane (DF) and ethyl acetate (AF) fractions Results represent the mean ± SD of at least 3 independent experiments indicating the percentage of viable cells relative to vehicle-treated (control) cells.

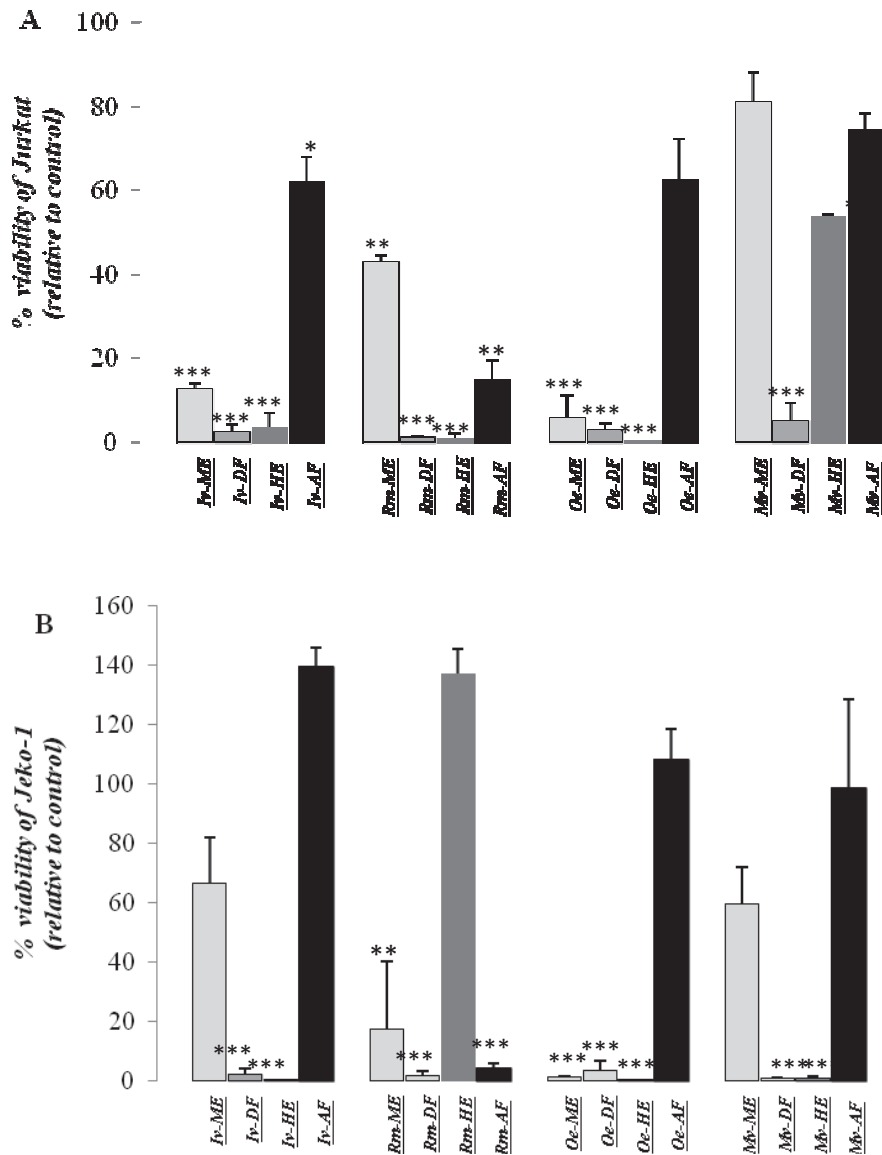


Figure 23. Cell viability analysis of Acute T-cell Leukemia and Mantle Cell Lymphoma cell lines. Jurkat (A) and Jeko-1 (B) cells were treated and the data obtained represented as in Figure 22.

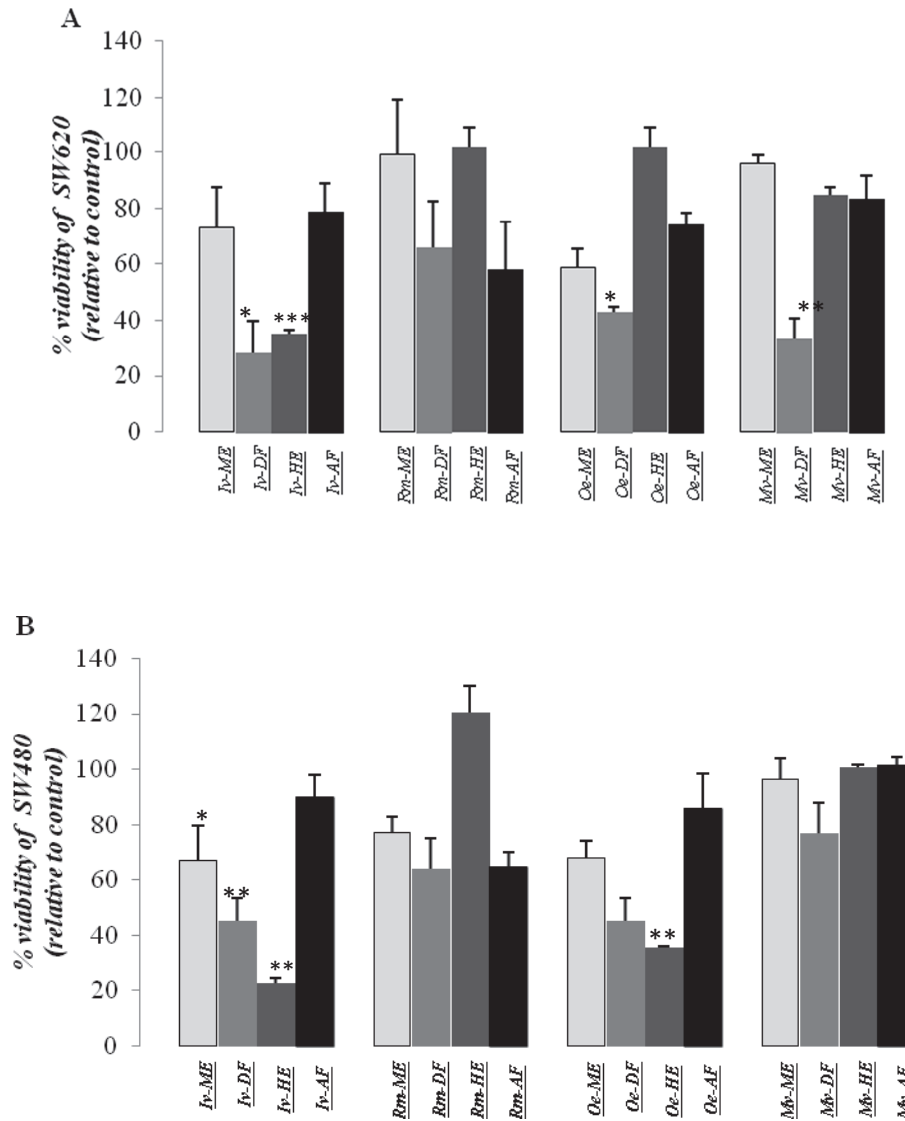


Figure 24. Cell viability analysis of colon cancer cell lines. SW620 and SW480 colorectal cancer cells were treated and the data obtained represented as in Figure 22.

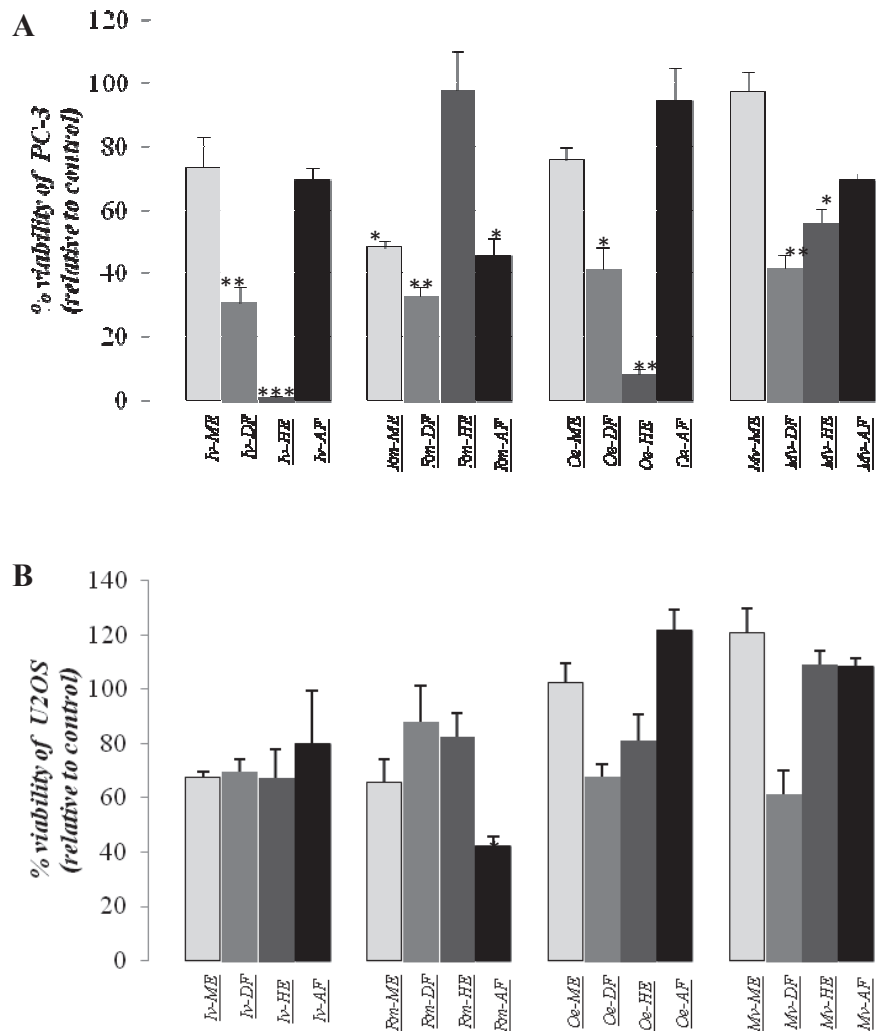


Figure 25. Cell viability analysis of Prostate cancer and Osteosarcoma cell lines. Prostate cancer PC-3 (A) and osteosarcoma U2OS (B) cells were treated and the data obtained represented as in Figure 22.

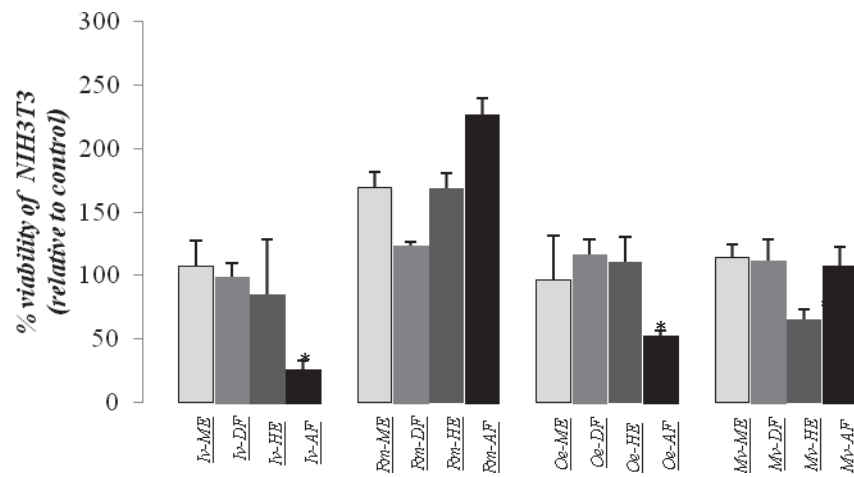


Figure 26. Cell viability analysis of Mouse embryonic fibroblast cell line. NIH3T3 mouse fibroblasts were treated and the data obtained represented as in Figure 22.

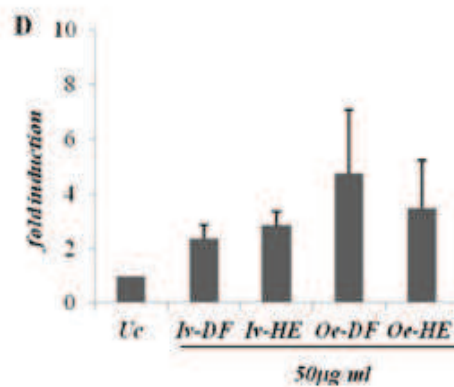
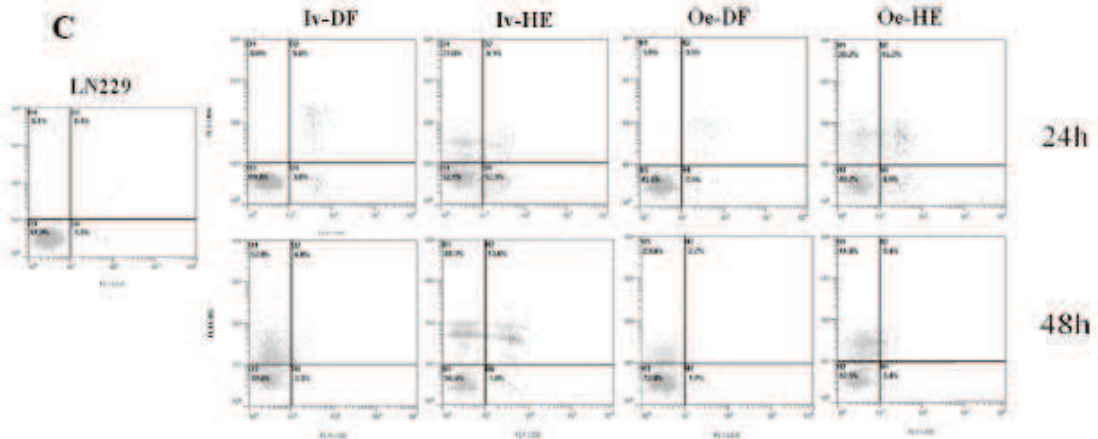
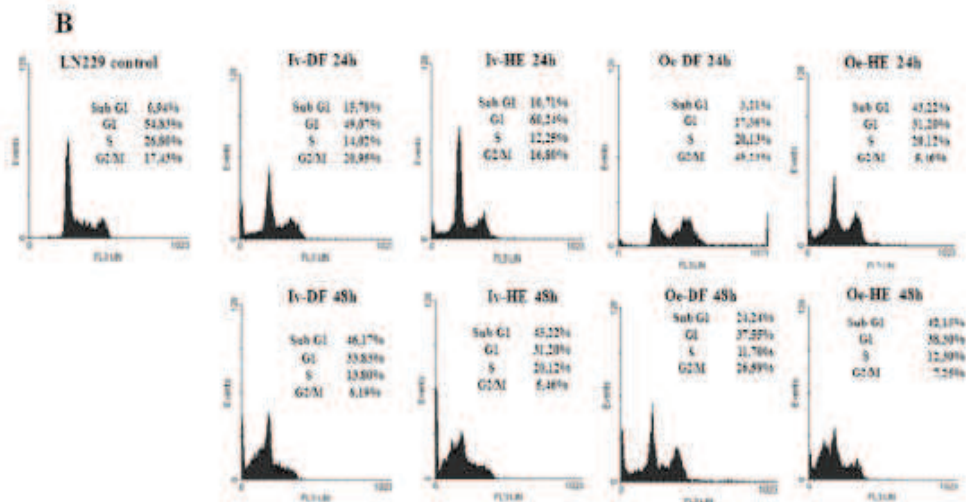
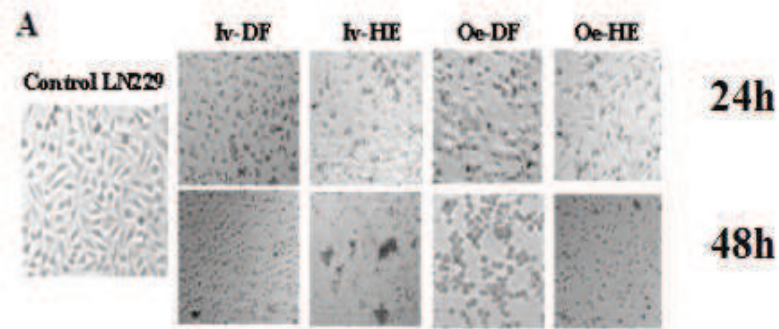


Figure 27. Cellular effects analysis of the most active extracts on LN229 glioblastoma cell line (A) images of morphological changes of LN229 cells under treatment with 50 μ g/ml of Iv-DF, Iv-HE, Oe-DF and Oe-HE for 24h and 48h (magnification 5 \times) (B) cell cycle analysis of LN229 cells treated same as in (A). (C) cell death analysis of LN229 at 24h and 48h under the same conditions as in (A) and (B). (D) caspase activity analysis of LN229 cells treated with Iv-DF, Iv-HE, Oe-DF and Oe-HE for 48h. Results show fold induction respective to untreated cells. Data are presented as means \pm SEM from three independent determinations performed in duplicate.

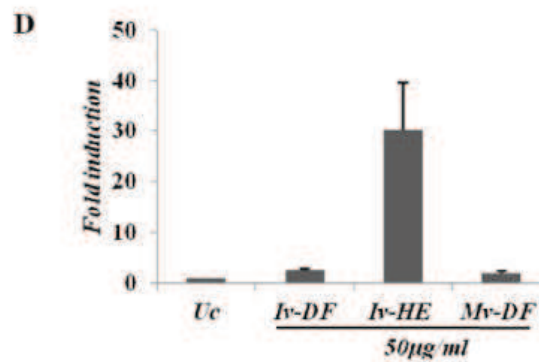
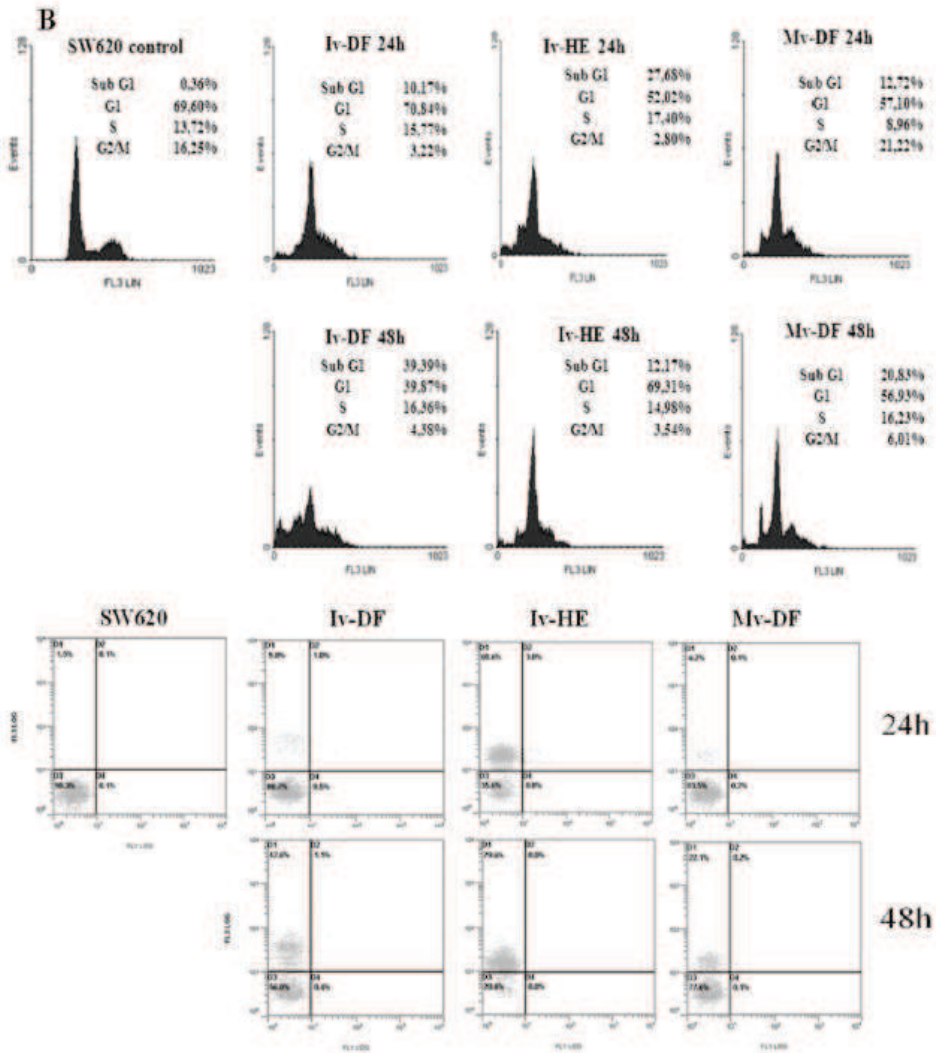
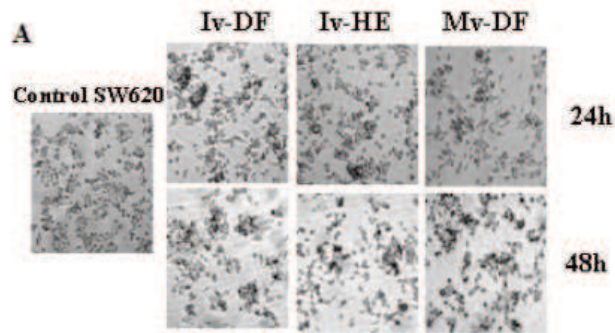


Figure 28. Cellular effects analysis of the most active extracts on SW620 colon cancer cells (A) images of morphological changes of SW620 cells under treatment with 50 μ g/ml of Iv-DF, Iv-HE and Mv-DF for 24h and 48h (magnification 5 \times) (B) cell cycle analysis of SW620 cells treated same as in (A). (B) cell cycle analysis of SW620 cells treated as in (A). (C) cell death analysis of SW620 at 24h and 48h under the same conditions as in (A) and (B). (D) caspases activity analysis of SW620 cells treated with Iv-DF, Iv-HE and Mv-DF for 48h. Results show fold induction respective to untreated cells. Data is means \pm SEM from three independent determinations performed in duplicate.

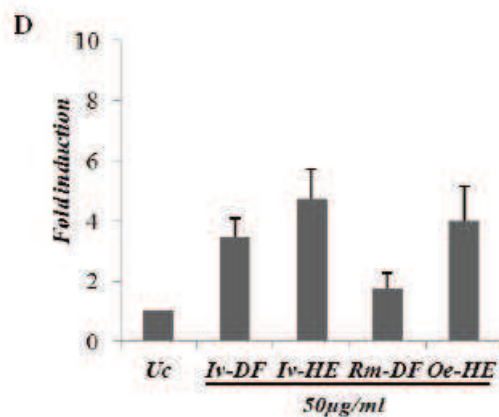
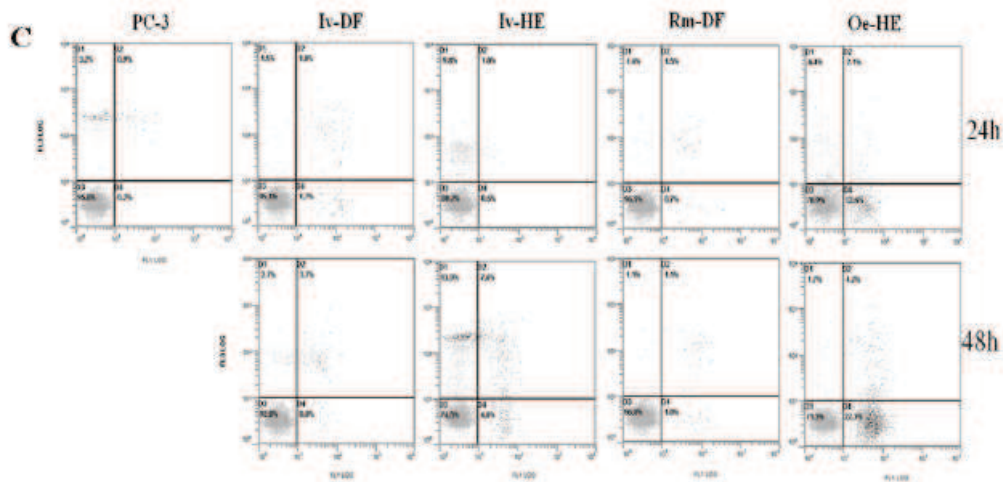
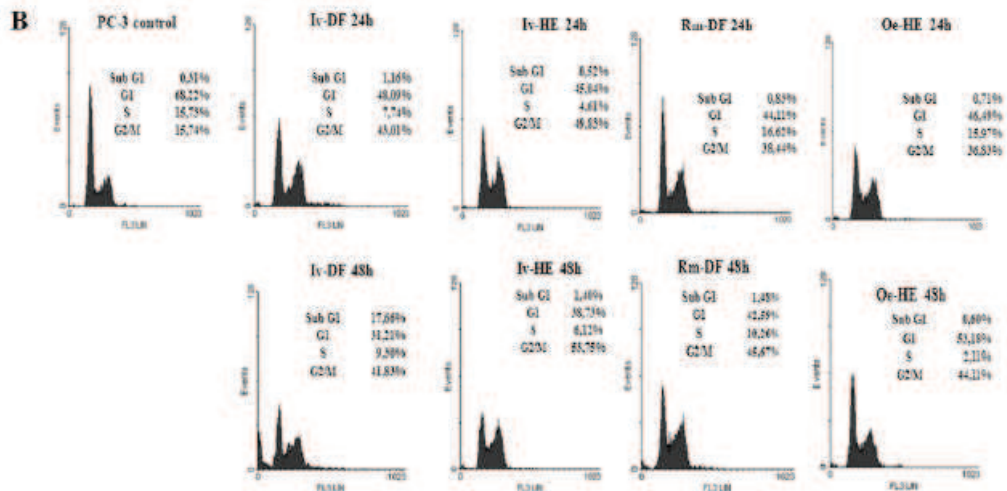
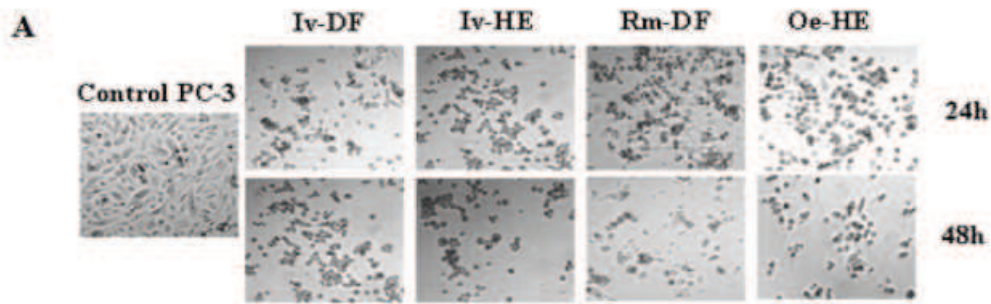


Figure 29. Cellular effects analysis of the most active extracts on PC-3 prostate cancer cells (A) images of morphological changes of PC-3 cells under treatment with 50 μ g/ml of Iv-DF, Iv-HE , Rm-DF and Oe-HE for 24h and 48h (magnification 5 \times). (B) cell cycle analysis of PC-3 cells treated same as in (A). (C) cell death analysis of PC-3 at 24h and 48h under the same conditions as in (A) and (B). (D) caspases activity analysis of PC-3 cells treated with Iv-DF, Iv-HE , Rm-DF and Oe-HE for 48h. Results show fold induction respective to untreated cells. Data is means \pm SEM from three independent determinations performed in duplicate.

6- Competing interest

The authors declare that there are no competing interests.

7- Authors contributions

This work was carried out in collaboration between all authors. Author LB performed all experiments and participated in the experimental design, analysis of the data and redaction of the manuscript. Author CAL participated in the experimental design, analysis of the data and preparation of the manuscript. The plants harvest, identification and extraction were done by authors NM and YB. Author SA participated in the analysis of the data and the preparation of the manuscript. Author SFM participated in the experimental design and the analysis of the data. Author PV directed the research and supervised the preparation of the manuscript. All authors have contributed and approved the manuscript.

8- Acknowledgments

We are grateful to Joan Seoane (Institut de Recerca Hospital Vall d'Hebron, Barcelona), for the gift of human glioma cell lines and to Beatriz Martínez (CNIO, Madrid) and Joan Gil (IDIBELL, Barcelona) for the gift of Jeko-1 and Jurkat cells, respectively. L.B. is a fellow of the Averroes mobility Programme (European Commission). P.V. is a “Ramón y Cajal” Fellow (Ministerio de Ciencia e Innovación, Spain).

Chapitre II

Chapitre II

Deuxième Article

Avant-propos

“*Retama monosperma* n-hexane extract induces cell cycle arrest and extrinsic pathway-dependent apoptosis in Jurkat cells ” par Lamiae Belayachi, Clara Aceves-Luquero, Nawel Merghoub, Youssef Bakri, Silvia Fernández de Mattos, Saaïd AmzazietPriam Villalonga.

Retama monosperma L. (Boiss.) Ou *Genista monosperma* L. (Lam.), est une plante annuelle et spontanée appartenant à la famille des Fabacées. Au Maroc, elle est connue sous le nom de « R'tam », on la trouve généralement dans les régions désertiques et dans le Moyen Atlas où elle a été largement utilisée dans la médecine traditionnelle. Dans cette étude, nous montrons l'effet anti-leucémique spécifique que présente l'extrait hexanique de *Rétama monosperma* sur la lignée cellulaire « Jurkat ». Rm-HE a montré une cytotoxicité significative contre les cellules Jurkat, alors qu'il s'est avéré essentiellement inefficace contre les fibroblastes normaux de souris (NIH3T3) et les lymphocytes normaux (TK-6). L'analyse par cytométrie en flux ainsi que la mesure de l'activité caspase, ont indiqué que Rm-HE a promu l'arrêt du cycle cellulaire en induisant une mort cellulaire programmée accompagnée par une atteinte de l'ADN. Cette dernière a été soutenue par une augmentation du taux de la p-H2A.X en fonction du temps d'exposition. D'autres expériences complémentaires ont montré que l'apoptose induite par Rm-HE était partiellement dépendante de JNK et caractérisée par une surexpression du Fas-L ainsi qu'une activation des caspases 8, 3, 7 et 9. Alors qu'aucune des protéines mitochondriales (pro et anti-apoptotique) analysées étaient significativement modifiées. La chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse a indiqué que l'acide α -linoléique, le campestérol, le stigmastérol et sitostérol sont les principaux composants bioactifs de l'extrait.

Ainsi, nos résultats suggèrent que les composés bioactifs présents dans Rm-HE exhibent une activité anti-leucémique importante. En induisant, l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose qui opère, au moins partiellement, par la voie extrinsèque.

Les aspects de ce travail, à savoir le design expérimental, les travaux de laboratoire, l'analyse des données, la conception des figures et la rédaction de l'article ont été réalisés au sein d'une

collaboration scientifique entre le Maroc et l'Espagne. Je suis spécialement reconnaissante au Programme de mobilité Averroès (Commission Européenne) pour la bourse de mobilité.

Cet article est publié par le journal «*BMC Complementary and Alternative Medicine*»

***Retama monosperma* n-hexane extract induces cell cycle arrest and extrinsic pathway-dependent apoptosis in Jurkat cells**

Abstract

Background

Retama monosperma L. (Boiss.) or *Genista monosperma* L. (Lam.), locally named as “R’tam”, is an annual and spontaneous plant belonging to the Fabaceae family. In Morocco, *Retama* genus is located in desert regions and across the Middle Atlas and it has been widely used in traditional medicine in many countries. In this study, we show that *Retama monosperma* hexane extract presents significant anti-leukemic effects against human Jurkat cells.

Methods

Human Jurkat cells, together with other cell lines were screened with different concentrations of *Retama monosperma* hexane extract at different time intervals. Growth inhibition was determined using luminescent-based viability assays. Cell cycle arrest and apoptosis were measured by flow cytometry analysis. Combined caspase 3 and 7 activities were measured using luminometric caspase assays and immunoblots were performed to analyze expression of relevant pro- and anti-apoptotic proteins. GC-MS were used to determine the chemical constituents of the active extract.

Results

Retama monosperma hexane extract (Rm-HE) showed significant cytotoxicity against Jurkat cells, whereas it proved to be essentially ineffective against both normal mouse fibroblasts (NIH3T3) and normal lymphocytes (TK-6). Cytometric analysis indicated that Rm-HE promoted cell cycle arrest, sub-G1 phase increase and apoptosis induction accompanied by DNA damage induction indicated by an increase in p-H2A.X levels. Rm-HE induced apoptosis was partially JNK-dependent and characterized by an increase in Fas-L levels together with activation of caspases 8, 3, 7 and 9, whereas neither the pro-apoptotic nor anti-apoptotic mitochondrial membrane proteins analyzed were significantly altered. Chemical identification analysis indicated that α -linolenic acid, campesterol, stigmasterol and sitosterol were the major bioactive components within the extract.

Conclusions

Our data suggest that bioactive compounds present in Rm-HE show significant anti leukemic activity inducing cell cycle arrest and cell death that operates, at least partially, through the extrinsic apoptosis pathway.

Key words: *Retama monosperma*, Acute T-cell leukemia, cytotoxicity, apoptosis, bioactive compounds.

***Retama monosperma* n-hexane extract induces cell cycle arrest
and extrinsic pathway-dependent apoptosis in Jurkat cells**

Lamiae Belayach^{a,c}, Clara Aceves-Luquero^a, Nawel Merghoub^c, Youssef Bakri^c, Silvia Fernández de Mattos^{a,b}, Saaïd Amzazi^c, Priam Villalonga^{a,b*}

^a*Cancer Cell Biology Group, Institut Universitari d'Investigació en Ciències de la Salut (IUNICS),* ^b*Departament de Biologia Fonamental, Universitat de les Illes Balears, Illes Balears, Spain,* and ^c*Biochemistry Immunology Laboratory, Faculty of Sciences, Mohammed V-Agdal University, Rabat, Morocco.*

**Corresponding author. Priam Villalonga. Mailing address: Institut Universitari d'Investigació en Ciències de la Salut (IUNICS), Edifici Científicotècnic, Ctra. Valldemossa Km 7,5, Illes Balears, Spain. Phone: +34 971 259961 Fax: +34 971 259501*

E-mail: priam.villalonga@uib.es

Abstract

Background

Retama monosperma L. (Boiss.) or *Genista monosperma* L. (Lam.), locally named as “R’tam”, is an annual and spontaneous plant belonging to the Fabaceae family. In Morocco, *Retama* genus is located in desert regions and across the Middle Atlas and it has been widely used in traditional medicine in many countries. In this study, we show that *Retama monosperma* hexane extract presents significant anti-leukemic effects against human Jurkat cells.

Methods

Human Jurkat cells, together with other cell lines were screened with different concentrations of *Retama monosperma* hexane extract at different time intervals. Growth inhibition was determined using luminescent-based viability assays. Cell cycle arrest and apoptosis were measured by flow cytometry analysis. Combined caspase 3 and 7 activities were measured using luminometric caspase assays and immunoblots were performed to analyze expression of relevant pro- and anti-apoptotic proteins. GC-MS were used to determine the chemical constituents of the active extract.

Results

Retama monosperma hexane extract (Rm-HE) showed significant cytotoxicity against Jurkat cells, whereas it proved to be essentially ineffective against both normal mouse fibroblasts (NIH3T3) and normal lymphocytes (TK-6). Cytometric analysis indicated that Rm-HE promoted cell cycle arrest, sub-G1 phase increase and apoptosis induction accompanied by DNA damage induction indicated by an increase in p-H2A.X levels. Rm-HE induced apoptosis was partially JNK-dependent and characterized by an increase in Fas-L levels together with activation of caspases 8, 3, 7 and 9, whereas neither the pro-apoptotic nor anti-apoptotic mitochondrial membrane proteins analyzed were significantly altered. Chemical identification analysis indicated that α -linolenic acid, campesterol, stigmasterol and sitosterol were the major bioactive components within the extract.

Conclusions

Our data suggest that bioactive compounds present in Rm-HE show significant anti leukemic activity inducing cell cycle arrest and cell death that operates, at least partially, through the extrinsic apoptosis pathway.

Key words: *Retamamonosperma*, Acute T-cell leukemia, cytotoxicity, apoptosis, bioactive compounds.

1- Introduction

Medicinal plants used in traditional or folk medicine and their active compounds, used in conventional medicine, constitute the basis for the treatment of many diseases including cancer, one of the major causes of mortality throughout the world. Statistics have estimated that cancer will cause 83.2million deaths between 2005 and 2015 (Kabbaj *et al.*,2012). Clinical applications have, for many decades, demonstrated their therapeutic effects. In fact, 40% of all available anticancer drugs are natural products or natural product-derived mimics, such as paclitaxel (from *Taxus brevifolia*), camptothecin (from *Camptotheca acuminata*), podophyllotoxin (from *Podophyllum emody*) and vinblastine (from *Catharanthus roseus*), which are widely-used anticancer agents (Vickers ,2002).

Retama monosperma L. (Boiss.) or *Genista monosperma* L. (Lam.), locally named as “R’tam”, is an annual and spontaneous plant belonging to the Fabaceae family. The genus *Retama* includes four species with a geographic distribution in the Mediterranean area, North Africa, and the Canary Islands (Bosch *et al.*,2004). In Morocco, *Retama* genus is largely located in desert regions and the Middle Atlas (El-shazly *et al.*,1996). This plant is used in traditional medicine in many countries, as purgative, vermifuge, antihelmintic, and abortive (Maghrani *et al.*,2005). Moreover, several studies have investigated *Retama* genus for various pharmacological effects, including hypoglycemic and diuretic (El-shazly *et al.*,1996, Bellakhdar, 1997), cytotoxic (Maghrani *et al.*,2005, Conforti *et al.*,2004), antioxidant, antiviral (Lopez-lázaro *et al.*,2000), antihypertensive (Edziri *et al.*,2010), anti-inflammatory (Eddouks *et al.*,2007)and antitumor activities(Bremner *et al.*,2009).

T-cell malignancies are highly aggressive neoplastic disorders that are generally resistant to conventional chemotherapy with a high rate of relapse and currently no efficient targeted therapies available for these diseases. In order to extend the treatment options and ultimately improve survival for patients with leukemia, it is imperative to increase the therapeutic arsenal of targeted therapies involving apoptotic cell death, that has been proposed as an efficient mechanism by which malignant tumor cells can be removed upon treatment with chemotherapeutic drugs without accompanying a local damaging inflammatory response (Zhao *et al.*,2010).

In chemotherapeutic drug-induced apoptosis of tumor cells, three different death signaling pathways can lead to apoptosis: the extrinsic death receptor-dependent pathway (Wallach *et al.*,1997), the intrinsic mitochondria-based pathway (Desagher and Martinou; 2000), and the intrinsic endoplasmic reticulum (ER) stress-mediated pathway (Nakagawa and Yuan; 2000).

In this study, we show that *Retama monosperma* hexane extract presents selectively an anti-leukemic effect, as indicated by its dramatic effects on Jurkat, but not other human cancer cells of various origins. We describe herein the major cellular effects of Rm-HE leading to cell cycle arrest and extrinsic pathway-dependent apoptosis. Finally, we suggest potential bioactive compounds responsible for these effects upon the determination of the chemical components of the extract by GC/MS.

2- Materials and methods

2-1 Plant material

Leaves of *Retama monosperma* L. (Boiss.) were collected in March 2009 from SidiBoughaba reserve in Mehdia-Rabat (Morocco). The plant was identified at the Scientific Institute of Rabat by Prof. M. Fennane, and the specimen was deposited in the Scientific Institute herbarium under the voucher specimen reference N° RAB78140.

2-2 Preparation of hexanic Extract

The powder of the dried plant was extracted successively using a Soxhlet apparatus with *n*-hexane to obtain hexanic extract (Rm-HE). The resulting extract was then evaporated by a Rotavapor to obtain the dried extract and was kept at -20°C until use.

2-3 Cell culture

Jurkat and Jeko-1 cells were maintained in RPMI-1640 with L-Glutamine and HEPES (Biological Industries Ltd., Kibbutz BeitHaemek, Israel). LN229, T98G, U87MG, SW620, SW480, U2OS, PC-3 and NIH3T3 cells were maintained in DMEM High Glucose (4.5 g/l) with L-glutamine (Invitrogen, Carlsbad, CA). All cells were grown in a humidified incubator at 37°C with 5% CO₂. RPMI and DMEM were supplemented with 10% heat inactivated foetal bovine serum and 100 units/ml penicillin/streptomycin (Biological Industries Ltd., Kibbutz BeitHaemek, Israel). All cell lines were subconfluent grown and passaged, routinely tested for mycoplasma contamination and subjected to frequent morphological tests and growth curve analysis as quality-control assessments. All cell lines were treated at a prophylactic concentration of 5 µg/ml with Plasmocin™ (InvivoGen, San Diego, CA).

2-4 *Drugs and inhibitors*

Doxorubicin (Developmental Therapeutics Program, Division of Cancer Treatment and Diagnosis, National Cancer Institute, Bethesda, MA), Q-v-Oph and SP600125 (Calbiochem, Darmstadt, Germany) were added directly to the media at the indicated concentration and cells were harvested or analyzed at the time points indicated in the figure legends.

2-5 *Cell viability assays*

The number of viable cells in culture was determined based on quantification of ATP, which signals the presence of metabolically-active cells, using the Cell Titer-Glo luminiscent assay kit (Promega, Madison, WI, USA) based on quantitation of the ATP present, which signals the presence of metabolically active cells, which is quicker than other commonly used methods to measure the number of viable cells (such as MTT, alamarBlue® or Calcein-AM) that require prolonged incubation steps to enable the cells' metabolic machinery to convert indicator molecules into a detectable signal. Following the manufacturer's instructions, the cells were plated in 96-well plates, treated 24 h later with extracts dissolved in DMSO for the indicated times and concentrations followed by addition of Cell Titer-Glo reagent. Luminiscence was detected using a multi-well Synergy Mx scanning spectrophotometer (Biotek, Winooski, VT).

2-6 *Cell cycle analysis*

Cell cycle analysis was performed using propidium iodide staining. Briefly, cells were washed in phosphate-buffered saline (PBS) and fixed in 70% ethanol. Fixed cells were then washed twice in PBS and stained in propidium iodide (50 µg/ml) in the presence of 50 µg/ml RNase A (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), then analysed by flow cytometry using a FACScan (Coulter Epics XL-MSL; Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) and winMDI software.

2-7 *Annexin V-FITC/propidium iodide flow cytometric analysis*

Analysis of phosphatidylserine externalization in apoptotic cells was determined by an ApoTarget Annexin-V-FITC Apoptosis kit (Invitrogen), according to the manufacturer's instructions. 2×10^5 cells were seeded in 6-well plates and treated with 50 µg/ml of Rm-HE for 48h. They were then collected and suspended in 100 µl of Annexin V-binding buffer. 5 µL of Annexin-V-FITC and 10 µL of propidium iodide were added and incubated 15 min at room temperature in the dark. Flow cytometry analysis was carried out using a FACScan (Coulter Epics XL-MSL; Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) and winMDI software.

2-8 Caspase activity analysis

Enzymatic activity of caspases was determined by measurement of caspases-3 and 7 activity by means of the luminometric Caspase-Glo 3/7 assay (Promega) according to the manufacturer's protocol using a Synergy HT multi-detection microplate reader (Bio-Tek, Winooski, VT, USA).

2-9 Gel electrophoresis and immunoblotting

Cells were harvested in a buffer containing 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA and 1% (v/v) Triton X-100 plus protease and phosphatase inhibitors. Protein content was measured by the Bradford procedure. Cell lysates were electrophoresed in SDS-polyacrylamide gels. After electrophoresis the proteins were transferred to Immobilon-P strips (Millipore, Billerica, MA) for 2 h at 60 V. The sheets were pre-incubated in TBS (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl), 0.05% Tween 20 and 5% defatted milk powder for 1 h at room temperature and then incubated for 1 h at room temperature in TBS, 0.05% Tween 20, 1% BSA and 0.5% defatted milk powder containing the appropriate antibodies: ρ H2A.X (#9718, 1:1000), Cleaved Caspase-3 (#9464, 1:1000), Cleaved Caspase-7 (#8438, 1:1000), Cleaved Caspase-9 (#7237, 1:1000), Caspase-8 (#9746, 1:1000), Bcl-2 (#2870, 1:1000), Bcl-x1 (#2764, 1:1000) and Mcl-1 (#5453, 1:1000) from Cell Signaling (Beverly, MA); Bax (BD610391, 1:1000) and Bad (BD610982, 1:1000) from BD Transduction Laboratories™ (California, USA); Bim (22-40, Millipore, Billerica, MA, 1:1000); Fas-L (sc-6237, 1:1000), JNK (sc-137018, 1:1000) and ρ JNK (sc-135642, 1:1000) from Santa Cruz (Santa Cruz, CA) and b-tubulin (T0198, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, 1:4000). After washing in TBS, 0.05% Tween 20, the sheets were incubated with a peroxidase-coupled secondary antibody (Dako, Glostrup, Denmark, 1/2000 dilution,) for 1 h at room temperature. After incubation, the sheets were washed twice in TBS, 0.05% Tween 20 and once in TBS. The peroxidase reaction was visualized by the enhanced chemiluminescence detection system (Millipore, Billerica, MA).

2-10 Derivatization for GC/MS analysis

For this purpose 100 μ l of the extract was dried with N₂ gas, then 100 μ l of derivatization agent (N, O-bis (trimethylsilyl) trifluoroacetamide with 1% of trimethylchlorosilane) was added, mixed and heated 10 minutes at 60°C.

2-11 Gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) analysis

The GC-MS analyses of *Retamamonosperma* hexanic extract (Rm-HE) were carried out at the Instrumental Technical Services of the Estación Experimental del Zaidín (CSIC, Granada, Spain). Briefly, 1 µl of the derivative solution was injected in a Varian 450GC coupled to 240 Ion Trap Mass Spectrometer as detector. The injection conditions were: splitless mode with 1 minute duration pulse, the injector temperature was 250°C; the He column flow was 1ml/minute in a capillary column (Varian Factor Four VF-5ms 30mx0.25mmx0.25µm). For Mass spectrometry conditions, the EI ionization was 70eV, the transfer line was at 280°C and the Trap at 240°C, mass range acquisition was from m/z 50 to m/z 500 and carried in Full Scan mode. Qualitative analysis of compounds was based on the comparison of their spectral mass and their relative Retention time with those of NIST08 mass spectra database and Kovats RI on the chromatograms recorded in Full Scan or in SIM mode using the characteristic ions. Quantitative analysis was realized by integration of peaks and calculated as percent of total identified area on the TIC chromatograms.

2-12 Statistical Analysis

Data are presented as means \pm SD of at least three different assays performed in triplicate. IC₅₀ value and the statistical significance of differences by Student's *t* test were assessed using GraphPad Prism (GraphPad Software Inc. La Jolla, CA). Statistically significant differences are indicated by ***P, 0.001, **P, 0.01 and *P, 0.05, respectively.

3- Results

3-1 Rm-HE exerts selective cytotoxicity against Jurkat cells

To investigate the potential effect of Rm-HE extract against cancer cells, various human cancer cell lines of different origin were screened to assess the cytotoxic activity of Rm-HE. Non-tumoral cell lines NIH3T3 and TK-6 were also tested as control. Interestingly, Rm-HE extract was dramatically effective against Jurkat cells whereas it induced only modest or negligible effects in the other tested cell lines (Figure 30A). We next performed a dose-response (0-50 µg/ml) viability assay in Jurkat cells in order to calculate the IC₅₀ for this cell line, using NIH3T3 and TK-6 cells as controls. The obtained cell growth curves prove that Rm-HE exerts a specific dose dependent inhibitory effect on cell proliferation in Jurkat cells (IC₅₀= 34.44 \pm 3.88 µg/ml). In agreement with our previous results, the extract exhibited no

effects on NIH3T3 and TK-6 (non-transformed cells lines) and a dose of 40µg/ml was chosen for further mechanistic studies in Jurkat cells(Figure 30B).

3-2 *Rm-HE promotes cell cycle arrest and induces apoptosis in Jurkat cells*

In order to investigate how Rm-HE affects cell cycle distribution, Jurkat cells were treated with a concentration of 40µg/ml for 24 and 48h. As shown in Figures 31A and 31B, Rm-HE effectively reduced the proportion of S-phase cells while strongly increasing the proportion of sub-G1 cells (33.05% at 24h and 43.48% at 48h). To elucidate the possible mechanism of Rm-HE induced sub-G1 population, we analyzed the presence of DNA damage by monitoring p-H2A.X levels. As shown in Figure 31C, increased levels of p-H2A.X were detected in Jurkat cells after only 4h, suggesting that Rm-HE treatment induced DNA damage. Double Annexin V/Propidium Iodide staining was next performed in order to analyze and quantify cellular death. Upon exposure to Rm-HE, a time-dependent increase in the number of Annexin V-positive cells (37%) at 24h was observed (Figure 31D). Taken together, these data indicate that Rm-HE induces DNA damage accompanied by cell cycle arrest and apoptosis in Jurkat cells.

3-3 *Rm-HE induces caspase-dependent apoptosis in Jurkat cells*

Activation of aspartate-specific cysteine proteases also known as caspases is a crucial biochemical event during apoptosis (Fadeel and Orenius; 2005, Kekre *et al.*,2005). Different caspases are activated during the initiation and execution phases of apoptosis. To investigate if Rm-HE-induced apoptosis is caspase dependent, we performed caspase 3/7 activity assays upon treatment of Jurkat cells with 40 µg/ml Rm-HE for 24 and 48h. Doxorubicin (1 µM), a conventional drug inducing caspase-dependent apoptosis was used as positive control. Figure 32A showed that both treatments similarly increased caspase activity up to 3-fold upon 48h. Accordingly, the presence of a specific caspase inhibitor (QVD-OPh) significantly reduced the cytotoxic effects of both Doxorubicin and Rm-HE on cell viability (Figure 32B).

Different caspases are activated by proteolytic cleavage at the initiation and execution phases of apoptosis (Srivastava *et al.*,1998). To determine the effect of Rm-HE on the activation of caspases, we monitored cleavage of caspases 8, 7, 3 and 9 in Jurkat cells following Rm-HE treatment at different time-points. Results of western blot analysis shown in Figure 32C indicate that Rm-HE treatment caused a strong activation of caspase 8 (detected at 4h) together with the activation of caspases 7, 3 and 9 in a time-dependent manner. This

observation confirms that Rm-HE-induced apoptosis is caspase-dependent and suggests that it operates via the extrinsic pathway.

3-4 Rm-HE-induced apoptosis is accompanied by Fas-L induction and partially involves JNK activation

Two major pathways are known to mediate cellular apoptosis, death receptor-dependent (extrinsic) and mitochondrial (intrinsic) pathways. Since our results suggest that apoptosis induced by Rm-HE operates via the extrinsic pathway, we further investigated the effects of Rm-HE on the expression of specific proteins involved in either of these pathways. To this end, we analyzed the expression levels of both pro- and anti-apoptotic members of the Bcl-2 family. Western blot analysis indicated that the expression levels of the anti-apoptotic proteins Bcl-xL, Mcl-1, and Bcl-2 (Catz and Johnson; 2013, Koo *et al.*, 2004), were not significantly altered upon Rm-HE treatment (Figure 33A). Regarding the pro-apoptotic members of the family, neither Bax nor Bad showed a significant increase upon Rm-HE, whereas Bim levels were modestly increased (Figure 33B). Since caspase-8 is generally activated following assembly of death-inducing signaling complex (DISC) during receptor-mediated apoptosis, we next investigated the expression of Fas ligand, a major inducer of the extrinsic pathway. Figure 32C revealed enhanced Fas-L expression upon exposure to Rm-HE; the statistical analysis of Fas-L blots in Figure 33D showed an expression increase up to 2-fold upon 16h of treatment. Accordingly, the inhibition of JNK, a key regulator of Fas-L expression, partially reduced the cytotoxic effects of Rm-HE on Jurkat cells (Figure 33E), as well as increased the JNK phosphorylation upon time (Figure 33F). Altogether, these observations clearly suggest that apoptosis induced by Rm-HE is activated, at least partially, via the caspase-8-dependent extrinsic pathway.

3-5 Characterization of chemical compounds in Retama monosperma hexanic extract.

