

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

ÉTUDE COMPARATIVE DE L'EXPRESSION DE BIOMARQUEURS
INFLAMMATOIRES DANS 7 LIGNÉES CELLULAIRES DÉRIVÉES DE
GLIOBLASTOMES :
IMPACT DES MOLÉCULES PHYTOCHIMIQUES

MÉMOIRE
PRÉSENTÉ
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN BIOCHIMIE

PAR
CLÉMENCE BENSIALI HADAUD

NOVEMBRE 2017

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.07-2011). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier mon directeur de recherche, le Professeur Borhane Annabi, pour avoir cru en mes capacités et qui m'a ouvert les portes de son laboratoire, pour la confiance qu'il m'a accordée et l'accueil chaleureux au sein de son équipe. Je remercie également le Dr Sylvie Lamy pour son aide précieuse et ses conseils, pour m'avoir guidée et épaulée tout au long de ma maîtrise. Je leur adresse toute ma reconnaissance pour leur disponibilité.

Mes chaleureux remerciements à Annie Levert, Alain Zgheib et Julie Poirier, pour leur support technique et moral. Je tiens également à témoigner toute mon amitié et ma reconnaissance aux membres du Laboratoire d'Oncologie Moléculaire, notamment Amélie Vézina qui m'a formée, conseillée et soutenue tout au long de mon parcours. Merci également à Evelyne Muhire pour son soutien, sa présence, son amitié et pour tous les fou rire et confidences que nous avons partagé depuis notre rencontre au laboratoire. Je tiens à remercier mes amis et collègues Samuel Sheehy, Samuel Burke-Nanni, Pascale Gagné, Djahida Djerir, Cynthia Charfi, Mustapha Idir, Amira Ouanouki, Hana Benenemissi, Jonathan Pratt, Nicolas Heddebaut, Bayader Annabi, pour les conseils et les bons moments passés ensemble, ce fut très agréable de travailler avec vous.

Je ne saurais manquer de remercier tout particulièrement les membres de ma famille pour leur soutien et leur amour. Christelle (maman) et Richard, vous avez toujours été présents pour moi. C'est vous qui m'avez permis de devenir ce que je suis. Merci pour votre écoute et vos conseils, vous m'avez donné la force de mener à terme ce projet d'étude. Merci à mes petites sœurs Célia, Mélissa et Joëlle qui n'ont

cessé et ne cessent encore de m'encourager dans tout ce que j'entreprend merci pour tout ce que vous m'apportez.

Je voudrais aussi remercier mes amis Maude Desjardins et Jaouad Chabli d'avoir été là pour moi dans les moments de doutes et qui ont toujours trouvé les mots justes pour me donner du courage et à ma deuxième famille de cœur rencontré à mon arrivée à l'UQAM Clara Lafortune, Audrey Glory, Florian Pierre et Carole-Anne De Carufel pour leur soutien et conseils tout au long de ma maîtrise.

Enfin, j'adresse des remerciements à la Fondation UQAM et à la Chaire en Prévention et Traitement du Cancer pour le support financier.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS.....	iii
TABLE DES MATIÈRES	v
LISTE DES FIGURES.....	ix
LISTE DES TABLEAUX.....	xi
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	xii
RÉSUMÉ	xvi
CHAPITRE I	
INTRODUCTION	1
1.1 Le cancer.....	1
1.1.1 Généralités.....	1
1.1.2 Statistiques.....	3
1.2 Le cancer du cerveau.....	4
1.2.1 Épidémiologie des tumeurs cérébrales	4
1.2.2 Classification des gliomes	5
1.2.3 Les glioblastomes	6
1.3 Inflammation et cancer	8
1.3.1 Généralités.....	8
1.3.2 Biomarqueurs de l'inflammation liés à la cancérogenèse	11
1.4 Les voies de signalisation intracellulaire impliquées dans le cancer	16
1.4.1 La voie de signalisation des MAP kinases	16
1.4.2 La voie de signalisation ERK	17

1.4.3	La voie de signalisation JNK	18
1.4.4	La voie de signalisation p38	20
1.5	Quelques biomarqueurs de l'angiogenèse, de l'invasion, de la migration et des métastases	20
1.5.1	VEGF.....	20
1.5.2	Matrice extracellulaire et métalloprotéases	21
1.5.3	Rôle de la périostine dans la cancérogénèse	23
1.6	La saine alimentation, une forme de prévention contre le cancer	24
1.6.1	Chimioprévention par des molécules issues de la diète.....	24
1.6.2	Les flavonoïdes, la sous-classe la plus abondante des polyphénols	26
1.6.3	L'épigallocatechine-3-gallate (EGCG), un polyphénol du thé vert	30
1.6.4	L'hydroxytyrosol un composé bénéfique pour la santé dans l'huile d'olive ...	32
1.6.5	La quercétine.....	34
1.6.6	La delphinidine	36
1.6.7	Le curcuma et curcumine.....	37
1.7	Prévenir le cancer	39
CHAPITRE II		
	OBJECTIFS DE RECHERCHE ET PROBLÉMATIQUE.....	43
CHAPITRE III		
	MATERIELS ET METHODES	45
3.1	Matériels	45
3.2	Les 7 lignées cellulaires dérivées de glioblastomes.....	46
3.3	Méthodes	47
3.3.1	Culture cellulaire	47
3.3.2	Extraction de l'ARN total	48
3.3.3	Synthèse d' ADNc et PCR en temps réel	49

3.3.4	Lyse cellulaire et récolte du milieu de culture conditionné.....	50
3.3.5	Dosage des protéines	51
3.3.6	Électrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE)	51
3.3.7	Immunodétection des protéines d'intérêt	52
3.3.8	Migration cellulaire en temps réel	52
3.3.9	Zymographie	53
CHAPITRE IV		
RÉSULTATS		54
4.1	Comparaison des biomarqueurs d'intérêt des 7 lignées de glioblastome stimulées par le TNF-α	54
4.1.1	Comparaison génique	54
4.1.2	Comparaison de l'expression des métalloprotéases	56
4.1.3	Etude comparative du pouvoir invasif de 7 lignées de glioblastomes	58
4.1.4	Expression des protéines d'intérêt dans une sélection de 4 lignées dérivées de glioblastomes	60
4.2	Impact des phytochimiques sur l'inflammation	62
4.2.1	U-118	62
4.2.2	U-138	69
4.2.3	U-87	77
4.2.4	HS-683.....	83
CHAPITRE V		
DISCUSSION.....		89
5.1	Similarités et différences d'expression observées dans les 7 lignées de glioblastomes face à l'inflammation	91
5.2	Potentiel anti-inflammatoire des cinq molécules phytochimiques dans la progression des glioblastomes	94

CHAPITRE VI	
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	98
ANNEXES	101
BIBLIOGRAPHIE	113

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1. Étapes de la cancérogenèse.....	3
Figure 1.2. IRM d'un Glioblastome temporal gauche.....	7
Figure 1.3. Inflammation protumorale.....	11
Figure 1.4. Implication de la liaison du TNF- α à son récepteur TNF-R1 dans toutes les phases de la cancérogenèse.....	13
Figure 1.5. Les voies de signalisation des MAP kinases.....	17
Figure 1.6. Structure de base des flavonoïdes.....	27
Figure 1.7. Schéma général de la voie de biosynthèse des flavonoïdes.....	29
Figure 1.8. Structure chimique de l'EGCG.....	31
Figure 1.9. Structure chimique de l'hydroxytyrosol.....	33
Figure 1.10. Structure chimique de la quercétine.....	35
Figure 1.11. Structure chimique de la delphinidine.....	37
Figure 1.12. Structure moléculaire de la curcumine.....	38
Figure 1.13. Une taille unique ne convient pas à tous.....	41
Figure 4.1. Expression des métalloprotéases MMP-9 et MMP-2 en en présence de TNF- α dans les 7 lignées cancéreuses de glioblastomes (n=1).....	57
Figure 4.2. Étude de la capacité migratoire des différentes lignées cancéreuses en présence ou non de TNF- α	59
Figure 4.3. Effet de la stimulation des 7 lignées cancéreuses au TNF- α durant 5 min et 24h sur l'expression des différentes protéines d'intérêt (n=1).....	61
Figure 4.4. Impact des molécules phytochimiques sur la migration des cellules U-118.....	65
Figure 4.5. Action des molécules phytochimiques sur l'expression des MMPs des U-118 stimulées au TNF- α (n=1).....	66
Figure 4.6. Impact des molécules phytochimiques sur l'expression des protéines de signalisations de la lignée U-118 stimulée au TNF- α pendant 5 min et 24h (n=1).....	68
Figure 4.7. Impact des molécules phytochimiques sur la migration des cellules U-138.....	72

Figure 4.8. Action des molécules phytochimiques sur l'expression des MMPs des U-138 stimulées au TNF- α (n=1).	73
Figure 4.9. Impact des molécules phytochimiques sur l'expression des protéines de signalisations de la lignée U-138 stimulée au TNF- α pendant 5 min et 24h (n=1). ...	76
Figure 4.10. Impact des molécules phytochimiques sur la migration des cellules U-87.	79
Figure 4.11. Action des molécules phytochimiques sur l'expression des MMPs des U-87 stimulées au TNF- α (n=1).	80
Figure 4.12. Impact des molécules phytochimiques sur l'expression des protéines de signalisations de la lignée U-87 stimulée au TNF- α pendant 5 min et 24h (n=1).	82
Figure 4.13. Impact des molécules phytochimiques sur la migration des cellules Hs-683.	85
Figure 4.14. Action des molécules phytochimiques sur l'expression des MMPs des Hs-683 stimulées au TNF- α (n=1).	86
Figure 4.15. Impact des molécules phytochimiques sur l'expression des protéines de signalisations de la lignée Hs-683 stimulée au TNF- α pendant 5 min et 24h (n=1). ...	88

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 3.1. Informations sur les lignées cellulaires utilisées dans notre travail (ATCC = American Type Culture Collection).	47
Tableau 4.1. Expression génique des biomarqueurs d'intérêt chez les 7 lignées cancéreuses. Les résultats expriment s'il y a eu une hausse, une baisse ou aucune différence de l'expression génique par rapport au contrôle (sans TNF- α)	55
Tableau 4.2. Effet des molécules phytochimiques sur l'expression des biomarqueurs d'intérêt de la lignée cellulaire U-118 stimulée au TNF- α	63
Tableau 4.3. Effet des molécules phytochimiques sur l'expression des biomarqueurs d'intérêt de la lignée cellulaire U-138 stimulée au TNF- α	70
Tableau 4.4. Effet des molécules phytochimiques sur l'expression des biomarqueurs d'intérêt de la lignée cellulaire U-87 stimulée au TNF- α	77
Tableau 4.5. Effet des molécules phytochimiques sur l'expression des biomarqueurs d'intérêt de la lignée cellulaire Hs-683 stimulée au TNF- α	83

LISTE DES ABRÉVIATIONS

67LR	Récepteur à la laminine de 67 kDa
ADN	Acide désoxyribonucléique
Akt	Protéine kinase B
AP-1	Protéine activatrice
Apaf-1	Facteur d'activation de peptidase apoptotique
ARE	Élément de réponse antioxydant
ARN	Acide ribonucléique
BHE	Barrière hémato encéphalique
COX-2	Cyclooxygénase-2
CSF	Facteur de stimulation des colonies, « colony-stimulating factor »
Cytc	Cytochrome c
DAG	Diacylglycérol
DMSO	Diméthylsulfoxyde
Dp	Delphinidine
EC (-)	-épicatéchine
ECG (-)	-épicatéchine-3-gallate
EGC (-)	-épigallocatechine
EGCG (-)	-épigallocatechine-3-gallate
EGF	Facteur de croissance épidermique

EGFR	Récepteur du facteur de croissance épidermique
ERK	Kinases de la régulation des signaux extracellulaires
ERN	Espèces réactives nitrosylées
ERO	Espèces réactives oxygénées
FGF	Facteur de croissance des fibroblastes
GBM	Glioblastome multiforme
HT	Hydroxytyrosol
I κ B	Inhibiteur de NF- κ B
IKK	I κ B kinase
IL-1	Interleukine 1
IL-6	Interleukine 6
iNOS	Oxyde nitrique synthétase inductible
IRM	Imagerie par résonance magnétique
JNK	Kinase c-Jun N-terminal
kDa	Kilos Dalton
MAPK	Protéine kinase activée par signal mitogène
MEC	Matrice extracellulaire
MMP	Métalloprotéase matricielle
MMP-2	Collagenase type IV/gélatinase A
MMP-9	Collagenase type IV/gélatinase B
MP	Médecine personnalisée
MT-MMP	Métalloprotéase matricielle de type membranaire