In order to identify putative bioactive compounds responsible for these effects, Rm-HE was subjected to Gc-MS analysis (Figure 34A). At least 60 compounds were present in Rm-HE, of which 43 were identified using mass spectrometry. Retention time, Cas Numbers and % of identified area are summarized in Table 6. The mass spectra of these compounds were matched with computer searches in the references libraries of NIST08 and Wiley7, and fragmentation patterns were compared with literature and commercially-available products data. The major bioactive compounds identified were α -Linoleic acid (13.97%), Stigmasterol

(10.34%), β -Sitosterol (7.92%) and Campesterol (11.09%). Figure 34B shows their chemical structures.

4- Discussion

Many current research efforts in the field of cancer therapeutics are focused on the development of highly specific agents able to selectively induce apoptosis in cancer, but not normal, cells. In the last two decades there has been a surge of anti-cancer drugs introduced, of which almost half of them are derived from natural sources (Koo *et al.*, 2004; Lee and Shacter; 1999). In Morocco, traditional medicine is supported by one of the world's oldest pharmacopoeia, with an environmental biodiversity that provides a wide arsenal of plant remedies (Jouad *et al.*, 2001). Currently, plants of the *Retama* genus have attracted an increasing interest due to their wide range of pharmacological effects including hypoglycemic and diuretic (El-shazly *et al.*, 1996, Bellakhdar, 1997), cytotoxic (Maghrani *et al.*, 2005, Conforti *et al.*, 2004), antioxidant, antiviral (Lopez-lázaro *et al.*, 2000), antihypertensive (Edziri *et al.*, 2010), anti-inflammatory (Eddouks *et al.*, 2007) and antitumor activities (Bremner *et al.*, 2009). In correlation with a previous report indicating an anti-leukemic effect of Rm-HE (Belayachi *et al.*, 2013), we confirm and extend herein the anti-leukemic and apoptotic-inducing effects of Rm-HE and indicate its cellular mechanism of action on Jurkat cells. For this purpose, a cytotoxic screening with Rm-HE was performed on a panel of established human cancer cell lines including Glioblastoma Multiforme, Acute T cell Leukemia, Mantle Cell Lymphoma, Colon cancer, Prostate Cancer and Osteosarcoma cells, together with non-tumoral control cell lines. In this context, Rm-HE exhibited a dramatic effect on Jurkat cells, which are usually used as a model of acute T cell leukemia, but was essentially ineffective against the other tested cell lines including a B-cell lymphoma cell line (Jeko-1). Interestingly, Acute T cell leukemia is a hematological malignancy characterized by a deregulated expression of apoptosis-related molecules (Droin *et al.*, 2013).

Interestingly, flow cytometry analysis confirmed that exposure to Rm-HE strongly promoted cell death as indicated by the dramatic time-dependent increase in the proportion of sub-G1 cells. In parallel with cellular death, we observed that the number of cells in S-phase was also highly reduced; indicating a block in cell cycle progression. DNA damage is one of the major mechanisms behind anticancer drug-induced cell cycle arrest and apoptosis (Zhu *et al.*, 2007, Cai *et al.*, 2007). Under normal conditions, genomic integrity in DNA damaged-cells is

usually restored through DNA repair. If DNA repair cannot be achieved properly or cells are overwhelmed by sustained damage, apoptosis ensues in order to remove genetically aberrant cells (Norbury and Zhivotovsky; 2004, Ljungman; 2010). In agreement with the induction of apoptosis, we observed that Rm-HE treatment elicited DNA damage at 4h as indicated by the increase in H2A.X phosphorylation, a well-established readout for the presence of double strand breaks (Dickey *et al.*, 2010).

In order to better understand the mechanisms of cellular death in response to Rm-HE, we performed flow cytometry analysis upon Annexin-V/ propidium iodide staining to detect and quantify the amount of cells undergoing apoptosis (Hsu *et al.*, 2009). In this setting, the number of Jurkat cells entering early apoptosis clearly increased in a time-dependent manner, demonstrating that Rm-HE treatment induces Jurkat cell death through the promotion of apoptosis. Since a fundamental requirement for apoptosis to take place is the activation of caspases (Fadeel and Orenius; 2005, Kekre *et al.*, 2005), we determined if the enzymatic activity of caspases 3 and 7 was increased in Jurkat cells upon Rm-HE treatment. As expected, Rm-HE clearly induced caspase activation to a similar extent as the conventional chemotherapeutic agent Doxorubicin, and in correlation with this, the inhibition of caspases resulted in a partial protection against Rm-HE-mediated cytotoxicity.

Two fundamental pathways are responsible for the induction of apoptosis: the mitochondrial or intrinsic pathway and the death receptor or extrinsic pathway (Hsu *et al.*, 2009). Western blot analysis confirmed that both executioner caspases 3 and 7 were cleaved and thus activated by Rm-HE treatment, in parallel with the results obtained in caspase activity assays. Remarkably, Rm-HE treatment rapidly led to procaspase 8 cleavages, which is indicative of activation of the extrinsic apoptotic pathway, an event that was followed by subsequent activation of caspase 9.

In order to understand the involvement of both intrinsic and extrinsic apoptotic pathways in this process, we further investigated molecular events related to both apoptotic pathways in Rm-HE-treated Jurkat cells. To this end, we investigated the activation of both anti- and pro-apoptotic members of the Bcl-2 family. The absence of significant alterations in members of this family in Rm-HE-treated cells pointed to the induction of apoptosis predominantly via the receptor-activated extrinsic pathway. Activation of the extrinsic apoptotic pathway is regulated downstream of the activation of death receptors, and involves ligand-induced formation of death-inducing signaling complex (DISC) that recruits and activates pro-caspase 8. Since a major activator of death receptors in human leukemic cells is Fas-ligand (Fas-L)

(kantari and Walczak; 2011), we next investigated whether Rm-HE treatment could induce Fas-L upregulation. Interestingly, we observed a time-dependent increase in Fas-L in Rm-HE-treated Jurkat cells. A key upstream molecular pathway leading to Fas-L expression is the stress-activated JNK pathway (Le Niculescu *et al.*, 1999, Mansouri *et al.*, 2003), which has been shown to lead through Fas-L to caspase 8 and caspase 3 activation (chiung-Huei *et al.*, 2005). Accordingly, JNK inhibition significantly reduced the cytotoxic effects of Rm-HE in Jurkat cells, suggesting that a JNK/Fas-L/caspase 8/caspase 3 pathway is activated following Rm-HE treatment to promote extrinsic pathway-dependent apoptosis in Jurkat cells. We cannot rule out the contribution of the caspase 8-independent, intrinsic apoptotic pathway to Rm-HE-induced apoptosis, as indicated by the detection of caspase 9 cleavage. However, the robust effects on caspase 8, together with our observations on the involvement of JNK and Fas-L clearly suggest that the extrinsic pathway is the predominant apoptotic pathway in our experimental conditions.

We finally performed GC-MS analysis in order to identify putative bioactive compounds responsible for these cellular effects. Four major bioactives compounds were identified: α -Linoleic acid, Campesterol, β -sitosterol and stigmasterol. When combined together, the last three have been shown to exert cytotoxic activity against cancer cells (Lai *et al.*, 2010). Remarkably, Stigmasterol showed an inhibition of cell growth that was not dose-responsive (around 40–50% inhibition between 1.6 and 50 $\mu\text{g/ml}$) in HS578T breast cancer cells (Lai *et al.*, 2010). Additionally, β -sitosterol and phytol, which is also present in Rm-HE, exhibited a clear cytotoxicity against various cancer cell lines including nasopharyngeal epidermoid carcinoma, breast cancer, cervical carcinoma, colon carcinoma and lung adenocarcinoma cells (Malek *et al.*, 2009). These observations support the notion that the combination of several bioactive compounds in Rm-HE exerts its anticancer activity, and pave the way for further research efforts aimed at elucidating if any of the identified compounds could be mainly responsible for these effects.

5- Conclusions

Our results clearly indicate that bioactive components of Rm-HE act either alone or in combination to promote cellular apoptosis, predominantly acting via the extrinsic apoptosis pathway, with a strong selectivity against human T cell leukemia. The mechanism whereby this extract induces apoptosis is likely to involve a JNK/Fas-L /caspase 8/caspase 3 pathway

in the presence of cell cycle arrest and DNA damage induction. Further studies are required to i) further understand the molecular basis of its antileukemic selectivity, ii) determine which of the identified bioactive compounds are responsible for these effects and iii) perform preclinical developmental research aimed at ensuring its safety and efficacy as therapeutic agents.

6- Figures and legends

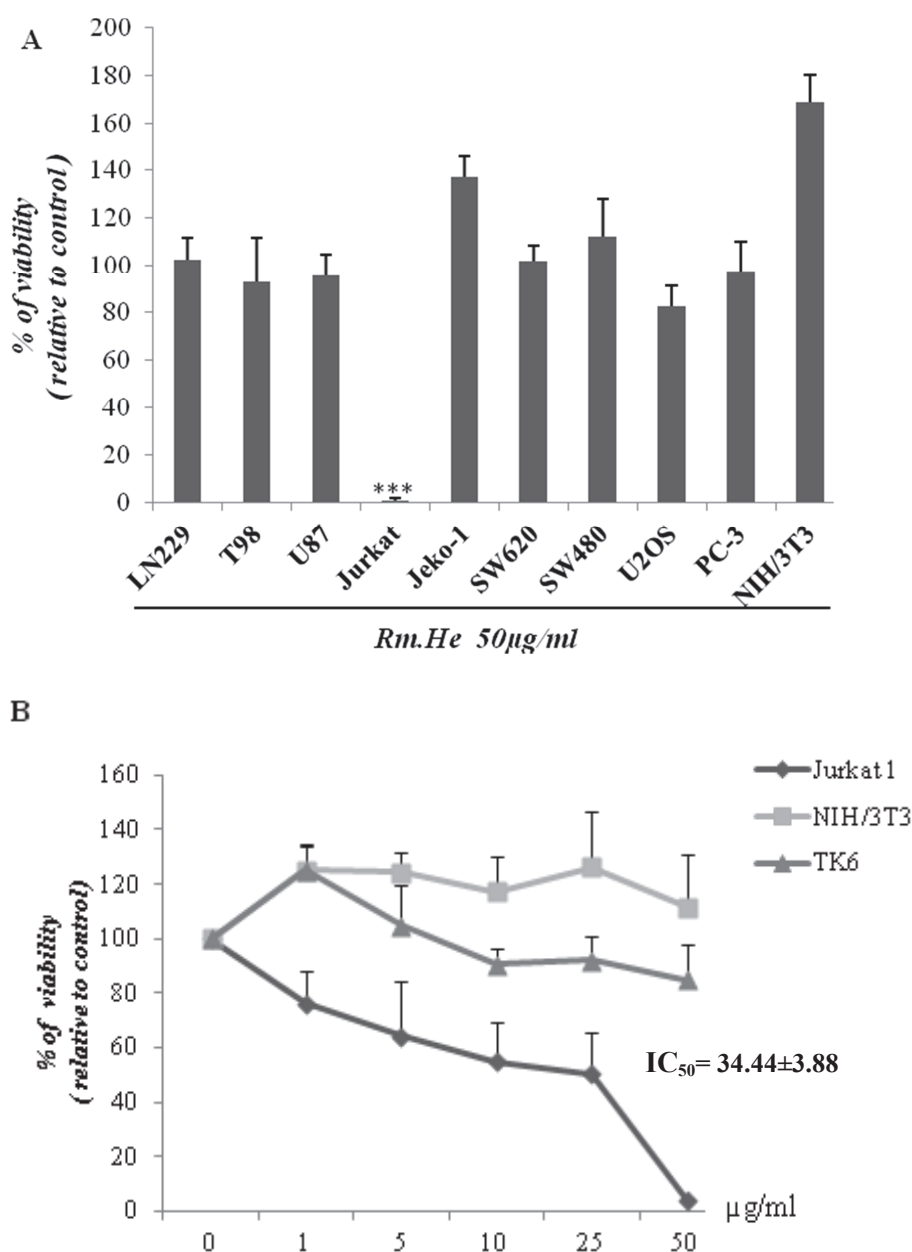


Figure 30. (A) Cytotoxic activity of RetamamonospermaHexanic Extract (Rm-HE) in a panel of cancer and non-transformed cell lines. LN229, T98, U87, Jurkat, Jeko-1, SW620, SW480, U2OS, PC-3 and NIH3T3 cells were incubated for 48 h with 50 µg/ml of (Rm-HE); Results represent the mean ±SD of at least 3 independent experiments indicating the percentage of viable cells relative to vehicle-treated (control) cells. **(B) Dose-response analysis of Retama monosperma Hexanic Extract (Rm-HE) and IC₅₀ determination on Jurkat cells.** Cells were treated with Rm-HE for 48h at different concentrations ranging from 1 to 50 µg/ml; IC₅₀ value (µg/ml) was determined graphically from the viability curves,

NIH3T3 and TK6 cells were used as control. Data are expressed as means \pm SD of triplicate determinations.

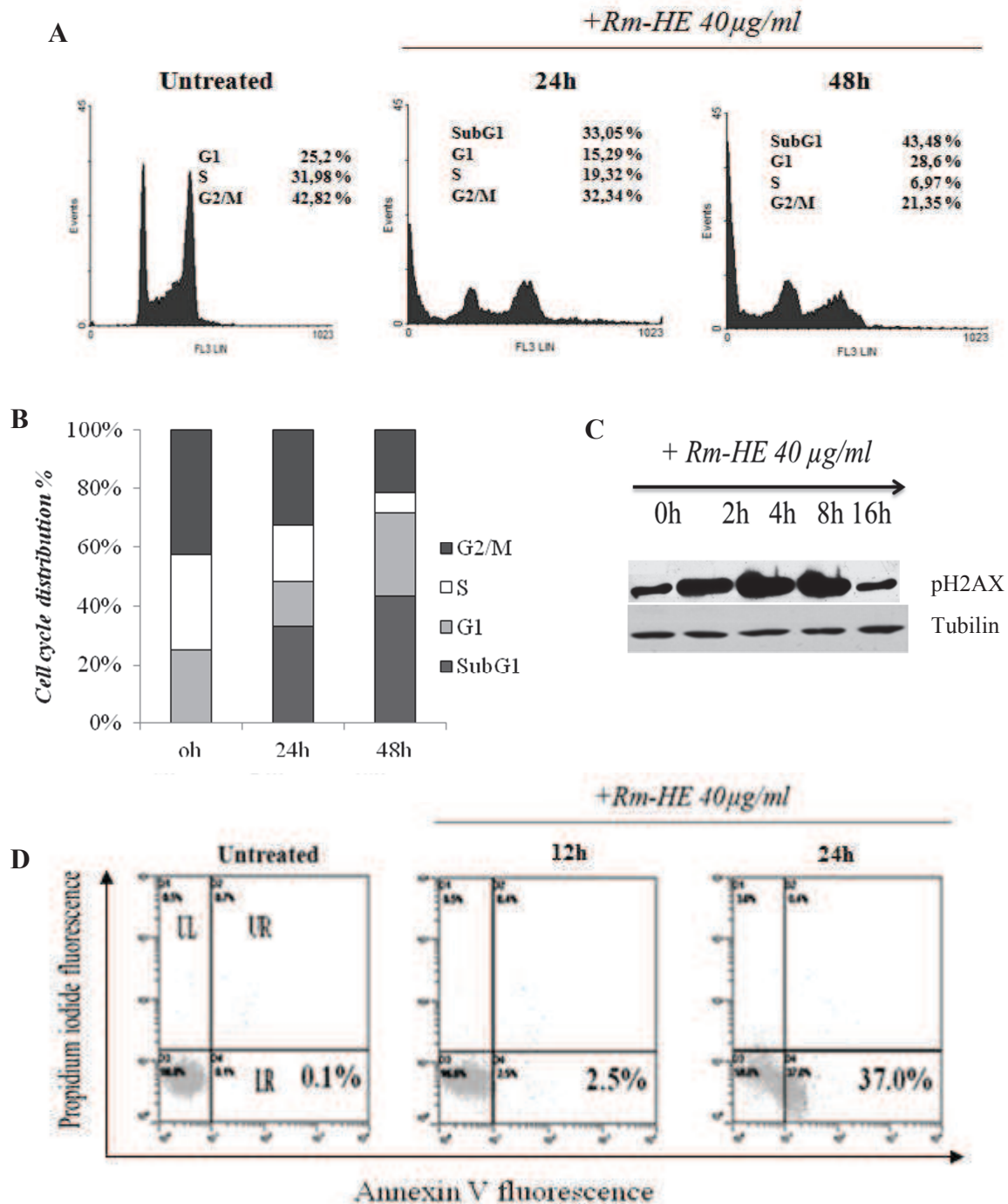


Figure 31. (A) Cell cycle analysis of Jurkat cells treated with *Retama monosperma* Hexanic Extract (Rm-HE) by flow cytometry. Jurkat cells (4×10^5 cells/ml) were incubated with 40 µg/ml of Rm-HE as indicated for 24h and 48h. Cells were harvested and their DNA content analysed by flow cytometry as described in Materials and Methods. The cell cycle distribution is shown for each experimental condition. (B) The graph summarizes the percentage of each phase in control, 24h and 48h-treated cells, respectively. (C) Effect of *Retama monosperma* Hexanic Extract (Rm-HE) on p-H2A.X levels. Cells (4×10^5 cells/ml) were treated with 40 µg/ml for 0, 2, 4, 8 and 16h. p-H2A.X levels in cellular extracts were detected by immunoblot with specific antibodies. Tubulin was used as an internal control. (D) Effect of *Retama monosperma* Hexanic Extract (Rm-HE) in Jurkat cell apoptosis analyzed by flow cytometry. Cells were treated with 40 µg/ml of Rm-HE for 12h and 24h. The x-axis shows

Annexin V-FITC staining and y-axis indicates Propidium iodide staining; Lower left (LL) quadrant: viable cells; lower right (LR) quadrant: early apoptotic cells; upper left (UL) quadrant: necrotic cells, upper right (UR) quadrant: late apoptotic cells.

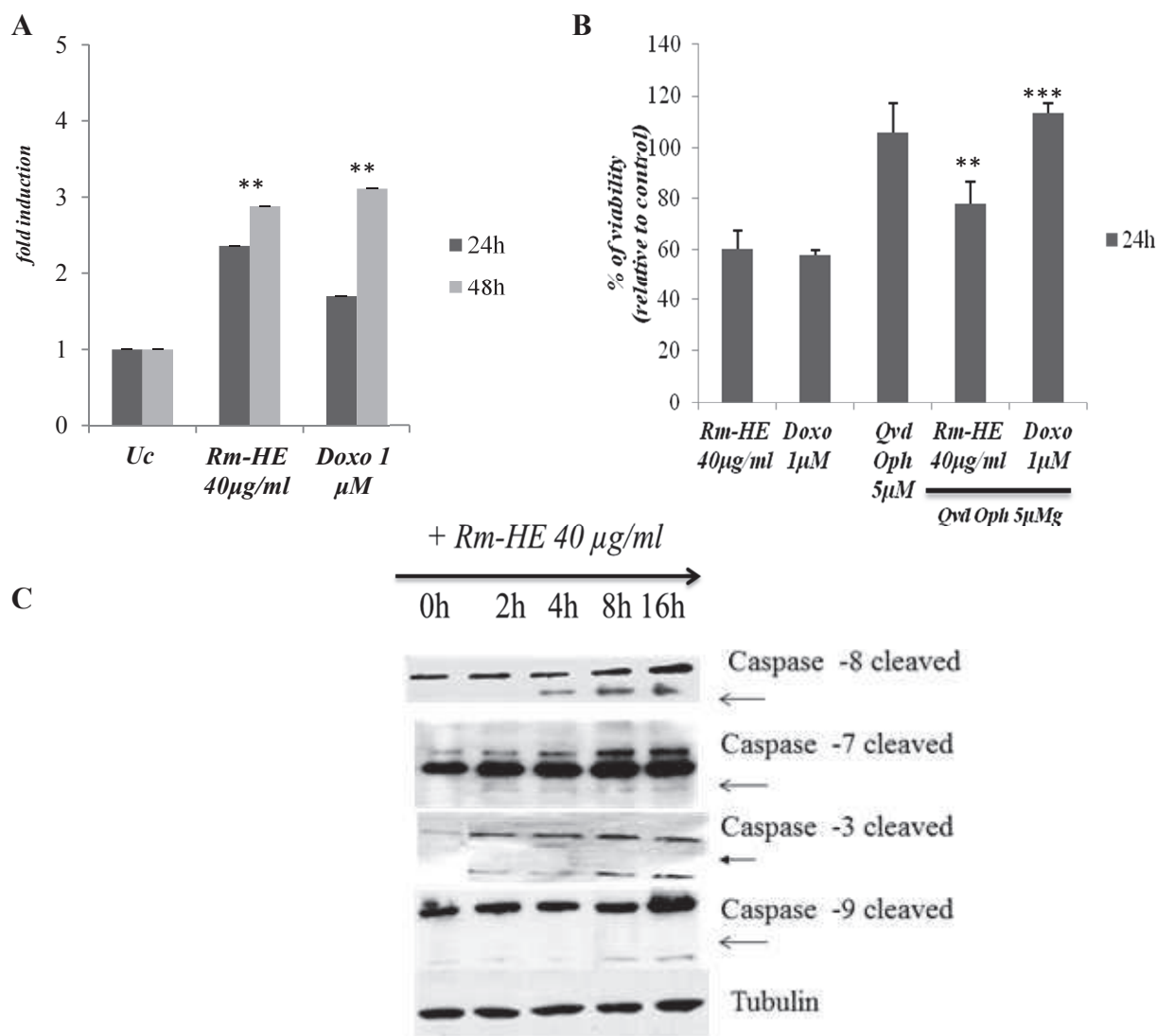


Figure 32 (A) Effect of *Retama monosperma* Hexanic Extract on caspase activity induction on Jurkat cells. Jurkat cells were treated with Rm-HE (40 µg/ml) or 1 µM Doxorubicin (positive control) for 24h and 48h and caspase activity was measured as indicated in Materials and Methods. Results indicate the average fold increase \pm S.E.M. in caspase activity relative to untreated cells from three independent determinations performed in duplicate. **(B) Effect of *Retama monosperma* Hexanic Extract on viability in the presence of a caspase inhibitor** Jurkat cells were pre-incubated for 1h with 5 µM Q-VD-Oph and Rm-HE (40 µg/ml) was added for 24 h. Doxorubicin was used as positive control. Cell viability is represented as a percentage relative to untreated cells, and data is means \pm S.E.M. from three independent determinations performed in duplicate. **(C) Effect of *Retama monosperma* Hexanic Extract on the expression and cleavage of caspases 8, 7, 3 and 9 in Jurkat cells.** 4×10^5 cells were treated with Rm-HE (40 µg/ml) for 0, 2, 4, 8 and 16h. Total and cleaved caspase levels in cellular extracts were detected by immunoblot with specific antibodies. Tubulin was used as an internal control.

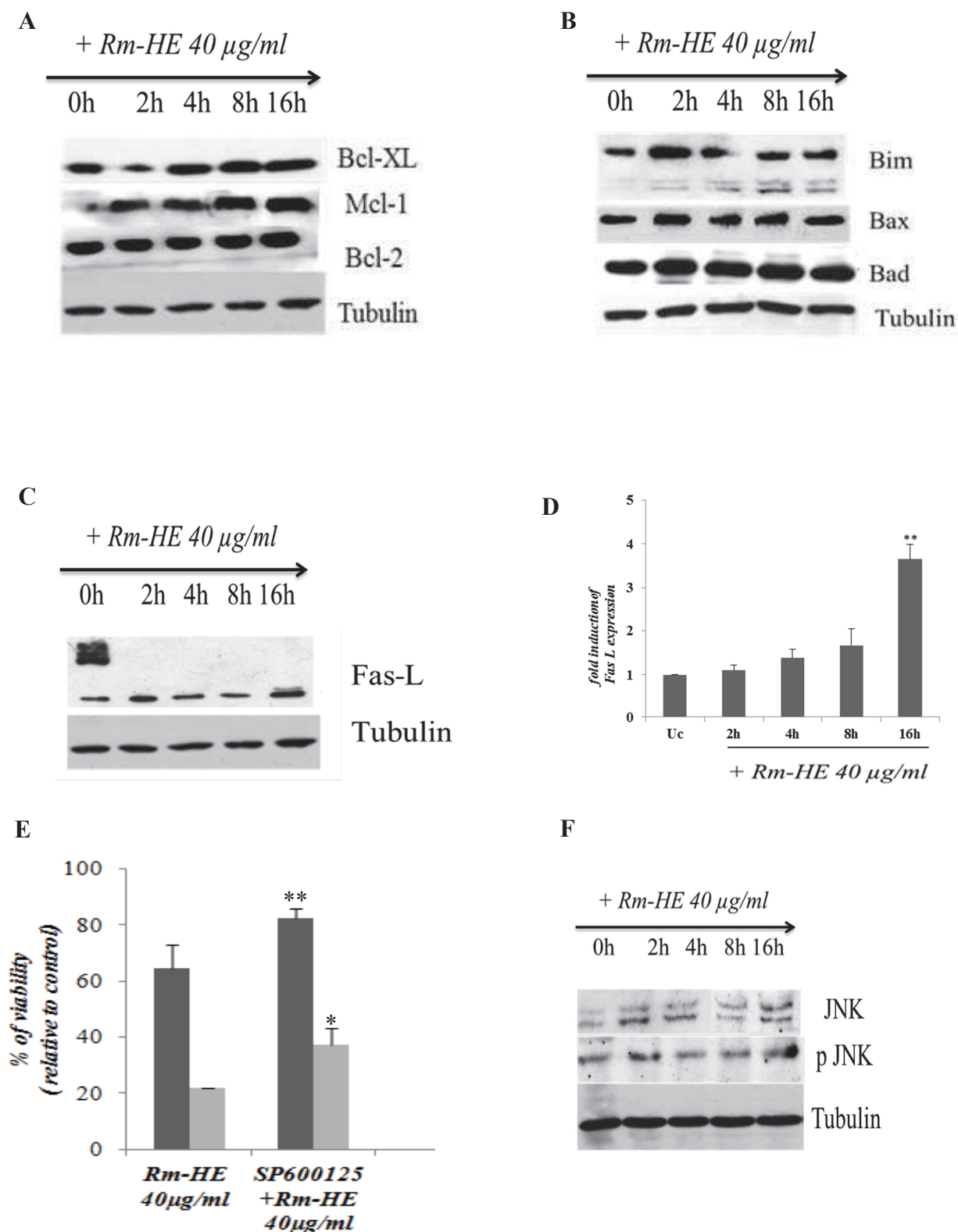
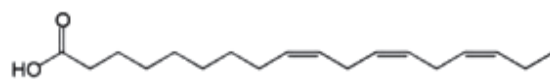
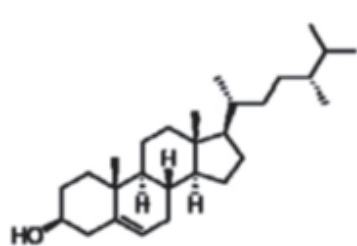


Figure 33. (A) Effect of *Rm-HE* on the expression and cleavage of apoptosis-related proteins in Jurkat cells. Expression of the anti-apoptotic proteins *Bcl-XL*, *Mcl-1* and *Bcl-2* was analyzed in extracts of Jurkat cells treated as indicated by immunoblot with specific antibodies. Tubulin was used as an internal control. (B) Expression of pro-apoptotic proteins *Bim*, *Bax* and *Bad* was analyzed in extracts of Jurkat cells treated as indicated by immunoblot

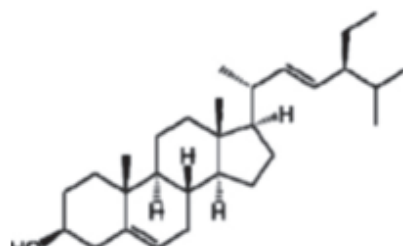
with specific antibodies. Tubulin was used as an internal control. **(C) Fas Ligand induction** was analyzed in extracts of Jurkat cells treated as indicated by immunoblot with specific antibodies. Tubulin was used as an internal control. **(D) Statistical analysis for Fas-L expression blots in Rm-HE treated cells.** 4×10^5 cells were treated with Rm-HE (40 $\mu\text{g/ml}$) for 0, 2, 4, 8 and 16h. Results indicate the average fold increase \pm S.E.M in Fas-L expression relative to untreated cells from three independent experiments. **(E) Effect of RetamamonospermaHexanic Extract on Jurkat cell viability in the presence of a JNK inhibitor.** Jurkat cells were pre-incubated for 1h with 10 μM SP600125 and then 40 $\mu\text{g/ml}$ of Rm-HE were added for 24h and 48h, as indicated. Cell viability is represented as a percentage relative to untreated cells. Data is means \pm S.E.M. from three independent determinations performed in duplicate. **(F) Effect of Retama monosperma Hexanic Extract on the JNK phosphorylation in Jurkat cells.** Expression of JNK and phosphor JNK was analyzed in extracts of Jurkat cells treated as indicated by immunoblot with specific antibodies. Tubulin was used as an internal control.



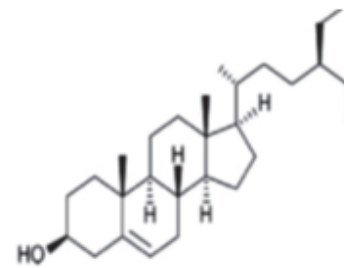
α -Linolenic acid



Campesterol



Stigmasterol



β -Sitosterol

Figure 34 Chemical structures of the major bioactive compounds of Retama monosperma Hexanic Extract.

Table 6: Compounds present in hexanic extract of *Retama monosperma* identified by CG/MS.

RT	Identified compounds	cas numbers	% Area
15,886	Propanoic Acid,2-[(trimethylsilyloxy)-, trimethylsilyl ester	17596-96-2	0,09
16,386	HexanoicAcid, trimethylsilylester	14246-15-2	0,04
16,46	Acetic acid, (trimethylsiloxy)-, trimethylsilyl ester	33581-77-0	0,027
21,694	Silanol,1,1,1-trimethyl-, 1-benzoate	2078-12-8	0,063
22,167	OctanoicAcid, trimethylsilylester	55494-06-9	0,063
24,805	NonanoicAcidtrimethylsilylester	82326-11-2	0,289
26,452	Dicyclohexylamine	101-83-7	0,139
27,305	DecanoicAcid, trimethylsilylester	55494-15-0	0,072
28,004	malatate	65143-63-7	0,036
29,279	TrimethylsilylVanillin	6689-43-6	0,103
29,368	(S)-dihydroactinidiolide	17092-92-1	0,257
31,347	P-Hydroxybenzoic Acid TMS ether TMS ester	2078-13-9	0,099
31,927	DodecanoicAcid, trimethylsilylester	55520-95-1	0,736
35,036	Nonanedioic Acid bis(trimethylsilyl) ester	17906-08-0	0,162
35,441	SPARTEINE	90-39-1	0,952
36,12	TetradecanoicAcidtrimethylsilylester	18603-17-3	0,686
37,734	methylpalmitate	112-39-0	0,374
38,077	PentadecanoicAcidtrimethylsilylester	74367-22-9	0,519
39,982	PalmiticAcidtrimethylsilylester	55520-89-3	2,406
40,124	Cytisine/baptitoxine/sophorine/Caulophylline	486-86-2	0,171
41,748	HeptadecanoicAcid, trimethylsilylester	55517-58-3	0,259
42,069	Aphylline	577-37-7	2,83
42,221	Phytol	352332	1,973
42,996	LinoleicAcidtrimethylsilyl	56259-07-5	9,988
43,156	α Linoleic Acid trimethylsilyl ester	97844-13-8	13,976
43,52	OctadecanoicAcid, trimethylsilylester	18748-91-9	1,35
43,723	Lupanine	550-90-3	0,212
45,127	NonadecanoicAcidtrimethylsilylester	74367-35-4	0,55
45,59	oleamide/SLEEPAMIDE	301-02-0	1,291
46,746	EicosanoicAcid, trimethylsilylester	55530-70-6	2,853
47,814	Monolupine /anagryne	486-89-5	2,275
48,903	Hexadecanoic Acid 2,3-bis[(trimethylsilyloxy)propyl ester	1188-74-5	2,569
49,742	DocosanoicAcidtrimethylsilylester	74367-36-5	2,804
50,022	(-)-PTEROCARPIN	524-97-0	0,329
50,197	Octadecanedioic Acid di(trimethylsilyl) ester	22396-20-9	0,438
51,265	1-TETRACOSANOL	506-51-4	3,65
51,684	Stearic Acid 2,3-bis(trimethylsilyloxy)propyl ester	1188-75-6	2,041
53,094	Brucine	357-57-3	0,654
53,702	PentacosanoicAcid	506-38-7	0,487
53,769	HexacosanoicAcid	506-46-7	2,781
57,238	Stigmasteroltrimethylsilylether	14030-29-6	10,34
57,609	β -Sitosteryltrimethylsilylether	2625-46-9	7,92
58,525	CAMPESTEROL	474-62-4	11,086

7- Competing interest

The authors declare that there are no competing interests.

8- Authors contributions

This work was carried out in collaboration between all authors. Author LB performed all experiments and participated in the experimental design, analysis of the data and redaction of the manuscript. Author CAL participated in the experimental design, analysis of the data and preparation of the manuscript. The plants harvest, identification and extraction were done by authors NM and YB. Author SA participated in the analysis of the data and the preparation of the manuscript. Author SFM participated in the experimental design and the analysis of the data. Author PV directed the research and supervised the preparation of the manuscript. All authors have contributed and approved the manuscript.

9- Acknowledgments

We are grateful to Dr. Rafael Núñez Gómez (Servicio de Instrumentación Científica, Estación Experimental del Zaidín CSIC, Granada, Spain), for the Gc-MS analysis of *Retama monosperma* hexanic extract and to Dr. Ruth Villalonga, Mr. Guillem Ramis and Ms. Margalida Serra Sitjar (Cancer Cell Biology Group, Institut Universitari d'Investigació en Ciències de la Salut "IUNICS") for scientific and technical help.

Chapitre III

Chapitre III

Troisième Article

Avant-propos

“Analysis of the biological activity of *Marrubium vulgare* extracts reveals cytotoxicity of the dichloromethane fraction against leukemia and lymphoma cell lines” par Lamiae Belayachi, Clara Aceves-Luquero, Nawel Merghoub, Youssef Bakri, Silvia Fernández de Mattos, Saïd Amzazi et Priam Villalonga.

Nommée localement « Marriwut » au Maroc et en Afrique du Nord, *Marrubium vulgare* est une plante appartenant à la famille des Lamiacées. Elle a été largement utilisée dans la médecine populaire comme agent expectorant et antispasmodique. Les propriétés traditionnellement attribuées à cette plante ont été évaluées par la recherche moderne, ainsi différents essais cliniques ont pu mettre en évidence ses diverses activités biologiques à savoir, analgésique, anti-inflammatoire, anti-œdémogène et antidiabétique. Notre étude avait pour but, examiner l'effet anti-tumoral que *Marrubium vulgare* a présenté précédemment. De ce fait, cinq extraits aqueux et organiques ont été testés sur les cellules (Jurkat, Jeko-1, TK-6 et NIH3T3), les mesures de viabilité cellulaire ont révélé qu'au moins, l'un des extraits criblés (La fraction dichlorométhane Mv-DF) était capable d'exercer une activité cytotoxique sans pour autant affecter les fibroblastes de souris (NIH3T3) et les lymphocytes normaux de control (TK-6). Ainsi, une étude détaillée du mécanisme d'action a permis d'analyser l'effet de Mv-DF sur la distribution du cycle cellulaire et l'induction de l'apoptose. L'analyse cytométrique a montré un arrêt en G1 pour les deux lignées (Jurkat et Jeko-1), accompagné d'une forte augmentation de l'activité des caspases effectrices 3 et 7 et par conséquent une induction de l'apoptose. Concernant l'analyse moléculaire, une régulation à la baisse des protéines anti-apoptotique (Bcl-2 et Mcl-1) ainsi qu'une inactivation de PARP ont été révélées. Des expériences supplémentaires avec des inhibiteurs sélectifs des voies (JNK, MAPK, Rho, p53 et JAK3) ont indiqué qu'aucune d'elles n'est considérablement impliquée dans l'induction de l'apoptose par Mv-DF. Une analyse GC-MS qualitative de la composition chimique de l'extrait, a montré que l'acide alpha-linolénique, l'acide palmitique, widdrol, le stigmastérol et β -sitosteryl sont les principaux composés bioactifs.

Ainsi, l'ensemble des résultats met en évidence l'activité anti-tumorale de *Marrubium vulgare* et par conséquent rallonge la liste des activités biologiques confirmées et attribuées à cette plante médicinale.

Les aspects de ce travail, à savoir le design expérimental, les travaux de laboratoire, l'analyse des données, la conception des figures et la rédaction de l'article ont été réalisés au sein d'une collaboration scientifique entre le Maroc et l'Espagne. Je suis spécialement reconnaissante au Programme de mobilité Averoès (Commission Européenne) pour la bourse de mobilité.

Cet article est soumis pour publication au journal «*Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine (eCAM)* »

Analysis of the biological activity of *Marrubium vulgare* extracts reveals cytotoxicity of the dichloromethane fraction against leukemia and lymphoma cell lines

Abstract

Marrubium vulgare, locally named “Marriwut” in Morocco and North Africa, belongs to the Lamiaceae family, and has been largely used in folk medicine as expectorant and antispasmodic. The properties traditionally ascribed to *Marrubium vulgare* have been evaluated by intensive modern research and clinical trials, confirming its diverse biological activities such as antioxidant, analgesic, anti-inflammatory, anti-oedematogenic, anti-diabetic and anti-tumoral. The purpose of this study is to investigate the anti-leukemic/lymphoma effect of *Marrubium vulgare* dichloromethane fraction on Jurkat (Acute T-cell leukemia) and Jeko-1 (Mantle Cell Lymphoma) cells. The plant was extracted using water and organic solvents, and five different extracts were screened on Jurkat, Jeko-1, TK-6 and NIH3T3 cells. Cell viability assays revealed that, at least, one of *Marrubium vulgare* extracts (dichloromethane fraction, Mv-DF) was able to exert cytotoxic activity against Jurkat (IC_{50} 11.54 ± 2.83) and Jeko-1 (IC_{50} 6.04 ± 2.77) cells. This fraction did not exhibit effects on non tumoral mouse fibroblasts (NIH3T3) and normal lymphocytes (TK-6). Cytometry analysis showed an increase in the sub-G1 population, induction of G1 arrest and apoptosis for both cell lines, in agreement with the induction of caspase activity. Accordingly, the molecular analysis revealed the down regulation of pro-survival proteins. Additional experiments with selective inhibitors of stress and survival pathways (JNK, MAPK, Rho, p53, and JAK3) indicated that none of these pathways was significantly involved in apoptosis induction. The bioactive compound analysis by CG/MS indicated that alpha linolenic acid, palmitic acid, widdrol, stigmasterol and β -sitosterol were the major bioactive ingredients of the extract. Together, our results suggest that the *Marrubium vulgare* dichloromethane fraction exerts an interesting anti-leukemia/lymphoma activity in Jurkat and Jeko-1 cells.

Key words: *Marrubium vulgare*, Acute T-cell leukemia, Mantle Cell Lymphoma, cytotoxicity, apoptosis, bioactive compounds.

Analysis of the biological activity of *Marrubium vulgare* extracts reveals cytotoxicity of the dichloromethane fraction against leukemia and lymphoma cell lines

Lamiae Belayachi^{a,c}, Clara Aceves-Luquero^a, Nawel Merghoub^c, Youssef Bakri^c, Silvia Fernández de Mattos^{a,b}, Saaïd Amzazi^c, Priam Villalonga^{a,b*}

^a *Cancer Cell Biology Group, Institut Universitari d'Investigació en Ciències de la Salut (IUNICS),* ^b *Departament de Biologia Fonamental, Universitat de les Illes Balears, Illes Balears, Spain,* and ^c *Biochemistry-Immunology Laboratory, Faculty of Sciences, Mohammed V-Agdal University, Rabat, Morocco.*

**Corresponding author. Priam Villalonga. Mailing address: Institut Universitari d'Investigació en Ciències de la Salut (IUNICS), Edifici Científicotècnic, Ctra. Valldemossa Km 7,5, Illes Balears, Spain. Phone: +34 971 259961 Fax: +34 971 259501*

E-mail: priam.villalonga@uib.es

Abstract

Marrubium vulgare, locally named “Marriwut” in Morocco and North Africa, belongs to the Lamiaceae family, and has been largely used in folk medicine as expectorant and antispasmodic. The properties traditionally ascribed to *Marrubium vulgare* have been evaluated by intensive modern research and clinical trials, confirming its diverse biological activities such as antioxidant, analgesic, anti-inflammatory, anti-oedematogenic, anti-diabetic and anti-tumoral. The purpose of this study is to investigate the anti-leukemic/lymphoma effect of *Marrubium vulgare* dichloromethane fraction on Jurkat (Acute T-cell leukemia) and Jeko-1 (Mantle Cell Lymphoma) cells. The plant was extracted using water and organic solvents, and five different extracts were screened on Jurkat, Jeko-1, TK-6 and NIH3T3 cells. Cell viability assays revealed that, at least, one of *Marrubium vulgare* extracts (dichloromethane fraction, Mv-DF) was able to exert cytotoxic activity against Jurkat ($IC_{50} 11.54 \pm 2.83$) and Jeko-1 ($IC_{50} 6.04 \pm 2.77$) cells. This fraction did not exhibit effects on non tumoral mouse fibroblasts (NIH3T3) and normal lymphocytes (TK-6). Cytometry analysis showed an increase in the sub-G1 population, induction of G1 arrest and apoptosis for both cell lines, in agreement with the induction of caspase activity. Accordingly, the molecular analysis revealed the down regulation of pro-survival proteins. Additional experiments with selective inhibitors of stress and survival pathways (JNK, MAPK, Rho, p53, and JAK3) indicated that none of these pathways was significantly involved in apoptosis induction. The bioactive compound analysis by CG/MS indicated that alpha linolenic acid, palmitic acid, widdrol, stigmasterol and β -sitosterol were the major bioactive ingredients of the extract. Together, our results suggest that the *Marrubium vulgare* dichloromethane fraction exerts an interesting anti-leukemia/lymphoma activity in Jurkat and Jeko-1 cells.

Key words: *Marrubium vulgare*, Acute T-cell leukemia, Mantle Cell Lymphoma, cytotoxicity, apoptosis, bioactive compounds.

1- Introduction

As an important source, plants may produce potential chemo preventive or chemotherapeutic agents. Traditional or folk medicinal herbs have been and are still prescribed to treat many diseases and condition such as cancer, one of the major causes of mortality throughout the world. In 2005 the global incidence of cancer was 11 million with more than 7, 6 million deaths, and is expected to increase to an incidence of 15, 5 million with 11, 5 million deaths by 2030 (Strong *et al.*,2008). However, cancer is in some cases a preventable disease (Glade; 2004)Chemoprevention, by definition, is a means of cancer control by which the occurrence of the disease can be entirely prevented, slowed down, or reversed by the administration of one or more naturally occurring and/or synthetic agents (Amin *et al.*,2009). Recent scientific efforts have focused on the potential roles of extracts of traditional herbs as alternative and complementary medications for cancer treatment. Herb extracts are often administered together with conventional cancer therapies to increase survival rates and enhance the quality of patient life(Kinghorn *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2009).

Acute T cell leukemia (ALL) and Mantle cell lymphoma (a distinct subtype of B-cell non Hodgkin lymphoma, NHL) are two hematological malignancies considered highly aggressive.They are neoplastic disorders that are generally resistant to conventional chemotherapy with a high rate of relapse and currently no efficient targeted therapies available (Zhao; 2010; Jaking-Razumovic and Aurer; 2002). In order to extend the treatment options and improve patients' survival, both the identification and development of new potent drugs that can trigger cell death in ALL and NHL cells are focal points in translational leukemia/lymphoma research.

Apoptosis, an important process in cell development and maintenance of tissue homeostasis, plays an essential role as a protective mechanism against carcinogenesis by eliminating damaged cells or abnormal excess cells (Schuchmann and Galle; 2004; Kaufmann and Hengartner; 2001).Apoptosis provides a number of useful clues when generating effective therapies (Schuchmann and Galle; 2004). Three different death signaling pathways can lead to apoptosis: the extrinsic death receptor-dependent pathway (Wallach *et al.*, 1997), the intrinsic mitochondria-based pathway (desagher and Martinou; 2000), and the intrinsic endoplasmic reticulum (ER) stress-mediated pathway (Nakagawa and Yuan; 2000). Many chemotherapeutic agents exert their anticancereffects by inducing apoptosis in cancer cells trough those pathways (Kundu *et al.*, 2005).

The *Marrubium* genus, commonly known as horehound or hoarhound, belongs to the *Lamiaceae* family and counts more than 30 different species of flowering native to temperate regions of Europe, northern Africa and Asia (Argypoulou *et al.*, 2009). Nowadays, in the north of Africa (Morocco, Temara-Rabat region) *Marrubium* plants are used in folk medicine as expectorants and for their antispasmodic properties, in acute or chronic bronchitis, coughs, asthma and for respiratory infections; they are also used in cases of lack of appetite and dyspepsia. Particularly, *Marrubium vulgare* (white horehound or common horehound), locally named “Marriwut”, is the most representative among the *Marrubium* species, being widely distributed in the area. The leaves and young flowering stems are currently used by traditional healers, alone or combined with other herbs as antiseptic, antispasmodic, antidiabetic, diuretic, strongly expectorant and tonic (bellakhdar *et al.*,1991). Many of the properties traditionally ascribed to *Marrubium vulgare* were confirmed by intensive modern research and clinical trials, such Antispasmodic (Schlemper *et al.*; 1996), Antinociceptive (Dz Jesus *et al.*; 2000), Analgesic (Meyre-Silva *et al.*; 2005), Antioxidant, Anti cholesterol (Berrougui *et al.*; 2006), Antioedematogenic (Stulzer *et al.*; 2004), Antidiabetic (Elbeny *et al.*; 2006, Erdogan *et al.*; 2010, Bou djlal *et al.*; 2012, Pukalskas *et al.*,2012).Furthermore, extracts of this plant have shown an antitumor activity (Belayachi *et al.*; 2013) and also some effect on neurological disorders (Erdogan *et al.*; 2010).

In this study, we show that *Marrubium vulgare* dichloromethane fraction selectively presents an anti-leukemic/lymphoma effect, as indicated by its dramatic effects on Jurkat and Jeko-1 cells. We describe herein the major cellular effects of Mv-DF leading to cell cycle arrest and cell death, by analyzing expressions of apoptosis-related molecules, including caspases, Bcl-2 family proteins and PARP. Finally, we suggest potential bioactive compounds responsible for those effects upon determination of the chemical components of the fraction by GC/MS.

2- Materials and methods

2-1 Plant material

The aerial parts of *Marrubium vulgare* L. were collected in March 2011 from Ain atik Temara-Rabat (Morocco). The plant was identified at the Scientific Institute of Rabat by Prof. M. Fennane, and the specimen was deposited in the Scientific Institute herbarium under the voucher specimen reference N° RAB78357.

2-2 Preparation of Extracts

The collected parts were air-dried and mechanically ground to produce a fine powder. 200g of plant powder was successively extracted using a Soxhlet apparatus with n-hexane (1.3L) and methanol (1.3L) to obtain hexanic extract (Mv-HE) and methanolic extract (Mv-ME) the resulting extracts were then evaporated by a Rotavapor to give dried extracts. The methanol concentrated extract was dissolved in distilled water and was successively extracted with dichloromethane (1.3L) and ethyl acetate (1.3L) to obtain dichloromethane fraction (Mv-DF) and ethyl acetate fraction (Mv-AF). All extracts were evaporated by a Rotavapor and kept at -20°C until use. For the aqueous extract (Mv-AQ), (80g) of the plant powder was extracted by infusion process for 15 min in water (100°C). The extract was filtered through Whatman filter paper, followed by lyophilization.

2-3 Cell culture

Jurkat, Jeko-1 and TK6 cells were maintained in RPMI-1640 with L-Glutamine and HEPES (Biological Industries Ltd., Kibbutz Beit Haemek, Israel). NIH3T3 cells were maintained in DMEM High Glucose (4.5 g/l) with L-glutamine (Invitrogen, Carlsbad, CA). All cells were grown in a humidified incubator at 37°C with 5% CO₂. RPMI and DMEM were supplemented with 10% heat inactivated foetal bovine serum and 100 units/ml penicillin/streptomycin (Biological Industries Ltd., Kibbutz Beit Haemek, Israel). All cell lines were subconfluent grown and passaged, routinely tested for mycoplasma contamination and subjected to frequent morphological tests and growth curve analysis as quality-control assessments. All cell lines were treated at a prophylactic concentration of 5 µg/ml Plasmocin™ (InvivoGen, San Diego, CA).

2-4 Drugs and inhibitors

Doxorubicin (Developmental Therapeutics Program, Division of Cancer Treatment and Diagnosis, National Cancer Institute, Bethesda, MA), Q-v-Ophand SP600125, U0126, H1152, Pifithrin α and JAK3 inhibitor I (Calbiochem, Darmstadt, Germany) were added directly to the media at the indicated concentration and cells were harvested or analyzed at the time points indicated in the figure legends.

2-5 Cell viability assays

The number of viable cells in culture was determined based on quantification of ATP, which signals the presence of metabolically-active cells, using the Cell Titer-Glo luminiscent assay

kit (Promega, Madison, WI, USA). Following the manufacturer's instructions, the cells were plated in 96-well plates, treated 24 h later with extracts dissolved in DMSO for the indicated times and concentrations, followed by addition of Cell Titer-Glo reagent. Luminescence was detected using a multi-well Synergy Mx scanning spectrophotometer (Biotek, Winooski, VT).

2-6 Cell cycle analysis

Cell cycle analysis was performed using propidium iodide staining. Briefly, cells were washed in phosphate-buffered saline (PBS) and fixed in 70% ethanol. Fixed cells were then washed twice in PBS and stained in propidium iodide (50 µg/ml) in the presence of 50 µg/ml RNase A (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), then analysed by flow cytometry using a FACScan (Coulter Epics XL-MSL; Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) and winMDI software.

2-7 Annexin V-FITC/propidium iodide flow cytometric analysis

Analysis of phosphatidylserine externalization in apoptotic cells was determined by an ApoTarget Annexin-V-FITC Apoptosis kit (Invitrogen), according to the manufacturer's instructions. 2×10^5 cells were seeded in 6-well plates and treated with 50 µg/ml of Mv-DF for 48h. They were then collected and suspended in 100 µl of Annexin V-binding buffer. 5 µL of Annexin-V-FITC and 10 µL of propidium iodide were added and incubated 15min at room temperature in the dark. Flow cytometry analysis was carried out using a FACScan (Coulter Epics XL-MSL; Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) and winMDI software.

2-8 Caspase activity analysis

Enzymatic activity of caspases was determined by measurement of caspases-3 and 7 activity by means of the luminometric Caspase-Glo 3/7 assay (Promega) according to the manufacturer's protocol using a Synergy HT multi-detection microplate reader (Bio-Tek, Winooski, VT, USA).

2-9 Gel electrophoresis and immunoblotting

Cells were harvested in a buffer containing 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA and 1% (v/v) Triton X-100 plus protease and phosphatase inhibitors. Protein content was measured by the Bradford procedure. Cell lysates were electrophoresed in SDS-polyacrylamide gels. After electrophoresis the proteins were transferred to Immobilon-P strips (Millipore, Billerica, MA) for 2 h at 60 V. The sheets were pre-incubated in TBS (20 mM

Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl), 0.05% Tween 20 and 5% defatted milk powder for 1 h at room temperature and then incubated for 1 h at room temperature in TBS, 0.05% Tween 20, 1% BSA and 0.5% defatted milk powder containing the appropriate antibodies: Cleaved Caspase-3 (#9464, 1:1000), Cleaved Caspase-7 (#8438, 1:1000), Bcl-2 (#2870, 1:1000), Mcl-1 (#5453, 1:1000) and PARP (#9542, 1:1000) from Cell Signaling (Beverly, MA); and β -tubulin (T0198, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, 1:4000). After washing in TBS, 0.05% Tween 20, the sheets were incubated with a peroxidase-coupled secondary antibody (Dako, Glostrup, Denmark, 1/2000 dilution,) for 1 h at room temperature. After incubation, the sheets were washed twice in TBS, 0.05% Tween 20 and once in TBS. The peroxidase reaction was visualized by the enhanced chemiluminescence detection system (Millipore, Billerica, MA).

2-10 Derivatizations for GC/MS analysis

For this purpose 100 μ l of the extract was dried with N₂ gas, then 100 μ l of derivatization agent (N, O-bis (trimethylsilyl) trifluoroacetamide with 1% of trimethylchlorosilane) was added, mixed and heated 10 minutes at 60°C.

2-11 Gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) analysis

The GC-MS analyses of *Marrubium vulgare* Dichloromethane Fraction (Mv-DF) were carried out at the Instrumental Technical Services of the “Estación Experimental del Zaidín” (CSIC, Granada, Spain). Briefly, 1 μ l of the derivative solution was injected in a Varian 450GC coupled to 240 Ion Trap Mass Spectrometer as detector. The injection conditions were: splitless mode with 1 minute duration pulse, the injector temperature was 250°C; the He column flow was 1 ml/minute in a capillary column (Varian Factor Four VF-5 ms 30m \times 0.25mm \times 0.25 μ m). For Mass spectrometry conditions, the EI ionization was 70 eV, the transfer line was at 280°C and the Trap at 240°C, mass range acquisition was from m/z 50 to m/z 500 and cared in Full Scan mode. Qualitative analysis of compounds was based on the comparison of their spectral mass and their relative Retention time with those of NIST08 mass spectra database and Kovats RI on the chromatograms recorded in Full Scan or in SIM mode using the characteristics ions. Quantitative analysis was realized by integration of peaks and calculated as percent of total identified area on the TIC chromatograms.

2-12 Statistical Analysis

Data are presented as means \pm SD of at least three different assays performed in triplicate. IC₅₀ value and the statistical significance of differences by Student's *t* test were assessed using GraphPad Prism (GraphPad Software Inc. La Jolla, CA). Statistically significant differences are indicated by ***P<0.001, **P <0.01 and *P <0.05, respectively.

3- Results

3-1 Cytotoxicity of *Marrubium vulgare* extracts and fractions against Jurkat and Jeko-1 cell lines.

To investigate the potential effect of *Marrubium vulgare* extracts against leukemia/lymphoma cell lines, various aqueous and organic extracts were screened to assess their cytotoxic activity. Non-tumoral cell lines NIH3T3 and TK-6 were also tested as control. Interestingly, the dichloromethane (Mv-DF) fraction was dramatically effective against both Jurkat and Jeko-1 cells, whereas the other extracts induced only modest or negligible effects (Figure 35A).

We next performed a dose-response (0-50 μ g/ml) viability assay of Mv-DF in Jurkat and Jeko-1 cells in order to calculate the IC₅₀, using TK-6 cells as control. The cell growth curves in Figure 35B prove that Mv-DF exerts a specific dose-dependent inhibitory effect on cell proliferation in Jurkat (IC₅₀= 11, 54 \pm 2, 83 μ g/ml) and Jeko-1 (IC₅₀= 6, 04 \pm 2, 77 μ g/ml) cells. In agreement with our previous results, the extract exhibited no effects on NIH3T3 and TK-6 (non-transformed cell lines). The concentrations of 20 μ g/ml and 10 μ g/ml were chosen respectively for Jurkat and Jeko-1 cells for further mechanistic studies.

3-2 Effect of Mv-DF on cell cycle distribution and apoptosis induction in Jurkat and Jeko-1 cells.

In order to investigate how Mv-DF affects cell cycle distribution, Jurkat and Jeko-1 cells were treated with a concentration of 20 μ g/ml and 10 μ g/ml respectively for 24 and 48h. As shown in Figure 36A, Mv-DF effectively reduced the proportion of S-phase cells while strongly increased the proportion of sub-G1 cells (43, 02% for Jurkat and 50, 91% for Jeko-1 at 48h). Double Annexin V/Propidium Iodide staining was then performed in order to analyze and quantify cellular death. Upon exposure to Mv-DF, an increase in the number of Annexin V-positive cells was observed for Jurkat (35, 5%) and Jeko-1 (23, 6%) at 24h (Figure 36B).

Taken together, these data indicate that Mv-DF induces cell cycle arrest and apoptosis in both hematological cell lines.

3-3 Effect of Marrubium vulgare on caspase activation and cleavage in Jurkat and Jeko-1 cells.

As a crucial biochemical event, different caspases are activated during the initiation and execution phases of apoptosis (Fadeel and Orenius; 2005, Kekre *et al.*, 2005). To examine if Mv-DF-induced apoptosis is caspase dependent in both hematological malignancies, we performed caspase 3/7 activity assays in Jurkat and Jeko-1 treated with 20µg/ml and 10µg/ml of Mv-DF respectively. Doxorubicin (1µM) was used as a positive control. Figure 37A (Jurkat) and Figure 37B (Jeko-1) showed that Mv-DF increased caspase activity up to 5-fold in Jurkat and to 12-fold in Jeko-1 cells 48h after treatment. Accordingly, pre-incubation with the specific caspase inhibitor (QVD-OPh) significantly reduced the cytotoxic effects of Mv-DF on cell viability of both Jurkat (Figure 37C) and Jeko-1 (Figure 37D) cells.

Caspases are activated by proteolytic cleavage at the initiation and execution phases of apoptosis (Srivastava *et al.*, 1998). To determine the effect of Mv-DF on their activation, we monitored the cleavage of caspases 3 and 7 in Jurkat and Jeko-1 cells following Mv-DF treatment at different time-points. Results of western blot analysis indicate that Mv-DF treatment caused cleavage of caspases 3 and 7 in a time dependent manner in Jurkat (Figure 37E) and Jeko-1 (Figure 37F) cells.

3-4 Effect of Marrubium vulgare on apoptotic signaling regulators in Jurkat and Jeko-1 cells.

To elucidate the molecular pathway of Mv-DF-mediated apoptosis, we determined whether caspases are involved as downstream effectors. The Mv-DF Fraction increased cleavage of caspases 3 and 7 in a time dependent manner. However, several cytoplasmic proteins, particularly members of the Bcl-2 family, are critical to apoptosis regulation. Of those, the anti-apoptotic subgroup, including Bcl-2 and Mcl-1, inhibits apoptosis (Catz and Johnson; 2013). Our western blot analysis shows that expression of Bcl-2 and Mcl-1 decreased in both cell lines in a time dependent manner in the presence of Mv-DF. As a downstream target of active caspase 3 during induction of apoptosis, poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) has been reported to be cleaved into two fragments (Lazenbnik *et al.*, 1994). This cleavage of PARP by active caspase 3 is proposed as a marker of apoptosis in many experimental models. In our study, the cleavage of PARP was detected in the both cell lines Jurkat (Figure 38A) and

Jeko-1 (Figure 38B) along with caspase 3 activation (Figure 37E and 37F). These results suggest that Mv-DF-induced apoptosis in Jurkat and Jeko-1 cells may involve the mitochondrial pathway. Subsequently, we analyzed whether the apoptotic effect of Mv-DF in Jurkat and Jeko-1 was also mediated by other cellular pathways; for this purpose additional experiments with a panel of selective inhibitors of stress and survival pathways (SP600125, U0126, H1152, Pifithrin α and JAK3) were performed in Jurkat (Figure 38C) and Jeko-1 (Figure 38D) cells upon Mv-DF treatment. The results showed that none of these pathways was significantly involved in apoptosis induction in both Jurkat and Jeko-1 cell lines. Taken together, these experimental findings suggest that neither JNK, ERK1/2, Rho, p53 nor JAK3 pathways are involved in Mv-DF induced apoptosis in Acute T cell leukemia and Mantle cell lymphoma cell lines.

3-5 Characterization of chemical compounds in Marrubium vulgare Dichloromethane Fraction.

In order to identify bioactive compounds responsible for these effects, Mv-DF was subjected to GC-MS analysis (Figure 39A). 30 compounds were identified using mass spectrometry. Retention time, Cas Numbers and % of identified area are summarized in Table 7. The mass spectra compounds were matched with computer searches in the references libraries of NIST08 and Wiley 7, and fragmentation patterns were compared with literature and commercially available products data. The major bioactive compounds identified were α -linoleic acid (12%), phytol (2, 45%), widdrol (12, 11%), palmitic acid (7, 2%), stigmasterol (16, 34%) and β -sitosterol (20, 99%). Figure 39B shows their chemical structures.

4- Discussion

T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) and Mantle cell lymphoma (B-NHL) are aggressive neoplastic disorders of lymphocytes lineage (Li *et al.*, 2013). They are known to have alterations in multiple cellular signaling pathways, which open new avenues for targeted therapy using multi-targeted agents inducing apoptosis and including natural products (Zhao; 2010). In the last two decades there has been a surge of anti-cancer drugs introduced, of which almost half of them are derived from natural sources (Lee *et al.*, 2013). Traditional medicine in Morocco is supported by one of the world's oldest pharmacopoeia with a wide arsenal of plant remedies (Jouad *et al.*;2001). Many of the activities traditionally ascribed to *M. vulgare* were confirmed by intensive modern research and clinical trials, such

antispasmodic (Schlemper *et al.*; 1996), antinociceptive (Dz Jesus *et al.*; 2000), analgesic (Meyre-Silva *et al.*; 2005), antioxidant, anti cholesterol (Berrougui *et al.*; 2006), antioedematogenic (Stulzer *et al.*; 2004), antidiabetic (Elbeny *et al.*; 2006, Erdogan *et al.*; 2010, Bou djlal *et al.*; 2012, Pukalskas *et al.*, 2012). Furthermore, extracts of this plant have shown an antitumor activity (Belayachi *et al.*; 2013) and also some effect on neurological disorders (Erdogan *et al.*; 2010).

In correlation with our previous observations indicating an anti-leukemic/lymphoma effect of *Marrubium vulgare* (Belayachi *et al.*; 2013), we herein confirm and extend the anti-leukemic/lymphoma and apoptotic inducing effects of Mv-DF and indicate its cellular mechanism of action in Jurkat and Jeko-1 cells. For this purpose, a cytotoxic screening with *Marrubium vulgare* extracts and fractions was performed in Acute T cell leukemia and Mantle cell lymphoma cell lines, together with non tumoral control cells. In this context, only Mv-DF exhibited a dramatic effect on both Jurkat and Jeko-1 cells, but no effect was noted in NIH3T3 or TK-6 cells. Interestingly, both T-ALL and B-NHL are hematological malignancies characterized by a deregulated expression of apoptosis-related molecules (Li *et al.*, 2013). Cell cycle control is a major event in cellular division. Deregulation of the cell cycle has proven to be associated with numerous carcinogenic processes (Kamesaki; 1998) Analytical results indicate that Mv-DF has strongly promoted cell death by a dramatic time-dependent increase in the proportion of sub-G1 cells in both cell lines. In parallel with cellular death, we observed that the number of cells in S-phase was also reduced, indicating a block in cell cycle progression.

Next we performed flow cytometry analysis upon Annexin-V/propidium iodide staining to detect and quantify the amount of cells undergoing apoptosis (Hsu *et al.*, 2009). According with the data, the number of Jurkat and Jeko-1 cells entering early apoptosis increased in a time-dependent manner, demonstrating that Mv-DF treatment induces cell death through the promotion of apoptosis.

Since a fundamental requirement for the genetically regulated cell suicide to take place is the activation of caspases (Grumm; 2013), we determined if the enzymatic activity of caspase 3 and 7 was increased in Jurkat and Jeko-1 cells upon Mv-DF treatment. Mv-DF clearly induced, as expected, caspase activation to a similar extent as the conventional chemotherapeutic agent Doxorubicin and in correlation with this, the inhibition of caspases add a partial protection against Mv-DF-mediated cytotoxicity in Acute T-cell leukemia and Mantle cell lymphoma cells.

Generally, apoptosis can occur via two fundamental pathways: the mitochondrial pathway and the death receptor pathway (Desagher and Martinou; 2000). Western blot analysis confirmed that both executioner caspases 3 and 7 were cleaved and thus activated by Mv-DF treatment, in parallel with the results obtained in caspases activity assays in both Jurkat and Jeko-1 cells. In order to understand the involvement of mitochondrial apoptotic pathway in this process in both cell lines, we further investigated some molecular events related to the intrinsic pathway in Mv-DF-treated Jurkat and Jeko-1 cells. The intrinsic pathway of apoptosis is regulated by the Bcl-2 family proteins; anti-apoptotic (e.g. Bcl-2 and Mcl-1) inhibits apoptosis by sequestering pro-forms of caspases or by preventing the release of mitochondrial apoptogenic factors (Tsujimoto; 1998), Adams and Cory; 2007). In this study, Mv-DF treatments altered the expression of anti-apoptotic proteins Bcl-2 and Mcl-1 in Jurkat and Jeko-1 cells in a time-dependent manner.

An early biochemical event that accompanies apoptosis in many cell types is the proteolytic cleavage of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP), a nuclear enzyme involved in DNA repair; during apoptosis, nucleosomal DNA fragmentation and nuclear condensation are accompanied by a rapid and quantitative cleavage of PARP which is a downstream target of active caspase-3(Lazenbnik *et al.*, 1994). In our context, the cleavage of PARP was detected in the both Acute T cell leukemia and Mantle cell lymphoma cell lines, along with caspase-3 activation through Mv-DF treatment.

Because apoptosis can be mediated through multiple pathways that involve a complex array of biochemical regulators and molecular interactions, we analyzed the effect of a panel of selective inhibitors of stress and survival pathways in Jurkat and Jeko-1 cell lines. To study the effect of JNK, MAPK, Rho, p53 and JAK3 in Mv-DF induced apoptosis, we used the JNK inhibitor SP600125, the MEK inhibitor U0126, the Rho inhibitor H1152, the p53 inhibitor pifithrin α and the JAK3 inhibitor. As shown, none of these inhibitors protected T-ALL and B-NHL cells from apoptosis induced by Mv-DF.

We have previously studied the effect of *Marrubium vulgare* organic extracts in different human cancer cell lines including Glioblastoma, colon cancer, prostate cancer and osteosarcoma cells (Belayachi *et al.*; 2013). All these cell lines showed much lower sensitivity to Mv-DF than Jurkat and Jeko-1 cells, which strongly support Mv-DF selectivity. However, further detailed investigations of the mechanism of action in both cell lines are necessary in order to obtain definite conclusions.

In this investigation, six major bioactive ingredients were identified by GC-MS analysis: α -linoleic acid (12%), phytol (2, 45%), widdrol (12, 11%), palmitic acid (7, 2%), stigmasterol

(16, 34%) and β -sitosterol (20, 99%). Remarkably, when stigmasterol and β -sitosterol are combined, they are known to exert a cytotoxic activity against cancer cells (Lai *et al.*; 2010). Phytol exhibited high cytotoxicity on HeLa (human cervix carcinoma), WI-38 (human lung fibroblast) and HL-60 (human promyelocytic leukemia) cells (Black *et al.*; 2004), and widdrol inhibits the growth of HT29 cells via induction of G1 arrest (hyun *et al.*; 2010). β -sitosterol inhibits growth of HT-29 human colon cancer cells and human prostate cancer LNCaP cell line by activating the sphingomyelin cycle, exhibits good cytotoxicity against various cancer cells, including KB nasopharyngeal epidermoid carcinoma cells, MCF-7 breast cancer cells, CasKi cervical carcinoma cells, HCT 116 colon carcinoma cells and A549 cells, and also affects the amounts and activity of components of the extrinsic apoptotic pathway in human breast adenocarcinoma cells (Von Holtzet *al.*; 1998; Amada *et al.*; 2007; Malek *et al.*; 2009). These observations support the notion that the combination of several bioactive compounds in Mv-DF exerts its anticancer activity, and pave the way for further research efforts aimed at elucidating if any of the identified compounds could be mainly responsible for these effects.

5- Conclusions

Our results suggest that bioactive components of Mv-DF act either alone or together to promote cell death, predominantly acting via the mitochondrial pathway, with a powerful selectivity to leukemia/lymphoma cell lines. Further studies are required to i) understand the molecular basis of its antileukemic/lymphoma selectivity, ii) determine which of the identified bioactive compounds are responsible for these effects and iii) perform preclinical developmental research aimed at ensuring its safety and efficacy as therapeutic agents.

6- Figures and legends

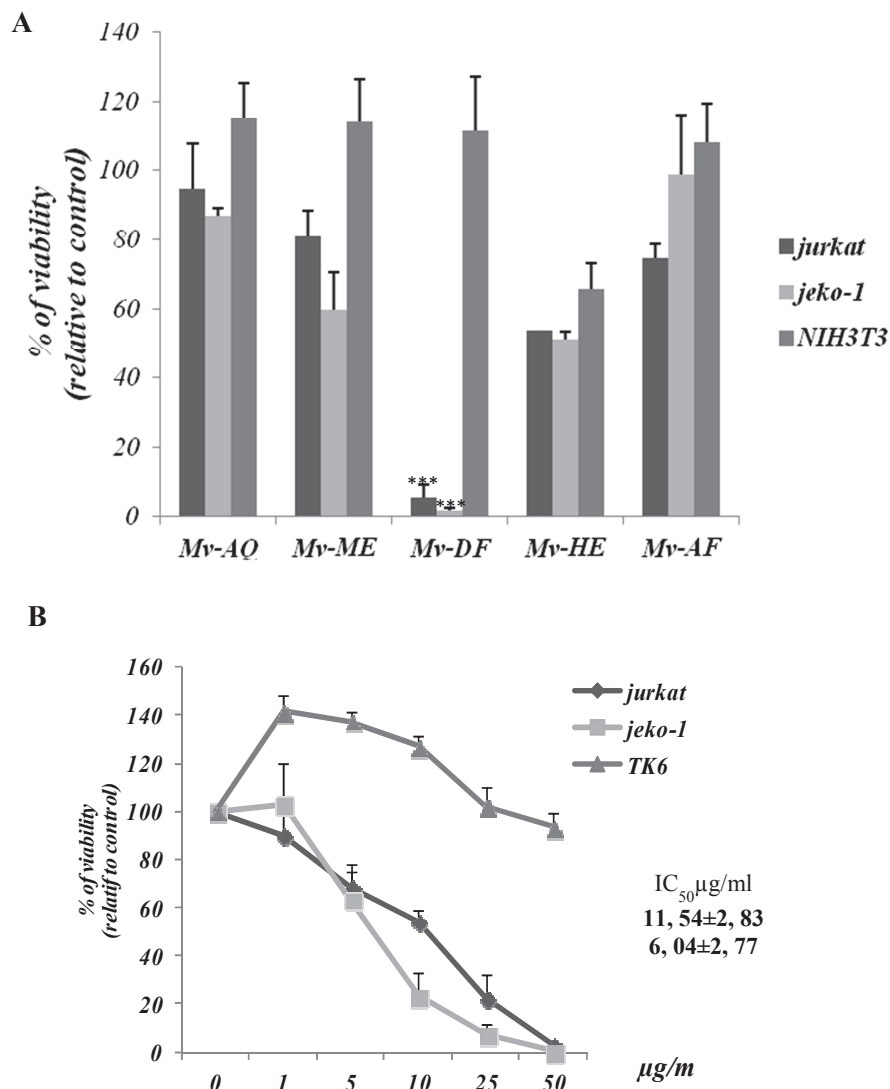


Figure 35: Cytotoxicity of Marrubium vulgare extracts and fractions against Jurkat and Jeko-1 cell lines. A) Cytotoxic activity of Marrubium vulgare aqueous and organic extracts in a panel of cancer and non-transformed cell lines. Jurkat, Jeko-1, and NIH3T3 cells were incubated for 48 h with 50 µg/ml of (Mv-DF). Results represent the mean ±SD of at least 3 independent experiments indicating the percentage of viable cells relative to vehicle-treated (control) cells. Statistically significant differences are indicated by * $p < 0.005$ compared with untreated cells. (B) Dose-response analysis of Marrubium vulgare dichloromethane extract (Mv-DF) and IC₅₀ determination on Jurkat and Jeko-1 cells. Cells were treated for 48h at different concentrations ranging from 1 to 50µg/ml; IC₅₀ value (µg/ml) was determined graphically from the viability curves, NIH3T3 and TK6 cells were used as control. Data are expressed as means ±SD of triplicate determinations.**

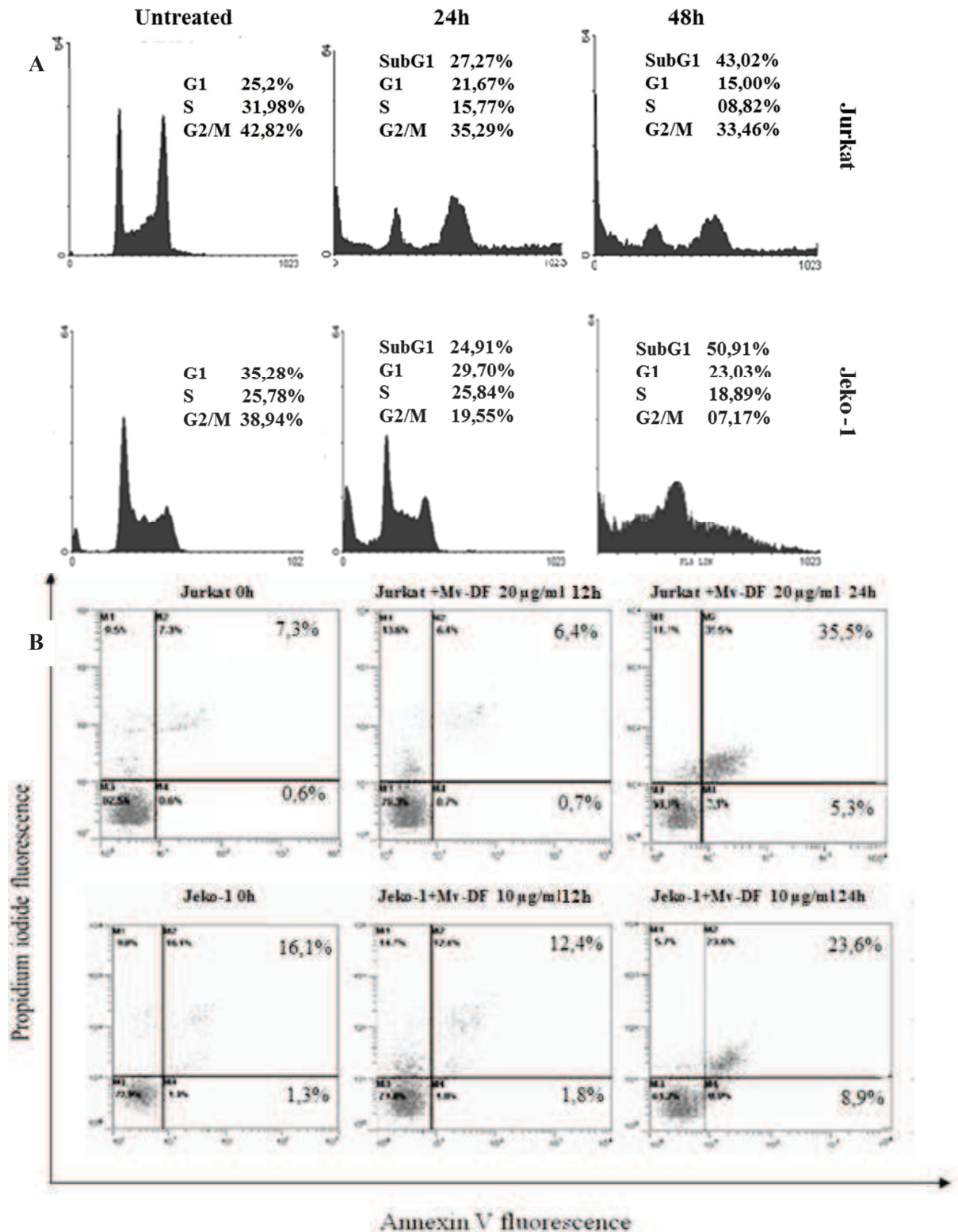
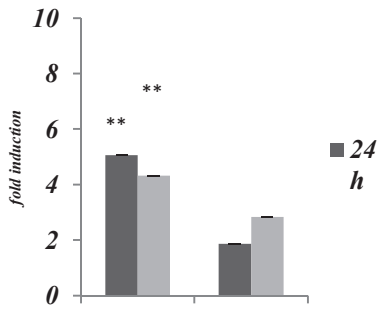


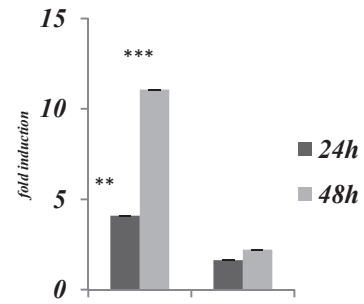
Figure 36: Analysis of Mv-DF cell cycle distribution and apoptosis induction in Jurkat and Jeko-1 cells. (A) Cell cycle analysis of Jurkat and Jeko-1 cells treated with Marrubium vulgare Extract (Mv-DF) by flow cytometry. Jurkat and Jeko-1 cells (4×10^5 cells/ml) were incubated with 20 µg/ml and 10 µg/ml of Mv-DF respectively for 24h and 48h. Cells were harvested and their DNA content analysed by flow cytometry as described in Materials and Methods. The cell cycle distribution is shown for each experimental condition. (B) Effect of

(Mv-DF) in Jurkat and Jeko-1 cell apoptosis analyzed by flow cytometry. Jurkat and Jeko-1 cells were treated with 20 $\mu\text{g/ml}$ and 10 $\mu\text{g/ml}$ of Mv-DF for 12h and 24h. The x-axis shows Annexin V-FITC staining and y-axis indicates Propidium iodide staining; Lower left (LL) quadrant: viable cells; lower right (LR) quadrant: early apoptotic cells; upper left (UL) quadrant: necrotic cells, upper right (UR) quadrant: late apoptotic cells.

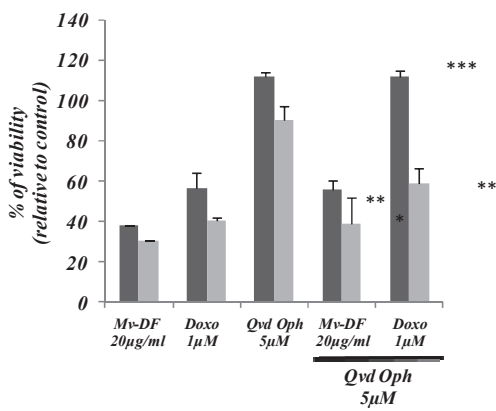
A



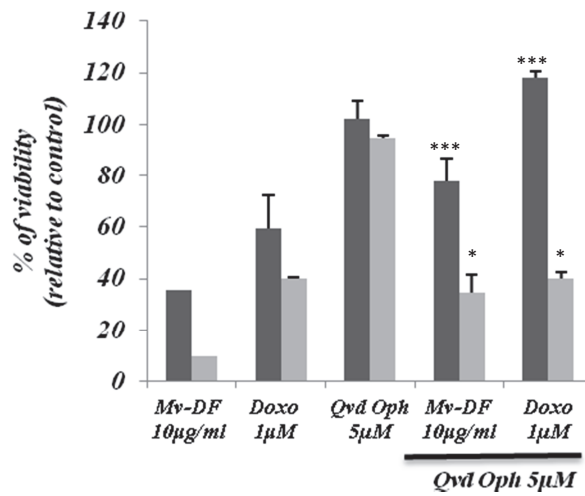
B



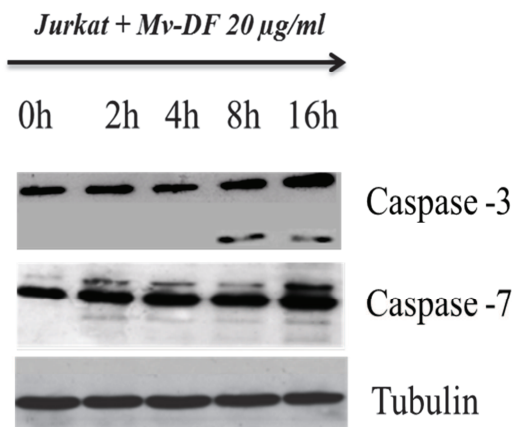
C



D



E



F

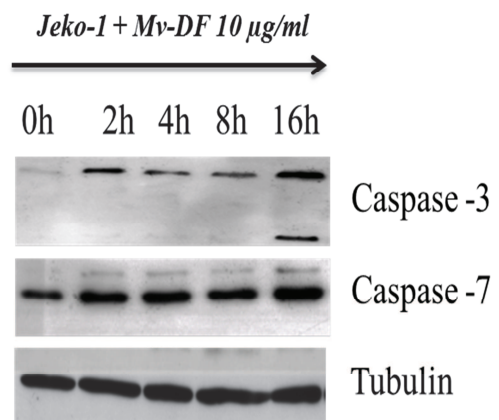


Figure 37: Effect of *Marrubium vulgare* on caspase activation and cleavage in Jurkat and Jeko-1 cells. (A) caspase activity was measured. (B) Jeko-1 cells were treated with Mv-Df 10 µg/ml or 1 µM Doxorubicin and the data obtained was represented as in Fig. 2 (A). Results

indicate the average fold increase \pm S.E.M in caspase activity relative to untreated cells from three independent determinations performed in duplicate. **Effect of Marrubium vulgare Extract (Mv-DF) on viability of Jurkat and Jeko-1 cells in the presence of caspase inhibitor.** Jurkat (C) and Jeko-1 (D) cells were pre-incubated for 1h with 5 μ M Q-VD-OPh and Mv-DF (20 μ g/ml or 10 μ g/ml) was added for 24 h. Doxorubicin was used as positive control. Cell viability is represented as a percentage relative to untreated cells, and data is means \pm S.E.M. from three independent determinations performed in duplicate. For A to D, statistically significant differences are indicated by *** $p < 0.005$, ** $p < 0.01$ and * $p < 0.05$ compared with untreated cells. **Effect on the expression and cleavage of caspases 3 and 7 in Jurkat and Jeko-1 cells.** 4×10^5 of Jurkat (E) and Jeko-1 (F) cells were treated with Mv-DF (20 μ g/ml or 10 μ g/ml) for the indicated times. Total and cleaved caspase levels in cellular extracts were detected by immunoblot with specific antibodies. Tubulin was used as an internal control.

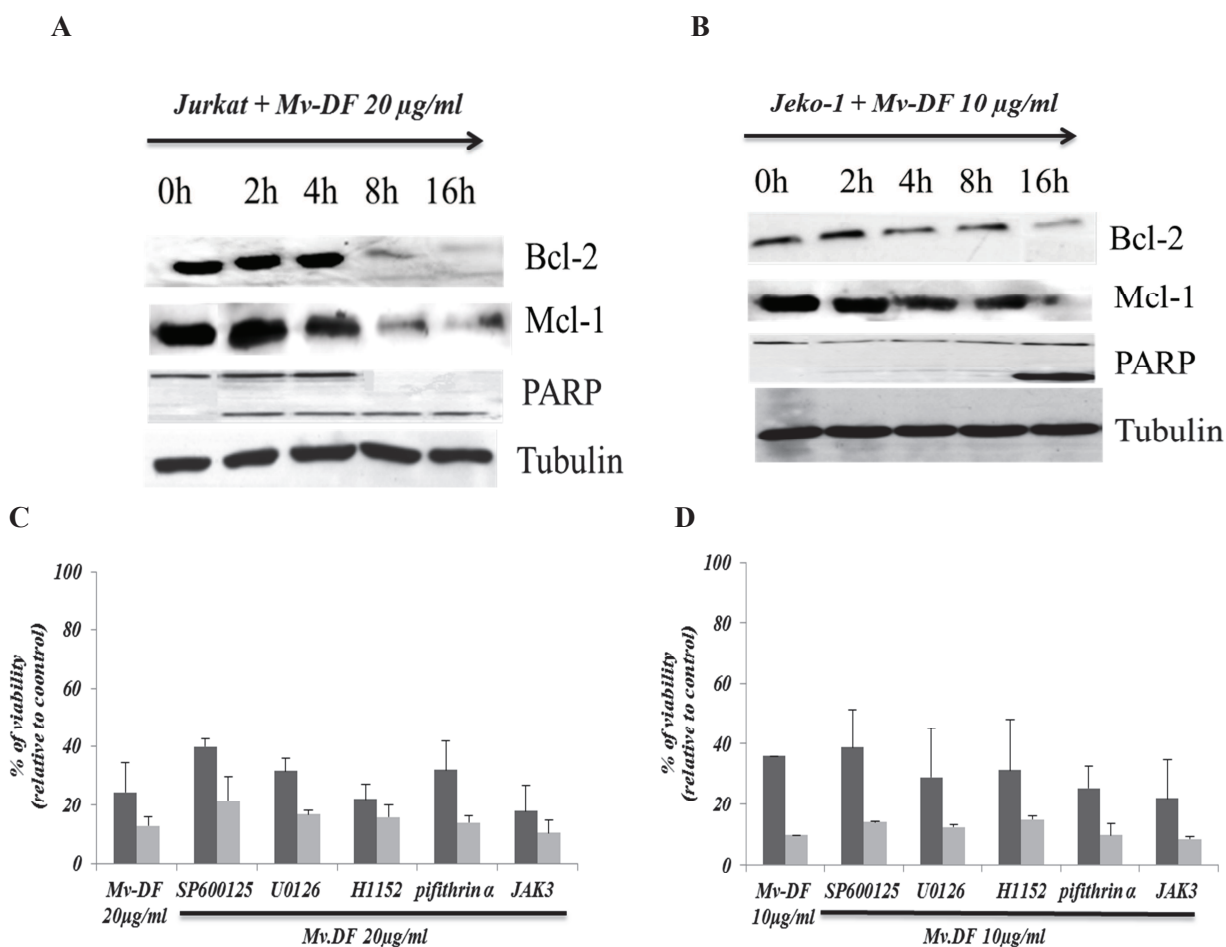
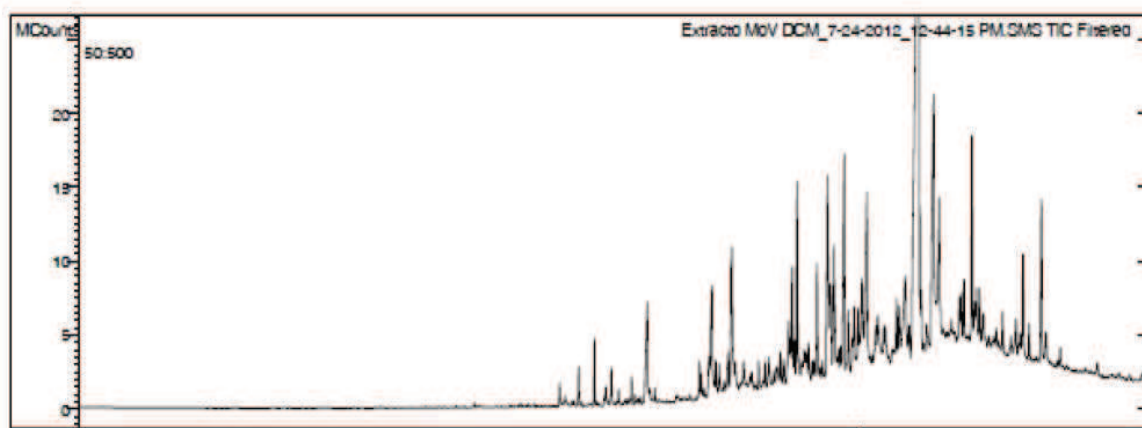


Figure 38: Characterization of the effects of the Mv-DF on apoptotic signaling mediators in Jurkat and Jeko-1 cells. (A) Effect of Mv-DF on the expression and cleavage of apoptosis related proteins in Jurkat and Jeko-1 cells. Expression of apoptotic proteins Bcl-2, Mcl-1 and PARP was analyzed in extracts of Jurkat (A) and Jeko-1 (B) cells treated as indicated by Immunoblot with specific antibodies. Tubulin was used as an internal control. **Effect of Mv-DF on the viability of Jurkat and Jeko-1 cells in presence of a panel of signaling pathways inhibitors.** Jurkat (C) and Jeko-1 (D) cells were untreated or treated respectively with 20 and 10 µg/ml of Mv-DF extract in the presence or absence of SP600125, U0126; H1152, Pifithrin or Jak3 inhibitor (all at 10 µM) for 24 and 48h . Inhibitors were pre-incubated for 1 hour before the addition of Mv-DF extract. Cell viability is represented as a percentage relative to untreated cells. Data is means ± S.E.M from three independent determinations performed in duplicate.

A



B

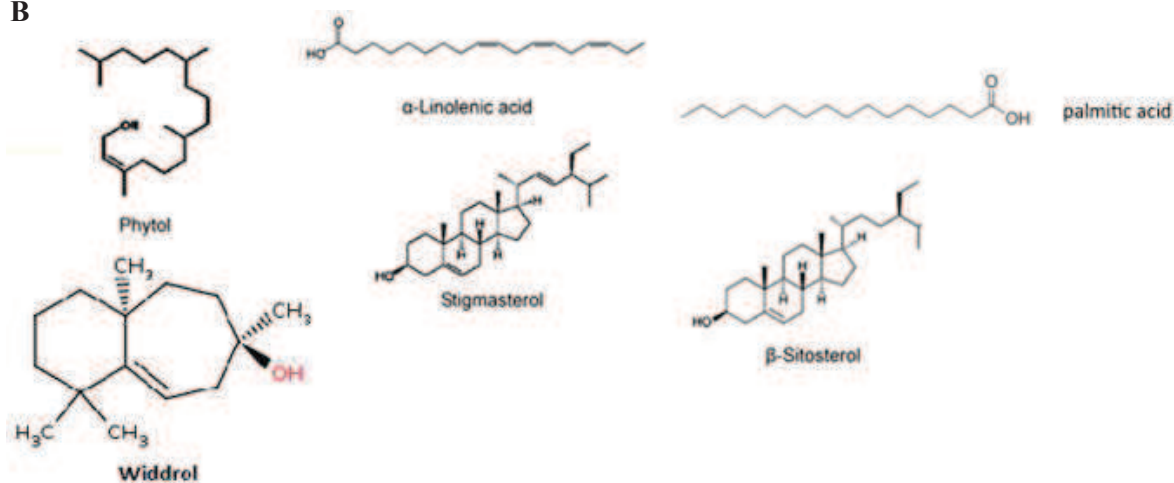


Figure 39: (A) Chromatogram of Marrubium vulgare Dichloromethane Fraction Extract obtained by CG. Compounds were identified by computer searches in the reference libraries of NIST and Wiley7, and fragmentation patterns were compared with literature Data. Mv-DF constituents are shown in Table 8. (B) Chemical structures of the major bioactive compounds of Marrubium vulgare Dichloromethane Fraction.

Table 7: Compounds present in dichloromethane fraction of *Marrubium vulgare* identified by CG/MS

RT	identified compound	cas numbers	% Area
15,96	trimethylsilyl trimethylsiloxy lactate	17596-96-2	0,15665796
16,462	Hexanoic acid, trimethylsilyl ester	14246-15-2	0,05221932
16,523	Trimethylsilyl trimethylsiloxyacetate	33581-77-0	0,26109661
21,019	1,3-Bis (trimethylsiloxy) acetone	17877-42-8	0,10443864
22,196	Octanoic acid, trimethylsilyl ester	55494-06-9	0,10443864
22,378	GLYCEROLtrimethylsilyl ester	6787-10-6	1,09660574
24,833	Nonanoic acid trimethylsilyl ester	82326-11-2	0,10443864
31,383	Benzoic acid,4-[(trimethylsilyl)oxy]-, trimethylsilyl ester	2078-13-9	0,15665796
31,962	Dodecanoic acid, trimethylsilyl ester	55520-95-1	0,05221932
34,439	Benzoic acid,3-methoxy-4-[(trimethylsilyl)oxy]-, trimethylsilyl ester	2078-15-1	2,50652742
35,082	Nonanedioic acid bis(trimethylsilyl) ester	17906-08-0	0,57441253
35,736	Benzoic acid, 3,4,5-trimethoxy-, trimethylsilyl ester	25432-43-3	2,24543081
36,165	Tetradecanoic acid trimethylsilyl ester	18603-17-3	0,26109661
37,139	Trimethylsilyl 3,5-dimethoxy-4-(trimethylsilyloxy) benzoate	10517-29-0	0,62663185
37,546	2-Propenoic acid, 3-[3-methoxy-4-[(trimethylsilyl)oxy]phenyl]-, trimethylsilyl ester	10517-09-6	0,20887728
37,987	3-[3-[(Trimethylsilyl)oxy]phenyl]propenoic acid trimethylsilyl ester	32342-01-1	0,10443864
40,024	Palmitic acid, trimethylsilyl ester	55520-89-3	7,20626632
40,872	2-Propenoic acid, 3-[3-methoxy-4-[(trimethylsilyl)oxy]phenyl]-, trimethylsilyl ester	10517-09-6	0,83550914
41,798	Heptadecanoic acid, trimethylsilyl ester	55517-58-3	0,36553525
42,268	PHYTOL	150-86-7	2,45430809
42,963	Linoleic acid trimethylsilyl	56259-07-5	4,75195822
43,085	alpha-Linolenic acid, trimethylsilyl ester	97844-13-8	7,57180157
43,532	Stearic acid trimethylsilyl ester	18748-91-9	2,50652742
46,775	Eicosanoic acid, trimethylsilyl ester	55530-70-6	0,78328982
47,748	Widdrol	6892-80-4	12,1148825
48,978	Hexadecanoic acid 2,3-bis[(trimethylsilyl)oxy]propyl ester	1188-74-5	4,96083551
49,78	Docosanoic acid trimethylsilyl ester	74367-36-5	3,23759791
51,777	Stearic acid 2,3-bis(trimethylsilyloxy)propyl ester	1188-75-6	6,99738903
57,642	Stigmasterol trimethylsilyl ether	14030-29-6	16,3446475
58,556	β -Sitosterol trimethylsilyl ether	2625-46-9	20,9921671

7- Competing interest

The authors declare that they have no competing interests.

8- Authors' contributions

LB performed all experiments and participated in the experimental design, analysis of the data and redaction of the manuscript. CAL participated in the experimental design, analysis of the data and preparation of the manuscript. The plants harvest, identification and extraction were done by NM and YB. SA participated in the analysis of the data and the preparation of the manuscript. SFM participated in the experimental design, data analysis and edited the manuscript. PV directed the research and edited the manuscript. All authors have contributed and approved the manuscript.

9- Acknowledgements

We are grateful to Dr. Rafael Núñez Gómez (Servicio de Instrumentación Científica, Estación Experimental del Zaidín CSIC, Granada, Spain), for the Gc-MS analysis of *Marrubium vulgare* dichloromethane fraction and to Dr. Ruth Villalonga, Mr. Guillem Ramis and Ms. Margalida Serra Sitjar (Cancer Cell Biology Group, Institut Universitari d'Investigació en Ciències de la Salut "IUNICS") for scientific and technical help.

Chapitre IV

Chapitre IV

Quatrième Article

Avant-propos

“Induction of cell cycle arrest and apoptosis by *Ormenis erirolepis* a Moroccan endemic plant in various human cancer cell lines” par Lamiae Belayachi, Clara Aceves-Luquero, Nawel Merghoub, Youssef Bakri, Silvia Fernández de Mattos, Saaïd Amzazi et Priam Villalonga.

Ormenis erirolepis Coss de la famille des Astéracées, est une plante appartenant à une sous-espèce endémique marocaine, traditionnellement appelée "Hellala" ou "Fergoga". Elle est généralement utilisée pour son effet hypoglycémiant, ainsi que pour le traitement de la douleur gastrique. Pour autant que nous sachions, aucune exploration scientifique de l'activité anti-tumorale d'*Ormenis erirolepis* n'était réalisée. De ce fait, nous avons décidé de tester les extraits et fractions organiques obtenus, sur un panel de lignées cancéreuses humaines d'origines différents, et cela dans le but de pouvoir élucider leurs mécanismes d'action, induisant l'arrêt de la croissance et la mort cellulaire. Pour cela, les extraits Oe-ME, Oe-DF, Oe-HE et Oe-AE ont été criblés sur les lignées : Jurkat, Jeko-1, TK-6, LN229, SW620, U2OS, PC-3 et NIH3T3. Les mesures de viabilité cellulaires, nous ont permis de calculer les valeurs d'IC₅₀ pour les extraits les plus prometteurs, notamment, Oe-DF et Oe-HE sur les lignées les plus sensibles. Remarquablement, les deux extraits n'exhibaient aucun effet cytotoxique sur les lignées contrôles NIH3T3 et TK-6. L'analyse de la distribution du cycle cellulaire et le taux d'expression de la p_{H2A.X} a montré qu'Oe-DF et Oe-HE induisaient une cassure des doubles brins d'ADN accompagnée par un arrêt du cycle en phase G1 chez les cellules : Jurkat, Jeko-1 et LN229, et en G2/M chez les cellules PC-3. Ces données sont en accord parfait avec l'augmentation de l'activité caspases observée après 48h du traitement. Des expériences supplémentaires avec des inhibiteurs sélectifs des voies (JNK, MAPK, Rho, p53, et JAK3) ont indiqué qu'aucune de ces voies n'est considérablement impliquée dans l'induction de l'apoptose promue par *Ormenis erirolepis*. L'analyse de composés bioactifs par CG-SM a indiqué que les principaux composés en Oe-DF étaient: l'acide linoléique (15,89%), Podophyllotoxine (17,89%) et la quercétine (22,95%). Pendant que les molécules majeures en Oe-HE sont: l'acide linoléique (9,76%), α -curcumène (7,07%), α -bisabolol (5,49%), Campesterol (4,41%), Stigmastérol (14,08%) et de β -sitostérol (7,49%).

Enfin, et à titre préliminaire, notre étude ouvre la voie à de nouvelles investigations pour élucider les mécanismes moléculaires possibles impliqués dans la mort des cellules

cancéreuses et l'arrêt du cycle cellulaire provoqués par *Ormenis eriolepis*, et aussi apporte un vrai soutien scientifique à l'utilisation des plantes médicinales marocaines par les guérisseurs traditionnels dans le traitement et chémoprévention du cancer.

Les aspects de ce travail, à savoir le design expérimental, les travaux de laboratoire, l'analyse des données, la conception des figures et la rédaction de l'article a été réalisée au sein d'une collaboration scientifique entre le Maroc et l'Espagne. Je suis spécialement reconnaissante au Programme de mobilité Averoès (Commission Européenne) pour la bourse de mobilité.

Cet article est soumis pour publication au journal «*International Journal of Medicinal Plants*»

Induction of cell cycle arrest and apoptosis by *Ormenis eriolepis* a Moroccan endemic plant in various human cancer cell lines

Abstract

Ormenis eriolepis Coss (Asteraceae) is an endemic Moroccan subspecies, traditionally named “Hellala” or “Fergoga”. It’s usually used for its hypoglycemic effect as well as for the treatment of stomacal pain. As far as we know, there is no scientific exploration of anti tumoral activity of *Ormenis eriolepis* extracts. In this regard, we performed a screening of organic extracts and fractions in a panel of both hematological and solid cancer cell lines, to evaluate the potential anti tumoral activity and to elucidate the respective mechanisms that may be responsible for growth arrest and cell death induction. The plant was extracted using organic solvents, and four different extracts were screened on Jurkat, Jeko-1, TK-6, LN229, SW620, U2OS, PC-3 and NIH3T3 cells. Cell viability assays revealed that, the IC₅₀ values were (11,63±5,37µg/ml) for Jurkat, (13,33±1,67µg/ml) for Jeko-1, (41,67±1,98µg/ml) for LN229 and (19,31±4,88µg/ml) for PC-3 cells upon treatment with Oe-DF and Oe-HE. Both the fraction and extract exhibited no effects on TK6 and NIH3T3 respectively. Cytometry analysis accompanied by p-H2A.X levels monitoring, showed that both the Dichloromethane Fraction and Hexanic extract induce DNA double stranded breaks (DSBs) accompanied by cell cycle arrest in G1 (Jurkat, Jeko-1 and LN22) and G2/M (PC-3) phases which is agreed with the caspase activity observed. Additional experiments with selective inhibitors of stress and survival pathways (JNK, MAPK, Rho, p53, and JAK3) indicated that none of these pathways was significantly involved in apoptosis induction. The bioactive compound analysis by CG/MS indicated that the major compounds in Oe-DF were: Linoleic Acid (15,89%), Podophyllotoxin (17,89%) and Quercetin (22,95%). For Oe-HE the major molecules were: Linoleic Acid (9,76%), α -curcumene (7,07%), α -bisabolol (5,49%), Campesterol (4,41%), Stigmasterol (14,08%) and β -sitosterol (7,49%).

Key words: *Ormenis eriolepis* Coss, cancer cell lines, cytotoxicity, apoptosis, bioactive compounds.

Induction of cell cycle arrest and apoptosis by Ormenis eriolepis a Moroccan endemic plant in various human cancer cell lines

Lamiae Belayachi^{a,c}, Clara Aceves-Luquero^a, Nawel Merghoub^c, Youssef Bakri^c, Silvia Fernández de Mattos^{a,b}, Saaïd Amzazi^c, Priam Villalonga^{a,b*}

^a *Cancer Cell Biology Group, Institut Universitari d'Investigació en Ciències de la Salut (IUNICS),* ^b *Departament de Biologia Fonamental, Universitat de les Illes Balears, Illes Balears, Spain, and* ^c *Biochemistry-Immunology Laboratory, Faculty of Sciences, Mohammed V-Agdal University, Rabat, Morocco.*

**Corresponding author. Priam Villalonga. Mailing address: Institut Universitari d'Investigació en Ciències de la Salut (IUNICS), Edifici Científicotècnic, Ctra. Valldemossa Km 7,5, Illes Balears, Spain. Phone: +34 971 259961 Fax: +34 971 259501*

E-mail: priam.villalonga@uib.es

Abstract

Ormenis eriolepis Coss (Asteraceae) is an endemic Moroccan subspecies, traditionally named “Hellala” or “Fergoga”. It’s usually used for its hypoglycemic effect as well as for the treatment of stomacal pain. As far as we know, there is no scientific exploration of anti tumoral activity of *Ormenis eriolepis* extracts. In this regard, we performed a screening of organic extracts and fractions in a panel of both hematological and solid cancer cell lines, to evaluate the potential anti tumoral activity and to elucidate the respective mechanisms that may be responsible for growth arrest and cell death induction. The plant was extracted using organic solvents, and four different extracts were screened on Jurkat, Jeko-1, TK-6, LN229, SW620, U2OS, PC-3 and NIH3T3 cells. Cell viability assays revealed that, the IC₅₀ values were (11,63±5,37µg/ml) for Jurkat, (13,33±1,67µg/ml) for Jeko-1, (41,67±1,98µg/ml) for LN229 and (19,31±4,88µg/ml) for PC-3 cells upon treatment with Oe-DF and Oe-HE. Both the fraction and extract exhibited no effects on TK6 and NIH3T3 respectively. Cytometry analysis accompanied by p-H2A.X levels monitoring, showed that both the Dichloromethane Fraction and Hexanic extract induce DNA double stranded breaks (DSBs) accompanied by cell cycle arrest in G1 (Jurkat, Jeko-1 and LN22) and G2/M (PC-3) phases which is agreed with the caspase activity observed. Additional experiments with selective inhibitors of stress and survival pathways (JNK, MAPK, Rho, p53, and JAK3) indicated that none of these pathways was significantly involved in apoptosis induction. The bioactive compound analysis by CG/MS indicated that the major compounds in Oe-DF were: Linoleic Acid (15,89%), Podophyllotoxin (17,89%) and Quercetin (22,95%). For Oe-HE the major molecules were: Linoleic Acid (9,76%), α -curcumene (7,07%), α -bisabolol (5,49%), Campesterol (4,41%), Stigmasterol (14,08%) and β -sitosterol (7,49%).

Key words: *Ormenis eriolepis* Coss, cancer cell lines, cytotoxicity, apoptosis, bioactive compounds.