NF- κ B	Facteur nucléaire de transcription kappa-B
NK	Cellule «natural killer»
OMS	Organisation mondiale de la santé
P38	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
P53	Protéine suppresseur de tumeur
PDGF	Facteur de croissance dérivé des plaquettes
PG	Prostaglandine
PGE ₂	Prostaglandine E ₂
PKC	Protéine kinase C
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acétate
POSTN	Périostine
Quer	Quercétine
STAT3	Transducteur de signal et activateur de la transcription 3
SLN	Signal de localisation nucléaire
SNC	Système nerveux central
TAM	Macrophages associés aux tumeurs
TGF- β	Facteur de croissance tumorale beta
TIMP	Inhibiteur tissulaire de MMP
TLR	Récepteur «toll-like»
TNF	Facteur de nécrose tumorale
TNF-R	Récepteur au TNF
TPA	12-O-tétradécanoylphorbol 13-acétate

VEGF	Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
VEGFR	Récepteur du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire

RÉSUMÉ

Le glioblastome est la tumeur cérébrale la plus fréquente et la plus agressive. Ce cancer est associé à une mortalité élevée. Il est caractérisé par des cellules cancéreuses instables, et aboutit souvent à des métastases locales dont la spécificité génétique varie considérablement d'un patient à l'autre limitant l'efficacité des traitements actuels. La médecine personnalisée consiste à traiter chaque patient en fonction des spécificités génétiques et biologiques de la tumeur, mais également en tenant compte de son mode de vie et de son alimentation. L'ensemble de ces facteurs influence l'évolution de la maladie et l'efficacité du traitement. Les principaux objectifs de notre étude sont de comparer l'expression génique de divers biomarqueurs de l'inflammation, de l'angiogenèse et du phénotype invasif induite par des facteurs pro-inflammatoires en présence ou en absence de composés phytochimiques présents dans les aliments d'origine végétale et que nous consommons et cela, dans 7 lignées cellulaires de gliomes (U-87 MG, U-138 MG, U-118 MG, U-251, A-172, T-98G et Hs-683). Les résultats obtenus nous permettent de dresser un profil d'expression des biomarqueurs inflammatoires et angiogéniques pour chacune des lignées. Les niveaux d'expression varient en fonction du TNF- α , du PMA ou des composés naturels dérivés du thé vert, des épices, des bleuets ou de l'huile d'olive. Dans l'ensemble, nos résultats permettront de mieux cibler les biomarqueurs tumoraux cérébraux afin d'optimiser le traitement et prévenir la croissance des glioblastomes.

Mots-clés : Cancer du cerveau, Prévention, Phytochimiques, Biomarqueurs, Inflammation, Angiogenèse.

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1 Le cancer

1.1.1 Généralités

Véritable fléau du XXI^{ème} siècle, le cancer est une pathologie caractérisée par la présence d'une, ou de plusieurs, tumeur maligne formée à partir de la mutation d'une cellule initialement normale, pouvant affecter différentes parties de l'organisme (*Organisation Mondiale De La Santé*. 2016). Cela résulte essentiellement en une prolifération cellulaire anormalement élevée, puis en l'activation de plusieurs voies de signalisation favorisant le maintien et la survie de ces nouvelles cellules tumorales (Neergheen *et al.*, 2010).

Le développement tumoral se déroule durant une période de temps plus ou moins étendue pouvant aller de 1 à 40 ans, en transitant via trois principales étapes qui sont : la phase d'initiation, de promotion et de progression (Neergheen *et al.*, 2010). L'évolution se fait d'abord localement, puis peut s'étendre via le sang et la lymphe à d'autres endroits du corps où se forment les métastases colonisant ainsi les autres tissus (**figure 1.1**) (Hanahan et Weinberg, 2000).

La phase d'initiation correspond à la période où se produit une lésion majeure au niveau de l'ADN d'une cellule. Cela peut être conséquent à différents évènements externes, tels que le tabac, les produits chimiques et rayons ionisants, les organismes infectieux, ou bien par des évènements internes comme les mutations héréditaires, les hormones, les conjonctures immunitaires et les inflammations chroniques (Luqman et Pezzuto, 2010). Tous ces facteurs peuvent agir ensemble ou de façon individuelle pour initier le développement du cancer. La phase de promotion commence lorsque la cellule mutée échappe au processus de réparation de l'ADN et consiste au développement et à la prolifération de la cellule transformée, formant ainsi un groupe de cellules transformées identiques. Enfin, la phase de progression s'établit après une période de temps plus ou moins longue. Durant ces phases, la tumeur acquiert des propriétés qui lui permettent de proliférer de façon anarchique, de survivre et de s'alimenter. En effet, les cellules cancéreuses échappent au contrôle de mort cellulaire programmée et prolifèrent de manière illimitée (Hanahan et Weinberg, 2000). Elles deviennent aussi insensibles aux signaux d'arrêt de croissance provenant du milieu extracellulaire (Hanahan et Weinberg, 2000)

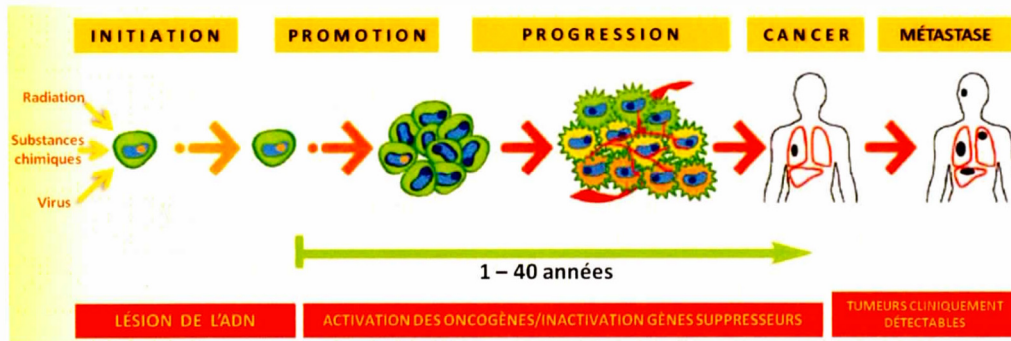


Figure 1.1. Étapes de la cancérogénèse.

Des agents nocifs affectent une cellule normale et l'initient à la cancérogénèse. La cellule subit des lésions au niveau de l'ADN et cela déclenche une prolifération incontrôlée. Des oncogènes sont activés et des gènes suppresseurs sont inactivés pour amener les cellules en phase de progression qui peut durer des années. Finalement, le cancer s'établit et peut être diagnostiqué. [Adapté de : Béliveau et Gingras, 2007]

1.1.2 Statistiques

Le cancer est la principale cause de décès au Canada depuis 2005. Selon les Statistiques Canadiennes sur le cancer de 2015, 196 900 Canadiens ont développé un cancer et 78 000 décès ont été estimés pour cette même année au Canada (*Statistiques canadiennes sur le cancer, 2015*).

Il a été rapporté également qu'environ 2 Canadiens sur 5 développeront un cancer au cours de leur vie, et qu'environ 1 Canadien sur 4 en mourra (*Statistiques canadiennes sur le cancer, 2015*). Le cancer du poumon, le cancer du sein, le cancer colorectal et le cancer de la prostate représentent plus de la moitié des nouveaux cas de cancer (51 %).

1.2 Le cancer du cerveau

1.2.1 Épidémiologie des tumeurs cérébrales

Toujours selon les statistiques de la Société canadienne du cancer de 2015, 2 660 canadiens ont reçu un diagnostic de cancer de l'encéphale. Actuellement, les tumeurs intracrâniennes constituent 2% de l'ensemble des cancers chez l'adulte. Bien que les cancers du système nerveux central (SNC) soient dix fois moins fréquents que le cancer du poumon, ils se placent au 9^{ème} rang dans les causes de décès par cancer au Canada (*Statistiques canadiennes sur le cancer, 2015*).

Au Canada, on consigne les statistiques de survie relative après 5 ans pour le cancer du cerveau. La survie relative après 5 ans pour le cancer du cerveau est de 25 %. Ce qui veut dire qu'une personne diagnostiquée d'un cancer du cerveau aurait, en moyenne, 25 % de chances de vivre 5 ans à la suite de son diagnostic comparativement à une personne dans la population générale (*Organisation Mondiale De La Santé. 2016*). De plus, ce type de cancer est la première cause de mortalité chez les enfants de 0 à 14 ans.

Actuellement, il n'existe aucun moyen permettant d'anticiper ou d'empêcher l'apparition des tumeurs intracrâniennes. De plus, un pronostic défavorable leur est souvent associé. Il devient donc impératif de trouver de nouveaux agents ayant une toxicité minimale et un effet thérapeutique durable afin de prévenir et/ou traiter ce type de cancer.

1.2.2 Classification des gliomes

Les tumeurs cérébrales se répartissent en deux catégories : les tumeurs primaires et les métastases. La première catégorie correspond aux néoplasies se développant au sein même du SNC (Kesari, 2011). Les métastases, quand à elles, correspondent aux tumeurs issues d'une migration au SNC de cellules cancéreuses initialement présente dans un autre tissu (Brasileiro de Aguiar *et al.*, 2014).

Parmi les tumeurs du cerveau, les plus fréquentes sont indéniablement les gliomes qui représentent environ 70% de toutes les tumeurs cérébrales primaires, et qui regroupent les astrocytomes, les épendymomes et les oligodendrogliomes (Dolecek *et al.*, 2012). L'OMS a réalisé un classement histologique des glioblastomes selon leur degré de malignité, les subdivisant en différents grades de I à IV (*Organisation Mondiale De La Santé*. 2016). Le grade I correspond aux tumeurs bénignes, non cancéreuses et englobe les astrocytomes pilocytiques, qui sont des tumeurs qui se caractérisent par un faible degré d'invasion tissulaire et par une masse tumorale circonscrite (Chintala *et al.*, 1999), et les astrocytomes sous-épendymaires à cellules géantes. Ce stade atteint le plus souvent les enfants, et est curable par chirurgie. Le grade II regroupe les astrocytomes diffus qui sont des tumeurs semi-bénignes. Les cellules cancéreuses de ce stade sont plus invasives, diffusent légèrement mais restent dans le groupe des tumeurs malignes à bas grade. S'en suivent les tumeurs de grade III qui regroupent les astrocytomes anaplasiques considérés comme des cancers semi-malins et présentant un caractère assez invasif et un degré de diffusion modéré (Chintala *et al.*, 1999). Enfin, nous retrouvons les glioblastomes multiformes (GBM) qui forment le grade IV et qui correspondent à des cancers malins. Ce sont des tumeurs qui se démarquent par un niveau de diffusion et d'invasion élevé (Chintala *et al.*, 1999; Louis *et al.*, 2007; Ricard *et al.*, 2012). Les gliomes malins sont

très vascularisés, et possèdent la capacité d'envahir les tissus environnants du cerveau. Malgré les progrès réalisés dans les traitements chirurgicaux et médicaux, ce type de cancer a conservé son mauvais pronostic (Shakur *et al.*, 2013).

1.2.3 Les glioblastomes

Les glioblastomes, aussi appelés glioblastomes multiformes (GBM), sont des tumeurs astrocytaires malignes de grade IV (*Organisation Mondiale De La Santé*. 2016) qui se développent à partir des cellules gliales de forme étoilée du cerveau connues sous le nom d'astrocytes (**figure 1.2**).

Le GBM peut survenir à la suite de la transformation d'un astrocytome de grade II ou III. On le qualifie alors de GBM secondaire (Ricard *et al.*, 2012; Wen et Kesari, 2008). Il peut aussi apparaître directement du grade IV; et il s'agit dans ce cas de GBM primaires. Ils surviennent à tout âge mais dans 70% des cas entre 45 et 70 ans (Baldi *et al.*, 2010; Figarella-Branger *et al.*, 2010; Tachamo *et al.*, 2016). Ils siègent le plus souvent au niveau des hémisphères cérébraux mais peuvent être localisés partout dans le SNC. L'évolution est souvent rapide (en 2-3 mois) sauf si le glioblastome provient de la transformation maligne d'un astrocytome de bas grade (glioblastome secondaire)(Figarella-Branger *et al.*, 2010).

Les symptômes diffèrent en fonction de la localisation de la tumeur, mais un certain nombre de signes sont suggestifs. Ils traduisent une hyperpression intracrânienne (céphalées, nausées et vomissements) qui s'associe souvent à des changements du comportement ou à des déficits neurologiques focaux tel que des troubles de la vision, perte de la mémoire et crises d'épilepsies (Tachamo *et al.*, 2016).