1- Introduction

Plants have been used for medicinal purposes since time immemorial. In recent years there is strong current interest in discovering new edible natural products with medicinal properties. It has been estimated by WHO (World Health Organization) (2002) that about 90% of the world's population from developing countries rely mainly on traditional medicines (mostly derived from plants) for their primary health care. In Morocco, the use of traditional medicine is widespread practice, the use of plants in the form of infusions or decoctions is a common practice among people of rural communities and their use is increasing in urban populations. (Gonzalez-Tejero *et al.*, 2008). The ethnobotanical and ethnopharmacological surveys conducted in different areas allowed the compilation of an inventory of 360 species and more than 500 prescriptions are recorded (Bellakhdar, 1997).

The genus *Ormenis* which includes *Ormenis eriolepis* Coss (Asteraceae) an endemic Moroccan subspecies, traditionally named "Hellala" or "Fergoga". It's usually used for its hypoglycemic effect as well as for the treatment of stomacal pain. Traditionally the inflorescences of this plant are mixed with honey and used for the treatment of the cardialgia ulcer and stomacal pain.

The ability of chemotherapeutic agents to induce apoptosis in tumor cells has become a therapeutic approach which may be enhanced by the development of novel approaches during treatment (Gibb *et al.*, 1997). Evidence from various studies suggests that metabolites derived from plants may possess pro-apoptotic properties and have great potential for possible applications in cancer prevention (Moongkarndi *et al.*, 2004; Kwon *et al.*, 2006; Prasanna *et al.*, 2009; Radhika *et al.*, 2010; Choedon *et al.*, 2010).

Apoptosis is characterized by particular morphological changes, including plasma membrane bleb, cell shrinkage, depolarization of mitochondria, chromatin condensation, DNA fragmentation and cell cycle arrest that can be triggered by damage on DNA (Ben-Porath and Weinberg, 2005; Maruyama *et al.*, 2009).

The γ -H2AX has been considered the main signaling protein involved in the response to DNA damage playing an important role in DNA repair (Yuan *et al.*, 2010).

The relationship between apoptosis and cell cycle arrest has been a recent focus. Apoptosis provides a number of useful clues when generating effective therapies and many chemotherapeutic agents exert their anticancer effects by inducing apoptosis and/or cell cycle arrest in cancer cells (Schuchmann and Galle, 2004).

As far as we know, there is no scientific exploration of anti tumoral activity of *Ormenis eriolepis* extracts. In this regard, the purpose of this study was the screening of organic extracts and fractions in a panel of both hematological and solid cancer cell lines, to evaluate the potential anti tumoral activity and to elucidate the respective mechanisms that may be responsible for growth arrest and cell death induction. Finally, we suggest potential bioactives compounds responsible for these effects upon determination of chemical composition of both Dichloromethane Fraction and Hexanic Extract by GC/MS.

2- Materials and methods

2-1 Plant material

The aerial parts of *Ormenis eriolepis* Coss. (Asteraceae) were collected in 2009 from Ouarzazat (Morocco). The plant was identified at the Scientific Institute of Rabat by Prof. M. Fennane, and the specimen was deposited in the Scientific Institute herbarium under the voucher specimen reference N° RAB.

2-2 Preparation of Extracts

The collected parts were air-dried and mechanically ground to produce a fine powder. 120g of plant powder was successively extracted using a Soxhlet apparatus with n-hexane (1.3L) and methanol (1.3L) to obtain hexanic extract (Oe-HE 3,91g) and methanolic extract (Oe-ME 10,94g) the resulting extracts were then evaporated by a Rotavapor to give dried extracts. The methanol concentrated extract was dissolved in distilled water and was successively extracted with dichloromethane (1.3L) and ethyl acetate (1.3L) to obtain dichloromethane fraction (Oe-DF 3,28g) and ethyl acetate fraction (Oe-AF 3,16g). All extracts were evaporated by a Rotavapor and kept at -20°C until use.

2-3 Cell culture

Jurkat, Jeko-1 and TK6 cells were maintained in RPMI-1640 with L-Glutamine and HEPES (Biological Industries Ltd., Kibbutz Beit Haemek, Israel). LN229, SW620, U2OS, PC-3 and NIH3T3 cells were maintained in DMEM High Glucose (4.5 g/l) with L-glutamine (Invitrogen, Carlsbad, CA). All cells were grown in a humidified incubator at 37°C with 5% CO₂. RPMI and DMEM were supplemented with 10% heat inactivated foetal bovine serum and 100 units/ml penicillin/streptomycin (Biological Industries Ltd., Kibbutz Beit Haemek, Israel). All cell lines were subconfluent grown and passaged, routinely tested for

mycoplasma contamination and subjected to frequent morphological tests and growth curve analysis as quality-control assessments. All cell lines were treated at a prophylactic concentration of 5 µg/ml Plasmocin™ (InvivoGen, San Diego, CA).

2-4 Drugs and inhibitors

SP600125, U0126, H1152, Pifithrin α and JAK3 inhibitor I (Calbiochem, Darmstadt, Germany) were added directly to the media at the indicated concentration and cells were harvested or analyzed at the time points indicated in the figure legends.

2-5 Cell viability assays

The number of viable cells in culture was determined based on quantification of ATP, which signals the presence of metabolically-active cells, using the Cell Titer-Glo luminiscent assay kit (Promega, Madison, WI, USA). Following the manufacturer's instructions, the cells were plated in 96-well plates, treated 24 h later with extracts dissolved in DMSO for the indicated times and concentrations, followed by addition of Cell Titer-Glo reagent. Luminiscence was detected using a multi-well Synergy Mx scanning spectrophotometer (Biotek, Winooski, VT).

2-6 Cell cycle analysis

Cell cycle analysis was performed using propidium iodide staining. Briefly, cells were washed in phosphate-buffered saline (PBS) and fixed in 70% ethanol. Fixed cells were then washed twice in PBS and stained in propidium iodide (50 µg/ml) in the presence of 50 µg/ml RNase A (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), then analysed by flow cytometry using a FACScan (Coulter Epics XL-MSL; Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) and winMDI software.

2-7 Annexin V-FITC/propidium iodide flow cytometric analysis

Analysis of phosphatidylserine externalization in apoptotic cells was determined by an ApoTarget Annexin-V-FITC Apoptosis kit (Invitrogen), according to the manufacturer's instructions. 2×10^5 cells were seeded in 6-well plates and treated with 50µg/ml of Mv-DF for 48h. They were then collected and suspended in 100µl of Annexin V-binding buffer. 5µL of Annexin-V-FITC and 10µL of propidium iodide were added and incubated 15 min at room temperature in the dark. Flow cytometry analysis was carried out using a FACScan (Coulter Epics XL-MSL; Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) and winMDI software.

2-8 Caspase activity analysis

Enzymatic activity of caspases was determined by measurement of caspases-3 and 7 activity by means of the luminometric Caspase-Glo 3/7 assay (Promega) according to the manufacturer's protocol using a Synergy HT multi-detection microplate reader (Bio-Tek, Winooski, VT, USA).

2-9 Gel electrophoresis and immunoblotting

Cells were harvested in a buffer containing 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA and 1% (v/v) Triton X-100 plus protease and phosphatase inhibitors. Protein content was measured by the Bradford procedure. Cell lysates were electrophoresed in SDS-polyacrylamide gels. After electrophoresis the proteins were transferred to Immobilon-P strips (Millipore, Billerica, MA) for 2 h at 60 V. The sheets were pre-incubated in TBS (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl), 0.05% Tween 20 and 5% defatted milk powder for 1 h at room temperature and then incubated for 1 h at room temperature in TBS, 0.05% Tween 20, 1% BSA and 0.5% defatted milk powder containing the appropriate antibodies: pH2A.X (#9718, 1:1000) and β -tubulin (T0198, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, 1:4000). After washing in TBS, 0.05% Tween 20, the sheets were incubated with a peroxidase-coupled secondary antibody (Dako, Glostrup, Denmark, 1/2000 dilution,) for 1 h at room temperature. After incubation, the sheets were washed twice in TBS, 0.05% Tween 20 and once in TBS. The peroxidase reaction was visualized by the enhanced chemiluminescence detection system (Millipore, Billerica, MA).

2-10 Derivatizations for GC/MS analysis

For this purpose 100 μ l of the extracts were dried with N₂ gas, then 100 μ l of derivatization agent (N, O-bis (trimethylsilyl) trifluoroacetamide with 1% of trimethylchlorosilane) was added, mixed and heated 10 minutes at 60°C.

2-11 Gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) analysis

The GC-MS analyses of *Ormenis erirolepis* Dichloromethane Fraction (Oe-DF) and Hexanic Extract (Oe-HE) were carried out at the Instrumental Technical Services of the "Estación Experimental del Zaidín" (CSIC, Granada, Spain). Briefly, 1 μ l of the derivative solution was injected in a Varian 450GC coupled to 240 Ion Trap Mass Spectrometer as detector. The injection conditions were: splitless mode with 1 minute duration pulse, the injector

temperature was 250°C; the He column flow was 1 ml/minute in a capillary column (Varian Factor Four VF-5 ms 30mx0.25mmx0.25 μm). For Mass spectrometry conditions, the EI ionization was 70 eV, the transfer line was at 280°C and the Trap at 240°C, mass range acquisition was from m/z 50 to m/z 500 and cared in Full Scan mode. Qualitative analysis of compounds was based on the comparison of their spectral mass and their relative Retention time with those of NIST08 mass spectra database and Kovats RI on the chromatograms recorded in Full Scan or in SIM mode using the characteristics ions. Quantitative analysis was realized by integration of peaks and calculated as percent of total identified area on the TIC chromatograms.

2-12 Statistical Analysis

Data are presented as means ± SD of at least three different assays performed in triplicate. IC₅₀ value and the statistical significance of differences by Student's *t* test were assessed using GraphPad Prism (GraphPad Software Inc. La Jolla, CA). Statistically significant differences are indicated by ***P <0.001, **P <0.01 and *P <0.05, respectively.

3- Results

3-1 Analysis of the cytotoxic activity of Ormenis eriolepis organic extracts against human cancer cell lines.

To investigate the potential effect of *Ormenis eriolepis* organic extracts against cancer, various hematological and solid cancer cell lines of different origin were screened. Non transformed cell lines TK-6 and NIH3T3 were also tested as control. Interestingly, both the dichloromethane fraction (Oe-DF) and the hexanic extract (Oe-HE) had exhibits respectively a dramatic effect against Jurkat and Jeko-1 (figure 40A) and LN229 and PC-3 (figure 40B) cells, both extracts had no effect against normal cell lines TK-6 and NIH3T3.

In order to calculate the IC₅₀, we next performed a dose-response (0-50 μg/ml) viability assay using TK-6 as control for Jurkat and Jeko-1 and NIH3T3 for LN229 and PC-3 cells. The obtained cell growth curves in Figure 41A and 41B prove that Oe-DF and Oe-HE exerts a specific dose dependant inhibitory effect on cell proliferation. The IC₅₀ values were (11,63±5,37 μg/ml) for Jurkat, (13,33±1,67 μg/ml) for Jeko-1, (41,67±1,98 μg/ml) for LN229 and (19,31±4,88 μg/ml) for PC-3 cells upon treatment with Oe-DF and Oe-HE. Both the fraction and extract exhibited no effects on TK6 and NIH3T3 respectively. Doses of 20 μg/ml

and 50 µg/ml were chosen for further mechanistic studies in (Jurkat; jeko-1) and (LN229; PC-3) cells.

3-2 Analysis of cell cycle effect of *Ormenis eriolepis* organic extracts.

In order to investigate how cell cycle distribution is affected, (jurkat ; Jeko-1) were treated with a concentration of 20 µg/ml of Oe-DF and (LN229 ; PC-3) with 50µg/ml of Oe-HE for 24 and 48h. As shown in figure 42 Oe-DF have effectively reduced the proportion of S-phase cells while strongly increased the proportion of Sub G1 cells (35,62% for jurkat and 64,75% for jeko-1 at 48h). Whereas Oe-HE in LN229 cells mainly exerts a combination of G1 arrest and sub- G1 increase at 24h, with this latter population further increasing at 48h up to 42%. In PC-3 cells Oe-HE induced a clear G2/M arrest which was already detectable at 24h leading at 48h to a G2/M cell population of 44.11%.

Next, we analyzed the presence of DNA damage by monitoring p-H2A.X levels to investigate the possible molecular mechanism of *Ormenis eriolepis*. As shown in Figure 42, increased levels of p-H2A.X were detected in Oe-DF treated cells (jurkat and jeko-1) as well as in Oe-HE treated cells (LN229 and PC-3) after 6h to 12h of treatment. Which suggest that both the Dichloromethane Fraction and Hexanic extract induce DNA double stranded breaks (DSBs) accompanied by cell cycle arrest in G1 (Jurkat, Jeko-1 and LN22) and G2/M (PC-3) phases.

3-3 Effect of *Ormenis eriolepis* organic extracts on apoptosis induction and caspases activation.

Double Annexin V/Propidium Iodide staining was performed to analyze and quantify cellular death. Upon exposure to treatment, an increase in the number of Annexin V positive cells was observed for both Oe-DF and Oe-HE as shown in Figure 43. For Jurkat and Jeko-1 cells, a percentage of (11% and 27,9%) was observed at 12h of Oe-DF exposure. where LN229 and PC-3 cells have shown an increase of apoptotic cell population of (24% and 20,4%) as well after 12h of treatment.

Different caspases are activated as a crucial biochemical event during apoptosis. To investigate if *Ormenis eriolepis* induced apoptosis in Jurkat, Jeko-1, LN229 and PC-3 cell lines is caspases dependent, we performed caspase 3/7 activity assays upon treatment of (Jurkat and Jeko-1) cells with 20µg/ml of Oe-DF and (LN229 and PC-3) cells with 50µg/ml of Oe-HE for 48h. Figure 45 prove that both treatments increased caspase activity to 8 and 14 fold up in jurkat and jeko-1 cells, while Oe-HE increased similarly the caspase activity to 4

fold up in both LN229 and PC-3 cells upon 48h of exposure. Accordingly, this data may suggest that *Ormenis eriolepis* induced cell death may include caspases activation.

3-4 Effect of Ormenis eriolepis organic extracts on stress and survival cell pathways.

As a preliminary investigation of the molecular mechanism of *Ormenis eriolepis* induced apoptosis, we analyzed additional experiments with a panel of selective inhibitors of stress and survival pathways (SP600125, U0126, H1152, Pifithrin α and JAK3) performed in (Jurkat and Jeko-1) (figure 46A) and (LN229 and PC-3) (Figure 46B) cells upon Oe-DF and Oe-HE treatments at 48h. The results showed that none of these pathways was significantly involved in *Ormenis eriolepis* induced cell death and that neither JNK, ERK1/2, Rho, p53 nor JAK3 pathways seems involved. Taken together, this results shows that more molecular investigation is needed to figure out the apoptotic signaling regulators responsible of *Ormenis eriolepis* anti tumoral effect in Jurkat, Jeko-1, LN229 and PC-3 cell lines.

3-5 Characterization of chemical compounds in Ormenis eriolepis Dichloromethane Fraction and Hexane Extract.

In order to recognize the bioactive compounds responsible for these effects, Oe-DF and Oe-HE were subjected to GC-MS analysis and compounds were identified using mass spectrometry (Figure 47A and 47B). Retention time, Cas Numbers and % of identified area are summarized in Table 8 and 9. The mass spectra compounds were matched with computer searches in the references libraries of NIST08 and Wiley 7, and fragmentation patterns were compared with literature and commercially available products data. The major bioactive compounds identified in Oe-DF (Figure 48A) were: Linoleic Acid (15,89%), Podophyllotoxin (17,89%) and Quercetin (22,95%). In Oe-HE (Figure 48B) the major molecules were: Linoleic Acid (9,76%), α -curcumene (7,07%), α -bisabolol (5,49%), Campesterol (4,41%), Stigmasterol (14,08%) and β -sitosterol (7,49%).

4- Discussion

After the rapid expansion of the use of monoclonal antibodies and various synthetic inhibitors directed against matrix metalloproteases or protein kinases, natural products are regaining attention in the oncology field. Due to their wide range of biological activities and low toxicity in animal models, natural products have been used as alternative treatments for cancers (Newman and Cragg 2012). Several drugs currently used in chemotherapy were

isolated from plant species. The best known are the Vinca alkaloids, vinblastine and vincristine, isolated from *Catharanthus roseus*, etoposide and teniposide, which are semi-synthetic derivatives of the natural product epipodophyllotoxin, Paclitaxel isolated from the bark of *Taxus brevifolia*, the semi-synthetic derivatives of camptothecin, irinotecan and topotecan, isolated from *Camptotheca acuminata*, among several others (Cragg *et al.*, 1993)

All Cancer cells are characterized by unregulated growth, as well as insufficient and inappropriate vascular supply (Tomida and Tsuruo, 1999).

T-cell lymphoblastic leukemia (Jurkat), Mantle cell lymphoma (Jeko-1), Glioblastoma multiforme (LN229) and Prostate Cancer (PC-3) are cell lines models for aggressive neoplastic disorders; they are known to have alteration in multiple cellular pathways including apoptosis. Deficiencies in this last, contribute to carcinogenesis by creating a permissive environment for genetic instability and accumulation of gene mutations conferring resistance to cytotoxic anticancer drugs and radiation (Green *et al.*; 1995).

Ormenis eriolepis Coss (Asteraceae) an endemic Moroccan subspecies, traditionally named “Hellala” or “Fergoga” used for its hypoglycemic effect as well as for the treatment of stomachal pain. As far as we know, there is no scientific exploration of the anti-tumor capacity of *Ormenis eriolepis* extracts. In this study, we present the first evidence of tumor cell growth inhibitory activity of Oe-DF and Oe-HE by using in vitro experimental models. We show that both organic extract decreased specifically the viability of Jurkat, Jeko-1, LN229 and PC-3 cell lines in a dose specific manner, while it did not affect non-transformed human lymphocyte and mice fibroblasts TK-6 and NIH3T3.

Disturbance of the cancer cell cycle is one of the therapeutic targets for development of new anticancer drugs (Carnero; 2002). Analytical results indicate that Oe-DF have effectively reduced the proportion of S-phase cells while strongly increased the proportion of Sub G1 cells. Whereas Oe-HE in LN229 cells mainly exerts a combination of G1 arrest and sub- G1 increase at 24h, with this latter population further increasing at 48h up. In PC-3 cells Oe-HE induced a clear G2/M arrest which was already detectable at 24h. Therefore, a mechanism inducing cell cycle arrest and senescence can be triggered by damage on DNA (Ben-Porath and Weinberg, 2005; Maruyama *et al.*, 2009). The occurrence of phosphorylation on histone H2AX, namely γ -H2AX, has been widely used as a sensitive marker of DNA damage. Both Oe-DF and Oe-HE increased γ -H2AX levels after 6h to 12h of treatment. Clearly, more specific studies are needed to investigate how Oe-DF and Oe-HE affect key proteins involved in cell cycle control in the four sensitive cell lines, namely P53, P16, P21, Cyclin dependant

kinase and cyclins. Therefore, these findings point to the cycle arrest is being caused by a sophisticated mechanism in which the actions are initiated by DNA double stranded breaks.

The process of programmed cell death, or apoptosis is an important homeostatic mechanism that balances cell division and cell death to maintain appropriate cell number in tissues (Elmore ; 2007). Flow cytometry analysis upon Annexin-V/propidium iodide staining detects and quantifies the amount of cells undergoing apoptosis. Upon exposure to treatment, an increase in the number of Annexin V positive cells was observed for both Oe-DF and Oe-HE in Jurkat and Jeko-1 cells, LN229 and PC-3 cells respectively in a time-dependent manner, demonstrating that *Ormenis eriolepis* induces cell death through the promotion of apoptosis.

Apoptosis signal transduction and execution require the coordinated action of the cascade of caspases (aspartate-specific cysteine proteases). Caspases are expressed as inactive proenzymes and become activated by proteolytic processing at internal aspartate residues when cells receive an apoptosis-inducing signal. At present 14 mammalian caspase family members have been described. Some, including caspases-2, -8, -9 and -10 are initiators of cell death (contain large prodomains). Once activated, these initiator caspases in turn activate the executioner caspases such as caspases-3, -6 and -7 (carry small prodomains). Thus, caspases can activate each other (Takahashi, 1999). For this purpose, we determined if the enzymatic activity of caspase 3 and 7 was increased in Jurkat and Jeko-1 under Oe-DF treatment, as well as LN229 and PC-3 under Oe-HE. Data shows, that both treatments increased caspase activity upon 48h of exposure. Which may suggest that *Ormenis eriolepis* induced cell death may include caspases activation.

Apoptosis can be mediated by several pathways that may involve complex molecular interactions and biochemical regulators. As a very preliminary investigation, we analyzed the effect of a panel of stress and survival pathways inhibitors in Jurkat, Jeko-1, LN229 and PC-3 cell lines under their respective *Ormenis eriolepis* treatment. For this regard, JNK inhibitor SP600125, the MEK inhibitor U0126, the Rho inhibitor H1152, the p53 inhibitor pifithrin α and the JAK3 inhibitor were used. As shown, none of these inhibitors protected the studied cell lines from *Ormenis eriolepis* induced cell death. However, further detailed investigations are needed to elucidate the mechanism of action in Jurkat, Jeko-1, LN229 and PC-3 cells in order to obtain definite conclusions.

In this study, GC-MS analysis was conducted on both Oe-DF and Oe-HE in order to recognize the bioactive compounds responsible for these effects. The major bioactive compounds identified in Oe-DF were: Linoleic Acid (15,89%), Podophyllotoxin (17,89%) and Quercetin (22,95%). In Oe-HE the major molecules were: Linoleic Acid (9,76%), α -

curcumene (7,07%), α -bisabolol (5,49%), Campesterol (4,41%), Stigmasterol (14,08%) and β -sitosterol (7,49%).

Remarkably, all these identified compounds are known for their cytotoxic activity against cancer cells. Podophyllotoxin, it is effective in the treatment of Wilms tumours, different types of genital tumors (carcinoma verrucosus, for example) and in non-Hodgkin and other lymphomas (Ayres and Loike, 1990) and lung cancer (Utsugi et al., 1996; Subrahmanyam et al., 1998). Three semisynthetic derivatives of podophyllotoxin, etoposide, teniposide and etopophos, were widely used as anticancer drugs and show good clinical effects against several types of neoplasms including testicular and small-cell lung cancers, lymphoma, leukaemia, Kaposi's sarcoma, etc (Ayres and Loike, 1990; Schacter, 1996). Numerous studies have described the cancer preventive effects and molecular mechanisms of quercetin, which has been shown to one of the major flavonoids with antiproliferative efficacy on a wide range of cancer cells (Boyer et al., 2004; Kang and Liang, 1997; Suh et al., 2010). For example, quercetin was shown to inhibit the growth of acute lymphoid and myeloid leukemia cells (Kang and Liang, 1997). It was also reported to have growth-inhibitory effects on human gastric and colon cancer cells by inhibiting cell cycle progression at the G1-S boundary (Suh et al., 2010). These diverse antitumor activities of quercetin make it a lead compound for the development of new effective cancer preventive or therapeutic agents. α -bisabolol is a small oily sesquiterpene alcohol that has been demonstrated to have activity against some malignant adherent human and rat cell lines and against spontaneous mammary tumors in HER-2 transgenic mice as well as in HepG2 and Glioma cells (Cavalieri *et al.*, 2004; Costarelli *et al.* 2010;. Darra *et al.*; 2008; Chen *et al.*; 2010). Campesterol, β -sitosterol and stigmasterol displayed remarkable cytotoxic activity against A549 cells. These in vitro data support findings that a mixture consisting of these three sterols exerted cytotoxic activity against cancer cells (Lai *et al.*, 2010). Notably, β -sitosterol induced G2/M arrest, endoreduplication, and apoptosis on U937 lymphoma cells and HL60 promyelocytic leukemic cells through the Bcl-2 and PI3K/Akt signaling pathways (Moon *et al.*, 2008). Stigmasterol maintained a non-dose-responsive inhibition of growth (around 40–50% inhibition between 1.6 and 50 μ g/ml) of HS578T breast cancer cells (Lai *et al.*, 2010).

5-conclusions:

Our study findings support the notion that *Ormenis erirolepis* have a combination of several bioactive compounds that can be responsible either alone or together for its outstanding

antitumor activity and also the chemoprevention proprieties that can have the plant decoction if used regularly in healthy diet, brings a clear scientific support to the use of Moroccan medicinal plants by traditional healers for the treatment of cancer patients. Finally and as preliminary information, it opens the way for further investigations to elucidate the possible molecular mechanisms involved in cancer cell death and cell cycle arrest.

6- Figures and legends

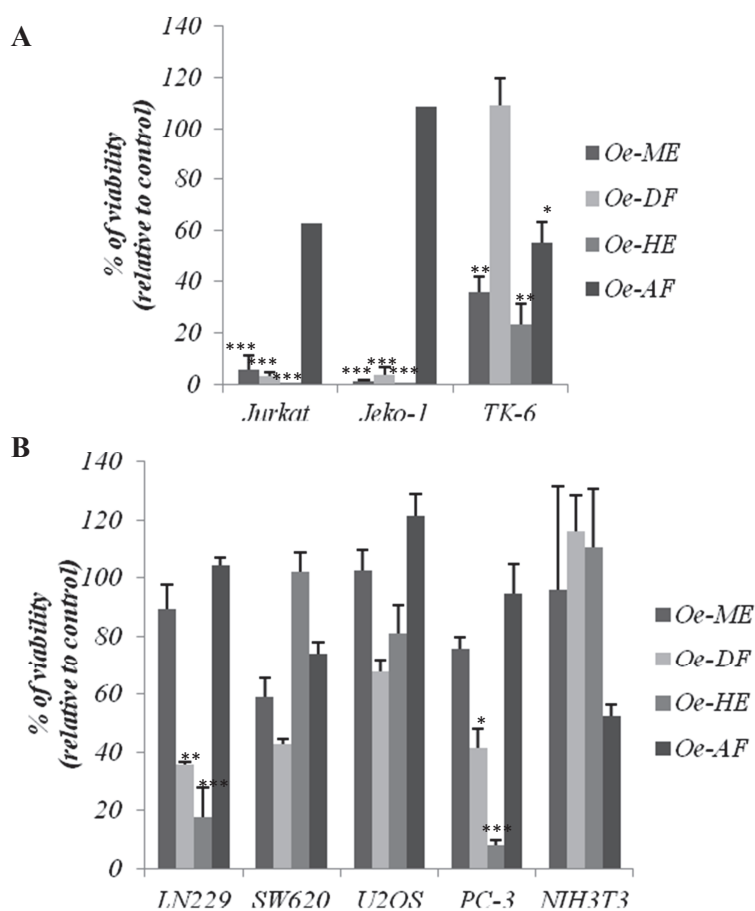


Figure 40: Cytotoxic activity of *Ormenis erirolepis* organic extracts and fractions in a panel of cancer and non-transformed cell lines. A. suspension cells panel Jurkat, Jeko-1, and TK-6 and B. adherent cells panel LN229, SW620, U2OS, PC-3 and NIH3T3; were incubated for 48 h with 50 $\mu\text{g/ml}$ of each extract and fraction. Results represent the mean \pm SD of at least 3 independent experiments indicating the percentage of viable cells relative to vehicle-treated (control) cells. Statistically significant differences are indicated by * $p < 0.005$ compared with untreated.**

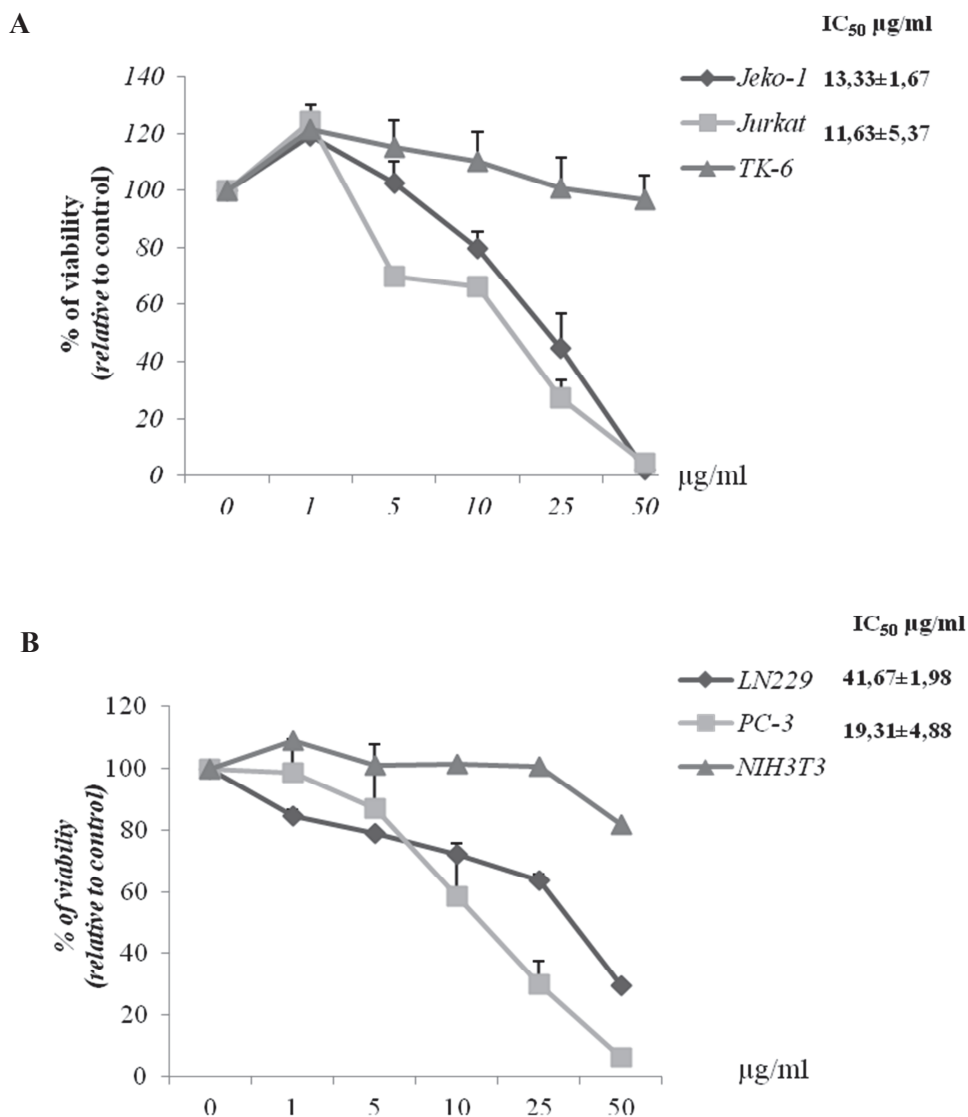


Figure 41: (A) Dose-response analysis of *Ormenis erirolepis* dichloromethane fraction (*Oe-DF*) and IC₅₀ determination on *Jurkat* and *Jeko-1* cells. (B) Dose-response analysis of *Ormenis erirolepis* hexanic extract (*Oe-HE*) and IC₅₀ determination on *LN229* and *PC-3* cells. Cells were treated for 48h at different concentrations ranging from 1 to 50µg/ml; IC₅₀ value (µg/ml) was determined graphically from the viability curves, *NIH3T3* and *TK6* cells were used as control. Data are expressed as means ±SD of triplicate determinations.

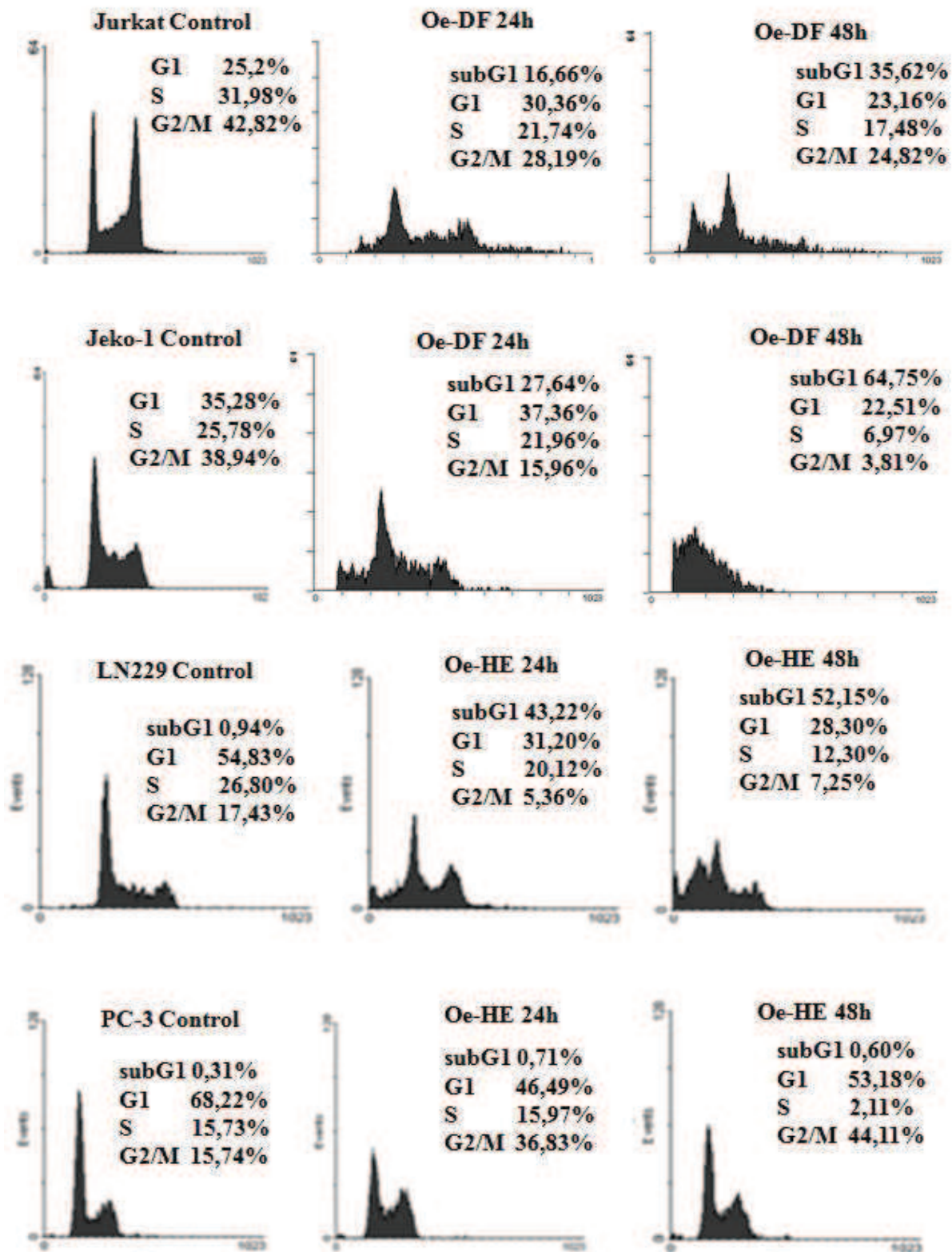


Figure 42: cell cycle distribution analysis of Jurkat, Jeko-1, LN229 and PC-3 cells treated respectively with *Ormenis erirolepis* Dichloromethane Fraction (Oe-DF) and Hexanic Extract (Oe-HE) by flow cytometry. Jurkat, Jeko-1, LN229 and PC-3 cells were incubated respectively with 20 µg/ml and 50 µg/ml of Oe-DF and Oe-HE for 24h and 48h. Cells were

harvested and their DNA content analysed by flow cytometry as described in Materials and Methods. The cell cycle distribution is shown for each experimental condition.

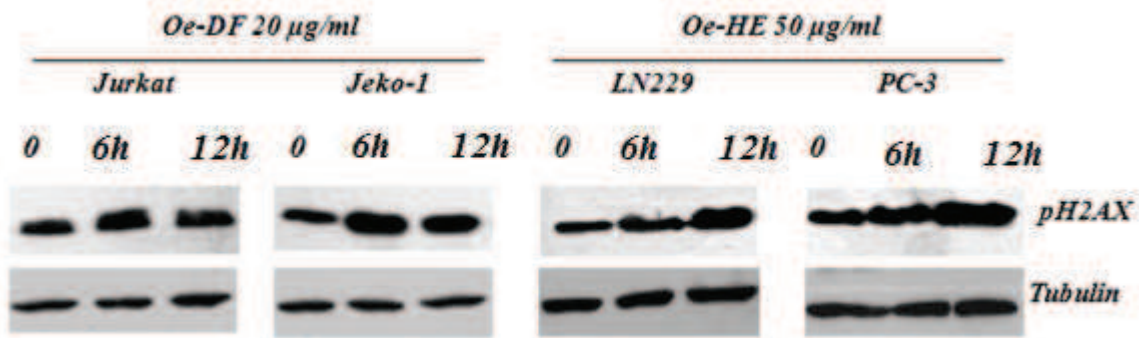


Figure 43: Effect of Oe-DF and Oe-HE on p-H2AX expression levels in Jurkat, Jeko-1, LN229 and PC-3 cells. Cells (4×10^6 cells/ml) were treated respectively with 20 µg/ml and 50 µg/ml of Oe-DF and Oe-HE for 0, 6 and 12h. p-H2A.X levels in cellular extracts were detected by immunoblot with specific antibodies. Tubulin was used as an internal control.

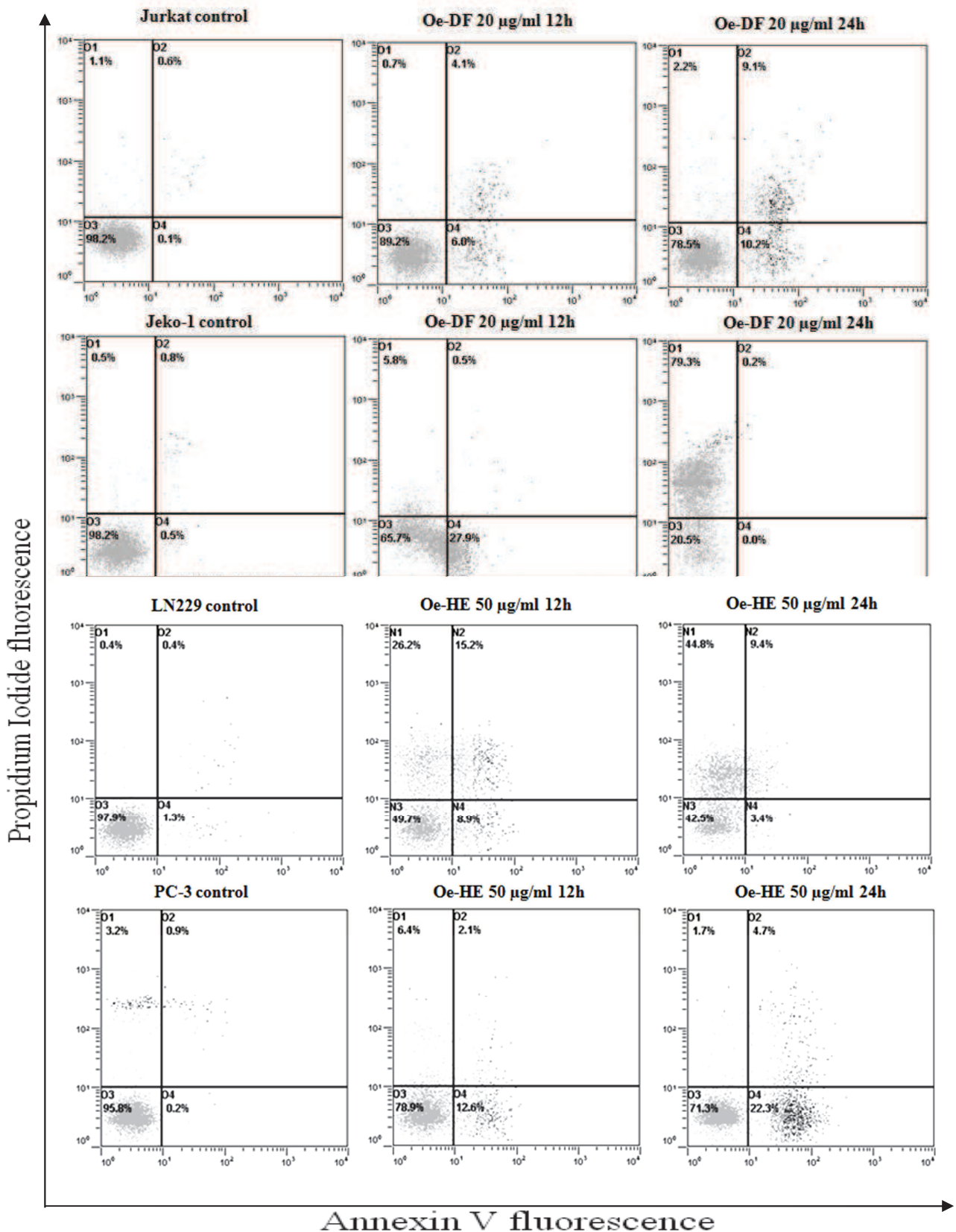


Figure 44: Effect of (Oe-DF) in Jurkat and Jeko-1 cell and (Oe-HE) in LN229 and PC-3 on apoptosis induction analyzed by flow cytometry. Jurkat , Jeko-1, LN229 and PC-3 cells were incubated respectively with 20 µg/ml and 50 µg/ml of Oe-DF and Oe-HE for 12h and 24h. The x-axis shows Annexin V-FITC staining and y-axis indicates Propidium iodide

staining; Lower left (LL) quadrant: viable cells; lower right (LR) quadrant: early apoptotic cells; upper left (UL) quadrant: necrotic cells, upper right (UR) quadrant: late apoptotic cells.

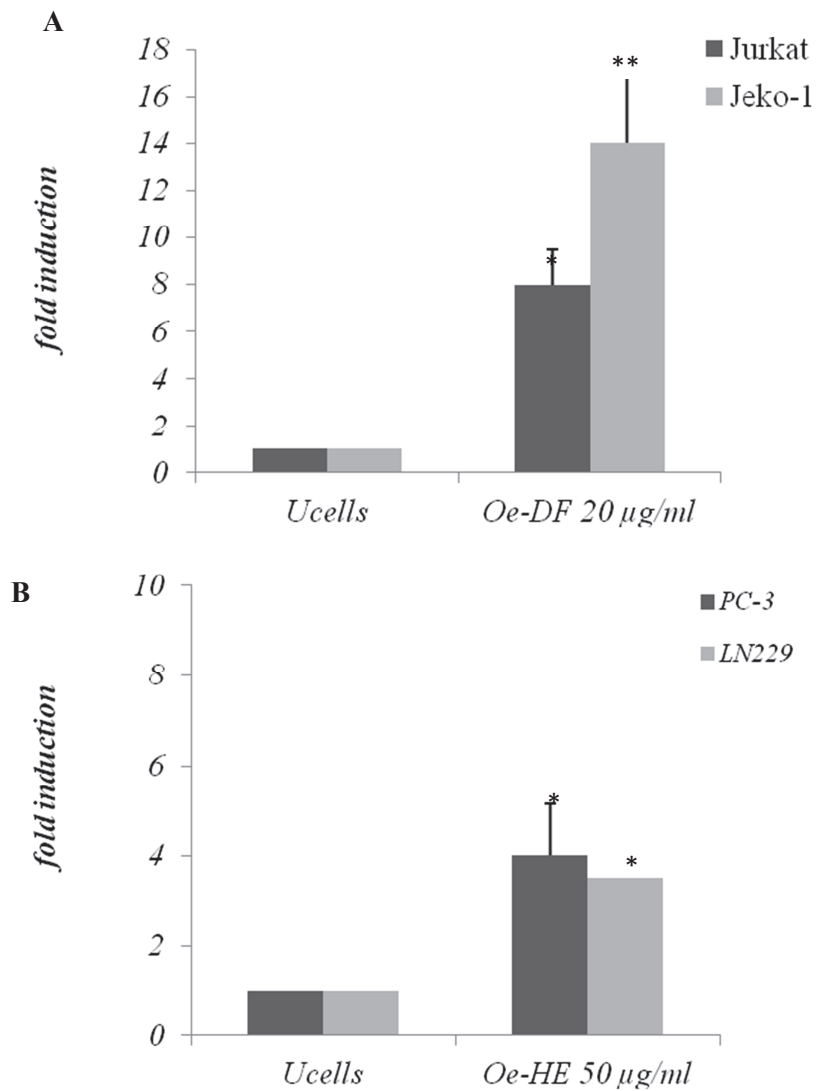


Figure 45: Effect of *Ormenis eriolepis* Fraction and Extract on caspase activity induction on Jurkat, Jeko-1, LN229 and PC-3 cells. (A) Jurkat and Jeko-1 cells were treated with 20 µg/ml of (Oe-DF) for 48h and caspase activity was measured (B) LN229 and PC-3 cells were treated with 50 µg/ml of (Oe-HE) for 48h and caspase activity was measured. Results indicate the average fold increase ± S.E.M in caspase activity relative to untreated cells from three independent determinations performed in duplicate.

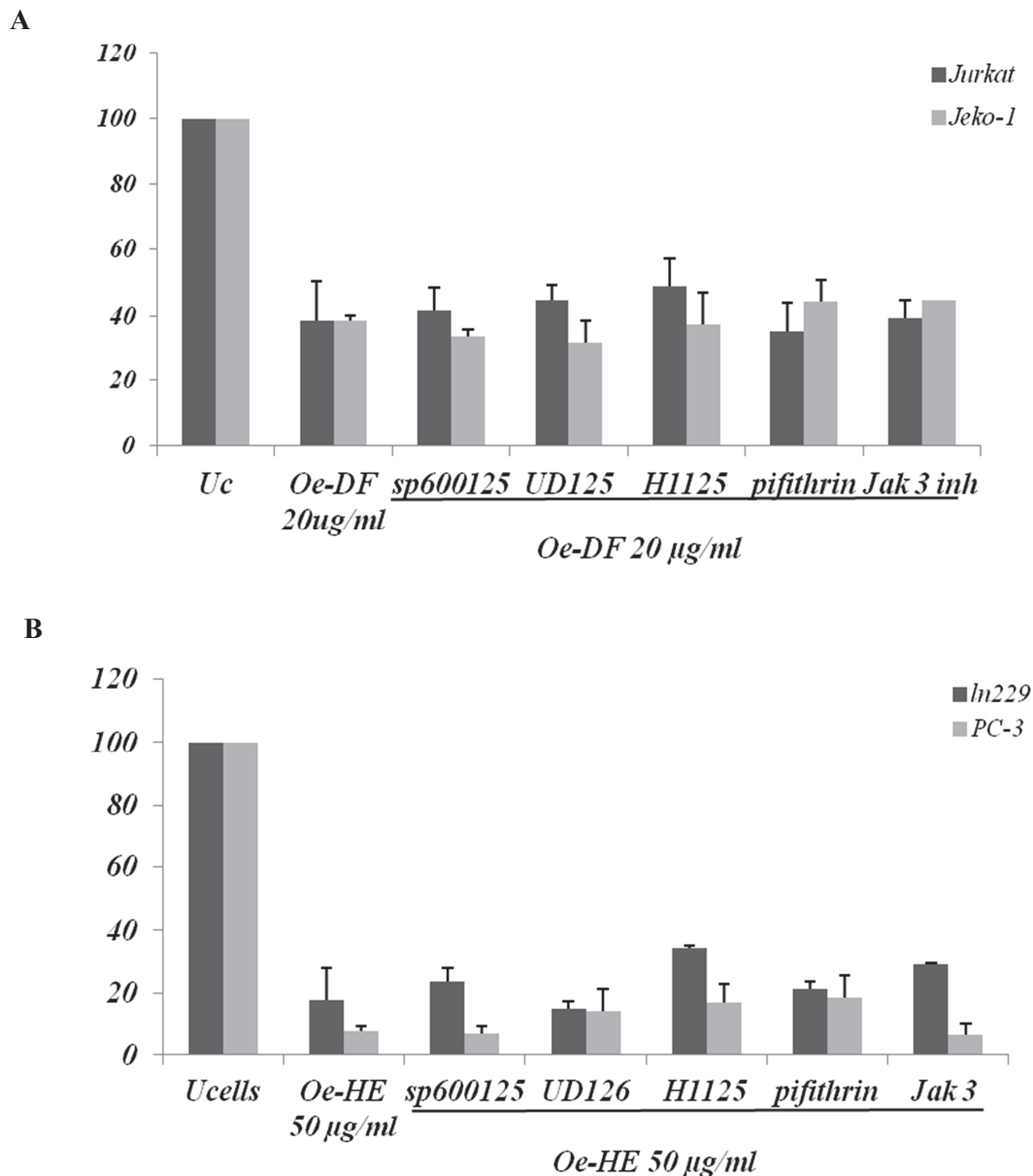


Figure 46: Effect of *Ormenis eriolepis* Fraction and Extract on the viability of Jurkat, Jeko-1, LN229 and PC-3 cells in presence of a panel of signaling pathways inhibitors. (A) Jurkat and Jeko-1 (B) LN229 and PC-3 cells were untreated or treated respectively with 20 and 50 $\mu\text{g/ml}$ of Oe-DF and Oe-HE in the presence or absence of SP600125, U0126; H1125, Pifithrin or Jak3 inhibitor (all at 10 μM) for 48h. Inhibitors were pre-incubated for 1 hour before the addition of Mv-DF extract. Cell viability is represented as a percentage relative to untreated cells. Data is means \pm S.E.M from three independent determinations performed in duplicate.

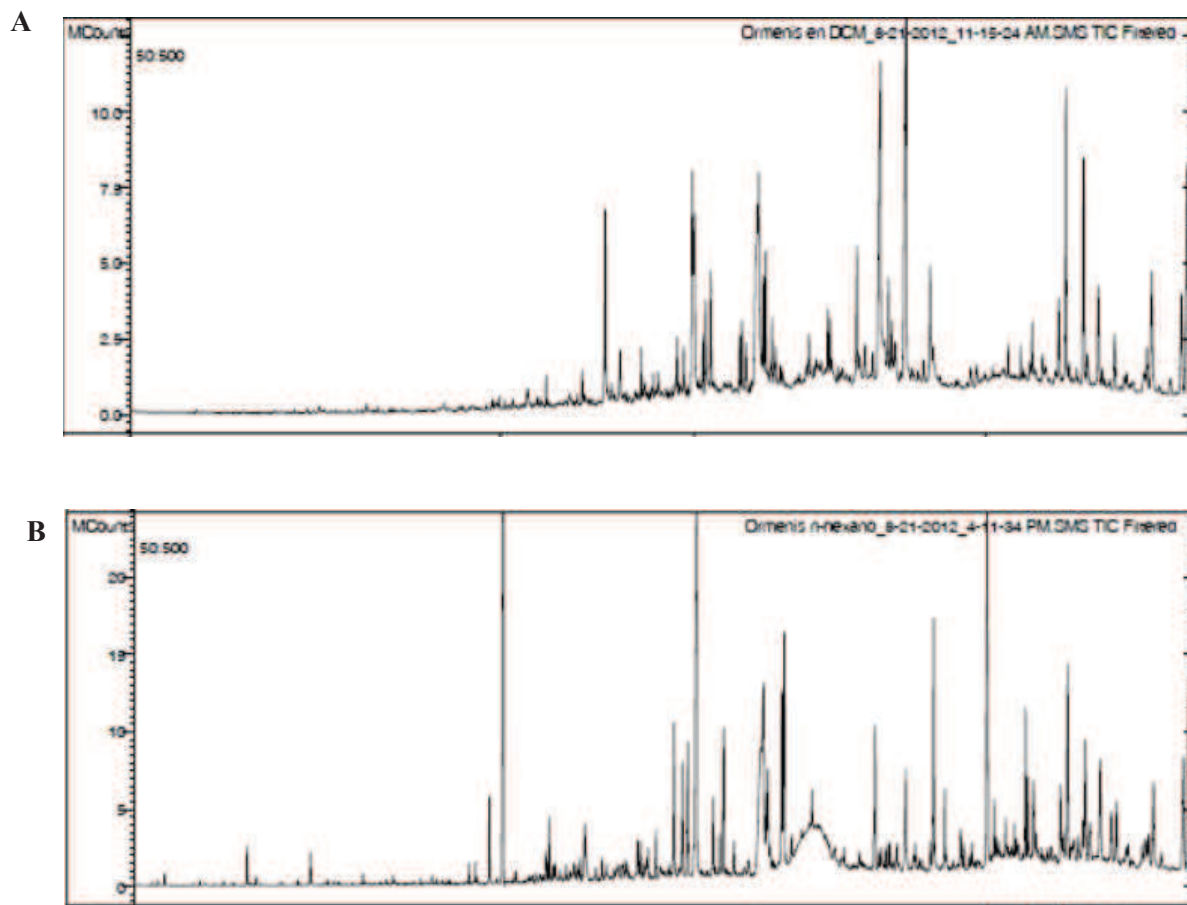


Figure 47: (A) Chromatogram of *Ormenis erirolepis* Dichloromethane Fraction obtained by CG. Compounds were identified by computer searches in the reference libraries of NIST and Wiley7, and fragmentation patterns were compared with literature Data. *Oe-DF* constituents are shown in Table 9. (B) Chromatogram of *Ormenis erirolepis* Hexanic Extract obtained by CG. *Oe-HE* constituents are shown in Table 9.

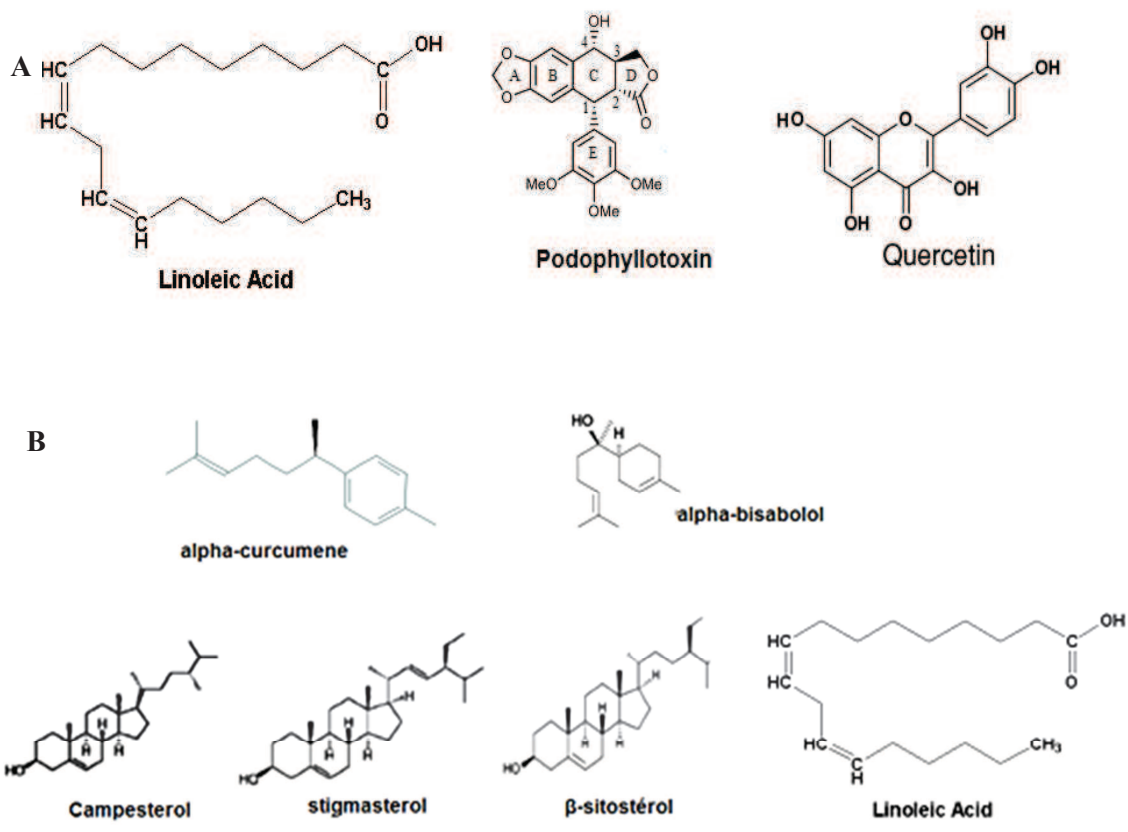


Figure 48: (A) Chemical structures of the major bioactive compounds of Ormenis eriolepis Dichloromethane Fraction. (B) Chemical structures of the major bioactive compounds of Ormenis eriolepis Hexanic Extract.

Table 8: Compounds present in dichloromethane fraction of *Ormenis eiriolepis* identified by CG/MS.

RT	identified compounds	cas numbers	% Area
15,877	Propanoic acid,2-[(trimethylsilyl)oxy]-, trimethylsilyl ester	17596-96-2	0,19604
16,449	Glycolic acid, TMS	33581-77-0	0,176436
16,748	2-(Trimethylsiloxy)propenoic acid trimethylsilyl ester	55191-13-4	0,19604
21,671	Silanol,1,1,1-trimethyl-, 1-benzoate	08/12/2078	0,470496
22,147	Octanoic acid, trimethylsilyl ester	55494-06-9	0,137228
23,091	Phenylacetoxyltrimethylsilane	2078-18-4	0,352872
23,531	Butanedioic acid, bis(trimethylsilyl) ester	40309-57-7	0,431288
23,877	Glyceric acid (3TMS)	38191-87-6	0,09802
24,787	Nonanoic acid trimethylsilyl ester	82326-11-2	0,176436
25,247	Benzaldehyde,p-(trimethylsiloxy)- (7CI,8CI)	1012-12-0	0,058812
27,294	Decanoic acid, trimethylsilyl ester	55494-15-0	0,235248
27,695	4'-(Trimethylsilyloxy)acetophenone	18803-29-7	0,470496
27,988	malatate	65143-63-7	0,29406
29,26	Trimethylsilylvanillin	6689-43-6	0,176436
29,441	(S)-dihydroactinidiolide	17092-92-1	0,842972
30,245	α -[(Trimethylsilyl)oxy]benzenepropionic acid trimethylsilyl ester	27750-45-4	0,09802
31,336	Benzoic acid,4-[(trimethylsilyl)oxy]-, trimethylsilyl ester	2078-13-9	0,646932
31,889	4-Methoxy-3-(trimethylsiloxy)benzoic acid methyl ester	55590-91-5	0,548912
33,343	Benzoic acid, 3,4-bis[(trimethylsilyl)oxy]-, methyl ester	27798-58-9	1,137032
35,023	Nonanedioic acid bis(trimethylsilyl) ester	17906-08-0	2,019212
35,433	Protocatechuic acid, di-TMS	2347-40-2	0,999804
35,098	Tetradecanoic acid trimethylsilyl ester	18603-17-3	1,097824
36,994	3-Methoxy-4-[(trimethylsilyl)oxy]benzenepropionic acid trimethylsilyl ester	56051-49-1	0,823368
37,06	Benzoic acid,3,5-dimethoxy-4-[(trimethylsilyl)oxy]-, trimethylsilyl ester	10517-29-0	0,9802
37,919	3-[3-[(Trimethylsilyl)oxy]phenyl]propenoic acid trimethylsilyl ester	32342-01-1	0,999804
38,883	1,11-Undecanedioic acid, di(trimethylsilyl) ester	106450-25-3	0,842972
39,199	3-[3,4-Bis(trimethylsilyloxy)phenyl]propenoic acid methyl ester	22020-29-7	2,372084
41,57	2-Propenoic acid, 3-[3,4-bis[(trimethylsilyl)oxy]phenyl]-, trimethylsilyl ester	10586-03-5	1,86238
42,53	ALMITIC ACID N-BUTYL ESTER	111-06-8	1,431092
42,91	Linoleic acid trimethylsilyl	56259-07-5	15,89884
43,458	Octadecanoic acid, trimethylsilyl ester	18748-91-9	4,901
46,698	Eicosanoic acid, trimethylsilyl ester	55530-70-6	2,078024
48,896	Hexadecanoic acid 2,3-bis[(trimethylsilyl)oxy]propyl ester	1188-74-5	8,586552
49,699	Docosanoic acid trimethylsilyl ester	74367-36-5	2,920996
51,665	Stearic acid 2,3-bis(trimethylsilyloxy)propyl ester	1188-75-6	4,587336
55,302	Podophyllotoxin	518-28-5	17,89845
56,24	Quercetin, penta-TMS	4067-66-7	22,95824

Table 9: Compounds present in the hexanic extract of *Ormenis eirirolepis* identified by CG/MS.

RT	identified compounds	cas numbers	% Area
15,879	2-(Trimethylsiloxy)propanoic acid trimethylsilyl ester	17596-96-2	0,14554795
16,377	Hexanoic acid, trimethylsilyl ester	14246-15-2	0,06849315
16,453	Glycolic acid, bis-TMS	33581-77-0	0,08561644
22,162	Octanoic acid, trimethylsilyl ester	55494-06-9	0,08561644
24,802	Nonanoic acid trimethylsilyl ester	82326-11-2	0,11986301
27,301	Decanoic acid, trimethylsilyl ester	55494-15-0	0,65924658
28,018	alpha-curcumene	644-30-4	7,07191781
28,697	(+)-aromadendrene	489-39-4	0,72773973
29,368	(S)-dihydroactinidiolide	17092-92-1	0,10273973
32,891	alpha-Bisabolol	515-69-5	5,49657534
35,032	Nonanedioic acid bis(trimethylsilyl) ester	17906-08-0	0,39383562
36,112	Tetradecanoic acid trimethylsilyl ester	18603-17-3	0,65924658
39,968	Hexadecanoic acid, trimethylsilyl ester	55520-89-3	4,29794521
41,732	Heptadecanoic acid, trimethylsilyl ester	55517-58-3	0,64212329
42,728	1,2-Hexadecanediol	6920-24-7	0,59075342
42,949	Linoleic acid trimethylsilyl	56259-07-5	9,76883562
43,096	alpha-Linolenic acid, trimethylsilyl ester	97844-13-8	15,3424658
43,467	Octadecanoic acid, trimethylsilyl ester	18748-91-9	2,43150685
46,707	Eicosanoic acid, trimethylsilyl ester	55530-70-6	1,27568493
48,372	1-Docosanol	661-19-8	6,59246575
48,897	Hexadecanoic acid 2,3-bis[(trimethylsilyl)oxy]propyl ester	1188-74-5	3,3989726
49,711	Docosanoic acid trimethylsilyl ester	74367-36-5	2,40582192
51,26	1-TETRACOSANOL	506-51-4	7,32020548
54,002	Icosanoic acid 2,3-bis(trimethylsilyloxy)propyl ester	55517-94-7	1,54109589
54,638	Hexacosanoic Acid	506-46-7	2,66267123
57,21	CAMPESTEROL	474-62-4	4,41780822
57,567	Stigmasterol trimethylsilyl ether	14030-29-6	14,0839041
58,444	β -Sitosteryl trimethylsilyl ether	2625-46-9	7,49143836

7- Competing interest

The authors declare that they have no competing interests.

8- Authors' contributions

LB performed all experiments and participated in the experimental design, analysis of the data and redaction of the manuscript. CAL participated in the experimental design, analysis of the data and preparation of the manuscript. The plants harvest, identification and extraction were done by NM and YB. SA participated in the analysis of the data and the preparation of the manuscript. SFM participated in the experimental design, data analysis and edited the manuscript. PV directed the research and edited the manuscript. All authors have contributed and approved the manuscript.

9- Acknowledgements

We are grateful to Dr. Rafael Núñez Gómez (Servicio de Instrumentación Científica, Estación Experimental del Zaidín CSIC, Granada, Spain), for the Gc-MS analysis of *Ormenis eriolepis* dichloromethane fraction and hexanic extract. Many thanks goes to, Dr. Ruth Villalonga, Mr. Guillem Ramis and Ms. Margalida Serra Sitjar (Cancer Cell Biology Group, Institut Universitari d'Investigació en Ciències de la Salut "IUNICS") for scientific and technical help.

Discussion
&
Conclusions

En dépit des progrès accomplis sur le plan thérapeutique et au niveau des techniques de dépistage, Le cancer est une cause importante de morbidité et de mortalité partout dans le monde. Les effets secondaires des médicaments anti-tumoraux, les problèmes de résistance et l'échappement tumoral demeurent les principales causes d'échec dans le traitement des cancers.

De nombreux efforts de recherche dans le domaine des traitements anti-cancéreux sont axés sur le développement d'agents hautement spécifiques capables d'induire sélectivement l'apoptose. Ces dernières années, les laboratoires pharmaceutiques en quête de nouvelles molécules à visée thérapeutiques, ont beaucoup investi dans la recherche de substances d'origine naturelles (Kinghorn A.D. *et al.*, 2009), pour contrecarrer la résistance de certaines tumeurs vis-à-vis de nombreux agents utilisés en chimiothérapie.

Depuis l'antiquité et grâce à leurs propriétés thérapeutiques, les plantes ont joué un rôle capital dans l'art de guérir. Aujourd'hui nous assistons au retour de l'utilisation des plantes médicinales pour favoriser la santé. Chaque plante médicinale a une définition qui lui est propre et une utilisation spécifique (Kansole ;, 2009).

Depuis plus de 40 ans, de nombreux médicaments provenant de milieu naturel sont actuellement utilisés en chimiothérapie anticancéreuse (Kinghorn A.D. *et al.*, 2009). Une récente étude, a montré que parmi les produits pharmaceutiques mis sur le marché durant la période 1981-2010, 55,79% des médicaments actuels sont constitués ou dérivés de produits naturels et seulement 44,21% des médicaments sont totalement synthétiques (Newman D.J. and Cragg G.M., 2012).

Le criblage de nouvelles molécules anticancéreuses est en premier lieu basé sur l'évaluation de leurs effets antiprolifératifs sur des lignées cancéreuses en culture. Les techniques d'évaluation de l'activité antiproliférative ou cytotoxique *in vitro*, par leurs simplicité de mise en œuvre, leurs spécificité, leurs sensibilité ; sont privilégiées par rapport aux techniques utilisant des modèles *in vivo* (Eisenbrand G. *et al.*, 2002).

Dans un premier temps, Nous avons donc étudié l'activité cytotoxique *in vitro*, des extraits organiques des plantes : *Inula viscosa*, *Retama monosperma L*, *Marrubium vulgare* et *ormentis eriolepis Coss.* issus de l'extractothèque du Laboratoire de Biochimie-Immunologie de la faculté des sciences de Rabat. A l'issue de cette étude, il ressort qu'au moins un extrait de chaque plante a été capable d'exercer une activité cytotoxique envers la majorité des lignées

cellulaires testées, les valeurs d'IC₅₀ des extraits actifs étaient dans la plupart des cas ≤ 30µg/ml. L'étude des effets cellulaires des extraits les plus actifs sur les lignées cellulaires LN229, SW620 et PC-3 montre clairement leur capacité à promouvoir l'arrêt du cycle cellulaire ainsi que la mort cellulaire.

Actuellement, les plantes du genre *Retama*, *Marrubium* et *Ormenis* ont attiré un intérêt croissant en raison de leur large éventail d'effets pharmacologiques. Ainsi une étude du mécanisme d'action des extraits de *Retama monosperma* L., *Marrubium vulgare* et *Ormenis erirolepis* a été réalisée ainsi que la caractérisation chimique des extraits les plus actifs. Une extraction a été réalisée à l'aide de solvants organiques de polarités différentes, permettant ainsi d'obtenir 4 types d'extraits dont la cytotoxicité a été évaluée vis-à-vis d'un panel de lignées cellulaires cancéreuses de différentes origines. Malgré l'existence de plusieurs publications rapportant les multiples propriétés pharmacologiques de ces plantes, les propriétés anticancéreuses du *Marrubium vulgare* et *Ormenis erirolepis* restent inédites.

Les résultats obtenus lors de nos expériences, ont révélé que l'extrait hexanique de *Retama monosperma* possédait un effet spécifique sur les cellules Jurkat, tandis que l'extrait Dichlorométhane de *Marrubium vulgare* possédait un effet significatif sur les cellules Jurkat et Jeko-1. Au sujet d'*Ormenis erirolepis*, seuls les extraits dichlorométhane et hexanique diminuait particulièrement la viabilité des cellules Jurkat, Jeko-1, LN229 et PC-3.

Il convient de noter, que les extraits étudiés étaient tous significativement inefficace contre les autres lignées cellulaires testées, y compris les lignées cellulaires NIH3T3 et TK-6 utilisées comme contrôle.

Les lignées Jurkat et Jeko-1 sont habituellement utilisées comme modèles d'étude de leucémie aiguë à cellules T (T-ALL) et de lymphome non hodgkinien à cellules B (B-NHL) qui sont des hémopathies malignes caractérisées par une expression dérégulée des protéines en relation avec l'apoptose (*Lee et al* ;2013).

Les cellules LN229 et PC-3 sont des modèles cellulaires utilisés respectivement pour étudier le glioblastome multiforme et le cancer de prostate, les deux correspondent à des troubles néoplasiques agressifs caractérisés par l'altération de plusieurs voies de signalisation, spécialement apoptotique. Favorisant ainsi un environnement cancérogène permissif, en induisant une instabilité génétique et en accumulant à la fois un nombre colossale de

mutations conférant ainsi, une résistance aux médicaments anticancéreux et aux radiations (Martin and Green;.1995).

L'analyse par cytométrie en flux a indiqué que Rm-HE a induit l'arrêt du cycle cellulaire, ainsi qu'une forte apoptose accompagné par un dommage de l'ADN indiqué par une augmentation du taux de la p-H2A.X après seulement 4h du traitement. Dans les conditions normales, l'intégrité du génome dans les cellules endommagées est en général rétablie grâce à une réparation d'ADN. Sinon, l'apoptose procède en éliminant les cellules génétiquement aberrantes (Norbury and Zhivotovsky; 2004, Ljungman; 2009).

Afin de mieux comprendre les mécanismes cellulaires en réponse à Rm-HE, nous avons effectué une analyse par cytométrie en flux en utilisant l'annexine-V couplée à l'iodure de propidium, ce qui a permis de détecter et de quantifier la quantité de cellules entrant en apoptose après 24h de traitement.

Etant donné que l'une des caractéristiques fondamentales de l'apoptose est l'activation des caspases (Faddeel et Orenius;. 2005, Kekre et al, 2005), nous avons mesuré si l'activité enzymatique des caspases 3 et 7 a été augmentée dans les cellules Jurkat après le traitement. Comme prévu, Rm-HE a induit clairement une forte activation des caspases dans une mesure similaire à l'agent chimiothérapeutique classique laDoxorubycine et, en corrélation avec cela, l'inhibition des caspases en utilisant un inhibiteur spécifique a donné lieu à une protection partielle contre la cytotoxicité induite préalablement par Rm-HE.

Les analyses par western blot ont montré que l'apoptose induite par Rm-HE était partiellement dépendante de JNK et caractérisée par une surexpression du Fas-L ainsi qu'une activation des caspases 8, 3, 7 et 9. Il faut noter aussi, que ni les protéines pro-apoptotiques ni pré-apoptotiques n'ont été altéré par Rm-HE suggérant ainsi que les composés bioactifs présents dans cet extrait induisent l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose, qui opère au moins partiellement, par la voie extrinsèque.

L'activation de la voie apoptotique extrinsèque est régulée en aval par l'activation du récepteur de la mort, elle implique une formation d'un complexe de signalisation d'induction de la mort (DISC) qui recrute et active la pro-caspase 8. Dans les cellules leucémiques humaines le Fas ligand (Fas-L) est l'un des agents principaux activant le récepteur de mort (Kantari and Walczak; 2011).

Par ailleurs, la recherche à montrer que Mv-DF était capable d'exercer son activité cytotoxique en induisant un arrêt en G1 pour les deux lignées (Jurkat et Jeko-1), accompagné d'une forte augmentation de l'activité des caspases effectrices 3 et 7. Concernant l'analyse moléculaire, une régulation à la baisse des protéines anti-apoptotique (Bcl-2 et Mcl-1) ainsi qu'une inactivation de PARP ont été révélées dans les deux lignées. Les expériences supplémentaires avec des inhibiteurs sélectifs des voies (JNK, MAPK, Rho, p53 et JAK3) ont indiqué qu'aucune d'elles n'était considérablement impliquée.

D'autre part, l'analyse de la distribution du cycle cellulaire et le taux d'expression de la p_{H2A.X} ont montré qu'Oe-DF et Oe-HE induisaient une cassure des doubles brins d'ADN accompagnée par un arrêt du cycle en phase G1 chez les cellules : Jurkat, Jeko-1 et LN229, et en G2/M chez les cellules PC-3. Ces données sont en accord parfait avec l'augmentation de l'activité caspases observée après 48h du traitement. Les expériences supplémentaires avec des inhibiteurs sélectifs des voies (JNK, MAPK, Rho, p53, et JAK3) ont indiqué qu'aucune de ces voies n'est impliquée dans l'induction de l'apoptose promue par *Ormenis eriolepis*.

L'apoptose constitue une des modalités les plus importantes de mort cellulaire, si importante qu'elle a éclipsé toutes les autres que l'on commence seulement à redécouvrir. La dérégulation de l'apoptose rompt le complexe équilibre entre la prolifération, la survie et la mort cellulaire et joue un rôle majeur dans le développement de maladies telles que les hémopathies malignes, dont les voies de signalisation impliquées dans la mort cellulaire sont altérées et fréquemment plus résistantes aux traitements (Zhao *et al.*, 2010).

Le mécanisme principal d'évolution des hémopathies malignes est un défaut dans l'apoptose, ainsi les cellules immatures s'accumulent dans le sang, la moelle et les organes lymphoïdes secondaires, causant ainsi des leucémies et lymphomes. Les raisons de ce défaut d'apoptose ne sont pas encore complètement élucidées.

Ainsi, rechercher à induire la mort cellulaire par apoptose, via les voies intrinsèque et extrinsèque, constitue une approche attractive pour de potentielles interventions thérapeutiques.

Pour ce faire, plusieurs stratégies ont été développées : (1) La voie dite mitochondriale en favorisant des clivages double-brins de l'ADN (DiJoseph *et al.*, 2004; Kreitman *et al.*, 2005; Kreitman *et al.*, 2009). Alternativement, d'autres approches visent soit à diminuer les effets de protéines antiapoptotiques comme Bcl-2 (Kim *et al.*, 2007) ou IAPs (Angell, 2008; Schimmer

and Dalili, 2005), soit à augmenter les effets de protéines proapoptotiques à domaine BH3 (D'Amelio et al., 2008) en développant des molécules qui interfèrent avec les facteurs proapoptotiques. Comme p53 est muté dans un grand nombre de cancers, une restauration des fonctionnalités de p53 peut aussi être envisagée, que ce soit en empêchant les interactions entre p53 et son inhibiteur Hdm2 (Shangary *et al.*, 2008; Vassilev, 2007). Bien d'autres méthodes aboutissent à une stimulation de la voie apoptotique intrinsèque : une inhibition de l'activité protéasomale peut être pro-apoptotique. Les inhibiteurs de méthylation de l'ADN (Baylin, 2005) voire de désacétylation d'histones (Prince *et al.*, 2008), entraînent une réactivation de gènes suppresseurs de tumeurs, une répression de la voie de signalisation PI3K-Akt stimulant la prolifération de cellules tumorales (Luo *et al.*, 2003) ou une neutralisation de HIF-1# (Welsh *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2006), ou encore le PARP qui est impliqué dans plusieurs fonctions cellulaires telles que la réparation de l'ADN et le maintien de l'intégrité du génome, Lors de l'apoptose, PARP est clivée par la caspase 3 ce qui l'empêche de jouer son rôle, entraînant ainsi une entrée en apoptose des cellules néoplasiques. (2) D'une façon similaire, d'autres approches thérapeutiques ciblent une stimulation agonistique (Ashkenazi and Herbst, 2008) des trois principaux récepteurs de la voie apoptotique extrinsèque qui sont Fas (Timmer *et al.*, 2002), TNF-R1/2 (Curnis *et al.*, 2000) et TRAIL-R1/2 (Carlo-Stella *et al.*, 2007). Une telle stimulation peut conduire à une induction de mort cellulaire par apoptose, tout comme à une diminution de l'expression de cFlip par des inhibiteurs de topoisomérasés ou de désacétylases d'histones (Yang, 2008). (3) Indépendamment de la voie apoptotique ciblée, une activation directe (Buckley *et al.*, 1999) ou indirecte (Dudich *et al.*, 2006) de la capasse-3 ou d'autres caspases initiatrices ou effectrices (Xie *et al.*, 2001) sont propices à une induction apoptotique.

Nous avons par la suite mis en évidence la composition chimique des extraits les plus actifs par GC/MS, qui a montré que l'acide α -linoléique, l'acide palmitique, le widdrol, le stigmastérol, le b-sitostérol et le campesterol sont les principaux composés bioactifs des extraits Rm-HE et Mv-DF.

Dans la littérature plusieurs études ont mis en évidence que les phytostérols possèdent des effets anti-cancéreux (Choi *et al.*, 2007) contre le cancer du poumon (Mendilaharsu et al., 1998), de l'estomac (De Stefani *et al.*, 2000), de l'ovaire (Mc Cann *et al.*, 2003) et du sein (Ju *et al.*, 2004). Ils inhibent la production de substances cancérigènes, la croissance des cellules cancéreuses, l'invasion et les métastases, et sont aussi capable de promouvoir l'apoptose (Meric *et al.*, 2006). Ils sont structurellement similaires au cholestérol et existent sous

plusieurs formes dans les plantes (Jones, 1999; Loi, 2000; Katan *et al.*, 2003; St-Onge et Jones, 2003; Abumweis *et al.*, 2008), y compris les β -sitostérol, campestérol et stigmastérol. Il a été rapporté que une fois ensemble, les trois derniers se sont révélés exercer une activité cytotoxique contre les cellules cancéreuses (Lai *et al.*, 2010). Remarquablement, le stigmastérol a montré une inhibition de la croissance cellulaire de l'ordre de 40 à 50% entre 1,6 et 50 $\mu\text{g/ml}$ dans les cellules de cancer du sein Hs578T (Lai *et al.*, 2010). En outre, le sitosterol et le phytol, qui est un terpénoïde extrêmement commun et également présent dans Rm-HE et Mv-DF, présentaient une cytotoxicité claire contre diverses lignées cellulaires de cancer comprenant le cancer nasopharyngé épidermoïde, le cancer du sein, le cancer du col utérin, le cancer du côlon et les cellules d'adénocarcinome du poumon (Malek *et al.*, 2009). Il a également été rapporté que β -sitostérol a augmenté les activités des enzymes antioxydantes suggérant que les phytostérols peuvent atténuer le développement du cancer en réduisant la production de carcinogènes. Le β -sitostérol empêche aussi la croissance des cellules cancéreuses du côlon humain HT-29 et la lignée cellulaire du cancer de la prostate LNCaP par l'activation du cycle de la sphingomyéline en affectant aussi l'activité des composants de la voie apoptotique extrinsèque dans des cellules de cancer du sein (Von Holtz *et al.*; 1998; Amada *et al.*; 2007; Malek *et al.*; 2009). Quant au Phytol, il a montré une cytotoxicité élevée sur les cellules WI-38 (fibroblastes du poumon humain) et HL-60 (leucémie humaine) (Black *et al.*; 2004).

Concernant le widdrol, un sesquiterpène naturel aussi présent dans la composition chimique de Mv-DF. Il est connu pour sa capacité à empêcher la croissance des cellules HT29 et induire l'apoptose dans les cellules du cancer du côlon par induction d'un arrêt du cycle cellulaire en G1 (Hyunet *et al.*; 2010) ainsi qu'une activation des protéines kinases AMP (Kang *et al.*, 2012).

Pour les extraits d'*Ormenis eriolepis*, l'analyse de la fraction dichlorométhane et de l'extrait hexanique a révélé que l'acide linoléique, la podophyllotoxine, la quercétine, α -curcumène, α -bisabolol, le campestérol, le stigmastérol et le β -sitostérol sont les composés bioactifs majeurs.

De toute évidence, tous ces composants identifiés sont connus pour leur activité cytotoxique contre les cellules cancéreuses. La Podophyllotoxine est une ligane extraite d'une plante le Podophyllum, Ce composé et ses dérivés ont une grande importance en tant que médicaments antinéoplasiques. Elle est cytotoxicité sur de nombreuses lignées cellulaires mais s'est

révélee trop toxique pour être utilisée directement en chimiothérapie. On s'est aperçus récemment que ce composé était synthétisé par un champignon endophyte vivant au contact du rhizome, *phialocephala fortinii*. D'ailleurs dans notre étude on a pu mettre en évidence pour la première fois sa présence dans un autre type végétale hors que Podophyllum.

Les études de relations structure-activité réalisée sur la podophyllotoxine a conduit plus tard à l'obtention d'analogues l'Etoposide, le Téniposide et l'Etophos qui sont des inhibiteurs de topoisomérase de type II, enzyme responsable de l'altération de la topologie de l'ADN et induisant de ce fait l'apoptose. Ces trois médicaments sont utilisés dans le traitement de certains cancers (cancer de poumons à petites cellules, cancer du sein, des testicules, de l'ovaire et de la maladie de Hodgins...) (Ayres et Loike, 1990; Schacter, 1996).

Un autre type de métabolites secondaires a été aussi mis en évidence dans la composition chimique d'*Ormenis erirolepis* : la quercétine.

C'est le plus puissant flavonoïde de type flavonol, il est capable de diminuer, chez le rat, l'incidence des tumeurs mammaires induites par le DMBA (7,12 diméthylbenz(a)anthracene) ou la NMU (Nnitrosométhylurée) (Verma *et al.*, 1988). Les études réalisées chez la souris avancent dans le même sens et mettent en évidence les effets protecteurs des flavonoïdes vis-à-vis des promoteurs des tumeurs (Kato *et al.*, 1983). L'action antitumorale de la quercétine pourrait aussi s'expliquer par une interaction de celle-ci avec le complexe calcium-calmoduline (Nishino *et al.*, 1984) qui jouerait aussi un rôle dans le mécanisme d'action de nombreux promoteurs de tumeur. C'est ainsi qu'un antagoniste de la calmoduline inhiberait l'induction de l'ODC (Ornitine Décarboxylase) par le TPA (12-0- tétradécanoylphorbol-13-acétate) (Verma and Boutwell, 1981). Le complexe calcium-calmoduline pourrait médier l'action du TPA en augmentant la synthèse d'ADN dans les cellules de foie (Boynton *et al.*, 1982).

Il a été démontré qu'en donnant à des rats ou à des souris une alimentation contenant de la flavone ou de la quercétine, on peut observer des effets chimio préventifs à divers niveaux, et en particulier au niveau du foie par une stimulation de la glutathion-S-transférase (Nijhoff *et al.*, 1995). Enfin, les flavonoïdes peuvent inhiber les enzymes intervenant dans l'activation des pro carcinogènes en intermédiaires mutagènes et carcinogènes (Obermeier *et al.*, 1995). Les résultats dans ce domaine sont difficiles à interpréter car les flavonoïdes semblent avoir des effets divers sur l'activité des enzymes de détoxification (Lasker *et al.*, 1984). Par exemple, la quercétine a été révélee inhiber la croissance des cellules leucémiques lymphoïdes et

Myéloïdesaiguës (Kang and Liang, 1997). Elle a également été rapportée comme ayant des effets inhibiteurs de croissance sur les cellules gastriques et du cancer du côlon humain par inhibition de la progression du cycle cellulaire en G1/S (Suh *et al.*, 2010). Ces diverses activités anti-tumorales de la quercétine en font un composant de premier ordre pour le développement de nouveaux agents thérapeutiques ou préventifs efficaces du cancer.

Enfin le α -bisabolol, un petit alcool huileux sesquiterpène qui a été jugé avoir une activité contre certaines souches cellulaires malignes adhérentes chez l'homme et la souris et contre les tumeurs mammaires spontanées chez la souris transgénique HER-2 ainsi que dans les cellules HepG2 et le gliome (Cavalieri *et al.*, 2004 ; Costarelli *et al* 2010 ; Darra *et al.*; 2008; Chen *et al.*; 2010).

Il est évident qu'entre le savoir-faire d'antan, la technologie et les connaissances d'aujourd'hui, l'emploi de substances naturelles dans la recherche pharmacologique rencontre actuellement une vraie résurrection.

Les conclusions de notre étude appuient la notion selon laquelle ces plantes présentent une association de plusieurs composants bioactifs qui peuvent être responsables seuls ou ensemble de leurs activités antitumorales exceptionnelles, aussi les propriétés chémopréventifs que peuvent avoir les décoctions de ces plantes quand elles sont utilisées régulièrement dans une alimentation saine, apportent un soutien scientifique clair à l'utilisation des plantes médicinales marocaines par les guérisseurs traditionnels pour le traitement des patients atteints de cancer.

Ainsi, les données obtenues dans cette étude honorent le savoir-faire ancestral et apportent le support scientifique nécessaire, en offrant un point de départ à plusieurs études à venir. Ainsi les perspectives immédiates de ce travail sont principalement la validation de nos résultats en confirmant l'effet anticancéreux des extraits *in vivo* chez l'animal. De même il est nécessaire d'évaluer la toxicité *in vivo* de ces extraits sur des souris afin de s'assurer de la spécificité tumorale sans apparition de toxicité secondaire.

D'autres études sont nécessaires en premier lieu pour déterminer lequel des composés bioactifs identifiés sont responsables de ces effets, et en second lieu pour mieux comprendre les bases moléculaires de la sélectivité anti-leucémique et anti lymphome induite par les extraits de *Retama monosperma* et de *Marrubium vulgare*. Ainsi qu'effectuer des recherches

sur le développement préclinique visant à assurer leurs sécurités et leurs efficacités en tant qu'agents thérapeutiques.

Annexes



Screening of North African Medicinal Plant Extracts for Cytotoxic Activity Against Tumor Cell Lines

Lamiae Belayachi^{1,3}, Clara Aceves-Luquero¹, Nawel Merghoub³,
Youssef Bakri³, Silvia Fernández de Mattos^{1,2}, Saaid Amzazi³
and Priam Villalonga^{1,2*}

¹*Cancer Cell Biology Group, Institut Universitari d'Investigació en Ciències de la Salut, (IUNICS), Spain.*

²*Departament de Biologia Fonamental, Universitat de les Illes Balears, Illes Balears, Spain.*

³*Biochemistry-Immunology Laboratory, Faculty of Sciences, Mohammed V-Agdal University, Rabat, Morocco.*

Authors' contributions

This work was carried out in collaboration between all authors. Author LB performed all experiments and participated in the experimental design, analysis of the data and redaction of the manuscript. Author CAL participated in the experimental design, analysis of the data and preparation of the manuscript. The plants harvest, identification and extraction were done by authors NM and YB. Author SA participated in the analysis of the data and the preparation of the manuscript. Author SFM participated in the experimental design and the analysis of the data. Author PV directed the research and supervised the preparation of the manuscript. All authors have contributed and approved the manuscript.

Research Article

Received 24th February 2013

Accepted 17th April 2013

Published 27th April 2013

ABSTRACT

Aims: The aim of this study was to evaluate the in vitro cytotoxic activity and cellular effects of organic extracts and fractions of four plants; *Inula viscosa*, *Ormenis eiriolepis* (Asteraceae), *Retama monosperma* (Fabaceae) and *Marrubium vulgare* (Lamiaceae), all of them used in Moroccan traditional medicine.

Methodology: The four plants were extracted using organic solvents and screened on a panel of human cancer cell lines including cell types from both solid and haematological cancer origin as well as non-transformed murine fibroblasts. Cell viability assays were

*Corresponding author: Email: priam.villalonga@uib.es;

performed with sixteen plant extracts. Sensitive cell lines were then exposed to increasing concentrations of the most efficient extracts in order to calculate IC₅₀ values. Microscopy, flow cytometry and caspase activity assays were then performed in LN229, SW620 and PC-3 cell lines upon treatment to investigate the cell morphology, cell cycle distribution and cell death.

Results: cell viability assays reveals that at least one extract from each plant was able to exert cytotoxic activity against the majority of cell lines tested, the IC₅₀ values of the active extracts were in most cases $\leq 30 \mu\text{g/ml}$. the study of the cellular effects of the most active extracts on LN229, SW620 and PC-3 cell lines shows their ability to promote cell cycle arrest and cell death. The data obtained herein support strongly the use of these plants by traditional healers for the treatment of cancer patients and could have some scientific support indicating the presence of bioactive compounds.

Conclusion: The reported biological activity of these four medicinal plants used in traditional Moroccan medicine provides a starting point for forthcoming studies to determine the molecular basis of their activity and to identify the chemical compounds within the most active extracts responsible for their antitumoral effects.

Keywords: *Inula viscose*; *Retama monosperma*; *Ormenis eriolepis*; *Marrubium vulgare*; Moroccan pharmacopeia; anticancer agents; cell proliferation; cell death.

1. INTRODUCTION

Numerous plant extracts have been used by several civilizations for their scent and medicinal properties. Active compounds within those extracts constitute the basis of traditional medicine systems that have been in existence for thousands of years and continue to provide mankind with new remedies [1]. According to the World Health Organization (WHO) about 65–80% of the world's population in developing countries depends essentially on plants for their primary health care due to poverty and lack of access to modern medicine [2]. Medicinal plants have thus a long history of use for almost every group of human diseases including cancer, one of the major causes of mortality throughout the world. Statistics have estimated that cancer will cause 83.2 million deaths between 2005 and 2015 [3]. Drug discovery from medicinal plants plays an important role in the treatment of cancer and, indeed, most new clinical applications of plant secondary metabolites and their active compounds derivatives over the last half century have been applied against cancer [4]. Of all available anticancer drugs between 1940 and 2002, 40% were natural products or natural product-derived mimics, including Vinca alkaloids, Taxus diterpenes, Camptotheca alkaloids, and Podophyllum lignans [5]. Currently, there are 16 new plant derived compounds being tested in clinical trials and 13 of these compounds are being tested in phase I or II, and 3 are in phase III. Among these compounds, flavopiridol, isolated from the Indian tree *Dysoxylum binectariferum* and mesoindigo, isolated from the Chinese plant *Indigo feratinctoria*, have been shown to exhibit anti-cancer effects with lesser toxicity than conventional chemotherapeutic drugs [6]. Ethnomedical knowledge is one of the main strategies to select plant species in cancer drug discovery [7]. In Morocco, traditional medicine belongs to one of the world's oldest pharmacopoeia; in fact it disposes of a wide arsenal of plants remedies because of the natural diversity of the environment and flora [8]. The aim of this study was to evaluate the in vitro cytotoxic activity and cellular effects of organic extracts and fractions of four plants; *Inula viscosa*, *Ormenis eriolepis* (Asteraceae), *Retama monosperma* (Fabaceae) and *Marrubium vulgare* (Lamiaceae), all of them used in Moroccan traditional medicine. The plant selection was based on their reputation as folk

medicines in the treatment of tumors [9]; and related diseases and also on their previously reported phytochemical and biological properties (Table 1).

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Plant Material

The selected plants were collected in different areas of Morocco during the period 2007-2011 and were identified by Dr. M. Fennane from the Scientific Institute of Rabat (Table 1).

Table 1. Ethnobotanical data and some reported pharmacological activities of plants species used in this study

Plants species (family)	Trivial name	Place of collection	Part plant collected	Traditional use	Pharmacological activities and references
<i>Inula viscosa</i> L. Ait. (Asteraceae)	Magramane- Terhala	Ain atik Temara	Leaves	Skin diseases, treat cutaneous abscesses, wound healing, Tuberculosis, bronchial infections [9]	Antimicrobial activity [11]. Antifungal activity [12] Anti inflammatory effects [13]. Antitumoral activity [14], [15], [16].
<i>Retama monosperma</i> L. Bois (Fabaceae)	R'tm	Sidi- Boughaba Mahdia	Leaves	Purgative, vermifuge, antihelmintic, abortive and disinfectant [10]	Antitumoral activity [15], [16]
<i>Ormenis eriolepis</i> Coss. (Asteraceae)	Hellala	Ouarzazat	Aerial part	Stomachic, anthelmintic and antidiabetic [9]	Antibacterial activities [17] Antileishmania activities [18] Antifungic activity [19]
<i>Marrubium vulgare</i> L. (Lamiaceae)	Merriwut Merriwa	Temara	Aerial part	Antidiabetic, antidiarrheal, febrifuge, expectorant, antiicteric, treatophthalmia, otitis, abscesses feversandboils [9]	Antispasmodic [20] Antinociceptive [21] Analgesic [22] Antioxidant, Anti cholesterol [23] Antioedematogenic [24] Antidiabetic [25], [26], [27], [28].

2.2 Experimental Design

Plant extracts were screened across a panel of human cancer and a non-tumoral mouse fibroblast cell lines from different tumor origin (Table 2) to analyze the cytotoxic activity and determines the IC₅₀ of the most active extracts. In order to examine the cellular effects of the

most active extracts, we analyzed cell morphology, cell cycle distribution, cell death induction and caspase activity in LN229, SW620 and PC-3 cell lines.

Table 2. Cell lines used in the study related to the cells type and diseases

	Cell lines	Cell type	Disease
Human	LN-229	epithelial	Glioblastoma
	T98G	fibroblast	Glioblastomamultiforme
	U-87 MG	epithelial	Glioblastoma; Astrocytoma grade IV
	Jurkat	T lymphocyte	Acute T cell Leukemia
	JeKo-1	lymphoblast	non-Hodgkin lymphomas
	SW620	epithelial	Colorectal adenocarcinoma
	SW480	epithelial	Colorectal adenocarcinoma
	PC-3	epithelial	Prostate adenocarcinoma
	U2OS	epithelial	Osteosarcoma
Mice	NIH/3T3	Embryonic fibroblast	Normal

2.3 Preparation of Organic Extract

The collected parts of the selected plants were air-dried and mechanically ground to produce a fine powder. 200g of each plant powder was successively extracted using a Soxhlet apparatus with *n*-hexane (1.3L) and methanol (1.3L) to obtain hexanic extract and methanolic extract the resulting extracts were then evaporated by a Rotavapor to give dried extracts. The methanol concentrated extract was dissolved in distilled water and was successively extracted with dichloromethane (1.3L) and ethyl acetate (1.3L) to obtain dichloromethane fraction and ethyl acetate fraction. All extracts were evaporated by a Rotavapor and kept at -20°C until use.

2.4 Cell Culture

Jurkat and Jeko-1 cells were maintained in RPMI1640 with L-Glutamine and HEPES (Invitrogen, Carlsbad, CA). LN229, T98G, U87MG, SW620, SW480, U2OS, PC-3 and NIH3T3 cells were maintained in DMEM High Glucose (4.5 g/l) with L-glutamine (Invitrogen, Carlsbad, CA). All cells were grown in a humidified incubator at 37°C with 5% CO₂. RPMI and DMEM were supplemented with 10% heat inactivated foetal bovine serum and 100 units/ml penicillin/streptomycin (Invitrogen, Carlsbad, CA). All cell lines were subconfluently grown and passaged, routinely tested for mycoplasma contamination and subjected to frequent morphological tests and growth curve analysis as quality-control assessments. All cell lines were treated at a prophylactic concentration of 5 µg/ml with Plasmocin™ (InvivoGen, San Diego, CA).

2.5 Cell Viability Assays

The number of viable cells in culture was determined based on quantification of ATP, which signals the presence of metabolically active cells, using the Cell Titer-Glo Luminiscent assay kit (Promega, Madison, WI, USA) following the manufacturer's instructions. Briefly, cells were plated in 96-well plates, treated 24h later with 50 µg/ml of extracts dissolved in DMSO

for 48h followed by addition of Cell Titer-Glo reagent. Luminiscence was detected using a multi-well Synergy Mx scanning spectrophotometer (Biotek, Winooski, VT).

2.6 Cellular Morphology Analysis

Cells were plated in 6-well plates and treated with 50 µg/ml of the indicated extract for 24h and 48h. Representative images were collected under a light optic microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).

2.7 Cell Cycle Analysis

Cell cycle analysis was performed following propidium iodide staining. Briefly, trypsinized cells were washed in phosphate-buffered saline (PBS) and fixed in 70% ethanol. Fixed cells were then washed twice in PBS and DNA was stained with propidium iodide (50 µg/ml) in the presence of 50 µg/ml RNase A (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO), then analysed by flow cytometry using a FACS can (Coulter Epics XL-MSL; Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) and winMDI software.

2.8 Annexin V-FITC/Propidium Iodide FLOW Cytometric Analysis

Analysis of phosphatidylserine externalization in apoptotic cells was determined by Annexin-V-FITC (Invitrogen, Carlsbad, CA) staining, according to the manufacturer's instructions. Briefly, 2×10^5 cells were seeded in 6-well plates and treated with 50 µg/ml of the extracts for 48h. They were then collected and suspended in 100µl of Annexin V binding buffer. Following incubation with Annexin-V-FITC and propidium iodide for 15 min at room temperature in the dark, flow cytometry analysis was carried out using a FACScan (Coulter Epics XL-MSL; Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) and analyzed with the winMDI software.

2.9 Caspase Activity Assays

Caspase activity was determined by measurement of caspases 3 and 7 activity in control and treated cells with 50 µg/ml of indicated extracts plated in 96-well plates for 48h using the luminometric Caspase-Glo 3/7 assay (Promega) according to the manufacturer's protocol, using a Synergy HT multidetection microplate reader (Bio- Tek, Winooski, VT).

2.10 Statistical Analysis

Data are presented as means \pm SD of at least three different assays performed in triplicate. IC_{50} values and the statistical significance of differences by Student's t test were assessed using GraphPad Prism (GraphPad Software Inc. La Jolla, CA). Statistically significant differences are indicated by *** $P,0.001$, ** $P,0.01$ and * $P,0.05$.

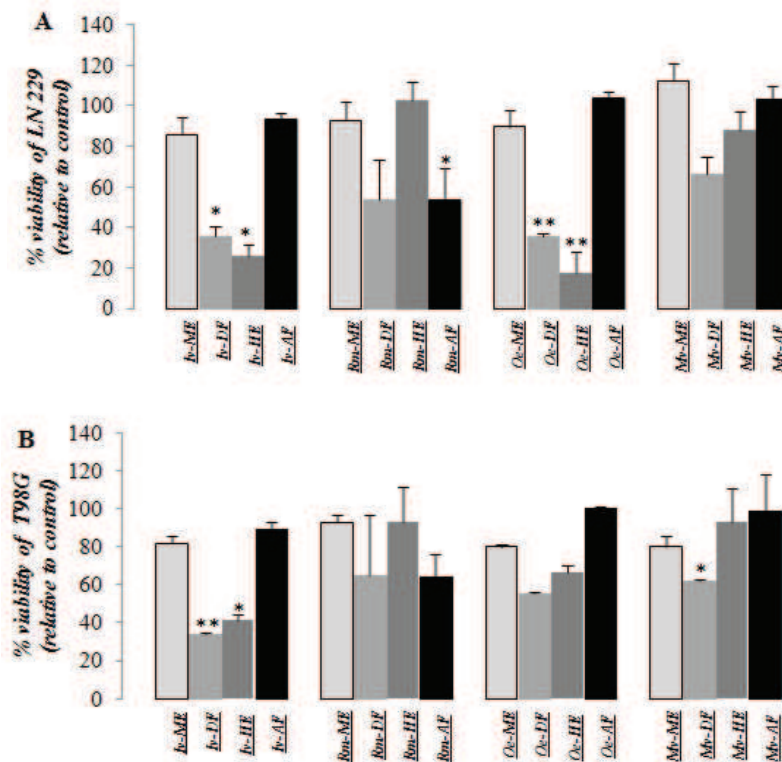
3. RESULTS AND DISCUSSION

For this study, four medicinal plants used for various diseases were harvested in different areas of Morocco. Four organic extracts of *Inula viscosa*, *Ormenis eiriolepis* (Asteraceae), *Retama monosperma* (Fabaceae) and *Marrubium vulgare* (Lamiaceae) were prepared. Table 1 summarizes the ethnobotanical data including botanical and local names, ethnomedical uses and the relevant plant parts employed together with their reported

pharmacological activity. The cytotoxic screening was performed on a panel of established human cancer cell lines including Glioblastoma Multiforme, Acute T cell Leukemia, Mantle Cell Lymphoma, Colon cancer, Prostate Cancer and Osteosarcoma cells. The NIH3T3 nontransformed mouse fibroblast cell line was employed as a control cell line to explore the cytotoxic effects of the extracts on nontumoral cells. Table 2 provides an overview of the characteristics of the cell lines used. In our screening program, all cell lines were initially treated with all sixteen extracts at a starting concentration of 50µg/ml to determine the selective activity of the extracts.

3.1 Selected Plant Extracts Show Cytotoxicity against Human Glioblastoma Cell Lines

The human glioblastoma cell lines LN229, T98G and U87MG were treated with the complete selection of plants extracts and fractions at 50µg/ml for 48h. Fig. 1 shows the percentage of cell viability compared to vehicle-treated cells. The results revealed that cell lines responded differently and each one was selectively sensitive to specific extracts. A significant reduction in cell viability was particularly observed in LN229 cells which were sensitive to *Iv-DF* (37.72%), *Iv-HE* (25.93%), *Oe-DF* (35.87%) and *Oe-HE* (17.81%) extracts (Fig. 1A), while T98G (Fig. 1B) and U87MG cell lines (Fig. 1c) were sensitive to *Iv-DF* (34.01%).and *Rm-DF* (34.01%).



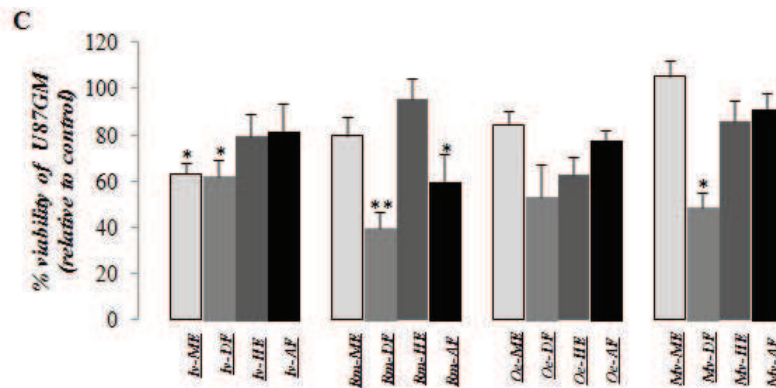


Fig. 1. Cell viability analysis of Glioblastoma cell lines

LN229 (A), T98G (B) and U87MG (C) cell lines were treated for 48 h with extracts from *Inula viscosa* (Iv), *Retama monosperma* (Rm), *Ormenis eiriolepis* (Oe) and *Marrubium vulgare* (Mv) with 50µg/ml of methanol (ME) and hexane extracts (HE) and dichloromethane (DF) and ethyl acetate (AF) fractions. Results represent the mean \pm SD of at least 3 independent experiments indicating the percentage of viable cells relative to vehicle-treated (control) cells. The differences between control and the indicated plants extracts treatment are statistically significant (Student t-test * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ respectively).

In Glioblastoma cells several key regulatory elements of cell homeostasis and apoptosis are altered at different levels, such as the status of the tumor suppressor p53 [29]. Previous characterization of p53 genotype and drug sensitivity of human cancer cell lines has revealed that cells with mutant or absent p53 are less sensitive than cells with wild-type p53 to the majority of clinically-used anticancer agents [30]. Interestingly, our results show that p53-mutant LN229 cells are the most sensitive glioblastoma cell line to the tested plant extracts, in comparison with U87MG cells, expressing wild-type p53.

3.2 Acute T-cell Leukemia and Mantle Cell Lymphoma Cell Lines Show Increased Sensitivity to the Tested Extracts

Jurkat (Acute T-cell leukemia) and Jeko-1 (Mantle Cell Lymphoma) cells were next evaluated with the panel of extracts. Both cell lines were very sensitive to at least one extract of each of the four medicinal plants selected. Fig. 2 reveals that, particularly, the dichloromethane fraction and hexanic extract of each plant are very effective on Jurkat (Fig. 2A) and Jeko-1 cells (Fig. 2B) with a percentage of viability lower than 6%.