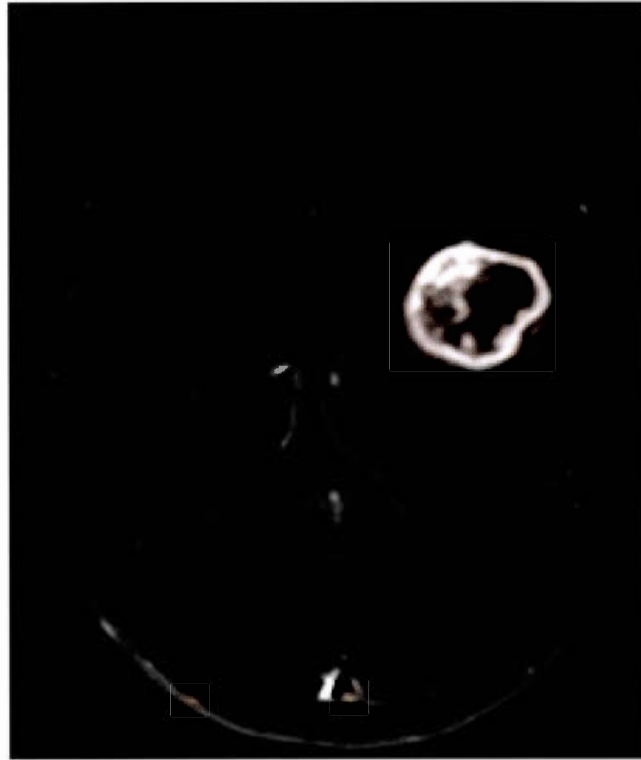


Figure 1.2. IRM d'un Glioblastome temporal gauche.
[Image adaptée de Imaging consult]

Les glioblastomes sont parmi les tumeurs les plus meurtrières avec une survie moyenne des patients d'environ 16 mois (Niyazi *et al.*, 2011). Ils sont connus pour leur grande agressivité due à leur niveau élevé de prolifération, leur rapidité à l'angiogenèse et leur pouvoir infiltrant dans les tissus sains. Les traitements actuels sont tout d'abord l'opération chirurgicale d'exérèse qui a pour but de retirer toute la tumeur. Malheureusement, ce but est rarement atteint car les cellules cancéreuses s'infiltrant dans le parenchyme cérébral normal (Baldi *et al.*, 2010). La seconde étape de traitement est la radiothérapie qui a pour objectif d'administrer une dose suffisante de radiation pour détruire toutes les cellules cancéreuses, mais pas trop élevée non plus afin de permettre aux cellules saines de se rétablir. Cette méthode

est souvent associée à de la chimiothérapie qui consiste en l'administration de médicaments nitrosurés et de témozolomide dont la finalité est d'arrêter ou de ralentir la croissance des cellules cancéreuses (Parsons *et al.*, 2008).

Malgré les progrès réalisés dans les traitements chirurgicaux et médicaux, ce type de cancer a conservé son mauvais pronostic (Shakur *et al.*, 2013). La faible efficacité de la chimiothérapie actuellement, disponible pour les traitements de tumeurs cérébrales, est en partie due à la présence de la barrière hémato-encéphalique (BHE) qui sépare le sang du parenchyme cérébral et qui limite la pénétration de la plupart des médicaments dans le système nerveux central (Regina *et al.*, 2008). En effet, la barrière hémato-encéphalique protège le cerveau des agents pathogènes, des toxines et des hormones circulant dans le sang. C'est un filtre sélectif, à travers lequel les aliments nécessaires au cerveau sont transmis, et les déchets sont éliminés. Seules les molécules de masses molaires supérieures à 500 Da, car la taille de ces molécules ne leur permet plus de traverser ce barrage par diffusion (Regina *et al.*, 2008).

1.3 Inflammation et cancer

1.3.1 Généralités

L'inflammation correspond à une réponse de défense de la part des tissus de l'organisme, suite à une blessure locale provoquée par des agents physiques, chimiques ou des germes pathogènes. Elle est souvent décrite par une rougeur, une chaleur, un gonflement et une douleur (Shlipak, 2002).

C'est un processus immunitaire généralement bénéfique, puisqu'il permet d'éliminer un agent néfaste. L'un de ses rôles est de favoriser la reconstruction des tissus lésés (Pujol, 1988). Malencontreusement, cet aspect de l'inflammation est détourné au bénéfice de la tumeur pour l'aider à évoluer vers un stade plus avancé. En effet, il est largement connu qu'une inflammation chronique contribue à la fois au développement et à la prédisposition des différents tissus au cancer ou à d'autres maladies (Andrew *et al.*, 2009).

En situation physiologique, l'inflammation est déclenchée par des cellules présentes dans la région endommagée, comme par exemple les plaquettes dans un caillot sanguin, qui sécrètent des facteurs inflammatoires tels le PDGF (*Platelet-Derived Growth Factor*: Facteur de croissance plaquettaire) (Mannaioni *et al.*, 1997). Les facteurs inflammatoires permettent alors le recrutement de cellules de l'inflammation comme les macrophages au site altéré. Ceux-ci ont pour fonction de défendre notre organisme et de favoriser la reconstruction de la zone tissulaire abîmée en sécrétant des enzymes, telles que les métalloprotéases (MMP) pour réorganiser la matrice extracellulaire (MEC) et permettre ainsi l'infiltration des cellules pouvant reconstruire le tissu (Coussens et Werb, 2002). Ces cellules sont les cellules endothéliales qui créent de nouveaux vaisseaux sanguins, les cellules épithéliales qui reconstruisent l'épithélium et les cellules du système immunitaire qui défendent le tissu. De plus le mécanisme d'angiogenèse, qui consiste au développement de nouveaux vaisseaux sanguins par bourgeonnement à partir de vaisseaux existants, est stimulé afin de revasculariser le tissu endommagé. La prolifération des cellules au site de l'inflammation est induite par des facteurs de croissance tels que l'EGF (*Epithelial Growth Factor*: Facteur de croissance épidermique), sécrétés par les macrophages afin de réparer le plus rapidement

possible la zone lésée (Aggarwal et Gehlot, 2009). Une fois la réparation effectuée, le processus inflammatoire cesse et l'équilibre biologique du tissu est rétabli.

Au cours des 20 dernières années, de nombreuses recherches ont montré qu'au niveau moléculaire, la majorité des maladies chroniques, dont le cancer, sont engendrées par une réaction inflammatoire dérégulée et chronique (Gupta, S. C. *et al.*, 2010). Lors d'un cancer, l'inflammation présente un réel avantage pour la tumeur car une part importante du processus inflammatoire est consacrée à la reconstruction du tissu ce qui sollicite des mécanismes intervenant également dans la tumorigenèse. Les cellules tumorales sécrètent des facteurs inflammatoires tel que PDGF et induisent l'inflammation tumorale. PDGF recrute les macrophages au sein de la tumeur (**figure 1.3**) (Tecchio et Cassatella, 2016). L'inflammation se comporte comme un puissant promoteur tumoral et permet la progression rapide de l'oncogenèse. Le développement et la survie, qui sont déjà suractivés dans les cellules tumorales, sont encore plus stimulés par l'inflammation (Lu *et al.*, 2006). L'angiogenèse, qui est importante pour la croissance de la tumeur est induite par l'inflammation. Lorsque les macrophages dégradent la MEC, ils favorisent en même temps l'infiltration des cellules cancéreuses dans le tissu sain, cela a pour conséquence d'accélérer l'oncogenèse vers un stade invasif (Cross et Claesson-Welsh, 2001). Un microenvironnement complexe et dynamique composé de cellules inflammatoires et immunitaires est créé autour de la tumeur. La sécrétion subséquente de cytokines, chimiokines et facteurs de croissance affectent le développement cancéreux dès l'initiation jusqu'à l'invasion (Sgambato et Cittadini, 2010).

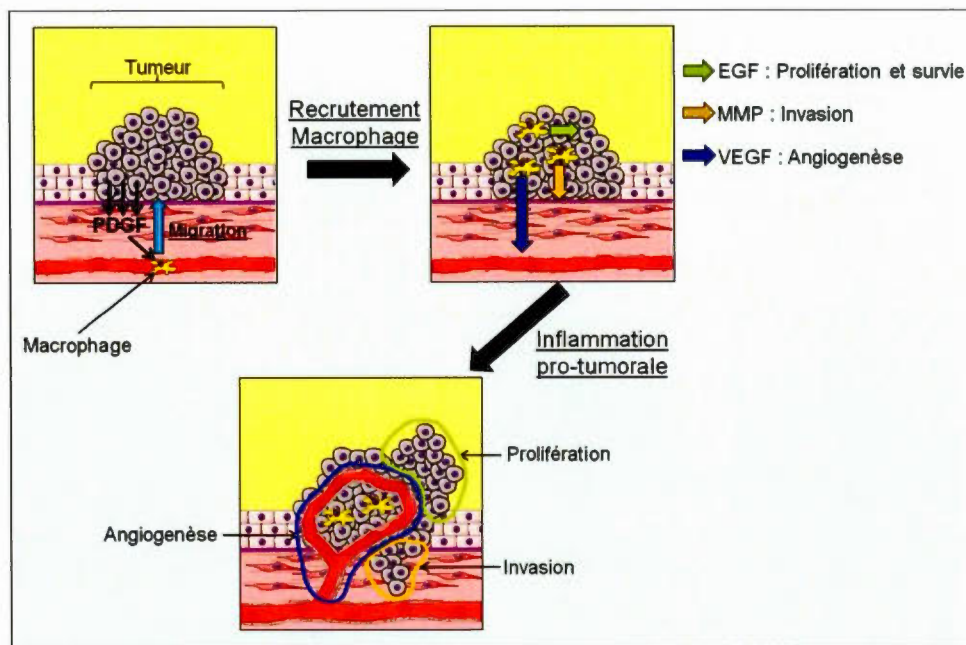


Figure 1.3. Inflammation protumorale.

Lorsqu'une tumeur sécrète des facteurs inflammatoires, comme le PDGF, elle recrute des macrophages. Les propriétés du macrophage dans la reconstruction des tissus sont alors utilisées au profit de la tumeur. Il y a stimulation de la prolifération des cellules cancéreuses, de l'angiogenèse tumorale et de l'invasion tumorale. Abréviations: PDGF: Facteur de croissance plaquettaire. EGF: Facteur de croissance épidermique. MMP: métalloprotéases. VEGF: Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire. [Adaptée de futura-sciences Grégory Ségala].

1.3.2 Biomarqueurs de l'inflammation liés à la cancérogenèse

Plusieurs biomarqueurs caractérisent le processus inflammatoire dans le cancer dont certains facteurs de transcription et certains les facteurs de croissance. Ces protéines de faible poids moléculaire (< 30000 daltons) stimulent la multiplication cellulaire et ont effet sur la croissance des vaisseaux sanguins et les neurones. Les chimiokines et les cytokines sont également des biomarqueurs qui régissent le

développement tumoral (Andrew *et al.*, 2009). Enfin ,les voies de signalisation tel que NF- κ B, p38, MAPK, ERK, JNK et Wnt promouvoient la cancérogénèse (Béliveau et Gingras, 2006).

1.3.2.1 Les facteurs de nécrose tumorale TNF- α et TNF- β .

Le facteur de nécrose tumorale (TNF) est une importante cytokine activatrice du processus inflammatoire. Cette cytokine est sécrétée par les macrophages et agit en synergie avec les interleukines IL-1 et IL-6, d'autres cytokines messagères et régulatrices du système immunitaire (Aggarwal, B. B. *et al.*, 2012; Aggarwal, Bharat B. *et al.*, 2012). Le TNF possède deux isoformes : le TNF- α et le TNF- β (van Horsen *et al.*, 2006). Le TNF- β est secrété exclusivement par les lymphocytes, par contre le TNF- α est produit par de nombreuses cellules : macrophages, monocytes, lymphocytes T et B, kératinocytes, cellules mésangiales, épithéliales, endothéliales, basophiles et mastocytes, polynucléaires neutrophiles, et éosinophiles, fibroblastes. Il intervient de façon prépondérante dans l'inflammation et le cancer (Takada *et al.*, 2008). Il agit par l'intermédiaire d'un récepteur membranaire spécifique dont il existe deux formes : TNF-R1 et TNF-R2 (figure 4). La présence d'une forme soluble du TNF-R constitue un système de régulation important, la synthèse du TNF-R étant sous le contrôle du TNF lui-même.

Lors de l'angiogenèse tumorale, plusieurs facteurs de croissance aident la migration des cellules endothéliales dont le TNF- α . En effet, le TNF- α y contribue indirectement en stimulant la production des gènes codant pour une famille de récepteurs tyrosine-kinases dans l'endothélium, les éphrines-A1 à travers ses récepteurs TNF-R1 et TNF-R2 et est induit par la voie SAPK/JNK. La voie p38/MAPK participe aussi à la migration induite par cette cytokine (Cheng, X. *et al.*, 2001). Les

actions du TNF dans les mécanismes de l'immunité et de l'inflammation s'exercent sur de nombreux types cellulaires et sont diverses (**figure 1.4**). Dans notre étude, l'utilisation du TNF- α sera à des fins de promotion de l'inflammation dans le milieu de culture des glioblastomes (Takada *et al.*, 2008).