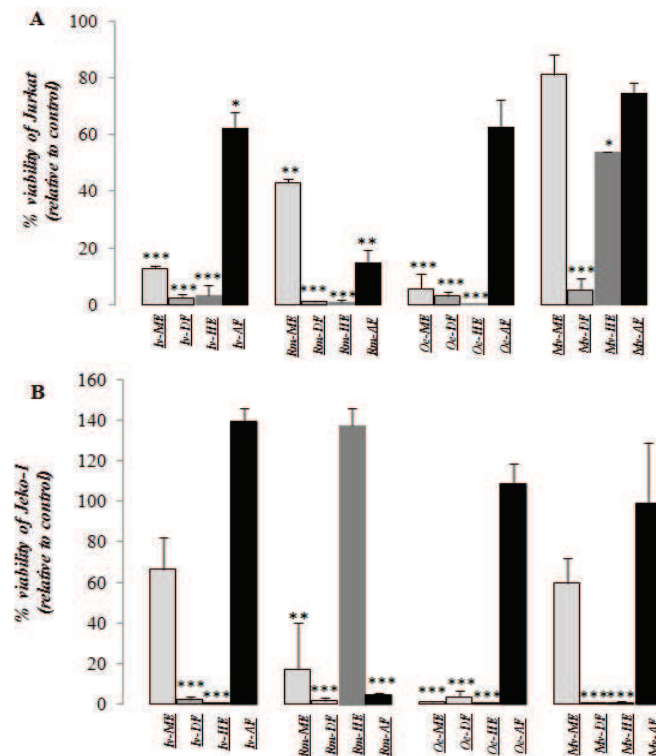


Fig. 2. Cell viability analysis of acute T-cell leukemia and mantle cell lymphoma cell lines

Jurkat (A) and *Jeko-1* (B) cells were treated and the data obtained represented as in Fig. 1. Results represent the mean \pm SD of at least 3 independent experiments indicating the percentage of viable cells relative to vehicle-treated (control) cells. The differences between control and the indicated plants extracts treatment are statistically significant (Student t-test * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ respectively).

Both hematological malignancies are characterized by a deregulated expression of apoptosis-related molecules. Overexpression of anti-apoptotic oncogenes is one of the mechanisms that decrease the efficacy of therapeutic agents [31]. Our results indicate that both oncohematological cell lines tested were very sensitive to several extracts. More studies are required to elucidate which survival pathways are affected.

3.3 Effects on Colorectal Cancer Cell Lines

The cell viability analysis of colorectal cancer cell lines (Fig. 3) indicates that three extracts induced clear significant effects on SW620 cells. *Iv-DF* (28, 35%), *Iv-HE* (35, 38%) and *Mv-DF* (33, 11%) (Fig. 3A), whereas *Iv-HE* (22, 63%) and *Oe-HE* (35, 38%) were active against SW480 cells (Fig. 3B). Colon cancer becomes resistant to apoptosis as it acquires metastatic potential [32]. SW480 and SW620 colon cancer cells were established from the same patient at different stages of tumor progression [32]. Metastatic SW620 colon cancer cells have undergone multiple gene product modifications resulting in resistance to cell death [32]. Interestingly, our data indicate that SW620 cells were more sensitive, suggesting

that our extracts may contain molecules with high therapeutic potential for multidrug resistant cell lines.

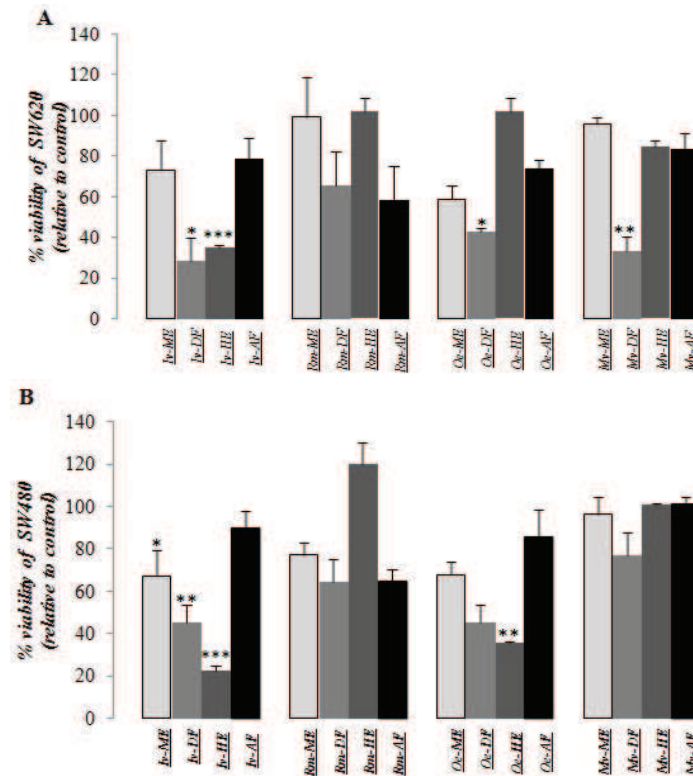


Fig. 3. Cell viability analysis of colon cancer cell lines

*SW620 and SW480 colorectal cancer cells were treated and the data obtained represented as in Fig. 1. Results represent the mean \pm SD of at least 3 independent experiments indicating the percentage of viable cells relative to vehicle-treated (control) cells. The differences between control and the indicated plants extracts treatment are statistically significant (Student t-test * P <0.05; ** P <0.01 and *** P <0.001 respectively).*

3.4 Analysis of Extract Activity against Prostate Cancer and Osteosarcoma Cells

The effect of the different extracts was also tested in the PC-3 Prostate cancer cell line and in U2OS Osteosarcoma cells, which were exposed to the same conditions described above (Fig. 4). Fig. 4A illustrates that only *Iv-HE* (1,2%) and *Oe-HE* (8,2%) were active against PC-3 cells, although they both induced a dramatic effect on these cells. Unfortunately, conventional chemotherapeutic drugs have a discreet effect on prostate cancers and do not provide a marked survival advantage for patients [33]. In contrast, in the Osteosarcoma cell line U2OS (Fig. 4B) almost none of the extracts exerted a significant activity at the tested concentration, except *Rm-AF* (42, 3%). This could be explained by the fact that U2OS cell line is chromosomally highly altered.

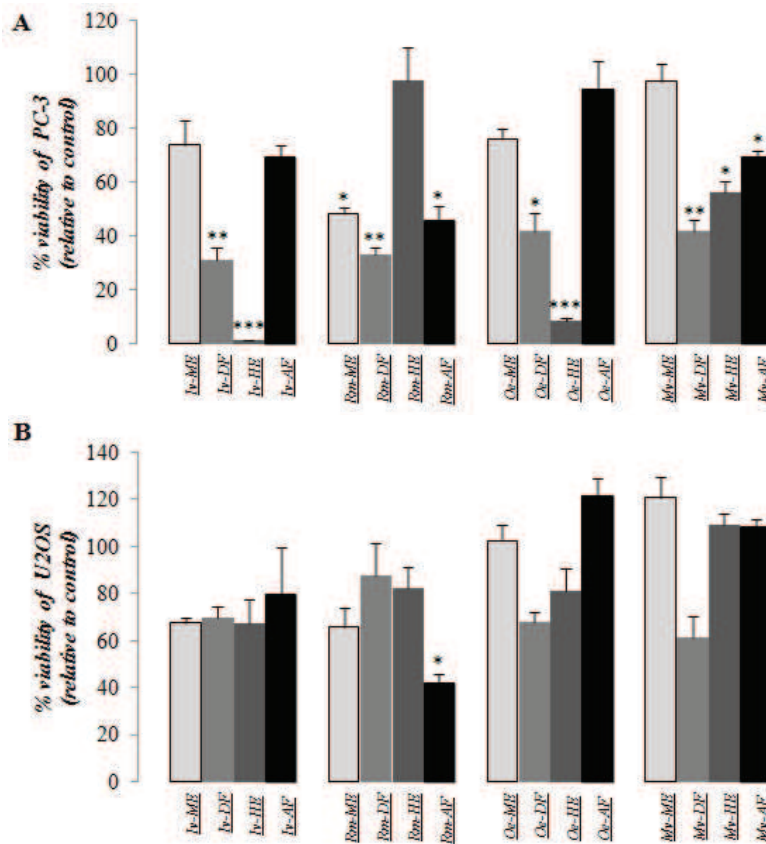


Fig. 4. Cell viability analysis of prostate cancer and osteosarcoma cell lines
 Prostate cancer PC-3 (A) and osteosarcoma U2OS (B) cells were treated and the data obtained represented as in Fig. 1. Results represent the mean \pm SD of at least 3 independent experiments indicating the percentage of viable cells relative to vehicle-treated (control) cells. The differences between control and the indicated plants extracts treatment are statistically significant (Student t-test * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ respectively).

3.5 Effects on Non-Transformed Cells

The murine fibroblast cell line NIH3T3 was chosen to test the toxicity of all the extracts. Interestingly, all the extracts with the exception of *Iv-AF* (26,32%), *Oe-AF* (52,59%) and *Mv-HE* (65,78%) were non-toxic for these cells at the concentration of 50 μ g/ml (Fig. 5; note the different scale of the y-axis). Taken together, the low cytotoxic profile exerted in both NIH3T3 and U2OS cells indicates that these extracts do not act as indiscriminate cellular poisons, rather reflecting a specific cell type-based.

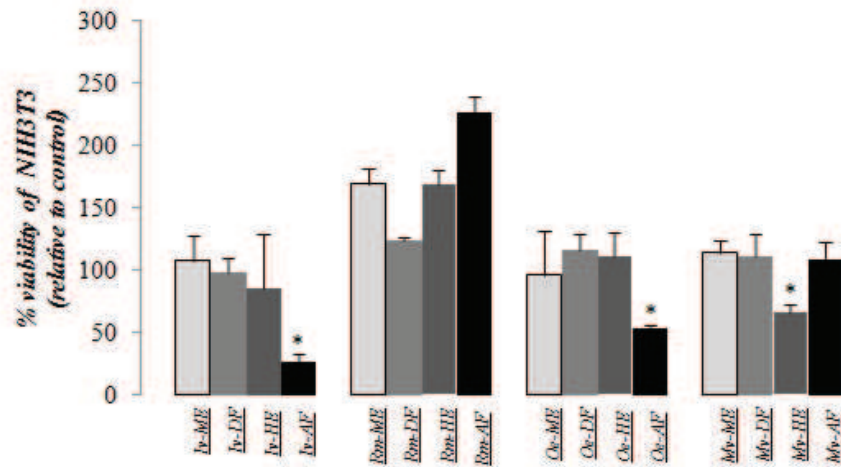


Fig. 5. Cell viability analysis of mouse embryonic fibroblast cell line

*NIH3T3 mouse fibroblasts were treated and the data obtained represented as in Fig. 1. Results represent the mean \pm SD of at least 3 independent experiments indicating the percentage of viable cells relative to vehicle-treated (control) cells. The differences between control and the indicated plants extracts treatment are statistically significant (Student t-test * $P < 0.05$).*

3.6 Analysis of the IC₅₀ of the Most Active Extracts in Sensitive Cell Lines

According to NCI (National Cancer Institute, U.S.A.) recommendations to consider a crude extract promising for further purification, IC₅₀ values need to be lower than 30 μ g/mL in order to discover and develop potential anticancer natural compounds [35,36]. For this purpose increasing concentrations ranging from 1 μ g/ml to 50 μ g/ml of selected extracts were then tested and the IC₅₀ values were calculated. All tested extracts were able to reduce cell viability in a dose-response manner after treatment. All determined IC₅₀ values for the most active extracts in sensitive cell lines are included in Table 3. In most cases the IC₅₀ values were under 30 μ g/ml, and specifically *Iv-DF*, *Iv-HE*, *Rm-DF*; *Rm-HE*; *Oe-DF*; *Oe-HE* and *Mv-DF* showed the most promising activities in this assay.

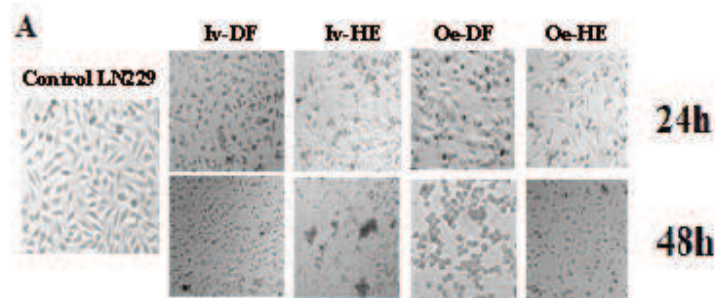
Table 3. IC₅₀ values of extracts (ME, HE) and fractions (DF, AF) of *Inula viscosa* (Iv), *Retamamonosperma* (Rm), *Ormeniseirirolepis* (Oe) and *Marrubiumvulgare* (Mv) against selected cell lines. Jurkat, Jeko-1, LN229, T98G, U87MG, SW620, SW480, U2OS and PC-3 were exposed to increasing concentration from different extracts range 1µg/ml to 50 µg/ml for 48h. The IC₅₀ values were determined only for the most active and non toxic extracts exhibiting a significant cell death effect using GraphPad Prism 5 software and Data are expressed as IC₅₀ ± SD of three independent experiments

Organic Extracts	IC ₅₀ (µg/ml) ±SD								
	Jurkat	Jeko-1	LN229	T98	U87	SW620	SW480	U2OS	PC-3
<i>Inula viscosa</i> L. Ait.									
<i>Iv-ME</i>	25,81±2,92	>50	NA	NA	>50	NA	>50	>50	NA
<i>Iv-DF</i>	11,16±6,95	8,68±3,1	17,66±5,4	20,50±2,21	>50	23,30±6,33	>50	>50	20,15±9,09
<i>Iv-HE</i>	7,52±4,57	<1	5,9±3,57	>50	NA	8,40±3,31	10,36±6,59	>50	6,53±1,42
<i>Iv-AF</i>	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<i>Retama monosperma</i> L.Bois.									
<i>Rm-ME</i>	>50	21,47±3,05	NA	NA	NA	NA	NA	>50	>50
<i>Rm-DF</i>	9,12±4,20	24,77±4,85	>50	>50	47,85±4,08	NA	>50	NA	45,41±4,6
<i>Rm-HE</i>	34,44±3,38	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<i>Rm-AF</i>	20,22±10,51	12,01±5,14	>50	>50	>50	>50	>50	NA	>50
<i>Ormenis erirolepis</i> Coss.									
<i>Oe-ME</i>	27,45±4,03	<1	NA	NA	NA	>50	>50	NA	NA
<i>Oe-DF</i>	11,33±5,37	13,63±1,67	21,70±2,37	>50	>50	>50	>50	>50	>50
<i>Oe-HE</i>	9,81±8,44	<1	41,67±1,98	>50	>50	NA	19,31±4,88	NA	12,59±4,69
<i>Oe-AF</i>	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<i>Marrubium vulgare</i> L.									
<i>Mv-ME</i>	NA	>50	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<i>Mv-DF</i>	11,54±2,83	6,04±2,77	>50	>50	>50	10,58±4,37	NA	>50	>50
<i>Mv-HE</i>	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<i>Mv-AF</i>	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA

NA: Not active; >50: above 50µg/ml; <1: below 1µg/ml

3.7 Analysis of the Cellular Effects of the Most Active Extracts in LN229 Glioblastoma Cells

Four extracts have shown a robust growth inhibitory activity against LN229 cells: *Iv-DF*, *Iv-HE*, *Oe-DF* and *Oe-HE*. We used these extracts at 50 µg/ml to treat LN229 cells for 24 and 48h and investigate their cellular effects. We observed that all extracts clearly induced cell shrinkage and floating cell formation, which are suggestive of cell death (Fig. 6A). We next performed flow cytometry following propidium iodide staining to quantitate the cell cycle distribution after treatment (Fig. 6B). *Iv-DF* causes a cell cycle arrest in G1 at 24h with a significant increase (46,17%) of the sub- G1 population at 48h. Similarly, *Iv-HE* induced a cell cycle arrest in G1 at 24h and increased the proportion of sub-G1 cells (43,22%) at 48h. Interestingly, *Oe-DF* seems to induce a G2/M arrest at 24h, followed by an increase in sub-G1 cell population (24,2%) at 48h (Fig. 6B), whereas *Oe-HE* mainly exerts a combination of G1 arrest and sub- G1 increase at 24h, with this latter population further increasing at 48h up to 42% (Fig. 6B). We next performed double Annexin V/Propidium Iodide staining following treatment with the selected extracts for 24h and 48h. In agreement with our previous results, cells shifted upon treatment in a time-dependent manner to regions mainly indicative of early apoptosis, late apoptosis and necrosis, showing a total percentage of cell death higher than 50% (Fig. 6C). We next performed caspase activity assays upon treatment of LN229 cells with 50 µg/ml of each extract for 48h. *Oe-DF* seemed to induce the higher increase in caspase activity, although a parallel increase in the proportion of apoptotic, as opposed to necrotic, cells was not detected by flow cytometry. This discrepancy may reflect an underestimation of the percentage of apoptotic cells detected by Annexin V staining. Altogether, the results obtained with LN229 cells are in agreement with our previous data showing that these cells were the most sensitive Glioblastoma cell line, compared with T98G and U87MG cells. Therefore, active compounds from *Inula viscosa* and *Ormenis eiriolepis* extracts may be attractive therapeutic agents; specially in Glioblastoma cells that present multiple alterations at different levels including loss of heterozygosity (LOH), inactivating mutations, methylation or altered expression of cancer-relevant signaling intermediates such as bcl-2 family members, inhibitors of apoptosis (IAPs) or receptor tyrosine kinases like the epidermal growth factor receptor(EGFR) and their down-stream effectors [30].



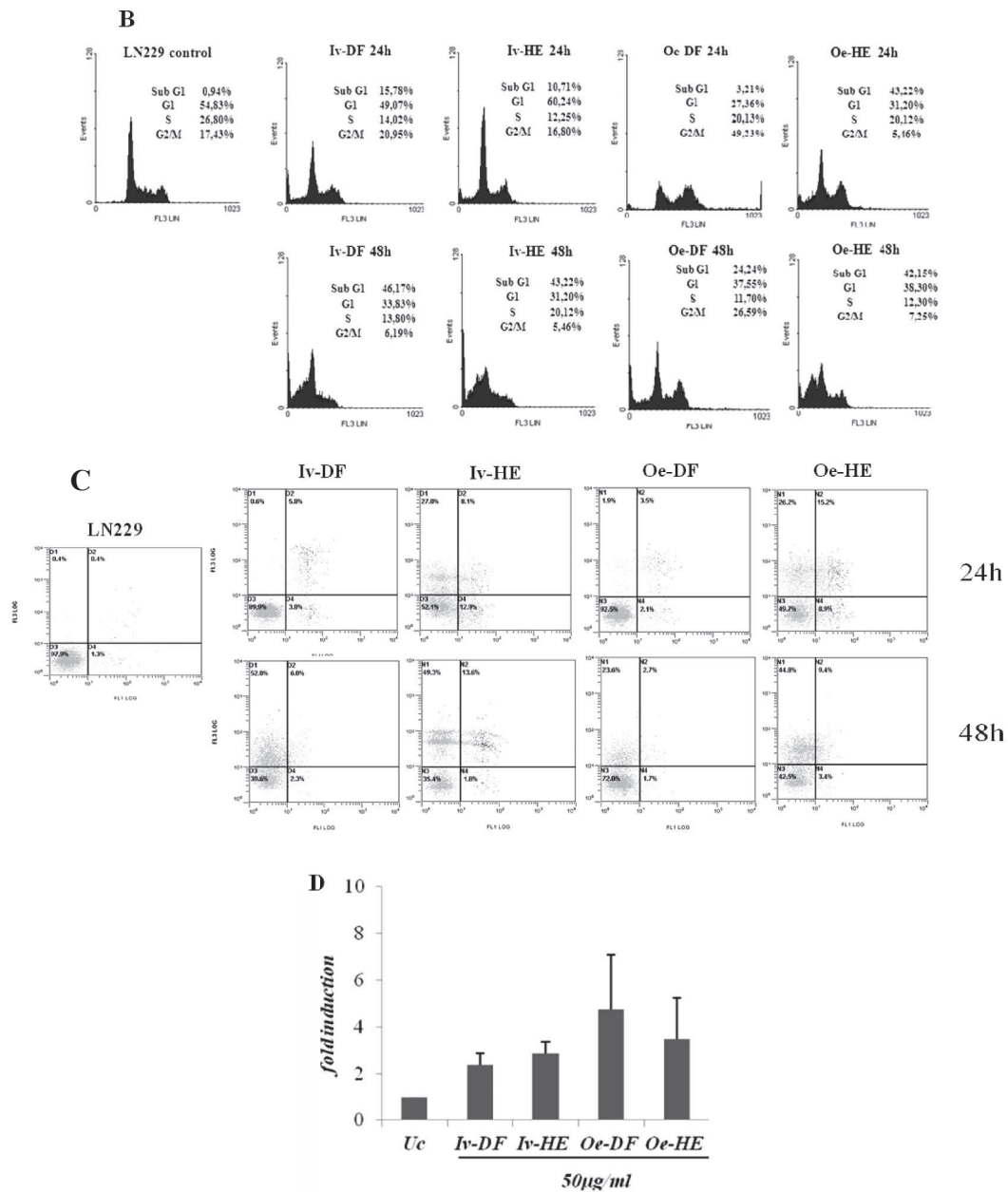
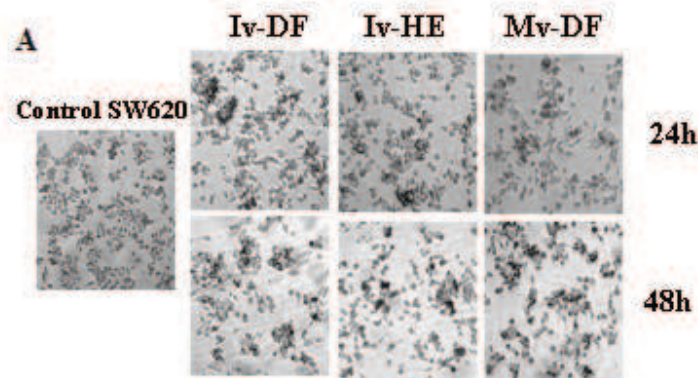


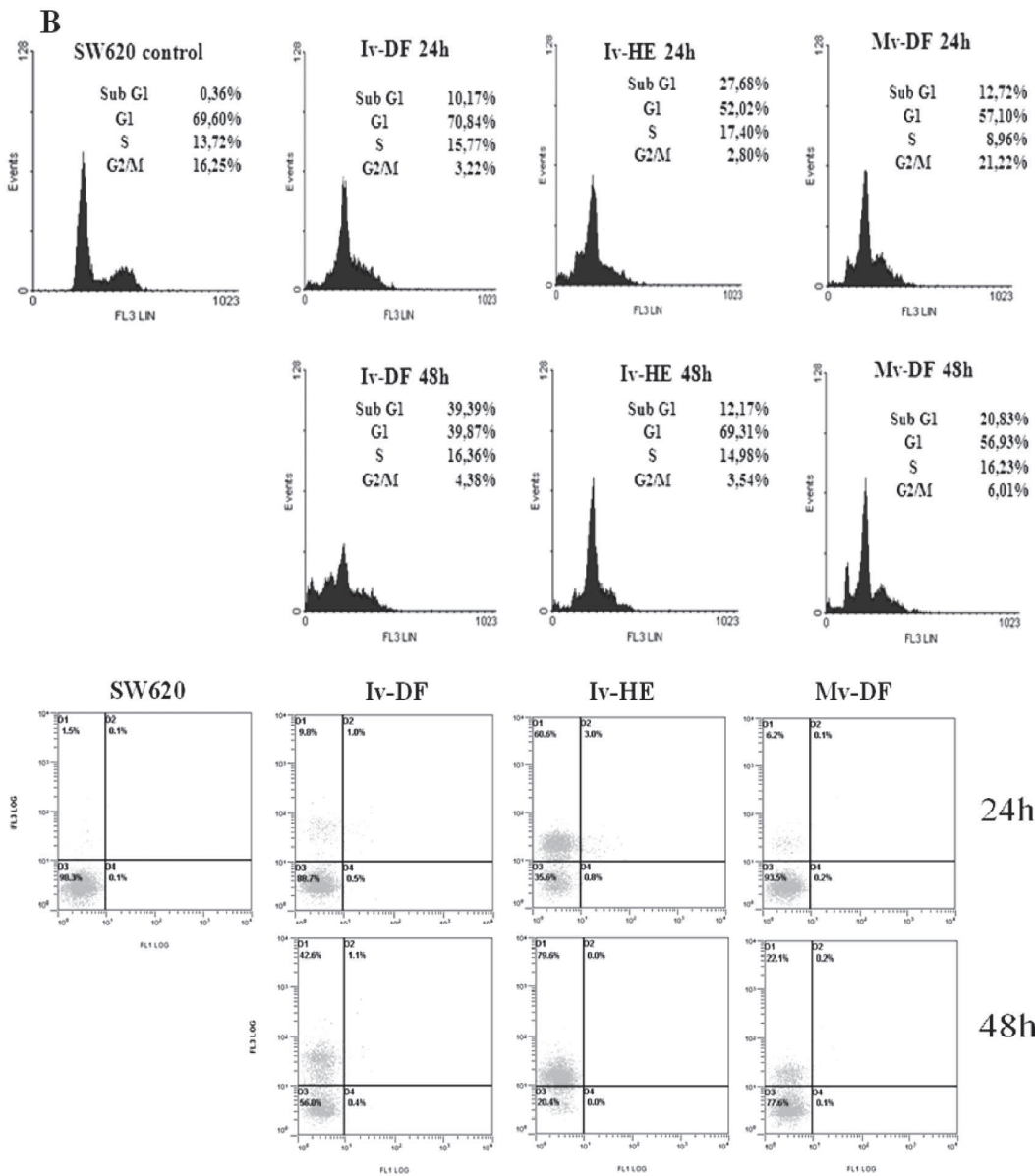
Fig. 6. Cellular effects analysis of the most active extracts on LN229 glioblastoma cell line

(A) images of morphological changes of LN229 cells under treatment with 50µg/ml of Iv-DF, Iv-HE, Oe-DF and Oe-HE for 24h and 48h (magnification 5×) (B) cell cycle analysis of LN229 cells treated same as in (A). (C) cell death analysis of LN229 at 24h and 48h under the same conditions as in (A) and (B). (D) caspase activity analysis of LN229 cells treated with Iv-DF, Iv-HE, Oe-DF and Oe-HE for 48h. Results show fold induction respective to untreated cells. Data is means ± SEM from three independent determinations performed in duplicate.

3.8 Analysis of the Cellular Effects of the Most Active Extracts in SW620 Colon Cancer Cells

Viability assays in colon cancer cells indicated that SW620 cells were the most sensitive to *Iv-DF*, *Iv-HE* and *Mv-DF*, which all exhibited clear cytotoxic effects (Fig. 3A). We thus used the same experimental approach as with LN229 cells to investigate if those extracts may affect SW620 cell morphology, cell cycle distribution and cellular death. Cell shrinkage and floating cell formation were observed upon treatment suggesting that *Iv-DF*, *Iv-HE* and *Mv-DF* were inducing cell death (Fig. 7A). Cell cycle analysis upon propidium iodide staining revealed that *Iv-DF*, *Iv-HE* and *Mv-DF* were able to induce cell cycle arrest in G1 at 24h and a clear increase in the sub-G1 population at 48h, with 39%, 12% and 21% cells in sub-G1, respectively (Fig. 7B). Annexin V/Propidium Iodide staining was then performed to better analyze cellular death. Treatment with all extracts dramatically increased cellular necrosis, without the presence of a detectable apoptotic cell fraction as indicated by the low numbers of Annexin V-positive cells (Fig. 7C). The percentages of necrotic cells at 48h were 42%, 79% and 22% for *Iv-DF*, *Iv-HE* and *Mv-DF*, respectively. Surprisingly, however, *Iv-HE* specifically induced a dramatic induction of caspase activity (30-fold) which again suggests that the detection of Annexin V-positive cells in these assays may not accurately reflect caspase-dependent apoptosis (Fig. 7D). In comparison with SW480 cells, their non metastatic counterpart, SW620 cells have acquired genetic defects both in the intrinsic and extrinsic pathways of apoptosis and are thus more resistant to apoptosis induced by CH-11, cisplatin, and ionizing radiation, respectively [32]. In our study SW620 cells were sensitive to *Inula viscosa* and *Marrubium vulgare* extracts, suggesting that those plants may lead to new therapeutic molecules that could challenge the acquired mechanisms leading to tumor cell resistance to current cytotoxic drugs in colon cancer.





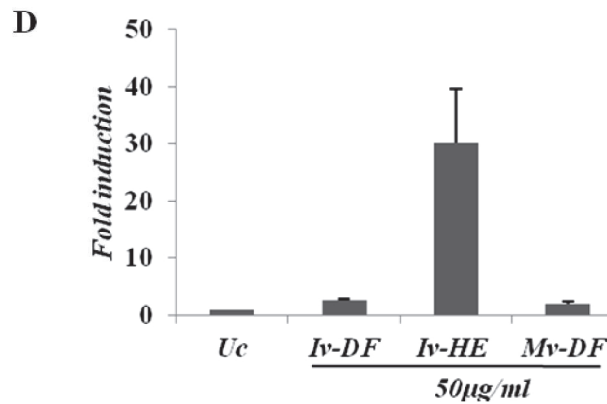
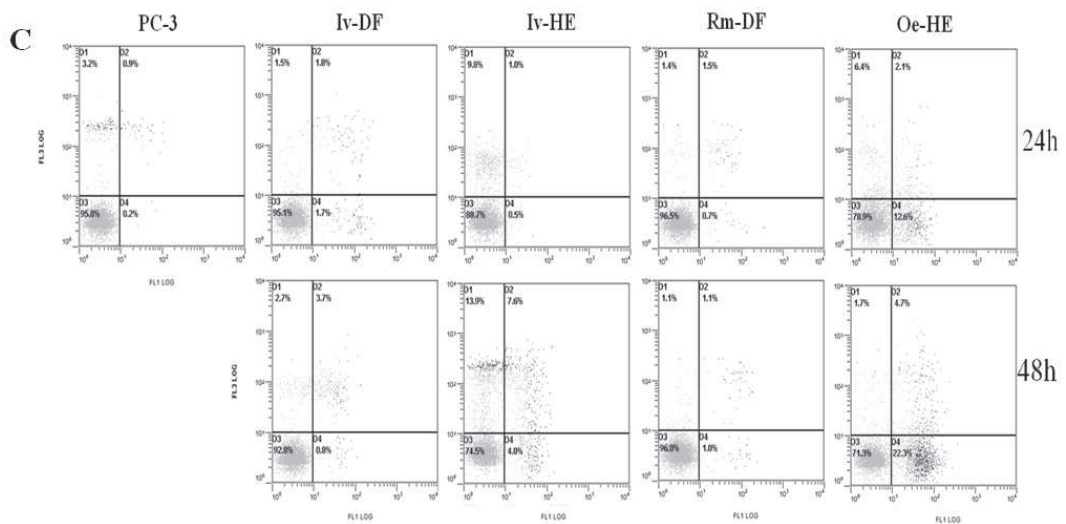
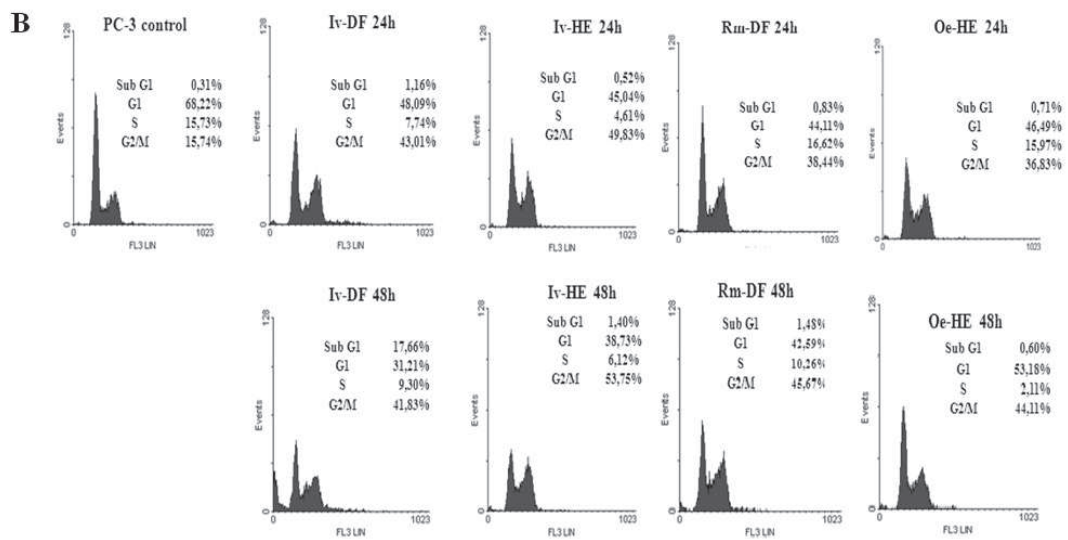
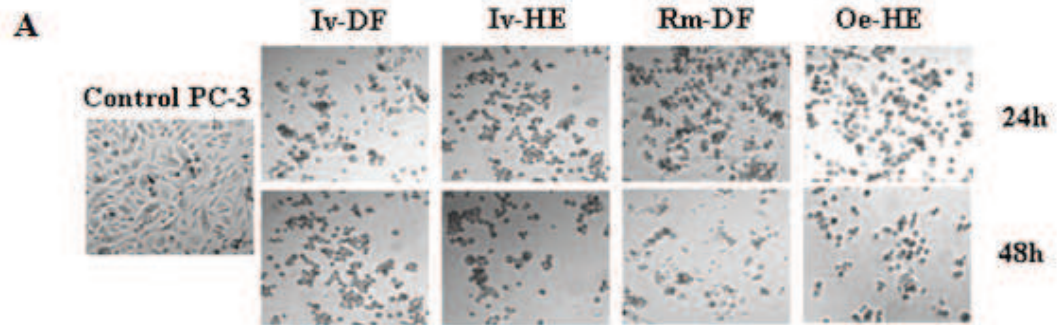


Fig. 7. Cellular effects analysis of the most active extracts on SW620 colon cancer cells

(A) images of morphological changes of SW620 cells under treatment with 50µg/ml of *Iv-DF*, *Iv-HE* and *Mv-DF* for 24h and 48h (magnification 5×) (B) cell cycle analysis of SW620 cells treated same as in (A). (C) cell death analysis of SW620 at 24h and 48h under the same conditions as in (A) and (B). (D) caspases activity analysis of SW620 cells treated with *Iv-DF*, *Iv-HE* and *Mv-DF* for 48h. Results show fold induction respective to untreated cells. Data is means ± SEM from three independent determinations performed in duplicate.

3.9 Analysis of the Cellular Effects of the Most Active Extracts in PC-3 Prostate Cancer Cells

The same experiments were next performed in PC-3 prostate cancer cells to figure out if the most active extracts in viability assays could also affect cell morphology, cell cycle progression and cell death. Morphological changes were observed in PC-3 cells upon treatment with *Iv-DF*, *Iv-HE*, *Rm-DF* and *Oe-HE* extracts for 24h and 48h. Rounding up and cell shrinking, with a clear reduction of cellular and nuclear volume were observed (Fig. 8A). Flow cytometry analysis of cell cycle distribution and cell death upon *Iv-DF*, *Iv-HE*, *Rm-DF* and *Oe-HE* treatment revealed that the four extracts induced a clear G2/M arrest which was already detectable at 24h leading at 48h to a G2/M cell population of 41,83%, 53,75%, 48,67% and 44.11%, respectively (Fig. 8B). The results obtained with Annexin V/Propidium iodide indicate that only *Iv-HE* and, more robustly, *Oe-HE* were able to induce cell death in PC-3 cells, reaching at 48h a percentage of 25% and 29% of cell death, respectively. Interestingly, in *Oe-HE*-treated cells the results primarily indicate apoptotic cell death. Accordingly, the results of caspase assays showed the highest increase of caspase activity in *Iv-HE* and *Oe-HE* treated cells. PC-3 prostate cancer cells are androgen-insensitive and apoptosis-resistant; they survive and eventually develop into androgen-refractory and metastatic clones [33]. Our data suggest that *Inula viscosa* and *Ormenis eiriolepis* extracts exert growth inhibition, cell cycle arrest and apoptosis induction and could contain active compounds with the potential to effectively target apoptosis extrinsic and intrinsic pathways. Therefore, more studies are clearly needed to clarify the molecular mechanisms involved.



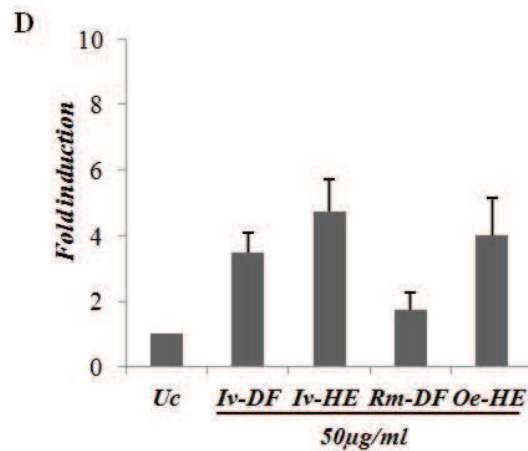


Fig. 8. Cellular effects analysis of the most active extracts on PC-3 prostate cancer cells

(A) images of morphological changes of PC-3 cells under treatment with 50µg/ml of *Iv-DF*, *Iv-HE*, *Rm-DF* and *Oe-HE* for 24h and 48h (magnification 5×). (B) cell cycle analysis of PC-3 cells treated same as in (A). (C) cell death analysis of PC-3 at 24h and 48h under the same conditions as in (A) and (B). (D) caspases activity analysis of PC-3 cells treated with *Iv-DF*, *Iv-HE*, *Rm-DF* and *Oe-HE* for 48h. Results show fold induction respective to untreated cells. Data is means ± SEM from three independent determinations performed in duplicate.

4. CONCLUSION

In agreement with our data, the antitumoral activity of the hexanic extract and the dichloromethane fraction of *Inula viscosa* and *Retama monosperma* were also observed in the cervical cancer cell lines HeLa and SiHa, where they exhibited a high level of cytotoxicity by inducing apoptosis following pro-caspase activation, Bcl-2 expression and PARP cleavage [16]. The chemical composition of *Inula viscosa* and *Retama monosperma* extracts has already been investigated. Numerous studies have revealed the presence of a sesquiterpene acid (isocostic acid) and two sesquiterpenes lactones: tomentosin and inuviscolide, as major compounds in *Inula viscosa* extract [16]. Indeed, this plant is a source of a number of bioactive compounds as well as flavonoids [13] and sesquiterpene derivatives [37]. However, the dichloromethane fraction of *Retama monosperma* revealed the presence of five known quinolizidine alkaloids together with sparteine, L-methyl cytosine, 17-oxosparteine, lupanine and anagyrene [16]. The *Retama* species have been reported to contain alkaloids [38] and flavonoids [39]. Accordingly, 15 quinolizidine and 3 dipiperidine alkaloids were isolated from the leaves of flowering plants of *R. monosperma* collected from Morocco [40]. The compositional analysis of the aqueous infusion of *Marrubium vulgare* has revealed the presence of fifteen metabolites, all belonging to the class of polyphenols. Particularly, seven flavonoids have been detected, together with 5-caffeoylquinic (chlorogenic) acid in small amounts; the extract is dominated by the presence of a series of complex molecules, characterized as verbascoside (acteoside) derivatives [26]. However, the chemical constituents of *Ormenis eirirolepis* still remain to be investigated. The selected species are reported to have both preventive and therapeutic properties. According to our findings, the use of these plants by traditional healers for the treatment of cancer patients

could have some scientific support. Because cancer drug-resistance is a significant health problem, the screening of medicinal plants for new anticancer agents remains a priority in drug discovery programs. The herein reported biological activity of medicinal plants used in traditional Moroccan medicine provides a starting point for forthcoming studies to determine the molecular basis of their activity and to identify the chemical compounds. Within the most active extracts responsible for their antitumoral effects.

CONSENT

Not applicable.

ETHICAL APPROVAL

Not applicable.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to Joan Seoane (Institut de Recerca Hospital Vall d'Hebron, Barcelona), for the gift of human glioma cell lines and to Beatriz Martínez (CNIO, Madrid) and Joan Gil (IDIBELL, Barcelona) for the gift of Jeko-1 and Jurkat cells, respectively. L.B. is a fellow of the Averroes mobility Programme (European Commission). P.V. is a "Ramón y Cajal" Fellow (Ministerio de Ciencia e Innovación, Spain).

DECLARATION OF COMPETING INTEREST

The authors declare that there are no competing interests.

REFERENCES

1. Ameenah Gurib-Fakim. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine*. 2006;27(1):1-93.
2. João B. Calixto, Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: A personal view, *Journal of Ethnopharmacology*. 2005;100(1–2):131-134.
3. Kabbaj F, Meddah B, Cherrah Y, Faouzi E. Ethnopharmacological profile of traditional plants used in Morocco by cancer patients as herbal therapeutics. *Phytopharmacology*. 2012;2(2):243-256.
4. Mark SB. The role of natural product chemistry in drug discovery. *Journal of Natural Products*. 2004;67(12):2141–2153.
5. David JN, Gordon MC, Kenneth MS. The influence of natural products upon drug discovery. *Natural Product Reports*. 1999;17(3):215–234.
6. Arvind Saklani, Samuel K. Kutty. Plant-derived compounds in clinical trials. *Drug Discovery Today*. 2008;13(3–4):161-171.
7. Lautié E, Quintero R, Fliniaux M-A, Villarreal M-L. Selection methodology with scoring system: Application to Mexican plants producing podophyllotoxin related lignans. *Journal of Ethnopharmacology*. 2008;120(3):402-412.
8. Jouad H, Haloui M, Rhiouani H, El Hilaly J, Eddouks M. Ethnobotanical survey of medicinal plants used for the treatment of diabetes, cardiac and renal diseases in the North centre region of Morocco (Fez–Boulemane), *Journal of Ethnopharmacology*, October 2001;77 (2–3):175-182.

9. Jamal Bellakhdar, Renée Claisse, Jacques Fleurentin, Chafique Younos, Repertory of standard herbal drugs in the Moroccan pharmacopoeia. *Journal of Ethnopharmacology*. 1991;35(2):123-143.
10. Benrahmoune I.Z. & Dubruille C., 2003. Invitation à l'amour des plantes. Guide floristique illustré de la réserve biologique de Sidi Bou Ghaba. Editions Scriptura, Rabat; 2003.
11. Maoz M, Neeman I. Effect of *Inula viscosa* extract on chitin synthesis in dermatophytes and *Candida albicans*. *Journal of Ethnopharmacology*. 2000;71(3):479-482.
12. Cafarchia C, De Laurentis N, Milillo MA, Losacco V, Puccini V, Antifungal activity of essential oils from leaves and flowers of *Inula viscosa* (Asteraceae) by Apulian region. *Parassitologia*. 2002;44:153-156.
13. Hernández V, Carmen Recio M, Máñez S, Rosa Giner M, Ríos J-L, Effects of naturally occurring dihydroflavonols from *Inulaviscosa* on inflammation and enzymes involved in the arachidonic acid metabolism, *Life Sciences*. 2007;81(6):480-488.
14. Rozenblat S, Grossman S, Bergman M, Gottlieb H, Cohen Y, Dovrat S, Induction of G2/M arrest and apoptosis by sesquiterpene lactones in human melanoma cell lines, *Biochemical Pharmacology*. 2008;75(2):369-382.
15. Merghoub N, Benbacer L, Amzazi S, Morjani H, El mzibri M, Cytotoxic effect of some Moroccan medicinal plant extracts on human cervical cell lines, *Journal of Medicinal Plants Research*. 2009;3:1045–1050.
16. Benbacer L, Merghoub N, El Btaouri H, Gmouh S, Attaleb M, Morjani H, Amzazi S and El Mzibri M. Antiproliferative Effect and Induction of Apoptosis by *Inulaviscosa* L. and *Retamamonosperma* L. Extracts in Human Cervical Cancer Cells, *Topics on Cervical Cancer With an Advocacy for Prevention*, Dr. R. Rajamanickam (Ed.), 2012; ISBN: 978-953-51-0183-3.
17. El Hanbali F, Mellouki F, Akssira M, Balasquez A. Etude Comparative des Compositions Chimiques et de l'Activité Antibactérienne des Huiles Essentielles de *Chamaemelumeriolepis* Maire et *ChamaemelumAfricana*J. & Four. 1er CongrèsMaroco-Espagnol sur la Chimie Organique et 4ème Rencontre Andalou-Marocaine sur la Chimie des Produits Naturels 16-18 sept 2004.
18. El Hanbali F, Mellouki F, Akssira M, Balasquez A. Etude Activité antileishmaniennes huiles essentielles de deux camomilles: *Ormeniseriolepis* et *Ormenisafricana*. International Congress On Medicinal Plants, Errachidia 16-19 March 2005.
19. Hamani, Rouhi R, Idrissi Hassani LM. Étude anatomique et screening phytochimique de trois espèces du sud marocain: *Chamaecytisus mollis*, *Retama monosperma* et *Hesperolaburnum platycarpum*. Détermination du potentiel antifongique des extraits aqueux. The 3rd International Symposium on Aromatic and Medicinal Plants (SIPAM3). The first International symposium on Bioactive Molecules (CIMB1) Oujda – Morocco 29- 30 May 2008.
20. Schlemper V, Ribas A, Nicolau M, CechinelFilho V, Antispasmodic effects of hydroalcoholic extract of *Marrubiumvulgare* on isolated tissues, *Phytomedicine*. 1996;3(2):211-216.
21. De Jesus R.A.P, Cechinel-Filho V, Oliveira A.E, Schlemper V, Analysis of the antinociceptive properties of marrubiin isolated from *Marrubiumvulgare*, *Phytomedicine*. 2000;7(2):111-115.
22. Meyre-Silva C, Yunes R.A, Schlemper V, Campos-Buzzi F, Cechinel-Filho V, Analgesic potential of marrubiin derivatives, a bioactive diterpene present in *Marrubium vulgare* (Lamiaceae), *Il Farmaco*. 2005;60(4):321-326.

23. Berrougui H, Isabelle M, Cherki M, Khalil A, Marrubium vulgare extract inhibits human-LDL oxidation and enhances HDL-mediated cholesterol efflux in THP-1 macrophage, Life Sciences. 2006;80(2):105-112.
24. Stulzer HK, Tagliari MP, Zampirolo JA, Cechinel-Filho V, Schlemper V, Antioedematogenic effect of marrubiin obtained from Marrubiumvulgare, Journal of Ethnopharmacology. 2006;108(3):379-384.
25. Elberry AA, Harraz FM, Ghareib SA, Gabr SA, Nagy AA, Methanolic extract of Marrubiumvulgare ameliorates hyperglycemia and dyslipidemia in streptozotocin-induced diabetic rats, International Journal of Diabetes Mellitus, Available online 5 2011; ISSN 1877-5934, 10.1016/j.ijdm.2011.01.004.
26. Boudjelal A, Henchiri C, Siracusa L, Sari M, Ruberto G, Compositional analysis and in vivo anti-diabetic activity of wild Algerian Marrubiumvulgare L. infusion, Fitoterapia. 2012;83(2):286-292.
27. Erdogan Orhan I, Belhattab R, Şenol FS, Gülpinar AR, Hoşbaş S, Kartal M. Profiling of cholinesterase inhibitory and antioxidant activities of *Artemisia absinthium*, *A. herba-alba*, *A. fragrans*, *Marrubium vulgare*, *M. astranicum*, *Origanum vulgare* subsp. glandulosum and essential oil analysis of two Artemisia species, Industrial Crops and Products. 2010;32(3):566-571.
28. Pukalskas A, Rimantas Venskutonis P, Salido S, de Waard P, van Beek T A, Isolation, identification and activity of natural antioxidants from horehound (*Marrubium vulgare* L.) cultivated in Lithuania, Food Chemistry. 2012;130(3):695-701.
29. Eisele G, Weller M. Targeting apoptosis pathways in glioblastoma, Cancer Letters. 2013;332(2):335-45.
30. Baguley BC, Hicks KO, Wilson WR, Chapter 15 - Tumor cell cultures in drug development, In: Bruce C. Baguley and David J. Kerr, Editor(s), Anticancer Drug Development, Academic Press, San Diego. 2002;269-284.
31. Nathalie Droin, Leslie Guéry, Naïma Benikhlef, Eric Solary, Targeting apoptosis proteins in hematological malignancies, Cancer Letters.2013;332(2):325-34.
32. Huerta S, Heinzerling JH, Anguiano-Hernandez YM, Huerta-Yepez S, Lin J, Chen D, Bonavida B, Livingston EH. Modification of Gene Products Involved in Resistance to Apoptosis in Metastatic Colon Cancer Cells: Roles of Fas, Apaf-1, NFκB, IAPs, Smac/DIABLO, and AIF, Journal of Surgical Research. 2007;142(1):184-194.
33. Huang YT, Huang DM, Chueh SC, Teng CM, Guh JH, Alisol B acetate, a triterpene from *Alismatis rhizoma*, induces Bax nuclear translocation and apoptosis in human hormone-resistant prostate cancer PC-3 cells, Cancer Letters. 2006;231(2):270-278.
34. Jain R, Kumar Jain S, Screening of in vitro cytotoxic activity of some medicinal plants used traditionally to treat cancer in Chhattisgarh state, India, Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. 2011;1(2):147-150.
35. de Mesquita M L, Ede Paula J, Pessoa C, de Moraes MO, L Veras, Grougnet R, et al, Cytotoxic activity of Brazilian Cerrado plants used in traditional medicine against cancer cell lines, Journal of Ethnopharmacology. 2009;123(3):439-445.
36. Steenkamp V, Gouws MC, Cytotoxicity of six South African medicinal plant extracts used in the treatment of cancer, South African Journal of Botany. 2006;72(4):630-633.
37. Fontana G, La Rocca S, Passannanti S, Paternostro MP. Sesquiterpene compounds from *Inulaviscosa*, Natural Product Research. 2007;20-21(9):824-827.
38. Abdel Halim OB, Abdel Fattah H, Halim A.F, Murakoshi I. Comparative chemical and biological studies of the alkaloidal content of Lygos species and varieties growing in Egypt, Acta Pharmaceutica Hungarica. 1997;67:241-247.

39. Kassem M, Mosharrafa SA, Saleh NA, Abdel-Wahab SM. Two new flavonoids from *Retama raetam*. *Fitoterapia*. 2000;71:649-654.
40. Touati D, Allain P, Pellecuer J, Fkih-Tetouani SA. Alkaloids from *Retama monosperma* ssp. *Eumonosperma*. *Fitoterapia*. 1996;67:49-52.

© 2013 Belayachi et al.; This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Peer-review history:

The peer review history for this paper can be accessed here:
<http://www.sciencedomain.org/review-history.php?iid=223&id=13&aid=1293>

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Retama monosperma n-hexane extract induces cell cycle arrest and extrinsic pathway-dependent apoptosis in Jurkat cells

Lamia Belayachi^{1,3}, Clara Aceves-Luquero¹, Nawel Merghoub³, Youssef Bakri³, Silvia Fernández de Mattos^{1,2}, Saaïd Amzazi³ and Priam Villalonga^{1,2*}

Abstract

Background: *Retama monosperma* L. (Boiss.) or *Genista monosperma* L. (Lam.), locally named as "R'tam", is an annual and spontaneous plant belonging to the Fabaceae family. In Morocco, *Retama* genus is located in desert regions and across the Middle Atlas and it has been widely used in traditional medicine in many countries. In this study, we show that *Retama monosperma* hexane extract presents significant anti-leukemic effects against human Jurkat cells.

Methods: Human Jurkat cells, together with other cell lines were screened with different concentrations of *Retama monosperma* hexane extract at different time intervals. Growth inhibition was determined using luminescent-based viability assays. Cell cycle arrest and apoptosis were measured by flow cytometry analysis. Combined caspase 3 and 7 activities were measured using luminometric caspase assays and immunoblots were performed to analyze expression of relevant pro- and anti-apoptotic proteins. GC-MS were used to determine the chemical constituents of the active extract.

Results: *Retama monosperma* hexane extract (Rm-HE) showed significant cytotoxicity against Jurkat cells, whereas it proved to be essentially ineffective against both normal mouse fibroblasts (NIH3T3) and normal lymphocytes (TK-6). Cytometric analysis indicated that Rm-HE promoted cell cycle arrest and apoptosis induction accompanied by DNA damage induction indicated by an increase in p-H2A.X levels. Rm-HE induced apoptosis was partially JNK-dependent and characterized by an increase in Fas-L levels together with activation of caspases 8, 3, 7 and 9, whereas neither the pro-apoptotic nor anti-apoptotic mitochondrial membrane proteins analyzed were significantly altered. Chemical identification analysis indicated that α -linolenic acid, campesterol, stigmasterol and sitosterol were the major bioactive components within the extract.

Conclusions: Our data suggest that bioactive compounds present in Rm-HE show significant anti leukemic activity inducing cell cycle arrest and cell death that operates, at least partially, through the extrinsic apoptosis pathway.

Keywords: *Retama monosperma*, Acute T-cell leukemia, Cytotoxicity, Apoptosis, Bioactive compounds

* Correspondence: priam.villalonga@uib.es

¹Cancer Cell Biology Group, Institut Universitari d'Investigació en Ciències de la Salut (IUNICS), Edifici Científicotècnic, Ctra Km 7,5, Valldemossa, Illes Balears, Spain

²Departament de Biologia Fonamental, Institut Universitari d'Investigació en Ciències de la Salut (IUNICS), Universitat de les Illes Balears, Edifici Científicotècnic, Ctra Km 7,5, Valldemossa, Illes Balears, Spain

Full list of author information is available at the end of the article

Background

Medicinal plants used in traditional or folk medicine and their active compounds, used in conventional medicine, constitute the basis for the treatment of many diseases including cancer, one of the major causes of mortality throughout the world. Statistics have estimated that cancer will cause 83.2 million deaths between 2005 and 2015 [1]. Clinical applications have, for many decades, demonstrated their therapeutic effects. In fact, 40% of all available anticancer drugs are natural products or natural product-derived mimics, such as paclitaxel (from *Taxus brevifolia*), camptothecin (from *Camptotheca acuminata*), podophyllotoxin (from *Podophyllum emody*) and vinblastine (from *Catharanthus roseus*), which are widely-used anticancer agents [2].

Retama monosperma L. (Boiss.) or *Genista monosperma* L. (Lam.), locally named as "R'tam", is an annual and spontaneous plant belonging to the Fabaceae family. The genus *Retama* includes four species with a geographic distribution in the Mediterranean area, North Africa, and the Canary Islands [3]. In Morocco, *Retama* genus is largely located in desert regions and the Middle Atlas [4]. This plant is used in traditional medicine in many countries, as purgative, vermifuge, antihelmintic, and abortive [5]. Moreover, several studies have investigated *Retama* genus for various pharmacological effects, including hypoglycemic and diuretic [4,6], cytotoxic [7,8], antioxidant, antiviral [9], antihypertensive [10], anti-inflammatory [11] and antitumor activities [12].

T-cell malignancies are highly aggressive neoplastic disorders that are generally resistant to conventional chemotherapy with a high rate of relapse and currently no efficient targeted therapies available for these diseases [13]. In order to extend the treatment options and ultimately improve survival for patients with leukemia, it is imperative to increase the therapeutic arsenal of targeted therapies involving apoptotic cell death, that has been proposed as an efficient mechanism by which malignant tumor cells can be removed upon treatment with chemotherapeutic drugs without accompanying a local damaging inflammatory response [14].

In chemotherapeutic drug-induced apoptosis of tumor cells, three different death signaling pathways can lead to apoptosis: the extrinsic death receptor-dependent pathway [15], the intrinsic mitochondria-based pathway [16], and the intrinsic endoplasmic reticulum (ER) stress-mediated pathway [17].

In this study, we show that *Retama monosperma* hexane extract presents selectively an anti-leukemic effect, as indicated by its dramatic effects on Jurkat, but not other human cancer cells of various origins. We describe herein the major cellular effects of Rm-HE leading to cell cycle arrest and extrinsic pathway-dependent apoptosis. Finally, we suggest potential bioactive compounds

responsible for these effects upon the determination of the chemical components of the extract by GC/MS.

Methods

Plant material

Leaves of *Retama monosperma* L. (Boiss.) were collected in March 2009 from Sidi Boughaba reserve in Mehdiarabat (Morocco). The plant was identified at the Scientific Institute of Rabat by Prof. M. Fennane, and the specimen was deposited in the Scientific Institute herbarium under the voucher specimen reference N° RAB78140.

Preparation of hexanic extract

The powder of the dried plant was extracted successively using a Soxhlet apparatus with *n*-hexane to obtain hexanic extract (Rm-HE). The resulting extract was then evaporated by a Rotavapor to obtain the dried extract and was kept at -20°C until use.

Cell culture

Jurkat, TK6 and Jeko-1 cells were maintained in RPMI-1640 with L-Glutamine and HEPES (Biological Industries Ltd., Kibbutz Beit Haemek, Israel). LN229, T98G, U87MG, SW620, SW480, U2OS, PC-3 and NIH3T3 cells were maintained in DMEM High Glucose (4.5 g/l) with L-glutamine (Invitrogen, Carlsbad, CA). All cells were grown in a humidified incubator at 37°C with 5% CO₂. RPMI and DMEM were supplemented with 10% heat inactivated foetal bovine serum and 100 units/ml penicillin/streptomycin (Biological Industries Ltd., Kibbutz Beit Haemek, Israel). All cell lines were subconfluent grown and passaged, routinely tested for mycoplasma contamination and subjected to frequent morphological tests and growth curve analysis as quality-control assessments. All cell lines were treated at a prophylactic concentration of 5 µg/ml with Plasmocin™ (Invivo Gen, San Diego, CA).

Drugs and inhibitors

Doxorubicin (Developmental Therapeutics Program, Division of Cancer Treatment and Diagnosis, National Cancer Institute, Bethesda, MA), Q-v-Ophand and SP600125 (Calbiochem, Darmstadt, Germany) were added directly to the media at the indicated concentration and cells were harvested or analyzed at the time points indicated in the figure legends.

Cell viability assays

The number of viable cells in culture was determined based on quantification of ATP, which signals the presence of metabolically-active cells, using the Cell Titer-Glo luminiscent assay kit (Promega, Madison, WI, USA), which is quicker than other commonly-used methods to measure the number of viable cells (such as MTT, alamar Blue® or Calcein-AM) that require prolonged incubation steps to

enable the cells' metabolic machinery to convert indicator molecules into a detectable signal. Following the manufacturer's instructions, the cells were plated in 96-well plates, treated 24 h later with extracts dissolved in DMSO for the indicated times and concentrations followed by addition of Cell Titer-Glo reagent. Luminiscence was detected using a multi-well Synergy Mx scanning spectrophotometer (Biotek, Winooski, VT).

Cell cycle analysis

Cell cycle analysis was performed using propidium iodide staining. Briefly, cells were washed in phosphate-buffered saline (PBS) and fixed in 70% ethanol. Fixed cells were then washed twice in PBS and stained in propidium iodide (50 µg/ml) in the presence of 50 µg/ml RNase A (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), then analyzed by flow cytometry using a FACScan (Coulter Epics XL-MSL; Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) and winMDI software.

Annexin V-FITC/propidium iodide flow cytometric analysis

Analysis of phosphatidylserine externalization in apoptotic cells was determined by an Apo Target Annexin-V-FITC Apoptosis kit (Invitrogen, Carlsbad, CA), according to the manufacturer's instructions. 2×10^6 cells were seeded in 6-well plates and treated with 50 µg/ml of Rm-HE for 48 h. They were then collected and suspended in 100 µl of Annexin V-binding buffer. 5 µL of Annexin-V-FITC and 10 µL of propidium iodide were added and incubated 15 min at room temperature in the dark. Flow cytometry analysis was carried out using a FACScan (Coulter Epics XL-MSL; Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) and winMDI software.

Caspase activity analysis

Enzymatic activity of caspases was determined by measurement of caspases-3 and 7 activity by means of the luminometric Caspase-Glo 3/7 assay (Promega, Madison, WI, USA) according to the manufacturer's protocol using a Synergy HT multi-detection microplate reader (Bio-Tek, Winooski, VT, USA).

Gel electrophoresis and immunoblotting

Cells were harvested in a buffer containing 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA and 1% (v/v) Triton X-100 plus protease and phosphatase inhibitors. Protein content was measured by the Bradford procedure. Cell lysates were electrophoresed in SDS-polyacrylamide gels. After electrophoresis the proteins were transferred to Immobilon-P strips (Millipore, Billerica, MA) for 2 h at 60 V. The sheets were pre-incubated in TBS (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl), 0.05% Tween 20 and 5% defatted milk powder for 1 h at room temperature and then incubated for 1 h at room temperature in TBS,

0.05% Tween 20, 1% BSA and 0.5% defatted milk powder containing the appropriate antibodies: pH2A.X (#9718, 1:1000), Cleaved Caspase-3 (#9464, 1:1000), Cleaved Caspase-7 (#8438, 1:1000), Cleaved Caspase-9 (#7237, 1:1000), Caspase-8 (#9746, 1:1000), Bcl-2 (#2870, 1:1000), Bcl-xl (#2764, 1:1000) and Mcl-1 (#5453, 1:1000) from Cell Signaling (Beverly, MA); Bax (BD610391, 1:1000) and Bad (BD610982, 1:1000) from BD Transduction Laboratories™ (California, USA); Bim (22-40, Millipore, Billerica, MA, 1:1000); Fas-L (sc-6237, 1:1000), JNK (sc-137018, 1:1000) and pJNK (sc-135642, 1:1000) from Santa Cruz (Santa Cruz, CA) and β-tubulin (T0198, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, 1:4000). After washing in TBS, 0.05% Tween 20, the sheets were incubated with a peroxidase-coupled secondary antibody (Dako, Glostrup, Denmark, 1/2000 dilution,) for 1 h at room temperature. After incubation, the sheets were washed twice in TBS, 0.05% Tween 20 and once in TBS. The peroxidase reaction was visualized by the enhanced chemiluminescence detection system (Millipore, Billerica, MA).

Derivatization for GC/MS analysis

For this purpose 100 µl of the extract was dried with N₂ gas, then 100 µl of derivatization agent (N, O-bis(trimethylsilyl) trifluoroacetamide with 1% of trimethylchlorosilane) was added, mixed and heated 10 minutes at 60°C.

Gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) analysis

The GC-MS analyses of *Retama monosperma* hexanic extract (Rm-HE) were carried out at the Instrumental Technical Services of the "Estación Experimental del Zaidín" (CSIC, Granada, Spain). Briefly, 1 µl of the derivative solution was injected in a Varian 450GC coupled to 240 Ion Trap Mass Spectrometer as detector. The injection conditions were: splitless mode with 1 minute duration pulse, the injector temperature was 250°C; the He column flow was 1 ml/minute in a capillary column (Varian Factor Four VF-5 ms 30 m×0.25 mm×0.25 µm). For Mass spectrometry conditions, the EI ionization was 70 eV, the transfer line was at 280°C and the Trap at 240°C, mass range acquisition was from m/z 50 to m/z 500 and cared in Full Scan mode. Qualitative analysis of compounds was based on the comparison of their spectral mass and their relative Retention time with those of NIST08 mass spectra database and Kovats RI on the chromatograms recorded in Full Scan or in SIM mode using the characteristics ions. Quantitative analysis was realized by integration of peaks and calculated as percent of total identified area on the TIC chromatograms.

Statistical analysis

Data are presented as means ± SD of at least three different assays performed in triplicate. IC₅₀ value and the

statistical significance of differences by Student's *t* test were assessed using GraphPad Prism (GraphPad Software Inc. La Jolla, CA). Statistically significant differences are indicated by ****P*, 0.001, ***P*, 0.01 and **P*, 0.05, respectively.

Results

Analysis of the cytotoxic activity of Rm-HE against human cancer cell lines

To investigate the potential effect of Rm-HE extract against cancer cells, various human cancer cell lines of different origin were screened to assess the cytotoxic activity of Rm-HE. Non-tumoral cell lines NIH3T3 and TK6 were also tested as control. Interestingly, Rm-HE

extract was dramatically effective against Jurkat cells whereas it induced only modest or negligible effects in the other tested cell lines (Figure 1A). We next performed a dose-response (0-50 µg/ml) viability assay in Jurkat cells in order to calculate the IC₅₀ for this cell line, using NIH3T3 and TK6 cells as controls. The obtained cell growth curves in Figure 1B prove that Rm-HE exerts a specific dose-dependent inhibitory effect on cell proliferation in Jurkat cells (IC₅₀ = 34.44 ± 3.88 µg/ml). In agreement with our previous results, the extract exhibited no effects on NIH3T3 and TK6 (non-transformed cells lines) and a dose of 40 µg/ml was chosen for further mechanistic studies in Jurkat cells.

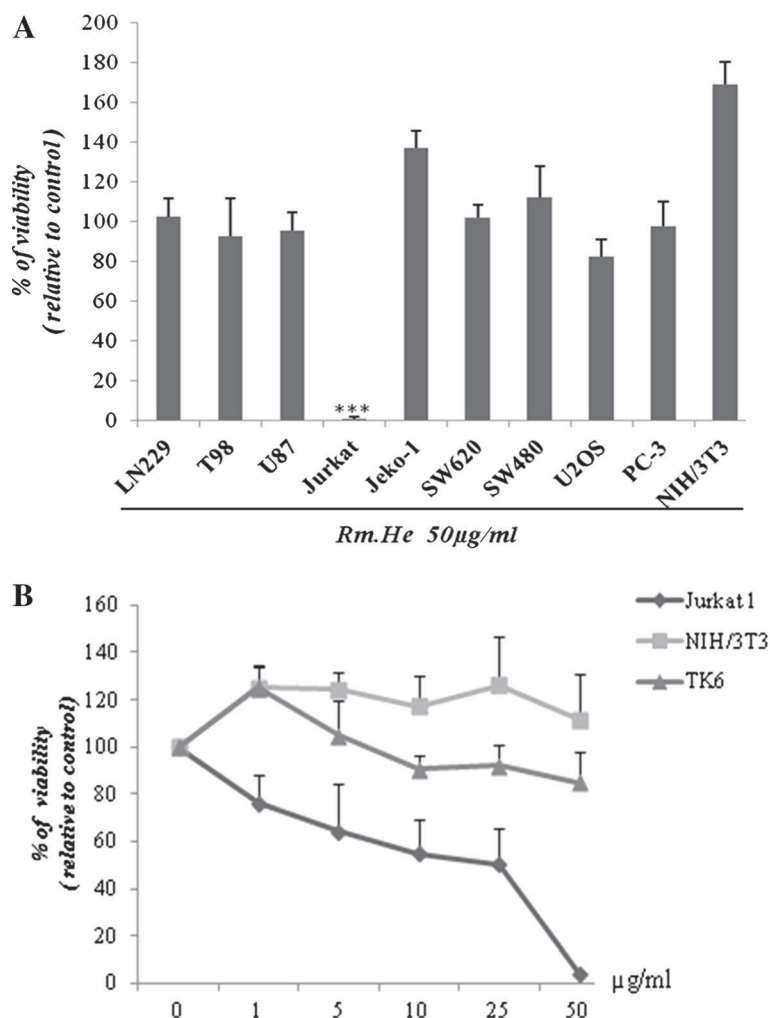
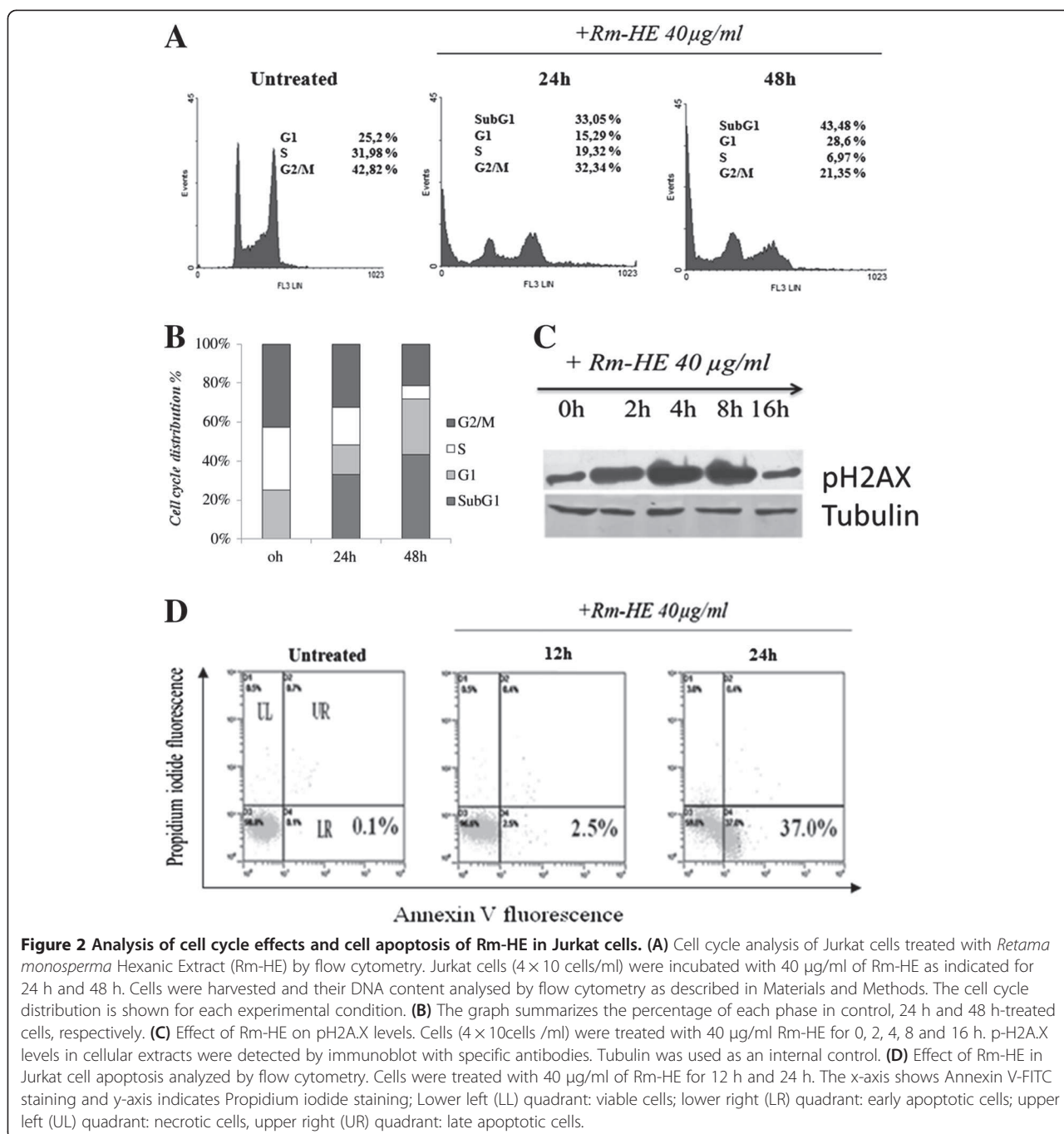


Figure 1 Analysis of the cytotoxic activity of Rm-HE against human cancer cell lines. **(A)** Cytotoxic activity of *Retama monosperma* Hexanic Extract (Rm-HE) in a panel of cancer and non-transformed cell lines. LN229, T98, U87, Jurkat, Jeko-1, SW620, SW480, U2OS, PC-3 and NIH3T3 cells were incubated for 48 h with 50 µg/ml of (Rm-HE); Results represent the mean ± SD of at least 3 independent experiments indicating the percentage of viable cells relative to vehicle-treated (control) cells. **(B)** Dose-response analysis of *Retama monosperma* Hexanic Extract (Rm-HE) and IC₅₀ determination on Jurkat cells. Cells were treated with Rm-HE for 48 h at different concentrations ranging from 1 to 50 µg/ml; IC₅₀ value (µg/ml) was determined graphically from the viability curves, NIH3T3 and TK6 cells were used as control. Data are expressed as means ± SD of triplicate determinations.

Analysis of cell cycle effects of Rm-HE in Jurkat cells

In order to investigate how Rm-HE affects cell cycle distribution, Jurkat cells were treated with a concentration of 40 µg/ml for 24 and 48 h. As shown in Figures 2A and B, Rm-HE effectively reduced the proportion of S-phase cells while strongly increasing the proportion of sub-G1 cells (33.05% at 24 h and 43.48% at 48 h). To elucidate the possible mechanism of Rm-HE induced sub-G1 population, we analyzed the presence of DNA damage by

monitoring p-H2A.X levels. As shown in Figure 2C, increased levels of p-H2A.X were detected in Jurkat cells after only 4 h, suggesting that Rm-HE treatment induced DNA damage. Double Annexin V/Propidium Iodide staining was next performed in order to analyze and quantify cellular death. Upon exposure to Rm-HE, a time-dependent increase in the number of Annexin V-positive cells (37%) at 24 h was observed (Figure 2D). Taken together, these data indicate that Rm-HE induces



DNA damage accompanied by cell cycle arrest and apoptosis in Jurkat cells.

Effects of Rm-HE on apoptosis induction in Jurkat cells

Activation of aspartate-specific cysteine proteases also known as caspases is a crucial biochemical event during apoptosis [18,19]. Different caspases are activated during the initiation and execution phases of apoptosis. To investigate if Rm-HE-induced apoptosis is caspase dependent, we performed caspase 3/7 activity assays upon treatment of Jurkat cells with 40 µg/ml Rm-HE for 24 and 48 h. Doxorubicin (1 µM), a conventional drug inducing caspase-dependent apoptosis was used as positive control. Figure 3A showed that both treatments similarly increased caspase activity up to 3-fold upon 48 h. Accordingly, the presence of a specific caspase inhibitor (QVD-Oph) significantly reduced the cytotoxic effects of both Doxorubicin and Rm-HE on cell viability (Figure 3B).

Different caspases are activated by proteolytic cleavage at the initiation and execution phases of apoptosis [20]. To determine the effect of Rm-HE on the activation of caspases, we monitored cleavage of caspases 8, 7, 3 and 9 in Jurkat cells following Rm-HE treatment at different time-points. Results of western blot analysis shown in Figure 3C indicate that Rm-HE treatment caused a strong activation of caspase 8 (detected at 4 h) together with the activation of caspases 7, 3 and 9 in a time-dependent manner. This observation confirms that Rm-HE-induced apoptosis is caspase-dependent and suggests that it operates via the extrinsic pathway.

Characterization of the effects of Rm-HE on apoptotic signaling mediators

Two major pathways are known to mediate cellular apoptosis, death receptor-dependent (extrinsic) and mitochondrial (intrinsic) pathways. Since our results suggest that apoptosis induced by Rm-HE operates via the extrinsic

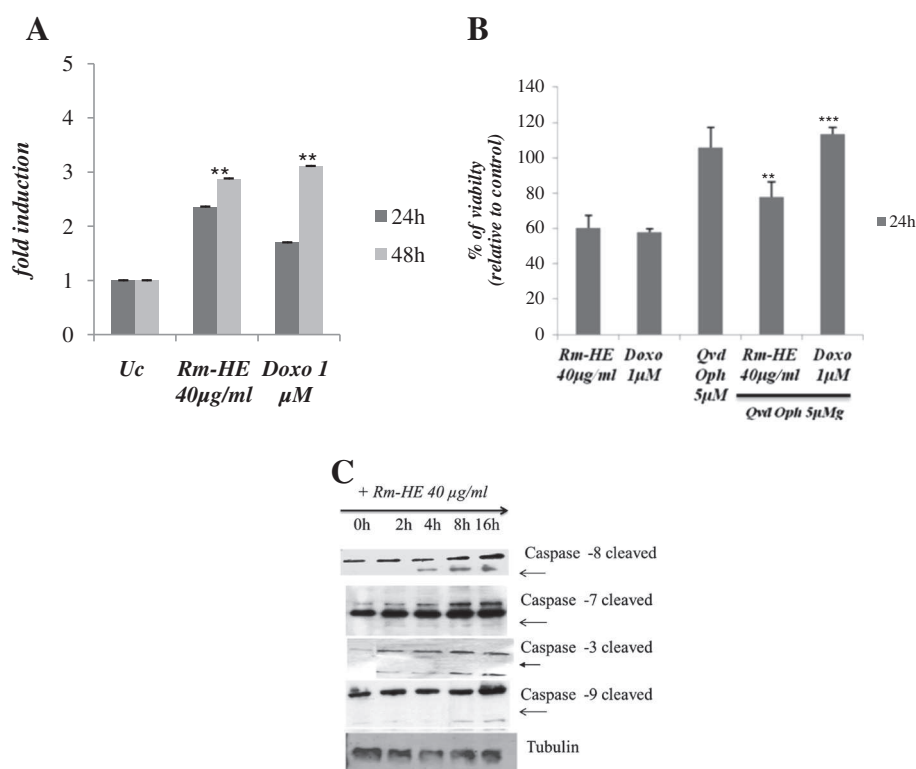


Figure 3 Effects of Rm-HE on apoptosis induction and activation of caspases in Jurkat cells. **(A)** Effect of *Retama monosperma* Hexanic Extract on caspase activity induction on Jurkat cells. Jurkat cells were treated with Rm-HE (40 µg/ml) or 1 µM Doxorubicin (positive control) for 24 h and 48 h and caspase activity was measured as indicated in Materials and Methods. Results indicate the average fold increase ± S.E.M in caspase activity relative to untreated cells from three independent determinations performed in duplicate. **(B)** Effect of *Retama monosperma* Hexanic Extract on viability in the presence of a caspase inhibitor Jurkat cells were pre-incubated for 1 h with 5 µM Q-VD-Oph and Rm-HE (40 µg/ml) was added for 24 h. Doxorubicin was used as positive control. Cell viability is represented as a percentage relative to untreated cells, and data is means ± S.E.M. from three independent determinations performed in duplicate. **(C)** Effect of *Retama monosperma* Hexanic Extract on the expression and cleavage of caspases 8, 7, 3 and 9 in Jurkat cells. 4 × 10 cells were treated with Rm-HE (40 µg/ml) for 0, 2, 4, 8 and 16 h. Total and cleaved caspase levels in cellular extracts were detected by immunoblot with specific antibodies. Tubulin was used as an internal control.

pathway, we further investigated the effects of Rm-HE on the expression of specific proteins involved in either of these pathways. To this end, we analyzed the expression levels of both pro- and anti-apoptotic members of the Bcl-2 family. Western blot analysis indicated that the expression levels of the anti-apoptotic proteins Bcl-xL, Mcl-1, and Bcl-2 [20,21], were not significantly altered upon Rm-

HE treatment (Figure 4A). Regarding the pro-apoptotic members of the family, neither Bax nor Bad showed a significant increase upon Rm-HE, whereas Bim levels were modestly increased (Figure 4B). Since caspase-8 is generally activated following assembly of death-inducing signaling complex (DISC) during receptor-mediated apoptosis, we next investigated the expression of Fas ligand, a major

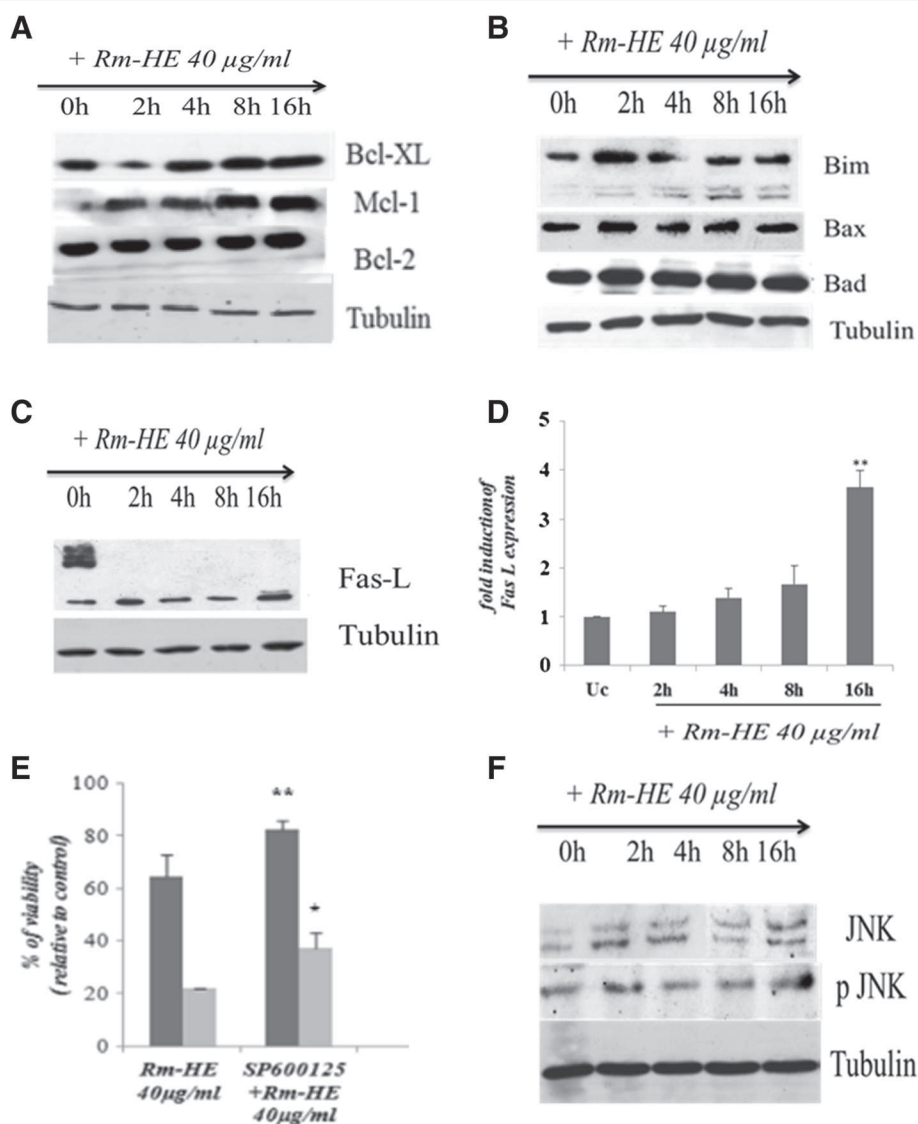


Figure 4 Characterization of the effects of Rm-HE on apoptotic signaling mediators. (A) Effect of Rm-HE on the expression and cleavage of apoptosis-related proteins in Jurkat cells. Expression of the anti-apoptotic proteins Bcl-XL, Mcl-1 and Bcl-2 was analyzed in extracts of Jurkat cells treated as indicated by immunoblot with specific antibodies. Tubulin was used as an internal control. **(B)** Expression of pro-apoptotic proteins Bim, Bax and Bad was analyzed in extracts of Jurkat cells treated as indicated by immunoblot with specific antibodies. Tubulin was used as an internal control. **(C)** Fas Ligand induction was analyzed in extracts of Jurkat cells treated as indicated by immunoblot with specific antibodies. Tubulin was used as an internal control. **(D)** Statistical analysis for Fas-L expression blots in Rm-HE treated cells. Results indicate the average fold increase \pm S.E.M in Fas-L expression relative to untreated cells from three independent experiments. The difference between untreated cells and cells treated for 16 h with Rm-HE are statistically significant (Student's *t*-test: ***P* < 0.01). **(E)** Effect of Rm-HE on Jurkat cell viability in the presence of a JNK inhibitor. Jurkat cells were pre-incubated for 1 h with 10µMSP600125 and then 40 µg/ml of Rm-HE were added for 24 h and 48 h, as indicated. Cell viability is represented as a percentage relative to untreated cells. Data is means \pm S.E.M. from three independent determinations performed in duplicate. **(F)** Effect of Rm-HE on the JNK phosphorylation in Jurkat cells. Expression of JNK and phospho-JNK were analyzed in extracts of Jurkat cells treated as indicated by immunoblot with specific antibodies. Tubulin was used as an internal control.

inducer of the extrinsic pathway. Figure 4C revealed enhanced Fas-L expression upon exposure to Rm-HE; the statistical analysis of Fas-L blots in Figure 4D showed an expression increase up to 3-fold upon 16 h of treatment. Accordingly, the inhibition of JNK, a key regulator of Fas-L expression, partially reduced the cytotoxic effects of Rm-HE on Jurkat cells (Figure 4E), in agreement with the observed increase in JNK phosphorylation upon time (Figure 4F). Altogether, these observations suggest that apoptosis induced by Rm-HE is activated, at least partially, via the caspase-8-dependent extrinsic pathway.

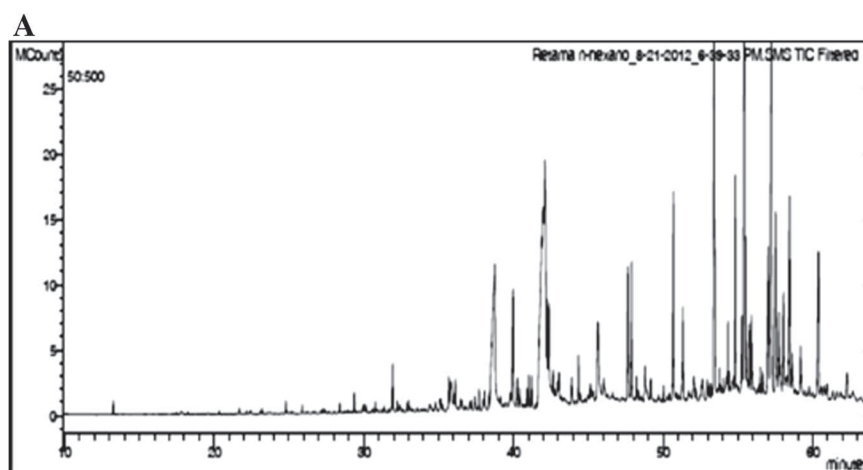
Characterization of chemical compounds in *Retama monosperma hexanic extract*

In order to identify putative bioactive compounds responsible for these effects, Rm-HE was subjected to GC-MS analysis (Figure 5). At least 60 compounds were present in Rm-HE, of which 43 were identified using mass spectrometry. Retention time, Cas Numbers and %

of identified area are summarized in Table 1. The mass spectra of these compounds were matched with computer searches in the references libraries of NIST08 and Wiley7, and fragmentation patterns were compared with literature and commercially-available products data. The major bioactive compounds identified were α -Linolenic acid (13.97%), Stigmasterol (10.34%), β -Sitosterol (7.92%) and Campesterol (11.09%). Figure 5B shows their chemical structures.

Discussion

Many current research efforts in the field of cancer therapeutics are focused on the development of highly specific agents able to selectively induce apoptosis in cancer, but not normal, cells. In the last two decades there has been a surge of anti-cancer drugs introduced, of which almost half of them are derived from natural sources [22,23]. In Morocco, traditional medicine is supported by one of the world's oldest pharmacopoeia, with an environmental



B

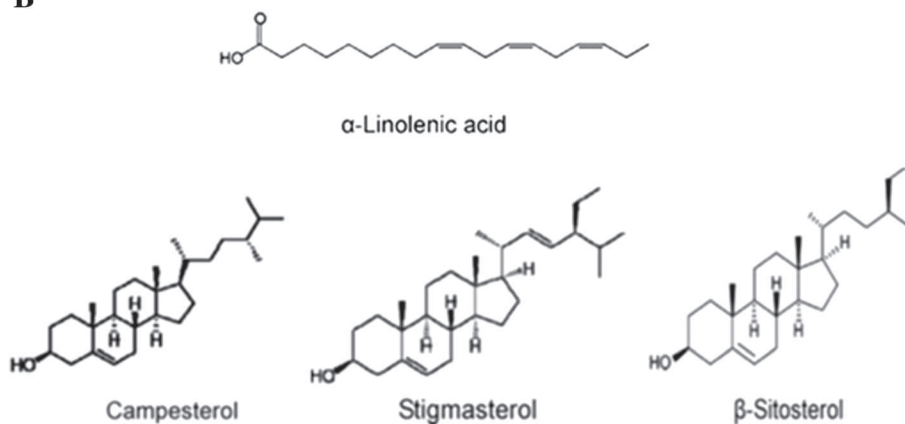


Figure 5 Characterization of chemical compounds in *Retama monosperma* hexanic extract. **A)** Chromatogram of *Retama monosperma* Hexanic Extract (Rm-HE) obtained by CG. Compounds were identified by computer searches in the reference libraries of NIST and Wiley7, and fragmentation patterns were compared with literature data. Rm-HE constituent are shown in Table1. **(B)** Chemical structures of the major bioactive compounds of *Retama monosperma* Hexanic Extract.

Table 1 Compounds present in hexanic extract of Retama monosperma identified by CG/MS

RT	Identified compounds	cas numbers	% Area
15,886	Propanoic Acid,2-[(trimethylsilyloxy)-, trimethylsilyl ester	17596-96-2	0,09
16,386	HexanoicAcid, trimethylsilylester	14246-15-2	0,04
16,46	Acetic acid, (trimethylsiloxy)-, trimethylsilyl ester	33581-77-0	0,027
21,694	Silanol,1,1,1-trimethyl-, 1-benzoate	2078-12-8	0,063
22,167	OctanoicAcid, trimethylsilylester	55494-06-9	0,063
24,805	NonanoicAcidtrimethylsilylester	82326-11-2	0,289
26,452	Dicyclohexylamine	101-83-7	0,139
27,305	DecanoicAcid, trimethylsilylester	55494-15-0	0,072
28,004	malatate	65143-63-7	0,036
29,279	TrimethylsilylVanillin	6689-43-6	0,103
29,368	(S)-dihydroactinidiolide	17092-92-1	0,257
31,347	P-Hydroxybenzoic Acid TMS ether TMS ester	2078-13-9	0,099
31,927	DodecanoicAcid, trimethylsilylester	55520-95-1	0,736
35,036	Nonanedioic Acid bis(trimethylsilyl) ester	17906-08-0	0,162
35,441	SPARTEINE	90-39-1	0,952
36,12	TetradecanoicAcidtrimethylsilylester	18603-17-3	0,686
37,734	methylpalmitate	112-39-0	0,374
38,077	PentadecanoicAcidtrimethylsilylester	74367-22-9	0,519
39,982	PalmiticAcidtrimethylsilylester	55520-89-3	2,406
40,124	Cytisine/baptitoxine/sophorine/Caulophylline	486-86-2	0,171
41,748	HeptadecanoicAcid, trimethylsilylester	55517-58-3	0,259
42,069	Aphylline	577-37-7	2,83
42,221	Phytol	352332	1,973
42,996	LinoleicAcidtrimethylsilyl	56259-07-5	9,988
43,156	α Linoleic Acid trimethylsilyl ester	97844-13-8	13,976
43,52	OctadecanoicAcid, trimethylsilylester	18748-91-9	1,35
43,723	Lupanine	550-90-3	0,212
45,127	NonadecanoicAcidtrimethylsilylester	74367-35-4	0,55
45,59	oleamide/SLEEPAMIDE	301-02-0	1,291
46,746	EicosanoicAcid, trimethylsilylester	55530-70-6	2,853
47,814	Monolupine /anagryrine	486-89-5	2,275
48,903	Hexadecanoic Acid 2,3-bis[(trimethylsilyloxy)propyl ester	1188-74-5	2,569
49,742	DocosanoicAcidtrimethylsilylester	74367-36-5	2,804
50,022	(-)-PTEROCARPIN	524-97-0	0,329
50,197	OctadecanedioicAcid di(trimethylsilyl) ester	22396-20-9	0,438
51,265	1-TETRACOSANOL	506-51-4	3,65
51,684	Stearic Acid 2,3-bis(trimethylsilyloxy)propyl ester	1188-75-6	2,041
53,094	Brucine	357-57-3	0,654
53,702	PentacosanoicAcid	506-38-7	0,487
53,769	HexacosanoicAcid	506-46-7	2,781
57,238	Stigmasteroltrimethylsilylether	14030-29-6	10,34
57,609	β -Sitosteryltrimethylsilylether	2625-46-9	7,92
58,525	CAMPESTEROL	474-62-4	11,086

biodiversity that provides a wide arsenal of plant remedies [24]. Currently, plants of the *Retama* genus have attracted an increasing interest due to their wide range of pharmacological effects including hypoglycemic and diuretic [4,6], cytotoxic [7,8], antioxidant, antiviral [9], antihypertensive [10], anti-inflammatory [11] and antitumor activities [12]. In correlation with our previous observations indicating an anti-leukemic effect of Rm-HE [25], we confirm and extend herein the anti-leukemic and apoptotic-inducing effects of Rm-HE and indicate its cellular mechanism of action on Jurkat cells. For this purpose, a cytotoxic screening with Rm-HE was performed on a panel of established human cancer cell lines including Glioblastoma Multiforme, Acute T cell Leukemia, Mantle Cell Lymphoma, Colon cancer, Prostate Cancer and Osteosarcoma cells, together with non-tumoral control cell lines. In this context, Rm-HE exhibited a dramatic effect on Jurkat cells, which are usually used as a model of acute T cell leukemia, but was essentially ineffective against the other tested cell lines including a B-cell lymphoma cell line (Jeko-1). Interestingly, Acute T cell leukemia is a hematological malignancy characterized by a deregulated expression of apoptosis-related molecules [26].

Interestingly, flow cytometry analysis confirmed that exposure to Rm-HE strongly promoted cell death as indicated by the dramatic time-dependent increase in the proportion of sub-G1 cells. In parallel with cellular death, we observed that the number of cells in S-phase was also reduced, indicating a block in cell cycle progression. DNA damage is one of the major mechanisms behind anticancer drug-induced cell cycle arrest and apoptosis [27,28]. Under normal conditions, genomic integrity in DNA damaged-cells is usually restored through DNA repair. If DNA repair cannot be achieved properly or cells are overwhelmed by sustained damage, apoptosis ensues in order to remove genetically aberrant cells [29,30]. In agreement with the induction of apoptosis, we observed that Rm-HE treatment elicited DNA damage at 4 h as indicated by the increase in H2A.X phosphorylation, a well-established readout for the presence of double strand breaks [31].

In order to better understand the mechanisms of cellular death in response to Rm-HE, we performed flow cytometry analysis upon Annexin-V/ propidium iodide staining to detect and quantify the amount of cells undergoing apoptosis [32]. In this setting, the number of Jurkat cells entering early apoptosis clearly increased in a time-dependent manner, demonstrating that Rm-HE treatment induces Jurkat cell death through the promotion of apoptosis. Since a fundamental requirement for apoptosis to take place is the activation of caspases [18,19], we determined if the enzymatic activity of caspases 3 and 7 was increased in Jurkat cells upon Rm-HE treatment. As expected, Rm-HE clearly induced caspase

activation to a similar extent as the conventional chemotherapeutic agent Doxorubicin, and in correlation with this, the inhibition of caspases resulted in a partial protection against Rm-HE-mediated cytotoxicity.

Two fundamental pathways are responsible for the induction of apoptosis: the mitochondrial or intrinsic pathway and the death receptor or extrinsic pathway [32]. Western blot analysis confirmed that both executioner caspases 3 and 7 were cleaved and thus activated by Rm-HE treatment, in parallel with the results obtained in caspase activity assays. Remarkably, Rm-HE treatment rapidly led to procaspase 8 cleavage, which is indicative of activation of the extrinsic apoptotic pathway, an event that was followed by subsequent activation of caspase 9.

In order to understand the involvement of both intrinsic and extrinsic apoptotic pathways in this process, we further investigated molecular events related to both apoptotic pathways in Rm-HE-treated Jurkat cells. To this end, we investigated the activation of both anti- and pro-apoptotic members of the Bcl-2 family. The absence of significant alterations in members of this family in Rm-HE-treated cells pointed to the induction of apoptosis predominantly via the receptor-activated extrinsic pathway. Activation of the extrinsic apoptotic pathway is regulated downstream of the activation of death receptors, and involves ligand-induced formation of death-inducing signaling complex (DISC) that recruits and activates pro-caspase 8. Since a major activator of death receptors in human leukemic cells is Fas-ligand (Fas-L) [33], we next investigated whether Rm-HE treatment could induce Fas-L upregulation. Interestingly, we observed a time-dependent increase in Fas-L in Rm-HE-treated Jurkat cells. A key upstream molecular pathway leading to Fas-L expression is the stress-activated JNK pathway [34,35], which has been shown to lead through Fas-L to caspase 8 and caspase 3 activation [36]. Accordingly, JNK inhibition significantly reduced the cytotoxic effects of Rm-HE in Jurkat cells, suggesting that a JNK/Fas-L/caspase 8/caspase 3 pathway is activated following Rm-HE treatment to promote extrinsic pathway-dependent apoptosis in Jurkat cells. We cannot rule out the contribution of the caspase 8-independent, intrinsic apoptotic pathway to Rm-HE-induced apoptosis, as indicated by the detection of caspase 9 cleavage. However, the robust effects on caspase 8, together with our observations on the involvement of JNK and Fas-L suggest that the extrinsic pathway is the predominant apoptotic pathway in our experimental conditions.

We finally performed GC-MS analysis in order to identify putative bioactive compounds responsible for these cellular effects. Four major bioactive compounds were identified: α -Linoleic acid, Campesterol, β -sitosterol and stigmasterol. When combined together, the last three have been shown to exert cytotoxic activity against cancer cells

[37]. Remarkably, Stigmasterol showed an inhibition of cell growth that was not dose-responsive (around 40–50% inhibition between 1.6 and 50 $\mu\text{g/ml}$) in HS578T breast cancer cells [37]. Additionally, β -sitosterol and phytol, which is also present in Rm-HE, exhibited a clear cytotoxicity against various cancer cell lines including nasopharyngeal epidermoid carcinoma, breast cancer, cervical carcinoma, colon carcinoma and lung adenocarcinoma cells [38]. These observations support the notion that the combination of several bioactive compounds in Rm-HE exerts its anticancer activity, and pave the way for further research efforts aimed at elucidating if any of the identified compounds could be mainly responsible for these effects.

Conclusions

Our results suggest that bioactive components of Rm-HE act either alone or in combination to promote cellular apoptosis, predominantly acting via the extrinsic apoptosis pathway, with a strong selectivity against human T cell leukemia. The mechanism whereby this extract induces apoptosis is likely to involve a JNK/Fas-L/caspase 8/caspase 3 pathway in the presence of cell cycle arrest and DNA damage induction. Further studies are required to i) understand the molecular basis of its antileukemic selectivity, ii) determine which of the identified bioactive compounds are responsible for these effects and iii) perform preclinical developmental research aimed at ensuring its safety and efficacy as therapeutic agents.

Competing interest

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

LB performed all experiments and participated in the experimental design, analysis of the data and redaction of the manuscript. CAL participated in the experimental design, analysis of the data and preparation of the manuscript. The plants harvest, identification and extraction were done by NM and YB. SA participated in the analysis of the data and the preparation of the manuscript. SFM participated in the experimental design and the analysis of the data. PV directed the research and edited the manuscript. All authors have contributed and approved the manuscript.

Acknowledgements

We are grateful to Dr. Rafael Núñez Gómez (Servicio de Instrumentación Científica, Estación Experimental del Zaidín CSIC, Granada, Spain), for the GC-MS analysis of *Retama monosperma* hexanic extract and to Dr. Ruth Villalonga, Mr. Guillem Ramis and Ms. Margalida Serra Sitjar (Cancer Cell Biology Group, Institut Universitari d'Investigació en Ciències de la Salut "IUNICS") for scientific and technical help.

Author details

¹Cancer Cell Biology Group, Institut Universitari d'Investigació en Ciències de la Salut (IUNICS), Edifici Científicotècnic, Ctra Km 7,5, Valldemossa, Illes Balears, Spain. ²Departament de Biologia Fonamental, Institut Universitari d'Investigació en Ciències de la Salut (IUNICS), Universitat de les Illes Balears, Edifici Científicotècnic, Ctra Km 7,5, Valldemossa, Illes Balears, Spain. ³Biochemistry Immunology Laboratory, Faculty of Sciences, Mohammed V-Agdal University, Rabat, Morocco.

Received: 2 October 2013 Accepted: 14 January 2014
Published: 24 January 2014

References

1. Kabbaj F, Meddah B, Cherrah Y, Faouzi E: Ethnopharmacological profile of traditional plants used in Morocco by cancer patients as herbal therapeutics. *Phytopharmacology* 2012, **2**:243–256.
2. Vickers A: Botanical medicines for the treatment of cancer: rationale, overview of current data, and methodological considerations for phase I and II trials. *Cancer Invest* 2002, **20**:1069–1079.
3. Bosch FX, Ribes J, Diaz M, Cleries R: Primary liver cancer: worldwide incidence and trends. *Gastroenterology* 2004, **127**:5–16.
4. El-Shazly A, Ateya AM, Witte L, Wink M: Quinolizidine Alkaloids Profiles of *Retamaraetam*, *R. sphaerocarpa* and *R. monosperma*. *Z Naturforsch* 1996, **51**:301–308.
5. Maghrani M, Michel JB, Eddouks M: Hypoglycaemic activity of *Retamaraetam* in rats. *Phytother Res* 2005, **19**(2):125–128.
6. Bellakhdar J: *La Pharmacopée Marocaine Traditionnelle*. Paris: Ed Ibis Press; 1997.
7. Maghrani M, Zeggwagh NA, Haloui M, Eddouks M: Acute diuretic effect of aqueous extract of *Retamaraetam* in normal rats. *J Ethnopharmacol* 2005, **99**(1):31–35.
8. Conforti F, Statti G, Tundis R, et al: Antioxidant and cytotoxic activities of *Retamaraetam* subsp. *Gussonei*. *Phytotherapy Res* 2004, **18**(7):585–587.
9. López-Lázaro M, Martín-Cordero C, Cortes F, Pinero J, Ayuso MJ: Cytotoxic activity of flavonoids and extracts from *Retamasphaerocarpa* Boissier. *Z Naturforsch C* 2000, **55**(1–2):40–43.
10. Edziri H, Mastouri M, Cheraif I, Aouni M: Chemical composition and antibacterial, antifungal and antioxidant activities of the flower oil of *Retamaraetam* (Forssk.) Webb from Tunisia. *Nat Prod Res* 2010, **24**(9):789–796.
11. Eddouks M, Maghrani M, Louedec L, Haloui M, Michel JB: Antihypertensive activity of the aqueous extract of *Retamaraetam* Forssk. leaves in spontaneously hypertensive rats. *J Herb Pharmacother* 2007, **7**(2):65–77.
12. Bremner P, Rivera D, Calzado MA, et al: Assessing medicinal plants from South-Eastern Spain for potential anti-inflammatory effects targeting nuclear factor-Kappa B and other pro-inflammatory mediators. *J Ethnopharmacol* 2009, **124**(2):295–305.
13. Merghoub N, Benbacer L, El Btaouri H, AitBenhassou H, Terryn C, Attaleb M, Madoulet C, Benjouad A, El Mzibri M, Morjani H, Amzazi S: In vitro antiproliferative effect and induction of apoptosis by *Retama monosperma* L. extract in human cervical cancer cells. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 2011, **15**:81–91.
14. Zhao WL: Targeted therapy in T-cell malignancies: dysregulation of the cellular signaling pathways. *Leukemia* 2010, **24**:13–21.
15. Wallach D, Boldin M, Varfolomeev E, et al: Cell death induction by receptors of the THF family: towards a molecular understanding. *FEBS Lett* 1997, **410**:96–106.
16. Desagher S, Martinou JC: Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol* 2000, **10**:369–377.
17. Nakagawa T, Yuan J: Cross-talk between two cysteine protease families; activation of caspase-12 by calpain in apoptosis. *J of Cell Biol* 2000, **150**:887–894.
18. Fadel B, Orrenius S: Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in human disease. *J Intern Med* 2005, **258**(6):479–517. Review. PubMed PMID: 16313474.
19. Kekre N, Griffin C, McNulty J, Pandey S: Pancreatistatin causes early activation of caspase-3 and flipping of phosphatidyl serine followed by rapid apoptosis specifically in human lymphoma cells. *Cancer Chemother Pharmacol* 2005, **56**:29–38.
20. Srivastava RK, Srivastava AR, Korsmeyer SJ, Nesterova M, Cho-Chung YS, Longo DL: Involvement of microtubules in the regulation of Bcl2 phosphorylation and apoptosis through cyclic AMP-dependent protein kinase. *Mol Cell Biol* 1998, **18**:3509–3517.
21. Catz SD, Johnson JL: BCL-2 in prostate cancer: a minireview. *Apoptosis* 2003, **8**(1):29–37.
22. Koo JW, Han JS, Kim JJ: Selective neurotoxic lesions of basolateral and central nuclei of the amygdala produce differential effects on fear conditioning. *J Neurosci* 2004, **24**:7654–7662.
23. Lee YJ, Shacter E: Oxidative stress inhibits apoptosis in human lymphoma cells. *J Biol Chem* 1999, **274**(28):19792–19798.
24. Jouad H, Haloui M, Rhiouani H, El Hilaly J, Eddouks M: 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* 2001, **77**(2–3):175–182.