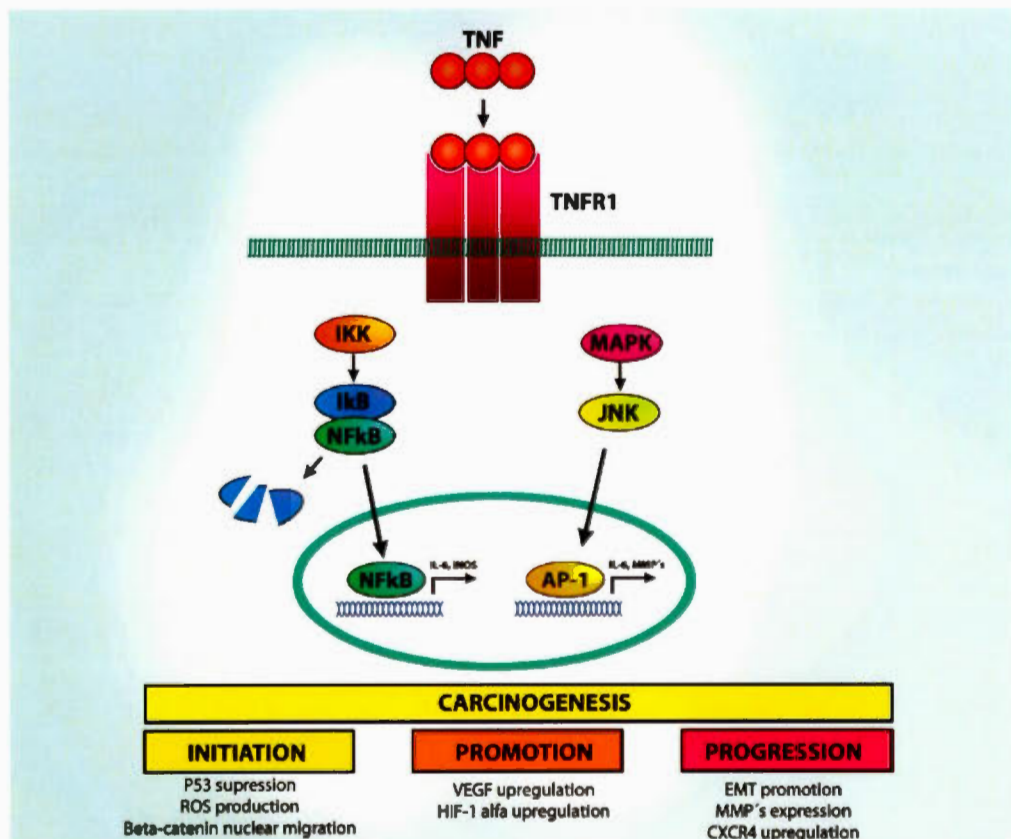


Figure 1.4. Implication de la liaison du TNF- α à son récepteur TNF-R1 dans toutes les phases de la cancérogénèse.

Cette liaison permet le recrutement de la protéine kinase IKK. Une protéine inhibitrice, I κ B- α , qui se lie normalement à NF- κ B et inhibe sa translocation, est phosphorylée par IKK et ensuite dégradée, libérant NF- κ B qui migre au noyau. Cette liaison du TNF- α à son récepteur permet également une forte activation du groupe JNK lié au stress, JNK est activé et se translate au noyau. Cela permet la transcription d'une vaste gamme de protéines impliquées dans la survie et la prolifération cellulaires, la réponse inflammatoire et les facteurs anti-apoptotiques. Durant la

cancérogénèse, l'activation de ces voies de signalisation par le TNF- α aide au processus de cancérogénèse dans toutes ses phases de progression

1.3.2.2 La cyclooxygénase-2

La cyclooxygénase-2 (COX-2) est une enzyme inductible par des médiateurs inflammatoires et des cytokines telles IL-1, IL-6 et TNF- α , participe à la production de prostaglandines dans les sites d'inflammation (Cheng *et al.*, 2007). En effet, COX-2, les prostaglandines synthétases et le cytochrome 5A jouent un rôle important dans la production de cinq prostanoides majeurs, la prostaglandine D2, la prostaglandine E2, la prostaglandine F2a, la prostaglandine I2 et la thromboxane A2, qui participent de façons importantes dans divers processus biologiques (Cheng *et al.*, 2007; Dixon *et al.*, 2013; Kalinski, 2012). De plus COX-2 est hautement exprimée dans les cellules inflammatoires de l'environnement tumoral (Kalinski, 2012; Sgambato et Cittadini, 2010). La régulation de son expression s'effectue de façon transcriptionnelle et traductionnelle (Cerella *et al.*, 2010). Son activité est exprimée dans les cellules endothéliales vasculaires, rénales et au niveau du SNC. Son ciblage thérapeutique et préventif est de plus en plus populaire, car COX-2 constitue un biomarqueur important de l'inflammation reliée au développement carcinogénique (Cerella *et al.*, 2010; Yao, M. *et al.*, 2003).

1.3.2.3 La voie de signalisation NF- κ B

Les protéines de la famille de facteurs de transcription NF- κ B comprennent cinq sous-unités qui fonctionnent en homo ou hétérodimères : p65 (Rel A), Rel B, c-Rel, p50 (NF- κ B-1) et p52 (NF- κ B-2). L'hétérodimère p50:p65 constitue la forme

classique, la plus étudiée, de NF- κ B (Gupta, S. C *et al.*, 2010). Ces cinq protéines ont toutes un domaine N-terminal d'environ 300 acides aminés, désigné le *Rel-homologie-domaine* (RHD), qui permet leur liaison à l'ADN, leur dimérisation et leur translocation nucléaire (Israël, 1991). La voie de signalisation par NF- κ B relie les phénomènes d'inflammation et de développement tumoral (Karin, 2009). Des gènes inflammatoires, immunorégulateurs, antiapoptotiques et régulateurs du cycle cellulaire sont induits par NF- κ B. Effectivement, NF- κ B est un facteur de transcription ubiquitaire qui régule l'expression des gènes impliqués dans la transformation, la survie, la prolifération, l'invasion, l'angiogenèse et la métastase des cellules tumorales (Helbig *et al.*, 2003). De plus, NF- κ B contrôle l'expression des gènes impliqués dans un certain nombre de réactions physiologiques, y compris les réponses immunitaires inflammatoires, les réactions inflammatoires de la phase aiguë, les réponses au stress oxydatif, l'adhésion cellulaire, la différenciation et l'apoptose (Gupta, S. C. *et al.*, 2010).

Lorsqu'il n'y a aucune stimulation chez les cellules, les protéines NF- κ B (p50 et p65) sont localisées dans le cytoplasme et sont reliées aux protéines inhibitrices I κ B présentes sous quatre isomères : I κ B- α , I κ B- β , I κ B- γ et I κ B- ϵ (Espinosa *et al.*, 2010; Gutsche *et al.*, 2016). La phosphorylation et la dégradation d'I κ B- α permettent la libération de l'hétérodimère p50/p65 et permet alors sa translocation au noyau. Lors de l'inflammation, la voie de signalisation NF- κ B est activée et régule la transcription de gènes essentiels à la survie des cellules et à la formation métastatique (Zheng *et al.*, 2011). Ces gènes activés par NF- κ B incluent les cytokines tel que « Colony Stimulating Factors » (CSF), le TNF- α ainsi que IL-1 et IL-6 (Helbig *et al.*, 2003). Comprennent également les chimiokines tels que IL-8, les molécules d'adhésion cellulaires et l'enzyme COX-2 (Espinosa *et al.*, 2010). Plusieurs de ces produits, tel que le TNF- α , activent directement la voie NF- κ B pour établir une

boucle autorégulatrice positive pouvant amplifier et augmenter la durée de la réponse inflammatoire (Yamamoto et Gaynor, 2001).

1.4 Les voies de signalisation intracellulaire impliquées dans le cancer

1.4.1 La voie de signalisation des MAP kinases

Les protéines MAP (*mitogen activated proteins*) kinases sont des enzymes essentielles appartenant à la superfamille des sérines/thréonine kinases (Davis, 1994). Elles sont impliquées dans 7 voies de signalisation distinctes qui permettent à la cellule de répondre de manière appropriée aux différents stimuli extracellulaires (Cobb et Goldsmith, 1995; Dhillon *et al.*, 2007). Les MAP kinases les plus documentées et caractérisées sont ERK1/2, JNK, p38 et ERK5 (**figure 1.5**). Ces enzymes jouent un rôle primordial dans l'embryogenèse, la prolifération et la différenciation cellulaire, et également dans la réponse au stress (Dhillon *et al.*, 2007). Les MAP kinases s'activent les unes les autres en cascade : la MAP-kinase est activée par une MAP-kinase-kinase, elle-même activée par d'autres : MAP-kinase-kinase, MAP-kinase-kinase-kinase. Ces cascades sont mises en branle en aval des récepteurs de la membrane cellulaire et des autres protéines de signalisation cytoplasmique. Dans le cas du cancer, les fonctions de ces voies de signalisation sont dérégulées (Roberts et Der, 2007).

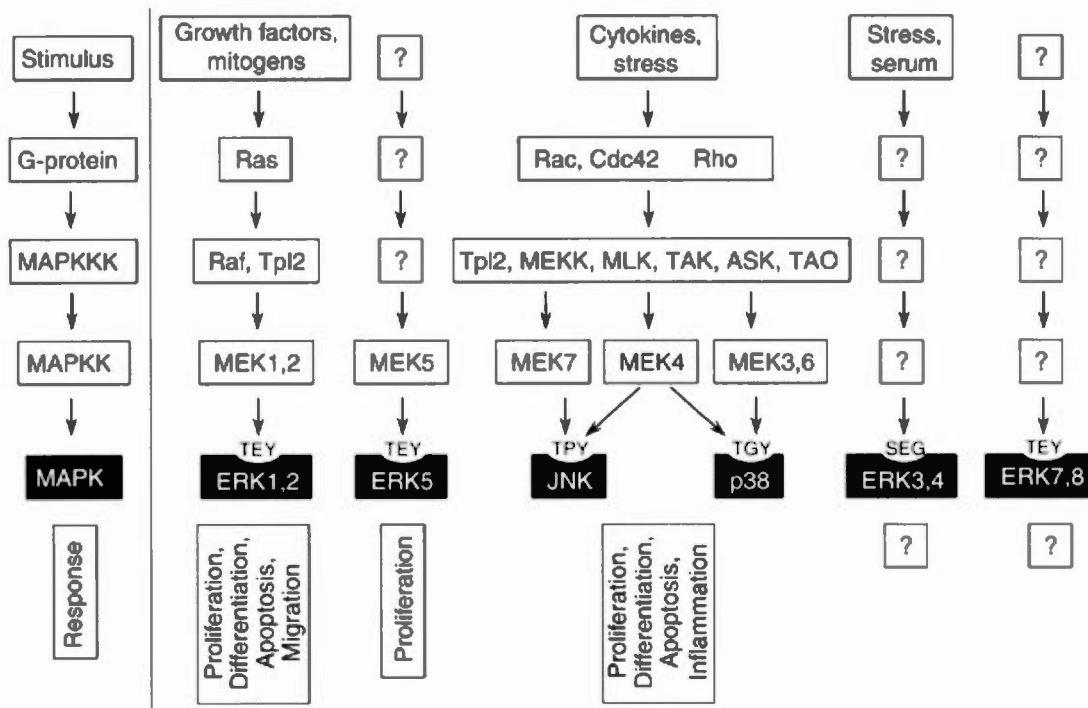


Figure 1.5. Les voies de signalisation des MAP kinases.

Les MAP kinases sont organisées en une cascade de signalisation, où elles sont activées par une kinase MAPKK et qui sont elles-mêmes activées par la suite par un type de kinases, MAPKKK, très diversifié. Les classes les plus importantes des MAPKs y sont représentées dans la figure: les voies d'ERK, p38 et JNK. [Adaptée de Dhillon *et al.*, 2007].

1.4.2 La voie de signalisation ERK

La voie ERK est une voie de signalisation intracellulaire qui joue un rôle majeur dans la prolifération cellulaire, la survie, la différenciation, la migration cellulaire ainsi que l'angiogenèse et l'apoptose (Buscà *et al.*, 2016). ERK est activée suite à une lésion de l'organisme ou à l'inflammation. Dans ces conditions d'alerte, le taux d'ERK phosphorylé augmente de façon séquentielle dans les cellules (Wang, L. N. *et al.*,

2011). La signalisation de la voie ERK est anormalement activée lors d'un cancer. Cela est la conséquence de l'activation en amont de récepteurs membranaires tels que les récepteurs épidermiques de facteur de croissance (EGFR) et les protéines RAS ou RAF, aidant ainsi à la survie et à la prolifération cellulaire et favorisant le processus métastatique (Roberts et Der, 2007).