25. Belayachi L, Aceves-Luquero C, Merghoub N, Bakri Y, Fernández de Mattos S, Amzazi S, Villalonga P: **Screening of North African Medicinal Plant Extracts for Cytotoxic Activity against Tumor Cell Lines**, *European. J of Med Plants* 2013, **3**(3):310–332.
26. Droin N, Guéry L, Benikhlef N, Solary E: **Targeting apoptosis proteins in hematological malignancies**. *Cancer Lett* 2013, **332**(2):325–334.
27. Zhu H, Huang M, Yang F, Chen Y, Miao ZH, Qian XH, Xu YF, Qin YX, Luo HB, Shen X, Geng MY, Cai YJ, Ding J: **R16, a novel amonafide analogue, induces apoptosis and G2-M arrest via poisoning topoisomerase II**. *Mol Cancer Ther* 2007, **6**(2):484–495.
28. Cai Y, Lu J, Miao Z, Lin L, Ding J: **Reactive oxygen species contribute to cellkilling and P-glycoprotein downregulation by salvicine in multidrug resistant K562/A02 cells**. *Cancer Biol Ther* 2007, **6**(11):1794–1799.
29. Norbury CJ, Zhivotovsky B: **DNA damage-induced apoptosis**. *Oncogene* 2004, **23**(16):2797–2808.
30. Ljungman M: **The DNA damage response—repair or despair?** *Environ Mol Mutagen* 2010, **51**(8–9):879–889.
31. Dickey JS, Redon CE, Nakamura AJ, Baird BJ, Sedelnikova OA, Bonner WM: **Chapter 273: stress and γ -H2AX**. In *Handbook of Cell Signaling (Second Edition)*. Edited by Bradshaw RA, Dennis EA. San Diego: Academic Press; 2010:2273–2282.
32. Hsu YL, Chia CC, Chen PJ, Huang SE, Huang SC, Kuo PL: **Shallot and licorice constituent isoliquiritigenin arrests cell cycle progression and induces apoptosis through the induction of ATM/p53 and initiation of the mitochondrialsystem in human cervical carcinoma HeLa cells**. *Mol Nutr Food Res* 2009, **53**(7):826–835.
33. Kantari C, Walczak H: **Caspase-8 and Bid, Caught in the act between death receptors and mitochondria**, *BiochimicaetBiophysicaActa (BBA). Mole Cell Res* 2011, **1813**(4):558–563. ISSN 0167-4889.
34. Le-Niculescu H, Bonfoco E, Kasuya Y, Claret FX, Green DR, Karin M: **Withdrawal of survival factorsresults in activation of the JNK pathway in neuronal cells leading to Fas Ligand induction and cell death**. *Mol Cell Biol* 1999, **19**:751–763.
35. Mansouri A, Ridgway LD, Korapati AL, Zhang Q, Tian L, Yet W, *et al*: **Sustained activation of JNK/p38 MAPK pathways in response to cisplatin leads to Fas ligand induction and cell death in ovarian carcinoma cells**. *J of Biol Chem* 2003, **278**:19245–19256.
36. Chiung-Huei P, Tsui-Hwa T, Chien-Ning H, Shu-Ping H, Chau-Jong W: **Apoptosis induced by penta-acetyl geniposide in C6 glioma cells is associated with JNK activation and Fas ligand induction**. *Toxicol Appl Pharmacol* 2005, **202**(2):172–179.
37. Lai CS, Mas RH, Nair NK, Mansor SM, Navaratnam V: **Chemical constituents and in vitro anticancer activity of Typhoniumflagelliforme (Araceae)**. *J Ethnopharmacol* 2010, **127**(2):486–494.
38. Malek SNA, Shin SK, Wahab NA, Yaacob H: **Cytotoxic components of Pereskialeo (Kunth) DC. (Cactaceae) leaves**. *Molecules* 2009, **14**:1713–1724.

doi:10.1186/1472-6882-14-38

Cite this article as: Belayachi *et al.*: *Retama monosperma n-hexane extract induces cell cycle arrest and extrinsic pathway-dependent apoptosis in Jurkat cells*. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 2014 **14**:38.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



Références bibliographiques

Adams J, Cory S. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene* 2007;26(9):1324-1337. doi:10.1038/sj.onc.1210220.

Afifi-Yazar, F.U., Kasabri, V., Abu-Dahab, R., 2011. Medicinal plants from Jordan in the treatment of cancer: traditional uses vs. in vitro and in vivo evaluations— Part 1. *Planta Medica* 77, 1203–1209.

Alatise O, Lawal OO, Adesunkanmi AK, Agbakwuru AE, Arigbabu OA, Ndububa DA, Ojo OS, Abdulkadir A: Clinical pattern and management of gastric cancer in Ile-Ife. Nigeria. *Arab J Gastroenterol* 2007,8:123–126.

Alcouffe J, Therville N, Segui B, Nazzal D, Blaes N, Salvayre R, Thomsen M, Benoist H. Expression of membrane-bound and soluble FasL in Fas- and FADD-dependent T lymphocyte apoptosis induced by mildly oxidized LDL. *FASEB J.* 2003;18:122–124.

Algandaby, M.M., Alghamdi, H.A., Ashour, O.M., Abdel-Naim, A.B., Ghareib, S.A., Abdel-Sattar, E.A., Hajar, A.S., 2010. Mechanisms of the antihyperglycemic activity of *Retama raetam* in streptozotocin-induced diabetic rats. *Food Chem Toxicol* 48, 2448-2453.

Ali-Shtayeh M.S., Yaghmour R.M., Faidi Y.R., Salem K., Al-Nuri M.A., 1998. Antimicrobial activity of 20 plants used in folkloric medicine in the Palestinian area. *J Ethnopharmacol* 60, 265–271.

Alkofahi A., Atta A.H., 1999 Pharmacological screening of the anti-ulcerogenic effects of some Jordanian medicinal plants in rats. *J Ethnopharmacol* 67, 341-345.

Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW, Yuan J. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell.* 1996 Oct 18;87(2):171.

Al-Rubeai M, Singh RP. Apoptosis in cell culture. *Curr Opin Biotechnol.* 1998 Apr;9(2):152-6.

Amani H., Rouhi R., Idrissi Hassani L.M., 2008. Étude anatomique et screening phytochimique de trois espèces du sud marocain: *Chamaecytisus mollis*, *Retama monosperma* et *Hesperolaburnum platycarpum*. Détermination du potentiel antifongique des extraits aqueux. Agadir, Maroc. The 3rd International Symposium on Aromatic and Medicinal Plants (SIPAM3) The first International symposium on Bioactive Molecules (CIMB1) Oujda –Morocco 29-30 May.

Arcamone, f., animati, f., berettoni, m., bigioni, m., capranico, g., casazza, a.m., caserini, c., cipollone, a., de cesare, m., franciotti, m., lombardi, p., madani, a., manzini, s., monteagudo, e., polizzi, d., pratesi, g., righetti, s.g., salvatore, c., supino, r. & zunino, f. (1997). Doxorubicin disaccharide analogue: apoptosis-related improvement of cacy in vivo. *J. Natl. Cancer. Inst.*, 89, 1217 - 1223.

Ashkenazi, A., and Herbst, R.S. (2008). To kill a tumor cell: the potential of proapoptotic receptor agonists. *J Clin Invest* 118, 1979-1990. Timmer *et al.*, 2002

Awen B.Z., Unnithan C.R., Ravi S., Kermagy A., Sasikumar J.M., Khrbash A.S., Ekreem W.L., 2011. Essential oils of *Retama raetam* from Libya: chemical composition and antimicrobial activity. *Nat Prod Res* 25, 927-933.

Bakkenist CJ, Kastan MB. DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature*. 2003 Jan 30;421(6922):499-506.

Baldwin EL, et al. (2005) Mms22p protects *Saccharomyces cerevisiae* from DNA damage induced by topoisomerase II. *Nucleic Acids Res* 33(3):1021-30.

Baylin, S.B. (2005). DNA methylation and gene silencing in cancer. *Nat Clin Pract Oncol* 2 Suppl 1, S4-11.

Bekker-Jensen S, Mailand N. Assembly and function of DNA double-strand break repair foci in mammalian cells. *DNA Repair (Amst)*. 2010 Dec 10; 9(12):1219-28.

BELLAKHDAR J. (1997) *La pharmacopée marocaine traditionnelle*, Paris, Ibis Press, 560-602.

Bellakhdar J., 1997. *La pharmacopée marocaine traditionnelle. Médecine arabe ancienne et savoirs populaires*. Ed Ibis press.

Bemelman WA. Minimally invasive surgery for early lower GI cancer. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2005 Dec;19(6):993-1005.

Bennett BL, Sasaki DT, Murray BW, O'Leary EC, Sakata ST, Xu W, Leisten JC, Motiwala A, Pierce S, Satoh Y, Bhagwat SS, Manning AM, Anderson DW. SP600125, an anthrapyrazolone inhibitor of Jun N-terminal kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Nov 20; 98(24):13681-6.

Benrahmoune I.Z., 2003. *Invitation à l'Amour des plantes - Réserve biologique de Sidi-Boughaba*. Ed Scriptr 114, 228-227

Bhuyan BK, Loughman BE, Fraser TJ, Day KJ. Comparison of different methods of determining cell viability after exposure to cytotoxic compounds. *Exp Cell Res*. 1976 Feb;97(2):275-80.

Billen, L.P., Kokoski, C.L., Lovell, J.F., Leber, B., and Andrews, D.W. (2008). Bcl-XL inhibits membrane permeabilization by competing with Bax. *PLoS Biol*. 6, e147.

Binaschi M., Bigioni M., Cipollone A., Rossi C., Goso C., Maggi C.A., Capranico G., Animati F., 2001. Anthracyclines : selected new developments. *Curr Med Chem Anti-Canc Agents* 1 113- 130.

Birgisson H, Páhlman L, Gunnarsson U, Glimelius B. Late adverse effects of radiation therapy for rectal cancer - a systematic overview. *Acta Oncol.* 2007;46(4):504-16.

Bortner, C. D., Oldenburg, N. B. E. and Cidlowski, J. A. (1995). The role of DNA fragmentation in apoptosis. *Trends Cell Biol.* 5, 21-25.

Bossi G, Griffiths GM. Degranulation plays an essential part in regulating cell surface expression of Fas ligand in T cells and natural killer cells. *Nat Med.* 1999 Jan;5(1):90-6.

Boyle P, Ferlay J. Cancer incidence and mortality in Europe, 2004. *Ann Oncol.* 2005 Mar;16(3):481-8.

Bssaibis F., Gmira N., Meziane M., 2009. Activité antibactérienne de *Dittrichia viscosa* (L.) W. Greuter. *Rev Microbiol Ind San et Environn* 3, 44-55.

Buckley, C.D., Pilling, D., Henriquez, N.V., Parsonage, G., Threlfall, K., Scheel-Toellner, D., Simmons, D.L., Akbar, A.N., Lord, J.M., and Salmon, M. (1999). RGD peptides induce apoptosis by direct caspase-3 activation. *Nature* 397, 534-539.

Burden DA, Osheroff N. Mechanism of action of eukaryotic topoisomerase II and drugs targeted to the enzyme. *Biochim Biophys Acta.* 1998 Oct 1;1400 (1-3):139-54.

Busino, L., Chiesa, M., Draetta, G. F. and Donzelli, M. (2004). Cdc25A phosphatase: combinatorial phosphorylation, ubiquitylation and proteolysis. *Oncogene* 23, 2050-2056.

Buunen M, Lange MM, Ditzel M, Kleinrensink GJ, van de Velde CJ, Lange JF. Level of arterial ligation in total mesorectal excision (TME): an anatomical study. *Int J Colorectal Dis.* 2009 Nov;24(11):1317-20.

Cafarchia C., De Laurentis N., Milillo M.A., Losacco V., (3-4):., P.V., 2002. Antifungal activity of oils from leaves and flowers of *Inula viscosa* (Asteraceae) by Apulian region. *Parassitologia* 44, 153-156.

Carlo-Stella, C., Lavazza, C., Locatelli, A., Vigano, L., Gianni, A.M., and Gianni, L. (2007). Targeting TRAIL agonistic receptors for cancer therapy. *Clin Cancer Res* 13, 2313-2317.

Caserta TM, Smith AN, Gultice AD, Reedy MA, Brown TL. Q-VD-OPh, a broad spectrum caspase inhibitor with potent antiapoptotic properties. *Apoptosis.* 2003 Aug;8(4):345-52.

Çelik, T.A., Aslantürk, O.S., 2010. Evaluation of cytotoxicity and genotoxicity of *Inula viscosa* leaf extracts with Allium test. *Journal of Biomedicine Biotechnology* <http://dx.doi.org/10.1155/2010/189252>.

Chen G, Yuan SS, Liu W, Xu Y, Trujillo K, Song B, Cong F, Goff SP, Wu Y, Arlinghaus R, Baltimore D, Gasser PJ, Park MS, Sung P, Lee EY. Radiation-induced assembly of Rad51 and Rad52 recombination complex requires ATM and c-Abl. *J Biol Chem*. 1999 Apr 30;274(18):12748-52.

Child ES, Mann DJ. The intricacies of p21 phosphorylation: protein/protein interactions, subcellular localization and stability. *Cell Cycle*. 2006 Jun; 5(12):1313-9.

Choi H, Charnsangavej C, Faria SC, Macapinlac HA, Burgess MA, Patel SR, Chen LL, Podoloff DA, Benjamin RS. Correlation of computed tomography and positron emission tomography in patients with metastatic gastrointestinal stromal tumor treated at a single institution with imatinib mesylate: proposal of new computed tomography response criteria. *J Clin Oncol*. 2007 May 1;25(13):1753-9.

Colditz, G. A., Baer, H. J., & Tamimi, R. M. (2006). Breast cancer. In D. Schottenfeld, & J. F. Fraumeni (Eds.), *Cancer epidemiology and prevention* (3rd ed.). USA: Oxford University Press.

Coleman CN. Modulating the radiation response. *Stem Cells*. 1996 Jan;14(1):10-5.

Coleman MG, Gough AC, Bunyan DJ, Braham D, Eccles DM, Primrose JN. Minisatellite instability is found in colorectal tumours with mismatch repair deficiency. *Br J Cancer*. 2001 Nov 16; 85(10):1486-91.

Coleman MP, Quaresma M, Berrino F, Lutz JM, De Angelis R, Capocaccia R, Baili P, Rachet B, Gatta G, Hakulinen T, Micheli A, Sant M, Weir HK, Elwood JM, Tsukuma H, Koifman S, E Silva GA, Francisci S, Santaquilani M, Verdecchia A, Storm HH, Young JL; CONCORD Working Group. Cancer survival in five continents: a worldwide population-based study (CONCORD). *Lancet Oncol*. 2008 Aug;9(8):730-56.

Colombo P., Gunnarsson K., Latropoulos M., Brughera M., 2001. Toxicological testing of cytotoxic drugs *International journal of oncology* 19 1021-1028.

Cools J. Identification and characterization of novel oncogenes in chronic eosinophilic leukemia and T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Verh K Acad Geneesk Belg*. 2010;72(1-2):55-70.

Corvò R. Evidence-based radiation oncology in head and neck squamous cell carcinoma. *Radiother Oncol*. 2007 Oct;85(1):156-70.

Curnis, F., Sacchi, A., and Corti, A. (2002). Improving chemotherapeutic drug penetration in tumors by vascular targeting and barrier alteration. *J. Clin. Invest.* 110, 475–482.

Darzynkiewicz Z, Bruno S, Del Bino G, Gorczyca W, Hotz MA, Lassota P, Traganos F. Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. *Cytometry*. 1992;13(8):795-808.

De Stefani E, Boffetta P, Ronco AL, Brennan P, Deneo-Pellegrini H, Carzoglio JC et al. (2000). Plant sterols and risk of stomach cancer: A case-control study in Uruguay. *Nutr Cancer* 37, 140–144. Mc Cann *et al.*, 2003

Deckbar D, Jeggo PA, Loblrich M. Understanding the limitations of radiation-induced cell cycle checkpoints. Cox MM, ed. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 2011;46(4):271-283.

Degterev A, Hitomi J, Gemscheid M, Ch'en IL, Korkina O, Teng X, Abbott D, Cuny GD, Yuan C, Wagner G, Hedrick SM, Gerber SA, Lugovskoy A, Yuan J. Identification of RIP1 kinase as a specific cellular target of necrostatins. *Nat Chem Biol*. 2008 May;4(5):313-21.

Diebold J, Le Tourneau A, Marmey B, Prevot S, Müller-Hermelink HK, Sevestre H, Molina T, Billotet C, Gaulard P, Knopf JF, Bendjaballah S, Mangnan-Marai A, Brière J, Fabiani B, Audouin J. Is sclerosing angiomatoid nodular transformation (SANT) of the splenic red pulp identical to inflammatory pseudotumour? Report of 16 cases. *Histopathology*. 2008 Sep;53(3):299-310.

DiJoseph JF, Goad ME, Dougher MM, Boghaert ER, Kunz A, Hamann PR, Damle NK. Potent and specific antitumor efficacy of CMC-544, a CD22-targeted immunoconjugate of calicheamicin, against systemically disseminated B-cell lymphoma. *Clin Cancer Res*. 2004 Dec 15;10(24):8620-9.

Dudich, E., Semenkova, L., Dudich, I., Denesyuk, A., Tatulov, E., and Korpela, T.(2006). Alpha-fetoprotein antagonizes X-linked inhibitor of apoptosis protein anticaspase activity and disrupts XIAP-caspase interaction. *FEBS J* 273, 3837-3849

Duncia JV, Santella JB 3rd, Higley CA, Pitts WJ, Wityak J, Fietze WE, Rankin FW, Sun JH, Earl RA, Tabaka AC, Teleha CA, Blom KF, Favata MF, Manos EJ, Daulerio AJ, Stradley DA, Horiuchi K, Copeland RA, Scherle PA, Trzaskos JM, Magolda RL, Trainor GL, Wexler RR, Hobbs FW, Olson RE. MEK inhibitors: the chemistry and biological activity of U0126, its analogs, and cyclization products. *Bioorg Med Chem Lett*. 1998 Oct 20; 8(20):2839-44.

Eddouks, M., Maghrani, M., Lemhadri, A., Ouahidi, M.L., Jouad, H., 2002. Ethnopharmacological survey of medicinal plants used for the treatment of diabetes mellitus, hypertension and cardiac diseases in the south-east region of Morocco (Tafilalet). *Journal of Ethnopharmacology* 82, 97–103.

Eddouks, M., Maghrani, M., Lemhadri, A., Ouahidi, M.L., Jouad, H., 2002. Ethnopharmacological survey of medicinal plants used for the treatment of diabetes mellitus, hypertension and cardiac diseases in the south-east region of Morocco (Tafilalet). *J Ethnopharmacol* 82, 97-103.

Eddouks, M., Maghrani, M., Louedec, L., Haloui, M., Michel, J.B., 2007. Antihypertensive activity of the aqueous extract of *Retama raetam* Forssk. leaves in spontaneously hypertensive rats. *J Herb Pharmacother* 7, 65-77.

Edziri H., Ammar S., Groh P., Mahjoub M.A., Mastouri M., Gutmann L., Mighri Z., Mahjoub A., 2007. Antimicrobial and cytotoxic activity of *Marrubium alysson* and *Retama raetam* grown in Tunisia. *Pak J Biol Sci* 10, 1759-1762.

Edziri H., Mastouri M., Cheraif I., Aouni M., 2010. Chemical composition and antibacterial, antifungal and antioxidant activities of the flower oil of *Retama raetam* (Forssk.) Webb from Tunisia. *Nat Prod Res* 24, 789-796.

Eisenbrand G, Pool-Zobel B, Baker V, Balls M, Blaauboer BJ, Boobis A, Carere A, Kevekordes S, Lhuguenot JC, Pieters R, Kleiner J. Methods of in vitro toxicology. *Food Chem Toxicol.* 2002 Feb-Mar;40(2-3):193-236.

Ekholm SV, Reed SI. Regulation of G(1) cyclin-dependent kinases in the mammalian cell cycle. *Curr Opin Cell Biol.* 2000 Dec;12(6):676-84.

El Hanbali F., Mellouki F., Akssira M., Balasquez A., 2004. Etude Comparative des Compositions Chimiques et de l'Activité Antibactérienne des Huiles Essentielles de *Chamaemelum eriolepis* Maire et *Chamaemelum Africana* J.&Four. 1er Congrès Maroc-Espagnol sur la Chimie Organique et 4ème Rencontre Andalou-Marocaine sur la Chimie des Produits Naturels 16-18.

El Hanbali F., Oulmoukhtar A.S., Lemrani M., Akssira M., Mellouki F., 2005. Activité anti-leishmanienne des huiles essentielles de deux camomilles : *Ormenis eriolepis* et *Ormenis africana*. International Congress On Medicinal Plants, Errachidia March 16-19, Morocco.

Estève MA, Carre' M, and Braguer D (2007) Microtubules in apoptosis induction: are they necessary? *Curr Cancer Drug Targets* 7:713–729.

Falck, J., Mailand, N., Syljuasen, R. G., Bartek, J. and Lukas, J. (2001). The ATM-Chk2-Cdc25A checkpoint pathway guards against radioresistant DNA synthesis. *Nature* 410, 842-847.

Festjens N, Vanden Berghe T, Vandenabeele P. Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: signalling cascades, important mediators and concomitant immune response. *Biochim Biophys Acta.* 2006 Sep-Oct;1757(9-10):1371-87.

Fontana, G., La Rocca, S., Passannanti, S., Paternostro, M., 2007. Sesquiterpene compounds from *Inula viscosa*. *Natural Product Research* 2, 824–827.

Fuentes-Prior P, Salvesen GS. The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition. *Biochem J*. 2004 Dec 1;384(Pt 2):201-32.

Fulda S, Debatin KM. Exploiting death receptor signaling pathways for tumor therapy. *Biochim Biophys Acta*. 2004 Dec 10;1705(1):27-41.

G.R., Tournier H.A., Prieto J.M., Mordujovich de Buschiazzo P., Rios J.L., 2002. Antioxidant activity of anti-inflammatory plant extracts. *Life Sciences* 70, 1023-1033.

Gardai SJ, Bratton DL, Ogden CA et al. (2006) Recognition ligands on apoptotic cells: a perspective. *J Leukoc Biol* 79:896–90.

Goldstein I, Ben-Horin S, Koltakov A, Chermoshnuk H, Polevoy V, Berkun Y, Amariglio N, Bank I. α 1beta1 Integrin⁺ and regulatory Foxp3⁺ T cells constitute two functionally distinct human CD4⁺ T cell subsets oppositely modulated by TNF α blockade. *J Immunol*. 2007 Jan 1;178(1):201-10.

Gondos A, Bray F, Brewster DH, Coebergh JW, Hakulinen T, Janssen- Heijnen ML, Kurtinaitis J, Brenner H (2008) Recent trends in cancer survival across Europe between 2000 and 2004: a model-based period analysis from 12 cancer registries. *Eur J Cancer* 44: 1463–1475

Gurib-Fakim A. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Mol Aspects Med*. 2006 Feb;27(1):1-93.

Hadrien Vuillet-A-Ciles, Aline Lagarde, Jacques Buxeraud, La chimiothérapie cytotoxique, *Actualités Pharmaceutiques*, Volume 53, Issue 540, November 2014, Pages 16-24

Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000 Jan 7;100(1):57-70.

Hashimoto T, Juso K, Nakano M, Nagano T, Kambayashi S, Nakashima A, Kikkawa U, Kamada S. Preferential Fas-mediated apoptotic execution at G1 phase: the resistance of mitotic cells to the cell death. *Cell Death Dis*. 2012 May24; 3:e313.

Heinrich M, Gibbons S. Ethnopharmacology in drug discovery: an analysis of its role and potential contribution. *J Pharm Pharmacol*. 2001 Apr;53(4):425-32.

Hernández, V., Recio, M.C., Máñez, S., Giner, R.M., Ríos, J.-L., 2007. Effects of naturally occurring dihydroflavonols from *Inula viscosa* on inflammation and enzymes involved in the arachidonic acid metabolism. *Life Sciences* 81, 480–488.

Hmamouchi M., 2001. Les plantes médicinales et aromatiques Marocaines. 2ème édition, Impri Fédala (Mohammadia).

Hortobagyi G.N., 1997. Anthracyclines in the treatment of cancer. An Overview *Drugs* 54 1-7. Hou M., Xu D., Bjorkholm M., Gruber A., 2001. Real-time quantitative telomeric repeat amplification protocol assay for the detection of telomerase activity. *Clin Chem* 47, 519-524.

Hseini S., Kahouadji A., Lahssissene H., Tijane M., 2007. Analyses floristique et ethnobotaniques des plantes vasculaires médicinales utilisées dans la région de Rabat (Maroc occidental). *Lazaroa* 28, 93-100.

Hudaib, M., Mohammad, M., Bustanji, Y., Tayyem, R., Yousef, M., Abuirjeie, M., Aburjai, T., 2008. Ethnopharmacological survey of medicinal plants in Jordan, Mujib Nature Reserve and surrounding area. *Journal of Ethnopharmacology* 120, 63–71.

Itoh N, Nagata S. A novel protein domain required for apoptosis. Mutational analysis of human Fas antigen. *J Biol Chem*. 1993 May 25;268(15):10932-7.

Jaffe AB, Hall A. 2005. Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 21:247–269.

Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2009. *CA Cancer J Clin*. 2009 Jul-Aug;59(4):225-49.

Johnson RP, El-Yazbi AF, Takeya K, Walsh EJ, Walsh MP, Cole WC. Ca²⁺ sensitization via phosphorylation of myosin phosphatase targeting subunit at threonine-855 by Rho kinase contributes to the arterial myogenic response. *The Journal of Physiology*. 2009;587(Pt 11):2537-2553. doi:10.1113/jphysiol.2008.168252.

Jones PJ (1999). Cholesterol-lowering action of plant sterols. *Curr Atheroscler Rep* 1, 230–235. Loi, 2000;

Jouad H., Haloui M., Rhiouani H., El Hilaly J., M., E., 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.

Ju YH, Clausen LM, Allred KF, Almada AL, Helferich WG (2004). β -Sitosterol, β -sitosterol glucoside, and a mixture of β -sitosterol and β -sitosterol glucoside modulate the growth of estrogen responsive breast cancer cells in vitro and ovariectomized athymic mice. *J Nutr* 134, 1145–1151

KAABECHE, M., 1990. - Les Groupements Végétaux de la Région de Bou-Saada. Contribution à la Synsystème des Groupements steppiques du Maghreb. Thèse de Doctorat d'Université. 2 Vol., Université de Paris-Sud, Centre d'Orsay, France.

Kahnamoui K, Cadeddu M, Farrokhyar F, Anvari M. Laparoscopic surgery for colon cancer: a systematic review. *Can J Surg*. 2007 Feb;50(1):48-57.

Kaileh, M., Berghe, W.V., Boone, E., Essawi, T., Haegeman, G., 2007. Screening of indigenous Palestinian medicinal plants for potential anti-inflammatory and cytotoxic activity. *Journal of Ethnopharmacology* 113, 510–516.

Kansole M.M.R. (2009). Etude ethnobotanique, phytochimique et activités biologiques de quelques lamiaceae du Burkina Faso. Mémoire pour obtenir un diplôme Diplôme d'Etudes Approfondies (D.E.A) en Sciences Biologiques Appliquées, Burkina Faso.

Kantari C, Walczak H. Caspase-8 and bid: caught in the act between death receptors and mitochondria. *Biochim Biophys Acta*. 2011 Apr;1813(4):558-63.

Kastan MB, Onyekwere O, Sidransky D, Vogelstein B, Craig RW. Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res*. 1991 Dec 1;51(23 Pt 1):6304-11.

Katan MB, Grundy SM, Jones P, Law M, Miettinen T, Paoletti R (2003). Efficacy and safety of plant stanols and sterols in the management of blood cholesterol levels. *Mayo Clin Proc* 78, 965–978.

Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 1972 Aug;26(4):239-57.

Khan N, Adhami VM, Mukhtar H. Apoptosis by dietary agents for prevention and treatment of prostate cancer. *Endocrine-related cancer* 2010;17(1):R39-R52.

Khan N, Adhami VM, Mukhtar H. Apoptosis by dietary agents for prevention and treatment of prostate cancer. *Endocrine-related cancer*. 2010;17(1):R39-R52.

Kinghorn AD, Farnsworth NR, Soejarto DD, Cordell GA, Pezzuto JM, Udeani GO, Wani MC, Wall ME, Navarro HA, Kramer RA, Menendez AT, Fairchild CR, Lane KE, Forenza S, Vyas DM, Lam KS, Shu Y-Z. Novel strategies for the discovery of plant-derived anticancer agents. *Pure Appl. Chem* 1999;71:611–1618.

Klas C, Debatin KM, Jonker RR, Kramer PH. Activation interferes with the APO-1 pathway in mature human T cells. *Int Immunol*. 1993 Jun;5(6):625-30.

Klionsky DJ, Emr SD. Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science*. 2000 Dec 1;290(5497):1717-21.

Komarova EA, Neznanov N, Komarov PG, Chernov MV, Wang K, Gudkov AV. p53 inhibitor pifithrin alpha can suppress heat shock and glucocorticoid signaling pathways. *J Biol Chem*. 2003 May 2;278(18):15465-8.

Kreitman RJ, Squires DR, Stetler-Stevenson M, Noel P, FitzGerald DJ, Wilson WH, Pastan I. Phase I trial of recombinant immunotoxin RFB4(dsFv)-PE38 (BL22) in patients with B-cell malignancies. *J Clin Oncol*. 2005 Sep 20;23(27):6719-29.

Kreitman RJ, Stetler-Stevenson M, Margulies I, Noel P, Fitzgerald DJ, Wilson WH, Pastan I. Phase II trial of recombinant immunotoxin RFB4(dsFv)-PE38 (BL22) in patients with hairy cell leukemia. *J Clin Oncol*. 2009 Jun 20;27(18):2983-90.

Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, El-Deiry WS, Golstein P, Green DR, Hengartner M, Knight RA, Kumar S, Lipton SA, Malorni W, Nuñez G, Peter ME, Tschopp J, Yuan J, Piacentini M, Zhivotovsky B, Melino G; Nomenclature Committee on Cell Death 2009. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ*. 2009 Jan;16(1):3-11.

Lauro, L., Rolih, C., 1990. Observations and research on an extract of *Inula viscosa* Ait. *Bollettino della Società Italiana di Biologia Sperimentale* 66, 829–834.

Lee JH, Paull TT. Direct activation of the ATM protein kinase by the Mre11/Rad50/Nbs1 complex. *Science*. 2004 Apr 2;304(5667):93-6.

Lefkopoulos D, Ferreira I, Isambert A, Le Péchoux C, Mornex F. [Present and future of the image guided radiotherapy (IGRT) and its applications in lung cancer treatment]. *Cancer Radiother*. 2007 Jan-Feb;11(1-2):23-31.

Les plantes médicinales et aromatiques marocaines de Hmamouchi (2001), 2ème édition.

Li H, Zhu H, Xu CJ, Yuan J. 1998. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 94: 491 –501.

Li Y., Wicha M.S., Schwartz S.J., Sun D., 2011. Implications of cancer stem cell theory for cancer chemoprevention by natural dietary compounds. *J Nutr Biochem*.

Lingwood, D., J. Ries, P. Schwillie, K. Simons. 2008. *Plasma membranes are poised for activation of raft phase coalescence at physiological temperature. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 105:10005–10010.*

Liu J, Lin A. (2005). Role of JNK activation in apoptosis: a doubleedged sword. *Cell Res* 15: 36–42.

Ljungman M. 2009. Targeting the DNA damage response in cancer. *Chem Rev* 109:2929–2950

Llambi, F., Moldoveanu, T., Tait, S.W.G., Bouchier-Hayes, L., Temirov, J., McCormick, L.M., Dillon, C.P., and Green, D.R. (2011). *Mol. Cell* 44, this issue, 517–531.

Lu D, Lin W, Gao X, et al. Direct ubiquitination of pattern recognition receptor FLS2 attenuates plant innate immunity. *Science (New York, NY)*. 2011;332(6036):1439-1442. doi:10.1126/science.1204903.

Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, Wang X. 1998. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 94: 481–490.

Luo, H., Hanratty, W.P., Dearolf, C.R. (1995). An amino acid substitution in the *Drosophila* hopTum-1 Jak kinase causes leukemia-like hematopoietic defects. *EMBO J.* **14**(7): 1412--1420.

Luo, J., Manning, B.D., and Cantley, L.C. (2003). Targeting the PI3K-Akt pathway in human cancer: rationale and promise. Cancer Cell 4, 257-262. Welsh et al., 2006

Lv M., Xu H., 2011. Recent Advances in Semisynthesis, Biosynthesis, Biological Activities, Mode of Action, and Structure-Activity Relationship of Podophyllotoxins: An Update (2008-2010).

Maas, C., Verbrugge, I., De Vries, E., Savich, G., Van De Kooij, L.W., Tait, S.W.G., Borst, J. Smac/DIABLO release from mitochondria and XIAP inhibition are essential to limit clonogenicity of Type i tumor cells after TRAIL receptor stimulation (2010) *Cell Death and Differentiation*, 17 (10), pp. 1613-1623.

Maghrani M., Michel J.B., Eddouks M., 2005a. Hypoglycaemic activity of *Retama raetam* in rats. *Phytother Res* 19, 125-128.

Maghrani M., Zeggwagh N.A., Haloui M., Eddouks M., 2005b. Acute diuretic effect of aqueous extract of *Retama raetam* in normal rats. *J Ethnopharmacol* 99, 31-35.

Magrath I. Building capacity for cancer control in developing countries: the need for a paradigm shift. *Lancet Oncol.* 2007; 8 (7): 562-3.

Magrath I. Building capacity for cancer control in developing countries: the need for a paradigm shift. *Lancet Oncol.* 2007 Jul;8(7): 562-3.

Máñez, S.,Hernández,V.,Giner,R.-M.,Ríos,J.-L.,Recio,M.D.C.,2007.Inhibitionof pro-inflammatory enzymes by inuviscolide,a sesquiterpene lactone from *Inula viscosa*. *Fitoterapia*78, 329–331.

Maoz M., Neeman I., 1998. Antimicrobial effects of aqueous plant extracts on the fungi *Microsporum canis* and *Trichophyton rubrum* and on three bacterial species. *Lett Appl Microbiol* 26, 61-63.

Maoz M., Neeman I., 2000. Effect of *Inula viscosa* extract on chitin synthesis in dermatophytes and *Candida albicans*. *Journal of Ethnopharmacology* 71, 479-482.

Maria Grazia Valsecchi, Eva Steliarova-Foucher Cancer registration in developing countries: luxury or necessity? *The Lancet Oncology* 1 February 2008 Volume 9 Issue 2 :159-167

Martin SJ and Green DR (1995) Protease activation during apoptosis: death by a thousand cuts. *Cell* 82: 349 ± 352

Matsuoka S, Ballif BA, Smogorzewska A, McDonald ER 3rd, Hurov KE, Luo J, Bakalarski CE, Zhao Z, Solimini N, Lerenthal Y, Shiloh Y, Gygi SP, Elledge SJ. ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. *Science*. 2007 May 25;316(5828):1160-6.

Mayer AM, Gustafson KR. Marine pharmacology in 2001-2: antitumour and cytotoxic compounds. *Eur J Cancer*. 2004 Dec;40(18):2676-704.

Mayer AM, Hamann MT. Marine pharmacology in 2000: marine compounds with antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiplatelet, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the cardiovascular, immune, and nervous systems and other miscellaneous mechanisms of action. *Mar Biotechnol (NY)*. 2004 Jan-Feb;6(1):37-52.

Meijer, A.H., Gabby Krens, S.F., Medina Rodriguez, I.A., He, S., Bitter, W., Ewa SnaarJagalska, B. and Spink, H.P. (2004) Expression analysis of the Toll-like receptor and TIR domain adaptor families of zebrafish. *Mol. Immunol.* 40, 773-783.

Melino G, Knight RA, Green DR. Publications in cell death: the golden age. *Cell Death Differ*. 2001 Jan;8(1):1-3.

Mellstedt H. Cancer initiatives in developing countries. *Ann Oncol*. 2006 Jun;17 Suppl 8:viii24-viii31.

Merghoub, N., Benbacer, L., Amzazi, S., Morjani, H., ElMzibri, M., 2009. Cytotoxic effect of some Moroccan medicinal plant extracts on human cervical cell lines. *Journal of Medicinal Plants Research* 3, 1045–1050.

Meric J, Rottey S, Olausson K, Soria J, Khayat D, Rixe O et al. (2006). Cyclooxygenase-2 as a target for anticancer drug development. *Crit Rev Oncol Hematol* 59, 51–64.

Moore A, Donahue CJ, Bauer KD, Mather JP. Simultaneous measurement of cell cycle and apoptotic cell death. *Methods Cell Biol*. 1998;57:265-78.

Muppidi JR, Siegel RM. Ligand-independent redistribution of Fas (CD95) into lipid rafts mediates clonotypic T cell death. *Nat Immunol*. 2004 Feb;5(2):182-9.

Musthaba ,S.M., Athar ,M.T., Kamal ,Y.T., Baboota ,S., Ali ,J., Ahmad,S., 2011. Fast analysis and validation of rutinin anti-psoriatic formulation by HPLC. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 34, 446–455.

Musthaba, S.M., Athar, M.T., Kamal, Y.T., Baboota, S., Ali, J., Ahmad, S., 2011. Fast analysis and validation of rutin in anti-psoriatic ayurvedic formulation by HPLC. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 34, 446–455.

Ndozangue-Touriguine O, Sebbagh M, Merino D, Micheau O, Bertoglio J, Breard J. A mitochondrial block and expression of XIAP lead to resistance to TRAIL-induced apoptosis during progression to metastasis of a colon carcinoma. *Oncogene* 2008; 27:6012–6022.

Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *J Nat Prod.* 2012 Mar 23;75(3):311-35.

Ngoma, T. "World Health Organization cancer priorities in developing countries." *Annals of oncology* 17.suppl 8 (2006): viii9-viii14.

Nobili S., Lippi D., Witort E., Donnini M., Bausi L., Mini E., Capaccioli S., 2009. Natural compounds for cancer treatment and prevention. *Pharmacol Res* 59, 365-378.

Norbury CJ, Zhivotovsky B. 2004. DNA damage-induced apoptosis. *Oncogene* 23:2797–2808.

Nyberg, K. A., Michelson, R. J., Putnam, C. W. and Weinert, T. A. (2002). Toward maintaining the genome, DNA damage and replication checkpoints. *Annu. Rev. Genet.* 36, 617-656.

Ogilvy S, Metcalf D, Gibson L, Bath ML, Harris AW and Adams JM. (1999). *Blood*, in press.

Passalacqua ,N.G ,Guarrera ,P.M ,DeFine ,G., 2007.Contribution to the knowledge of the folk plant medicine in Calabria region (SouthernItaly).*Fitoterapia*78, 52–68

Paul Nurse, Ordering S phase and M phase in the cell cycle, *Cell*, Volume 79, Issue 4, 18 November 1994

Pereira WO, Amarante-Mendes GP. Apoptosis: a programme of cell death or cell disposal? *Scand J Immunol.* 2011 May;73(5):401-7.

Pollard JM, Gatti RA. Clinical radiation sensitivity with DNA repair disorders: an overview. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2009 Aug 1;74(5):1323-31.

Prince, H.M., Bishton, M., and Harrison, S. (2008). The potential of histone deacetylase inhibitors for the treatment of multiple myeloma. *Leuk Lymphoma* 49, 385-387.

Qasem J.R., Al-Abed A.S., Abu-Blan M.A., 1995. Antifungal activity of clammy inula (*Inula viscosa*) on *Helminthosporium sativum* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Phytopathol Mediterr* 34, 7-14.

Rasola A, Bernardi P. The mitochondrial permeability transition pore and its involvement in cell death and in disease pathogenesis. *Apoptosis*. 2007 May;12(5):815-33.

Rates SM. Plants as source of drugs. *Toxicon*. 2001 May; 39 (5):603-13.

Reuter S, Eifes S, Dicato M, Aggarwal BB, Diederich M. Modulation of anti-apoptotic and survival pathways by curcumin as a strategy to induce apoptosis in cancer cells. *Biochem Pharmacol*. 2008 Dec 1;76(11):1340-51.

Rolland D, Ribrag V, Haioun C, Ghesquieres H, Jardin F, Bouabdallah R, Franchi P, Briere J, De Kerviler E, Chassagne-Clement C, Raponi M, Houlgatte R, Jais JP, Thieblemont C. Phase II trial and prediction of response of single agent tipifarnib in patients with relapsed/refractory mantle cell lymphoma: a Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte trial. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2010 Mar;65(4):781-90. doi: 10.1007/s00280-009-1185-4.

Saad, B., Said, O., 2011. Greco-Arab and Islamic Herbal Medicine—Traditional System, Ethics, Safety, Efficacy and Regulatory Issues. John Wiley & Sons Ed. p. 541.

Sakahira H, Enari M, Nagata S. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature*. 1998 Jan 1;391(6662):96-9.

Salhi S., Fadli M., Zidane L., Douira A., 2010. Etudes floristique et ethnobotanique des plantes médicinales de la ville de Kénitra (Maroc). *Lazaroa* 31, 133-146.

SANOGO, Abasse. "Cancers du pancréas: études cliniques, épidémiologique et prise en charge dans le service de médecine interne de l'hôpital du Point G."2004, *Th.: Méd* 345.

Santarpia L, Lippman SL, El-Naggar AK. Targeting the Mitogen-Activated Protein Kinase RAS-RAF Signaling Pathway in Cancer Therapy. *Expert opinion on therapeutic targets*. 2012; 16(1):103-119.

SANTOS, M.H.L.C. Avaliação do efeito de bacterias promotoras de crescimento no cultivo in vitro e em casa-de-vegetação de *Heliconia psittacorum*. 119p. 1999. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

Sapet C, Simoncini S, Loriod B, Puthier D, Sampol J, Nguyen C, Dignat-George F, Anfosso F. 2006. Thrombin-induced endothelial microparticle generation: identification of a novel pathway involving ROCK-II activation by caspase-2. *Blood*. 108:1868–1876.

Sassi A.B., Harzallah-Skhiri F., Bourgougnon N., Aouni M., 2008. Antiviral activity of some Tunisian medicinal plants against Herpes simplex virus type 1. *Nat Prod Res* 22, 53-65.

Schulte M, Reiss K, Lettau M, Maretzky T, Ludwig A, Hartmann D, et al. ADAM10 regulates FasL cell surface expression and modulates FasL-induced cytotoxicity and activation-induced cell death. *Cell Death Differ* 2007; 14:1040–1049.

Sebbagh M, Hamelin J, Bertoglio J, Solary E, Bréard J. Direct cleavage of ROCK II by granzyme B induces target cell membrane blebbing in a caspase-independent manner. *J Exp Med*. 2005 Feb 7;201(3):465-71.

Sebbagh M, Renvoizé C, Hamelin J, Riché N, Bertoglio J, Bréard J. Caspase-3-mediated cleavage of ROCK I induces MLC phosphorylation and apoptotic membrane blebbing. *Nat Cell Biol*. 2001 Apr;3(4):346-52.

Shailaja Kasibhatla, Thomas Brunner, Laurent Genestier, Fernando Echeverri, Artin Mahboubi, Douglas R Green, DNA Damaging Agents Induce Expression of Fas Ligand and Subsequent Apoptosis in T Lymphocytes via the Activation of NF- κ B and AP-1, *Molecular Cell*, Volume 1, Issue 4, March 1998, Pages 543-551.

Shamas-Din A, Brahmabhatt H, Leber B, Andrews DW. BH3-only proteins: Orchestrators of apoptosis. *Biochim Biophys Acta*. 2011.

Shangary S, Brown KD, Adamson AW, Edmonson S, Ng B, Pandita TK, Yalowich J, Taccioli GE, Baskaran R. Regulation of DNA-dependent protein kinase activity by ionizing radiation-activated abl kinase is an ATM-dependent process. *J Biol Chem*. 2000 Sep 29;275(39):30163-8.

Shangary S, Qin D, McEachern D, Liu M, Miller RS, Qiu S, Nikolovska-Coleska Z, Ding K, Wang G, Chen J, Bernard D, Zhang J, Lu Y, Gu Q, Shah RB, Pienta KJ, Ling X, Kang S, Guo M, Sun Y, Yang D, Wang S. Temporal activation of p53 by a specific MDM2 inhibitor is selectively toxic to tumors and leads to complete tumor growth inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Mar 11;105(10):3933-8.

Shinohara M, et al. (2000) Tid1/Rdh54 promotes colocalization of rad51 and dmc1 during meiotic recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(20):10814-9.

Sofowora, A. (1993). *Medicinal plants and Traditional Medicine in Africa*. Spectrum Books Ltd (Pub.), Ibadan.

Steelman LS, Chappell WH, Abrams SL, et al. Roles of the Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR pathways in controlling growth and sensitivity to therapy-implications for cancer and aging. *Aging (Albany NY)*. 2011;3(3):192-222.

Steensma, D.P., McClure, R.F., Karp, J.E., Tefferi, A., Lasho, T L., Powell, H.L., DeWald, G.W., Kaufmann, S.H. JAK2 V617F is a rare finding in de novo acute myeloid leukemia, but STAT3 activation is common and remains unexplained (2006) *Leukemia*, 20 (6), pp. 971-978.

Stewart MJ, Steenkamp V, Zuckerman M. The toxicology of African herbal remedies. *Ther Drug Monit* 1998;20:510—6.

St-Onge MP, Jones PJ (2003). Phytosterols and human lipid metabolism: efficacy, safety, and novel foods. *Lipids* 38, 367–375 Abumweis *et al*, 2008

Strasser A, Jost PJ, Nagata S. The many roles of FAS receptor signaling in the immune system. *Immunity*. 2009 Feb 20;30(2):180-92.

Tahraoui, A., El-Hilaly, J., Israili, Z.H., Lyoussi, B., 2007. Ethnopharmacological survey of plants used in the traditional treatment of hypertension and diabetes in southeastern Morocco (Errachidia province). *Journal of Ethnopharmacology* 110, 105–117.

Talib, W.H., Mahasneh, A.M., 2010a. Antimicrobial, cytotoxicity and phytochemical screening of Jordanian plants used in traditional medicine. *Molecules* 15, 1811–1824.

Talib, W.H., Mahasneh, A.M., 2010b. Antiproliferative activity of plant extracts used against cancer in traditional medicine. *Scientia Pharmaceutica* 78, 33–45.

Talib, W.H., Zarga, M.H.A., Mahasneh, A.M., 2012. Antiproliferative, antimicrobial and apoptosis inducing effect of compounds isolated from *Inula viscosa*. *Molecules* 17, 3291–3303.

Thangapazham, R.L., A. Sharma and R.K. Maheshwari, 2006. Multiple molecular targets in cancer chemoprevention by curcumin. *AAPS J.*, 8(3): 52

Thornberry NA, Rano TA, Peterson EP, Rasper DM, Timkey T, Garcia-Calvo M, Houtzager VM, Nordstrom PA, Roy S, Vaillancourt JP, Chapman KT, Nicholson DW. A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis. *J Biol Chem*. 1997 Jul 18;272(29):17907-11.

Tjandra JJ, Chan MKY. Follow-up after curative resection of colorectal cancer: a meta-analysis. *Diseases Colon and Rectum*. 2007;50(11):1783–1799.

Tubiana M. [Prevention of cancer and the dose-effect relationship: the carcinogenic effects of ionizing radiations]. *Cancer Radiother*. 2009 Jul;13(4):238-58.

Ulivieri C. Cell death: insights into the ultrastructure of mitochondria. *Tissue Cell*. 2010 Dec;42(6):339-47.

Vassilev, L.T. (2007). MDM2 inhibitors for cancer therapy. *Trends Mol Med* 13, 23-31.

Veiss, D.J., Sorenson, C.M., Shutter, J.R., and Korsmeyer, S.J. (1993). Bcl-2–deficient mice demonstrate fulminant lymphoid apoptosis, polycystic kidneys, and hypopigmented hair. *Cell* 75, 229–240.

Viallard JF, Lacombe F, Belloc F, Pellegrin JL, Reiffers J. [Molecular mechanisms controlling the cell cycle: fundamental aspects and implications for oncology]. *Cancer Radiother.* 2001 Apr;5(2):109-29.

von Haefen C, Wieder T, Essmann F, Schulze-Osthoff K, Dörken B and Daniel PT. (2003). *Oncogene*, 22, 2236–2247.

Vousden KH, Lane DP. p53 in health and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007 Apr;8(4):275-83.

Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P. Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ.* 2003 Jan;10(1):45-65.

Wajant H. CD95L/FasL and TRAIL in tumour surveillance and cancer therapy. *Cancer Treat Res.* 2006;130:141-65.

Warmerdam DO, Kanaar R, Smits VAJ. Differential Dynamics of ATR-Mediated Checkpoint Regulators. *Journal of Nucleic Acids* 2010.

Weinberg RA. Oncogenes and tumor suppressor genes. *CA Cancer J Clin.* 1994 May-Jun;44(3):160-70.

Westendorp MO, Frank R, Ochsenbauer C, Stricker K, Dhein J, Walczak H, Debatin KM, Krammer PH. Sensitization of T cells to CD95-mediated apoptosis by HIV-1 Tat and gp120. *Nature.* 1995 Jun 8;375(6531):497-500.

Wieder T, Essmann F, Prokop A, Schmelz K, SchulzeOsthoff K, Beyaert R, Dörken B and Daniel PT. (2001). *Blood*, 97, 1378 -1387.

Xie, X., Zhao, X., Liu, Y., Zhang, J., Matusik, R.J., Slawin, K.M., and Spencer, D.M. (2001). Adenovirus-mediated tissue-targeted expression of a caspase-9-based artificial death switch for the treatment of prostate cancer. *Cancer Res* 61, 6795-6804.

Xu J, Kalos M, Stolk JA, Zasloff EJ, Zhang X, Houghton RL, Filho AM, Nolasco M, Badaró R, Reed SG. Identification and characterization of prostein, a novel prostate-specific protein. *Cancer Res.* 2001 Feb 15;61(4):1563-8

Yang, J.K. (2008). FLIP as an anti-cancer therapeutic target. *Yonsei Med J* 49, 19-27.

Yarden RI, Pardo-Reoyo S, Sgagias M, Cowan KH, Brody LC. BRCA1 regulates the G2/M checkpoint by activating Chk1 kinase upon DNA damage. *Nat Genet.* 2002Mar;30(3):285-9.

Youle, Richard J., and Andreas Strasser, (2008) The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 47-59.

Yu X, Chini CC, He M, Mer G, Chen J. The BRCT domain is a phospho-protein binding domain. *Science*. 2003 Oct 24;302(5645):639-42.

Zeggwagh, N.A., Ouahidi, M.L., Lemhadri, A., Eddouks, M., 2006. Study of hypoglycaemic and hypolipidemic effects of *Inula viscosa* L. aqueous extract in normal and diabetic rats. *J Ethnopharmacol* 108, 223-227.

Zhang, W., Zhang, H., and Xing, L. (2006). Antisense oligonucleotide of hypoxia-inducible factor-1alpha suppresses growth and tumorigenicity of lung cancer cells A549. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 26, 448-450.

Zhou D.C., Zittoun R., Marie J.P., 1995. Homoharringtonine: an effective new natural product in cancer chemotherapy. *Bull Cancer* 82, 987-995.

Ziegler DS, Kung AL. Therapeutic targeting of apoptosis pathways in cancer. *Curr Opin Oncol*. 2008 Jan;20(1):97-103.