La protéine kinase ERK dispose de deux isoformes sous les noms de ERK-1 d'un poids moléculaire de 43 kDa et ERK-2 de 41 kDa. Quand ces protéines sont phosphorylées, elles acquièrent respectivement un poids moléculaire de 44 kDa et 42 kDa (Yao, Z. et Seger, 2009). Ces deux isoformes possèdent un degré d'homologie de séquence de 84% et ont des fonctions redondantes (Mendoza *et al.*, 2015). La littérature nous apprend qu'une modification de leur niveau d'expression pourrait expliquer la plupart des divergences fonctionnelles constatées lors de leur suppression spécifique (Frémin *et al.* ; Mendoza *et al.*, 2015). Le niveau d'activation total de ces kinases ERK-1 et ERK-2 se manifeste donc comme étant un paramètre déterminant pour spécifier différentes réponses cellulaires suite à l'activation de la voie ERK (Mendoza *et al.*, 2015). Pour des raisons de simplicité, l'appellation ERK sous-entendra les deux isoformes dans ce mémoire.

1.4.3 La voie de signalisation JNK

Les protéines JNK appartiennent à la famille des SAP (Stress Activated Protein) kinases et sont présentes sous trois isoformes : JNK-1 (SAPK- γ), JNK-2 (SAPK- α) et JNK-3 (SAPK- β). JNK-1 et JNK-2 sont exprimées de façon ubiquitaires chez les mammifères (Auladell *et al.*, 2017). JNK-3 semble être plus limité et n'est localisé qu'au niveau du cerveau, du cœur et des testicules. Leur appellation JNK (c-jun

NH2-terminal kinases) est due à leur moyen d'activation qui est associé à la phosphorylation du domaine NH2-terminal du gène proto oncogène c-jun. Comme leur nom l'indique, elles sont impliquées dans la réponse au stress cellulaire, mais aussi dans l'apoptose et la transformation maligne (Davis, 2000).

Les JNK sont activées par des cytokines, les radiations UV, la privation de certains facteurs de croissance et les agents néfastes pour l'ADN (Kyriakis et Avruch, 2001). Elles sont également activées mais plus faiblement par les récepteurs couplés aux petites protéines G, le sérum et d'autres facteurs de croissance (Kyriakis et Avruch, 2001). Comme pour les autres MAP kinases, l'activation de JNK nécessite une cascade de phosphorylation des résidus Tyrosine et Thréonine au niveau de leur motif conservé Thr-ProTyr (Davis, 1994). Lorsque les cellules ne sont pas stressées, l'activité kinase de JNK est inhibée par la protéine JIP-1 (JNK interacting protein 1). Celle-ci se lie à JNK et la bloque au niveau du cytoplasme empêchant ainsi l'induction des gènes par cette voie de signalisation (Fuchs *et al.*, 1998).

JNK est un médiateur de l'apoptose induite par le stress et est aussi associé à la suppression de tumeurs en réponse à des stress, d'inflammation ou d'hypoxie (Biau *et al.*, 2015; Dhanasekaran et Reddy, 2008; Liu et Lin, 2007, 2015). Toutefois, d'autres observations évoquent que la protéine JNK-1 joue un rôle dans le processus de cancérogénèse des cellules. En effet, l'activation de JNK-1 est nécessaire dans la tumorigénèse induite par les UV (Ramaswamy *et al.*, 1998). De plus, des certaines études ont rapporté que JNK-1 aurait des fonctions pro-prolifératives alors que JNK-2 serait plutôt pro-apoptotique (Durbin, Hannigan, *et al.*, 2009; DurbinSomers, *et al.*, 2009).

1.4.4 La voie de signalisation p38

Comme les protéines JNK, la protéine p38 est un membre de la famille des SAP kinases et possède quatre isoformes connues sous : p38- α , p38- β , p38- γ et p38- δ . Ces protéines sont aussi activées par un stress cellulaire physique et chimique tel que le stress oxydatif, les UV, l'hypoxie, des cytokines comme IL-1 et le TNF- α (ZARUBIN et HAN, 2005). Les protéines kinases p38 sont impliquées dans plusieurs réponses intracellulaires. En effet, l'activation de cette voie de signalisation a un rôle primordial dans la synthèse de cytokines proinflammatoires (IL1 β , TNF- α et IL-6) (Guan *et al.*, 1998), dans l'induction d'enzymes telles que COX-2 (Badger *et al.*, 1998), dans l'expression d'enzymes intracellulaires tel que iNOS, un régulateur de l'oxydation (Craxton *et al.*, 1998; Da Silva *et al.*, 1997), et d'autres molécules de l'inflammation (Pietersma *et al.*, 1997). Son implication dans l'apoptose n'est plus à vérifier non plus (Fernandes-Alnemri *et al.*, 1996; Henkart et Grinstein, 1996; Xia *et al.*, 1995), son rôle est reconnu dans l'inflammation, la régulation du cycle cellulaire, la mort cellulaire, le développement, la différenciation et la tumorigenèse (Coulthard *et al.*, 2009). Son activation résulte de la phosphorylation d'un motif conservé Thr-Gly-Tyr (TGY) présent au niveau de sa boucle d'activation (Raingeaud *et al.*, 1995; Whitmarsh et Davis, 1996) ce qui entraîne la migration de la protéine dans le noyau.

1.5 Quelques biomarqueurs de l'angiogenèse, de l'invasion, de la migration et des métastases

1.5.1 VEGF

Le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) est une molécule

possédant cinq isoformes (VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D et PlGF), exprimés dans plusieurs tissus comme le cerveau, le foie, les reins, le cœur, les ovaires et la peau (Belgore *et al.*, 2004). Ces protéines ont un rôle prédominant dans la croissance vasculaire (Holmes *et al.*, 2007). En effet, le VEGF stimule la prolifération, inhibe l'apoptose, augmente la perméabilité vasculaire et l'angiogenèse en se liant à ses récepteurs membranaires VEGFR-1, VEGFR-2 et VEGFR-3 (Byrne *et al.*, 2005). Cette protéine est sécrétée par la majorité des cellules inflammatoires du système immunitaire tels que les lymphocytes, macrophages, neutrophiles et éosinophiles, mais également dans les cellules musculaires lisses et les cellules endothéliales (Carmeliet et Jain, 2011). Les propriétés de cette protéine lui permettent de jouer un rôle important dans la progression tumorale. En effet, les tumeurs ont besoin de nouveaux vaisseaux sanguins afin de satisfaire leur besoin en nutriments et en oxygène et pour cela elles font appel au phénomène d'angiogenèse que favorise le VEGF (Carmeliet et Jain, 2011). Celui-ci est sécrété en réponse au manque d'oxygénation locale (hypoxie) dans le microenvironnement de la tumeur et également en réponse aux facteurs de croissance FGF, EGF, PDGF et TGF- β ; les chimiokines tel que IL-6, la protéine tumorale p53 et l'estrogène (Carmeliet et Jain, 2011). L'inhibition de VEGF favoriserait l'arrêt de la croissance tumorale dans le sens où cela bloquerait l'angiogenèse et donc une incapacité des cellules tumorales à satisfaire leurs besoins en nutriments et oxygène.

1.5.2 Matrice extracellulaire et métalloprotéases

La matrice extracellulaire (MEC) représente tout le matériel dont les cellules ont besoin pour vivre dans de bonnes conditions et sert de soutien aux tissus environnants (Sottile *et al.*, 2003). La MEC est composée de polysaccharides, de

protéines fibreuses, de protéines de structure (collagène, élastine) et de protéines d'adhésion (fibronectine, laminine) jouant un rôle important dans l'interaction cellule-cellule ou cellule-MEC (Weber et Kuo, 2012). Elle est constamment en remodelage par des protéases, notamment la famille des métalloprotéases matricielles (MMPs).

Les MMPs sont des endopeptidases capables de dégrader tous les types de composants protéiques de la MEC (Gialeli *et al.*, 2011). Elles sont aussi impliquées dans le remodelage tissulaire, le développement embryonnaire, la croissance et la cicatrisation. Jusqu'à présent, il existe plus d'une vingtaine de MMPs, dont la gélatinase A (MMP-2) et la gélatinase B (MMP-9), qui ont un rôle dans la cancérogénèse et qui nous intéressent tout particulièrement dans le cadre de ce projet (Belkaid *et al.*, 2007). En effet, une fois ces deux MMPs activées, elles dégradent le collagène de type IV, la gélatine et l'élastine. Il y a alors une augmentation des niveaux d'expression des gélatinases lors de la cancérogénèse. Celles-ci sont spécifiquement impliquées dans les processus métastatiques et inflammatoires (Annabi *et al.*, 2007; Klein *et al.*, 2004; Weber et Kuo, 2012). De plus, les cellules cancéreuses expriment fortement les MMPs tout en réduisant la transcription de leurs inhibiteurs, les inhibiteurs tissulaires des métalloprotéinases (TIMPs) (Weber et Kuo, 2012).

MMP-9 peut être régulée selon de nombreux mécanismes : transcription, sécrétion, activation, inhibition et glycosylation (Van den Steen *et al.*, 2002). Dans la plupart des cellules, sa transcription est induite par des cytokines, des facteurs de croissance, des esters de phorbol tels que le 12-O-tétradécanoylphorbol-13-acétate (PMA), et des hormones se liant à des sites transcriptionnels spécifiques sur le promoteur de la MMP-9. Cette métalloprotéase est également impliquée dans le développement tumoral et dans l'angiogénèse (Gupta, A. *et al.*, 2013). La perte de

contrôle des mécanismes de régulation de la MMP-9 est également observée dans les maladies inflammatoires (blessures chroniques, inflammation de la peau, des tractus pulmonaires, gastro-intestinal et rénal, des articulations, des vaisseaux sanguins et du système nerveux), infectieuses, vasculaires, dégénératives et malignes comme dans le cas du cancer justement (Van den Steen *et al.*, 2002).

1.5.3 Rôle de la périostine dans la cancérogénèse

La périostine est une protéine d'adhésion sécrétée par les ostéoblastes et exprimée préférentiellement dans le périoste des os et dans le ligament périodontal des dents (Hwang *et al.*, 2014). La masse moléculaire du précurseur de la périostine est d'environ 93kDa. Plusieurs études ont montré la présence de facteurs modifiant l'expression de la périostine dans la cancérogénèse. En effet, l'expression de la périostine est modulée par le TGF- β (Horiuchi *et al.*, 1999), BMP-2 (Hwang *et al.*, 2014) et le facteur de transcription Twist (Oshima *et al.*, 2002). Il a été également démontré que la sécrétion de la périostine peut être modifiée par le PDGF et le FGF (Michaylira *et al.*, 2010).

Plusieurs études ont confirmé l'importance de la liaison de la périostine avec plusieurs protéines matricielles (Ruan *et al.*, 2009). Entre autres, la périostine interagirait avec certaines intégrines $\alpha\text{V}\beta\text{3}$, $\alpha\text{V}\beta\text{5}$, $\alpha\text{6}\beta\text{4}$ (Ruan *et al.*, 2009), jouant ainsi un rôle dans la cancérogénèse. Au niveau du cancer des ovaires, les hétérodimères $\alpha\text{V}\beta\text{3}$ et $\alpha\text{V}\beta\text{5}$ seraient à l'origine de la régulation de la migration et de l'adhésion cellulaire (Gillan *et al.*, 2002). De plus, l'activité proangiogénique de la périostine est liée à l'activation de la voie $\alpha\text{V}\beta\text{3}$ /FAK (Focal Adhesion Kinase) (Shao *et al.*, 2004). Il a été rapporté également l'existence d'une étroite relation entre

$\alpha v\beta 3$ et l'induction de la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) et cela suite à l'interaction entre ces intégrines et le récepteur EGFR/HER1/ErB1, activant ainsi l'invasion et finalement la métastase *in vivo* (Zhou, W. *et al.*, 2015).

Enfin, tout comme les protéines de la MEC, la périostine semble aussi jouer un rôle important dans certaines pathologies et, plus précisément, dans le remodelage tissulaire. À ce jour, plusieurs équipes ont caractérisé son interaction avec les intégrines modulant ainsi plusieurs processus cellulaires telles que les interactions cellule-matrice, l'adhésion et la prolifération, et finalement dans les processus de différenciation, de survie et de motilité cellulaire (Kudo *et al.*, 2007; Sirica *et al.*, 2014). L'implication de la périostine dans les processus tumoraux a été prouvée dans plusieurs recherches, notamment au niveau de l'instabilité génomique, l'immortalisation, la survie cellulaire, l'invasion et enfin l'angiogenèse et la métastase (Zhou, W. *et al.*, 2015)

1.6 La saine alimentation, une forme de prévention contre le cancer

1.6.1 Chimio-prévention par des molécules issues de la diète

La lutte contre le cancer est devenu un des défis les plus importants de notre époque. Selon une estimation réalisée par le Fonds Mondial de la Recherche contre le Cancer en 2007, 30% de tous les cancers sont directement rattachés au régime alimentaire des individus, et dans certains types de cancers comme celui du système gastro-intestinal, ce pourcentage peut atteindre les 70%. Il a été également rapporté qu'environ 30% des tumeurs peuvent être évitées avec une bonne alimentation et

une activité physique régulière (Wiseman *et al.*, 2008). De plus, de nombreuses études épidémiologiques ont montré que la consommation de fruits et légumes était associée à une baisse importante du risque de développer cette maladie (Béliveau et Gingras, 2014). C'est pour cela que les molécules issues d'aliments ont fait l'objet de nombreuses recherches et sont utilisées pour prévenir les cancers (Béliveau et Gingras, 2014). En effet les fruits, légumes et épices sont connus pour leurs excellentes sources en fibres, vitamines, minéraux et acides gras insaturés. Plusieurs d'entre eux contiennent des composés phytochimiques bienfaisants pour la santé tels que les polyphénols, les alcaloïdes et les terpènes et ont été corrélés pour inhiber l'initiation à la cancérogénèse et d'éviter le stade de l'invasion métastatique (Aggarwal et Shishodia, 2006). Ces molécules phytochimiques font partie intégrante de la chimioprévention qui correspond à l'utilisation d'agents naturels ou synthétiques dans le but de prévenir, supprimer ou inverser la progression tumorale (Aggarwal et Shishodia, 2006; Brenner et Hearing, 2008; Svatek *et al.*, 2008; Tan *et al.*, 2011).

Les cibles des molécules chimiopréventives sont principalement les facteurs de transcription (tel que NF- κ B, P53, STAT3), les facteurs de croissance (TNF, PDGF, VEGF,CSF), les protéines kinases (Akt, JNK, IKK, ERK, MAPK) et des protéines impliquées dans l'apoptose, les métastases, l'adhésion et le cycle cellulaire (Bcl- 2, caspase-3, COX-2, MMP-9, VCAM-1, cyclin D1) (Aggarwal et Shishodia, 2006; Béliveau et Gingras, 2007). En conséquence, prévenir le cancer en arrêtant le développement des cellules précancéreuses est essentiel car même les personnes en bonne santé ont un certain nombre de tumeurs dormantes. De nos jours, la notion de prévention du développement des microtumeurs dormantes par la nutrition est clairement établie (Béliveau et Gingras, 2014).

1.6.2 Les flavonoïdes, la sous-classe la plus abondante des polyphénols

Les polyphénols sont les phytochimiques les plus abondants des agents alimentaires végétaux, possédant divers avantages bénéfiques pour la santé, dont des effets neuroprotecteurs, cardioprotecteurs et chimiopréventifs (Vauzour *et al.*, 2010). Un tiers de l'apport total en polyphénols est représenté par les acides phénoliques, et les deux tiers restants sont des flavonoïdes. Les flavonoïdes (de flavus, « jaune » en latin) sont des molécules aromatiques polysubstituées abondamment présentes dans la majorité des plantes alimentaires car elles constituent les métabolites secondaires des plantes (Asif, 2012). Ces molécules ne participent pas de manière directe au développement de celles-ci mais elles sont primordiales dans la défense des cellules des plantes envers les microorganismes, les insectes, et les radiations UV (Harborne et Williams, 2000).

Les flavonoïdes comprennent plus de quatre mille cinq cents membres et possèdent des propriétés antivirales, antimicrobiennes, anti-inflammatoires, antiallergènes, antithrombotiques, antimutagènes, antinéoplasiques (Pietta, 2000). De plus, elles ont des effets cytoprotecteurs sur différents types de cellules. Des études épidémiologiques ont montré que la consommation de flavonoïdes peut être associée à une diminution du risque de plusieurs types de cancer (Birt *et al.*, 2001).

Un flavonoïde a une composition basée sur un squelette à 15 carbones et sa structure s'organise toujours autour d'un squelette 1,3- diphénylpropane C6-C3-C6 (**Figure 1.6**), décrit par une nomenclature spécifique. Les deux cycles benzéniques sont nommés cycle A et cycle B. Le chaînon propyle C3 peut être complété par une fonction éther formant ainsi un cycle central, appelé cycle C (Uchimiya *et al.*, 2016).

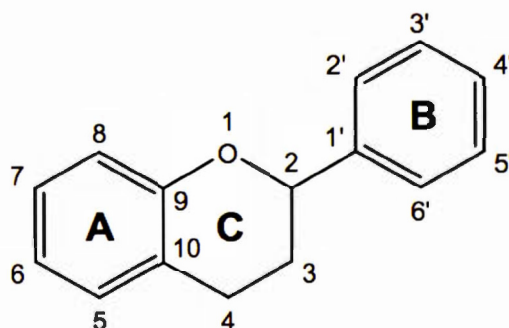


Figure 1.6. Structure de base des flavonoïdes

Les flavonoïdes sont divisés en 6 sous-classes principales (figure 1.7):

- Les flavones : abondantes chez les plantes supérieures sous forme aglycones ou glycosylées. Certaines, comme la lutéoline sont en partie responsables de l'aspect blanc ou ivoire de certaines fleurs, comme les roses et les œillets.
Exemple : Apigénine, lutéoline.
- Les flavanones : abondantes chez les agrumes, mais peu rencontrées chez les autres fruits interviennent dans la relation structure-degré d'amertume.
Exemple : Aringénine, hespéridine.
- Les flavonols : très répandus dans le règne végétal. De ce fait, ils sont abondants dans l'alimentation. Ils peuvent participer à la couleur jaune de certaines fleurs (primevère, chrysanthème jaune, fleur du cotonnier). On les retrouve principalement sous forme glycosylée dans les fruits et les légumes.
Exemple : Quercétine, myricétine kaempférol.
- Les catéchines : Initialement découverts dans les fruits de l'acacia a cachou, présentes dans les fève de cacao, plantes et racines.
Exemple : Épicatéchine, gallocatéchine.

- Les anthocyanidines : les anthocyanidines ont un squelette flavylum qui a la particularité d'être un chromophore. Ces flavonoïdes sont des pigments naturels très fréquemment rencontrés chez les végétaux. Ils sont en partie responsables des nuances de couleur rouge ($\lambda = 490-500$ nm), violet ($\lambda = 560-580$ nm) et bleu ($\lambda = 580-595$ nm) des fruits et des fleurs.

Exemple : Cyanidine, pélargonidine, delphinidine.

- Les isoflavones : sont présentes chez toutes les plantes mais seules les plantes de la famille des fabaceae (« légumineuses ») contiennent des quantités significatives d'isoflavones, connues pour leur propriété oestrogénique. On peut les retrouver dans le soja et les haricots verts.

Exemple : Génistéine, daidzéine.

La plupart des flavonoïdes présents dans les plantes sont attachés à des sucres (glucosides), mais peuvent se trouver sous forme d'aglycones (Asif, 2012). L'intérêt envers les bénéfices des flavonoïdes sur la santé a augmenté en raison de leur puissante propriété antioxydante et de leur capacité à capter les radicaux libres observés *in vitro* (Ross et Kasum, 2002).

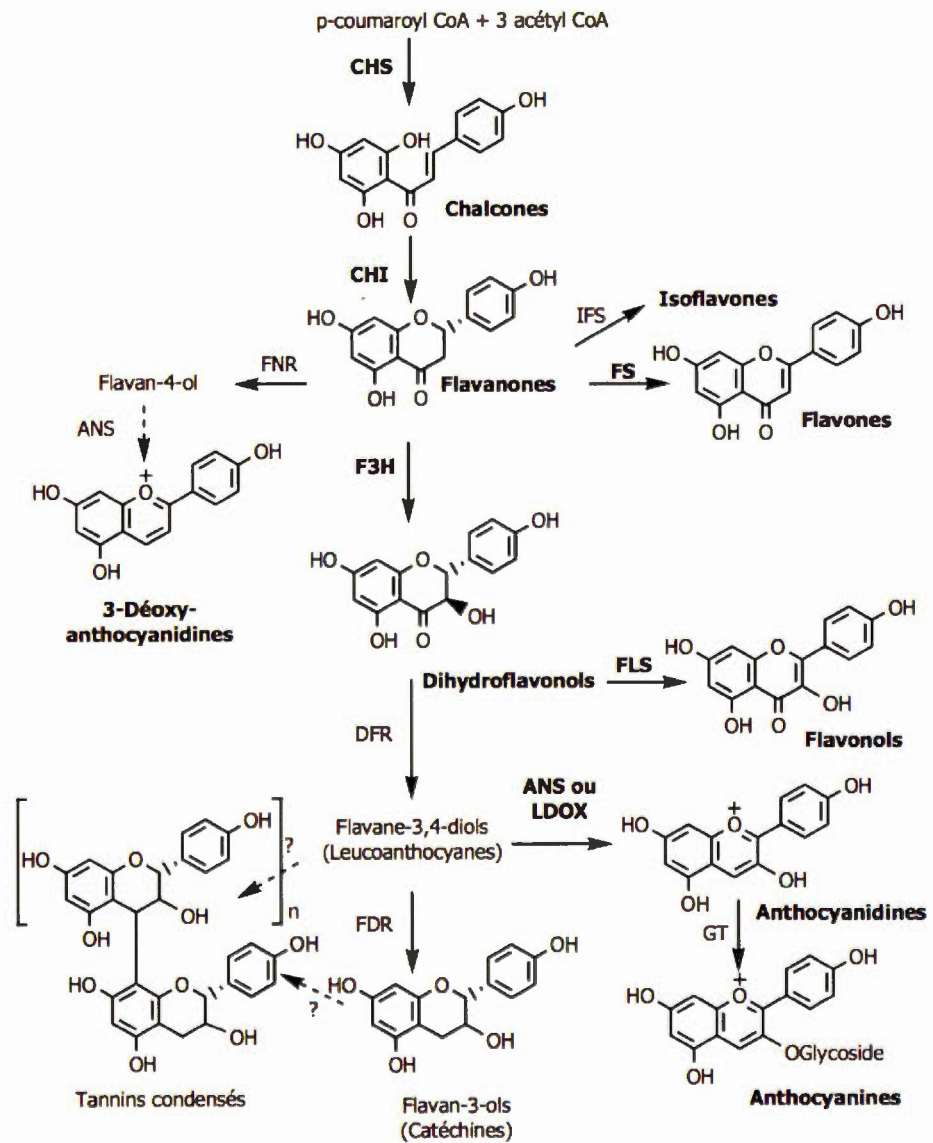


Figure 1.7. Schéma général de la voie de biosynthèse des flavonoïdes.

1.6.3 L'épigallocatechine-3-gallate (EGCG), un polyphénol du thé vert

Le thé est la seconde boisson la plus consommée dans le monde après l'eau. Il existe différents types de thé : noir, oolong et vert produits à partir des feuilles issues de l'arbre à thé ou théier le *Camellia Sinensis* (Liang *et al.*, 2007). Le thé est consommé en chauffant des feuilles fraîches à une haute température à la vapeur afin que le contenu polyphénolique d'intérêt bénéfique pour la santé ne soit pas altéré (Astill *et al.*, 2001; Liang *et al.*, 2007).

L'activité biologique chimio-préventive du thé vert a été documentée dans de nombreux articles scientifiques portant sur les cancers de la peau, des poumons, de l'œsophage, de l'estomac et plusieurs autres (Khan *et al.*, 2006). Prenons l'exemple du cancer colorectal : Il a été démontré chez les grands buveurs de thé une réduction de l'incidence du cancer colorectal de 57%. Additionnellement à cela, le thé vert aurait des vertus préventives pour les maladies cardiovasculaires et neurodégénératives (Cooper *et al.*, 2005).

Ces propriétés bienfaitantes dans le thé vert sont favorisées par les polyphénols, tout particulièrement les catéchines présentes dans les feuilles du thé vert. Les principales catéchines du thé vert sont : (-)-épigallocatechine-3-gallate (EGCG) (**figure 1.8**), (-)-épigallocatechine (EGC), (-)-épicatechine-3-gallate (ECG), (-)-épicatechine (EC), catéchine (C) et gallocatechine (GC) (Zaveri, 2006). Parmi toutes ces catéchines, l'EGCG est la plus présente dans le thé vert. Une seule tasse de thé vert contient environ 200 mg de polyphénols dont 50% d'EGCG et la majorité des effets biologiques du thé vert lui sont attribuées (Béliveau et Gingras, 2014; Chatterjee *et al.*, 2012; Di Domenico *et al.*, 2012) En effet, sa structure gallate lui confère un puissant pouvoir antioxydant. Cela lui permet d'inactiver les radicaux libres et de chélater certains ions (Zaveri, 2006). De plus, la masse moléculaire de

l'EGCG étant de 458,372 Da ,celle-ci peut facilement passer la barrière hémato-encéphalique du cerveau.

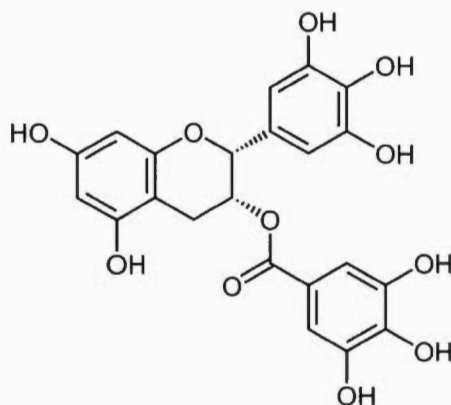


Figure 1.8. Structure chimique de l'EGCG
[Adapté de Zaveri, 2006]

De plus, il a été prouvé que cette molécule était impliquée dans de nombreux mécanismes cellulaires ciblés dans le cancer. Premièrement, l'EGCG est reconnue pour ses propriétés anti-angiogéniques en bloquant l'activation du récepteur au VEGF à la surface des cellules (Lamy *et al.*, 2002), et en inhibant la production cellulaire de VEGF en affectant la transcription de certains gènes (Jung *et al.*, 2001; Rahmani *et al.*, 2015). Dans un deuxième temps, le thé vert ralentit la multiplication cellulaire, surtout celle des cellules anormales que l'on trouve généralement en début de maladie, indiquant ainsi que la croissance des cancers est inhibée. De plus, l'EGCG inhibe la libération du TNF et réduit l'activité de l'ornithine décarboxylase, des biomarqueurs des cancers de l'estomac et du côlon (Lagarde, 2001), il fragmente l'ADN de la cellule cancéreuse, provoquant son apoptose (mort cellulaire programmée) (Asano *et al.*, 1997; Hibasami *et al.*, 1998).

L'EGCG est aussi appréciée pour sa capacité à inhiber l'invasion métastatique cancéreuse (Annabi *et al.*, 2005). En effet cette molécule prohibe l'action des métalloprotéines MMP-2 et MMP-9 dans les cellules cancéreuses et les cellules endothéliales (Ho *et al.*, 2007). Ces enzymes jouent un rôle important dans la dégradation de la membrane basale facilitent l'invasion des cellules, les métastases et l'angiogenèse (Ho *et al.*, 2007). Enfin, il a été démontré que l'EGCG avait également un pouvoir inhibiteur contrant l'activation de l'EGFR et HER2 , ainsi que celles de plusieurs voies de signalisations telles que la voie Akt, ERK et NF- κ B dans diverses tumeurs (Li *et al.*, 2014).

1.6.4 L'hydroxytyrosol un composé bénéfique pour la santé dans l'huile d'olive

L'incidence du cancer dans les pays méditerranéens est plus faible que dans les pays européens et américains (Key *et al.*, 2007). Plusieurs études ont prouvé que le bassin méditerranéen était beaucoup moins touché par le cancer du gros intestin, du sein de l'endomètre et de la prostate, et la principale raison est décernée au régime alimentaire de cette région du globe (Béliveau et Gingras, 2014). En effet, ces habitudes alimentaires sont exemplaires : riches en fruits et légumes, une consommation relativement faible de viande rouge et une forte consommation d'huile d'olive et de ses produits. Il a été estimé que les chances d'avoir un cancer sont diminuées de 15% chez les personnes adoptant un régime alimentaire de type méditerranéen (Béliveau et Gingras, 2014).

L'huile d'olive est le principal acteur de cette machinerie anti cancéreuse. En effet, plusieurs études se sont intéressées à ses effets bénéfiques sur la santé et ont

rapporté que les lipides de l'huile d'olive préviennent le cancer par comparaison aux autres formes de lipides ajoutés en raison de leur teneur élevée en acides gras mono insaturés (Owen *et al.*, 2000 a; Owen *et al.*, 2000 b; Visioli et Galli, 2001). Les composés de l'huile d'olive participent à la protection contre le cancer, tel est le cas des composés phénoliques de l'huile d'olive. Dans ce cadre, nous nous sommes penchés sur l'hydroxytyrosol (HT) (**figure 1.9**) et ses propriétés anticancéreuses.

L'hydroxytyrosol se trouve surtout dans l'olivier et dans ses fruits : les olives, ses feuilles et la pulpe. Il a été découvert lors du processus de fabrication de l'huile d'olive, appelé «trituration» (Schaffer *et al.*, 2007). L'hydroxytyrosol est le phénol le plus abondant dans l'huile d'olive et se caractérise par un groupement catéchol qui lui confère ses propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires (Charoenprasert et Mitchell, 2012; Rietjens *et al.*, 2007). Ses vertues ont déjà été prouvées sur un adénocarcinome du côlon humain (cellules HT-29) et la leucémie promyélocytaire (Fabiani *et al.*, 2002).

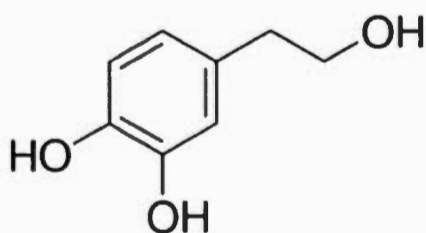


Figure 1.9. Structure chimique de l'hydroxytyrosol

De plus, l'hydroxytyrosol a le plus haut niveau d'activité d'absorption des radicaux libres jamais documenté pour un antioxydant naturel, et il possède des caractéristiques particulières qui augmentent son efficacité (de Bock *et al.*, 2013).

Ces particularités sont une absorption rapide dans la circulation sanguine et les tissus, sa capacité à traverser la BHE et ainsi pouvoir absorber les radicaux libres dans le SNC (Miro-Casas *et al.*, 2003). Enfin, il est un métabolite de la dopamine, un neurotransmetteur. Ce qui lui permet de jouer un rôle dans la neuroprotection. (Miro-Casas *et al.*, 2003) De plus, avec sa masse moléculaire de 154,16 Da, elle peut facilement passer la barrière hémato-encéphalique du cerveau.

Les différents composés phytochimiques de l'huile d'olive ciblent essentiellement l'inhibition des protéines kinases, l'induction de l'apoptose, l'inhibition de la migration cellulaire et de la métastase (Vazquez-Martin *et al.*, 2012). Il a été démontré que les composés phytochimiques de l'huile d'olive inhibent l'angiogénèse tumorale en bloquant l'action du VEGF et de son récepteur VEGF-R2, la tubulogénèse, la prolifération et la migration des cellules endothéliales affectant et la progression tumorale (Lamy *et al.*, 2014).

1.6.5 La quercétine

La quercétine est un flavonoïde présent chez les plantes comme métabolite secondaire. C'est aussi le plus abondant et le plus étudié de notre alimentation. La biodisponibilité de la quercétine dépend de son degré de glycosylation (**figure 1.10**) (Ross et Kasum, 2002). Elle est présente sous forme de glycosides, avec un ou deux résidus de glucose, dans l'oignon qui constitue une des principales sources alimentaires de flavonoïdes. On la retrouve également dans les câpres, les choux, les baies, le raisin, les haricots verts, le thé, les pommes et le sarrasin (Béliveau et Gingras, 2014). La quercétine est aussi disponible sous forme de complément

alimentaire (*Nutrition et Cancer Rapport d'expertise collective* 2011). De plus, sa masse moléculaire étant de 302,236 Da ,celle-ci peut facilement passer la barrière hémato-encéphalique du cerveau.

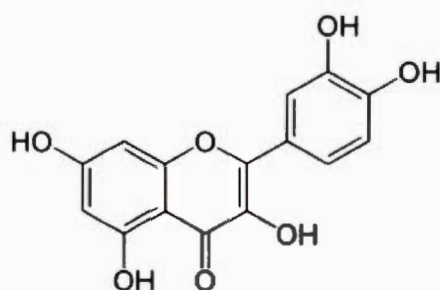


Figure 1.10. Structure chimique de la quercétine.

La quercétine est connue pour ses propriétés proapoptotiques et antioxydantes (Boots *et al.*, 2008). En effet, elle s'est avérée efficace en prévention de la prolifération cellulaire et de la carcinogenèse dans de nombreux autres modèles (Lagarde, 2001). Plusieurs mécanismes ont été suggérés pour expliquer l'inhibition de la cancérogenèse par la quercétine. Les topoisomérases sont des enzymes entraînant des torsions de l'ADN pendant la réplication et la transcription, responsables du développement de la tumeur (Nitiss, 2009). La quercétine est antagoniste des topoisomérases I et II produites par les cellules tumorales (Sudan et Rupasinghe, 2014). La quercétine a aussi des propriétés anti-inflammatoires. De plus, la quercétine induit, dans certaines cellules tumorales (lymphome T, tumeur du colon), un arrêt du cycle cellulaire en phase G1 (Zhou, J. *et al.*, 2016). Sur plusieurs lignées de cellules cancéreuses, la quercétine a induit l'apoptose dans ces modèles

se reflétant par la fragmentation de leur noyau et par la condensation de la chromatine nucléaire (Granado-Serrano *et al.*, 2006).

Selon une grande étude épidémiologique réalisée en Finlande, les personnes consommant une quantité élevée de quercétine avaient une faible incidence de cancer du sein et du poumon et de la prostate (Knekt *et al.*, 2002; Nischenametla *et al.*, 2006). De même que pour l'étude réalisée en Espagne, la quercétine s'est montrée efficace contre le cancer gastrique (Garcia-Closas *et al.*, 1999).

1.6.6 La delphinidine

La delphinidine est une molécule que l'on retrouve dans de nombreux aliments tels que les petits fruits comme les bleuets, raisins et légumes comme l'oignon rouge (**figure 1.11**). C'est un flavonoïde appartenant à la sous-classe des anthocyanidines, de puissants antioxydants, qui constituent les pigments responsables de la coloration de nombreuses fleurs et de nombreux fruits (Yun *et al.*, 2009). Ainsi, la delphinidine et ses dérivés donnent les teintes bleues, violettes et rouges des fleurs (telles que les violettes ou les delphiniums), mais aussi des fruits (tels que les raisins du cépage Cabernet-Sauvignon, les fruits rouges, les canneberges et les grenades) (Afaq *et al.*, 2007; Béliveau et Gingras, 2006, 2014). Sa masse moléculaire étant de 338,7 Da, elle passe facilement la barrière hémato-encéphalique du cerveau.

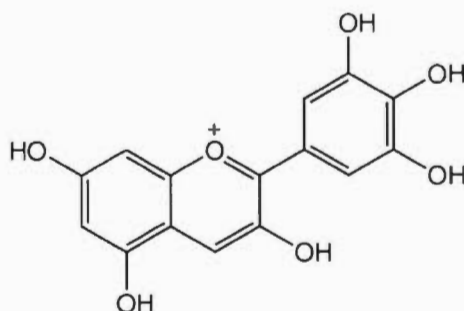


Figure 1.11. Structure chimique de la delphinidine.

Les anthocyanines possèdent de nombreuses vertues incluant des propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires, anti-microbiennes, anti-cancéreuses et neuroprotectrices (Yun *et al.*, 2009). Effectivement, des études ont démontré que les anthocyanidines possèdent un bon potentiel dans la prévention du cancer (Aggarwal et Shishodia, 2006; Hou, 2003; Lila, 2004). Les anthocyanes ont la capacité d'inhiber la promotion tumorale et ont un potentiel antiangiogénique (Bagchi *et al.*, 2004; Bomser *et al.*, 1996; Wang, L. S. et Stoner, 2008). Au sein de notre laboratoire, nous avons également démontré que la delphinidine inhibe le potentiel invasif des glioblastomes (Ouanouki *et al.*, 2016) et qu'elle est également un inhibiteur puissant de l'angiogenèse *in vitro* et *in vivo* par l'inhibition de la phosphorylation de VEGFR-2 (Lamy *et al.*, 2006; Ouanouki *et al.*, 2016).

1.6.7 Le curcuma et curcumine

La curcumine (diféruloylméthane) (**figure 1.12**) est un pigment polyphénolique jaune extrait des rhizomes de *Curcuma longa* (curry) (Gupta *et al.*, 2012). Cette plante herbacée, est cultivée en Inde, en Chine, à Taiwan, au Japon, au Myanmar, en Indonésie et en Afrique (Araujo et Leon, 2001). L'Inde est le plus grand producteur et le plus grand consommateur de curcuma au monde. À lui seul, la consommation

atteint 80% de la production mondiale ce qui signifie un apport alimentaire quotidien d'environ 2g de curcuma par personne (Béliveau et Gingras, 2014).

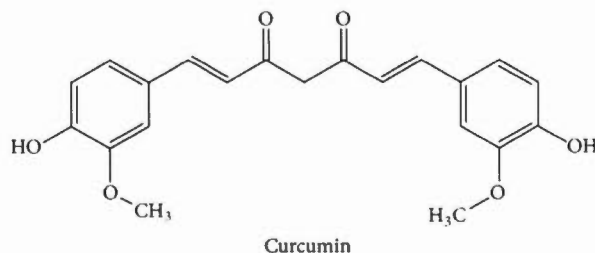


Figure 1.12. Structure moléculaire de la curcumine.

La curcumine est connue pour sa capacité à moduler l'expression des proto-oncogènes responsables de la prolifération tumorale (*c-fos*, *c-jun*, *c-myc*, *bcl-XL*). Elle inhibe également l'activité de la protéine kinase C et de la tyrosine kinase des cellules tumorales (médiateurs de signal cellulaire), bloquant ainsi le signal de transduction de ces cellules et induisant par ce mécanisme leur apoptose dans les phases de promotion et de progression (Cheng, A. L. *et al.*, 2001; Gupta *et al.*, 2012). Cet effet de la curcumine s'explique par l'inhibition marquée de la voie de signalisation NF- κ B (Gupta *et al.*, 2012; Olivera *et al.*, 2012). Elle inhibe la transformation, par le virus de l'Epstein Barr, des lymphocytes B en lymphomes (tumeur des ganglions) (Oh *et al.*, 2014). L'inhibition de la croissance des tumeurs dépend du moment et de la quantité d'administration de curcumine. L'intensité de cette inhibition est corrélée avec celle de l'inhibition de l'activité de l'ornithine décarboxylase. La curcumine arrête le cycle cellulaire aux niveaux des phases S/G2 et G2/M. Elle stimule l'activité de deux enzymes antioxydantes engagées dans la détoxification des produits de la peroxydation lipidique : la glutathion-peroxydase et la glutathion-transférase (Gupta, S. C. *et al.*, 2013). De plus, la masse moléculaire de

la curcumine étant de 368,38 Da ,celle-ci peut facilement passer la barrière hémato-encéphalique du cerveau.

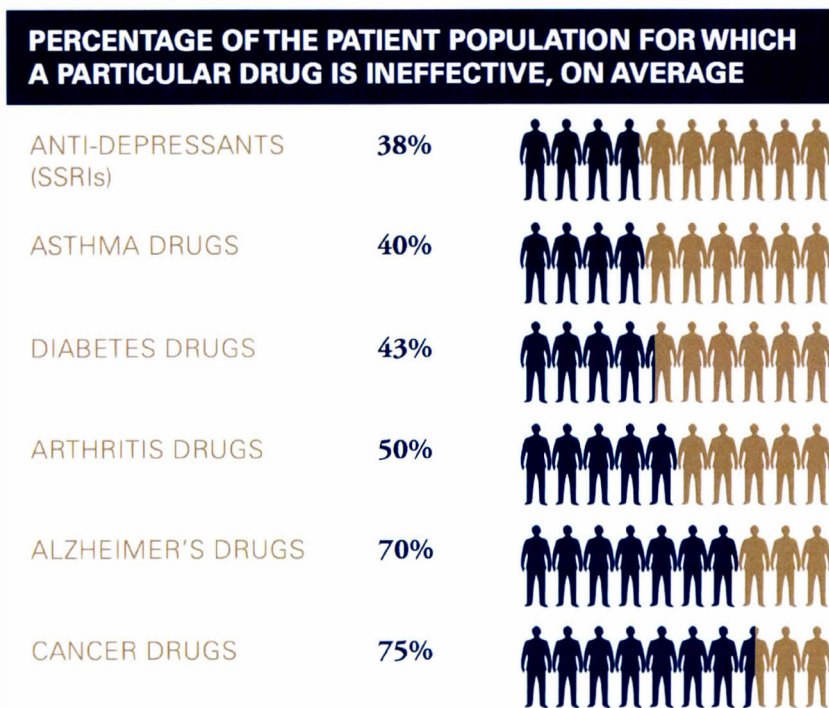
La curcumine est un puissant anti-inflammatoire qui réduit la production de TNF- α et qui inhibe l'activité de l'enzyme COX-2, diminuant ainsi la synthèse des prostaglandines inflammatoires et des thromboxanes de la série 2 (Gupta, S. C. *et al.*, 2013). La curcumine présente des propriétés anti-angiogéniques, elle réduit la prolifération de néovaisseaux nécessaires au développement des tumeurs solides. Cette propriété s'explique par l'inhibition de la synthèse d'ADN des cellules de l'endothélium vasculaire (Yance et Sagar, 2006). La curcumine réduit à la fois le nombre et le volume des tumeurs (Pulido-Moran *et al.*, 2016). Enfin, elle s'est également révélée efficace pour inhiber les effets œstrogéniques des pesticides et des substances chimiques de l'environnement.

1.7 Prévenir le cancer

Comme disait Hippocrate durant l'antiquité, il est plus important de savoir quel type de personne a la maladie que de savoir quel type de maladie a la personne (*Paving the Way for Personalized Medicine*, 2013). La médecine personnalisée (MP) repose sur ce principe même. En effet, la MP se définit comme une médecine qui propose des interventions sur mesure en fonction des caractéristiques propres du patient et se réfère donc à des soins de santé adaptés à l'individu (Abrahams et Silver, 2009). Depuis le début du XXI^{ème} siècle, la notion de génétique a été ajoutée dans cette définition. Cela implique l'utilisation de nouvelles méthodes d'analyses moléculaires visant à fournir une meilleure prise en charge de la maladie dont souffre un patient en fonction des spécificités génétiques et biologiques, mais également en tenant

compte de l'environnement du patient et de son mode de vie (Mini et Nobili, 2009). L'ultime but est de mettre l'accent sur une médecine préventive, sélectionner un traitement optimal et réduire les prescriptions d'essais et d'erreurs, aider à éviter les réactions secondaires indésirables des médicaments, améliorer la qualité de vie, révéler des utilisations supplémentaires ou alternatives des médicaments et aider à contrôler le coût global des soins de santé (Abrahams et Silver, 2009; *Paving the Way for Personalized Medicine*, 2013).

De nos jours, les traitements utilisés contre certaines maladies ne sont pas efficaces chez tous les patients. En effet 75% de la population atteinte du cancer ne répondent pas aux traitements qu'on leur prescrit (**figure 1.13**) (Spear *et al.*, 2001). Les causes de l'échec du traitement sont plus difficiles à déterminer, mais on peut supposer qu'une fraction importante est causée par des facteurs évitables. Le caractère génétique basé sur le patient est susceptible d'être une composante majeure des événements indésirables médicamenteux non préventifs et de l'échec thérapeutique, et pourrait contribuer entre 25% et 50% des réponses inappropriées aux médicaments (Spear *et al.*, 2001).



Source of data: Brian B. Spear, Margo Heath-Chiozzi, Jeffery Huff, "Clinical Trends in Molecular Medicine," Volume 7, Issue 5, 1 May 2001, Pages 201-204.

Figure 1.13. Une taille unique ne convient pas à tous.

Cette figure nous indique le pourcentage de patients ne répondant pas correctement aux traitements prescrits pour leur maladie. Il faut noter que le manque d'efficacité chez un patient donné peut refléter une interaction complexe de facteurs et peut également résulter de régimes posologiques inadéquats ou inappropriés d'un médicament qui serait autrement efficace, ainsi que le manque de conformité adéquate du patient. (*Paving the Way for Personalized Medicine*, 2013).

En expliquant pourquoi certains patients répondent ou ne répondent pas à un médicament et pourquoi certains éprouvent des effets indésirables alors que d'autres ne le font pas, nous pourrions utiliser ces informations pour adapter les indications de médicaments à certaines populations, améliorant ainsi la sécurité et l'efficacité des médicaments en précisant la ou les populations dans lesquelles elles

doivent être utilisées (Butts *et al.*, 2013). La MP permettra d'apporter de nouvelles connaissances dans ce domaine et de développer des biomarqueurs génétiques qui serviront de guide pour prendre les meilleures décisions thérapeutiques (Butts *et al.*, 2013; Verma, 2012). Pour le cas du cancer, la MP implique une thérapie d'adaptation pour chaque patient en fonction des caractéristiques uniques de sa tumeur d'une manière physiologique, moléculaire, génétique et épigénétique (Cho *et al.*, 2012; Ene et Holland, 2015). La capacité de caractériser d'un point de vue moléculaire les cellules tumorales a augmenté de façon spectaculaire durant ces 20 dernières années et a montré qu'il existait des différences significatives entre les échantillons de patients ayant le même type de tumeur ("Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways," 2008; Ene et Holland, 2015). Étant donné cette grande variabilité dans les mutations, cela nous conforte dans l'idée que la MP serait la seule approche réaliste pour éradiquer cette maladie chez tous les patients (Butts *et al.*, 2013).

Plus précisément, pour le GBM, il existe une hétérogénéité inter-tumorale mais également une hétérogénéité intra-tumorale au sein même de la tumeur. Cela nous ôte tout espoir de parvenir à une guérison avec les moyens actuels utilisés pour contrer la progression de cette maladie. De plus cela suggère que pour une thérapie personnalisée, les agents pharmacologiques ne seraient pas seulement adaptés pour cibler les différences de patient à patient, mais également pour la diversité de mutations au sein de la tumeur de chaque patient (Ene et Holland, 2015; Huse *et al.*, 2013).

CHAPITRE II

OBJECTIFS DE RECHERCHE ET PROBLÉMATIQUE

L'objectif de ce projet est de caractériser sept lignées cancéreuses de glioblastomes les plus utilisées dans les manipulations expérimentales de laboratoires dans le domaine de la recherche contre le cancer du cerveau. Ces 7 lignées sont les U-87 MG, U-138 MG, U-118 MG, U251, A172, T98G et Hs683.

Nous émettons l'hypothèse que les sept lignées cellulaires, malgré leur statut commun de « glioblastome » ne réagissent pas de la même manière lorsqu'elles sont stimulées par la même dose de TNF- α . Nous supposons également que le pouvoir cytotoxique de nos molécules naturelles d'intérêt sera également différent chez les sept glioblastomes.

Cette étude comparative couvrira tout d'abord l'effet de l'inflammation induite par le TNF- α . Nous verrons dans ce cas-là, comment réagissent les marqueurs de l'inflammation de l'angiogenèse et de l'invasion face à ces stimulations pro-inflammatoires au niveau protéique et génique.

Dans un deuxième temps, nous nous intéresserons aux 4 lignées de glioblastomes au pouvoir invasif différents afin de tester l'effet des molécules phytochimiques connues pour leurs propriétés anticancéreuses sur les mêmes biomarqueurs d'intérêt face à l'inflammation, induite par le TNF- α .

Les résultats obtenus nous permettront de dresser un profil d'expression des biomarqueurs pour chacune des lignées, de mieux les cibler afin d'optimiser de nouveaux traitements, prévenir la croissance des glioblastomes et de nous permettre de répondre aux questions suivantes :

- Les glioblastomes réagissent-ils de la même manière à l'inflammation et face aux différents traitements anticancéreux ?
- Quel est le meilleur candidat phytochimique pour la prévention du cancer du cerveau ?
- Faut-il un traitement personnalisé dans chaque cas de glioblastome ?

CHAPITRE III

MATERIELS ET METHODES

3.1 Matériels

Les différentes lignées cellulaires de glioblastomes (U87, U251, U138, Hs683, U118, A172 et T98) ont été achetées chez la compagnie ATCC (American Type Culture Collection (ATCC; Manassa, VA) et de NCI-Frederick Cancer DCTD Tumor/Cell line repository. Le TNF- α , sous forme lyophilisé a été fournie par la société Calbiochem (TNF- α Human, Recombinant, E.coli Cat# 654205) et le numéro de lot utilisé est D00141593. La catéchine EGCG utilisée provenait de MP Biomedicals (Solon, OH). L'hydroxytyrosol et la delphinidine proviennent de la compagnie Extrasynthese, la quercétine provient de la compagnie Sigma Chemical Company, et le curcumin utilisé de la compagnie LKT Laboratories. La migration cellulaire est effectuée à l'aide du Real-Time Cell Analyzer (RTCA) dual-plate (DP), et du system xCELLigence (Roche Diagnostics, QC). Les anticorps dirigés contre p-ERK (#4370), p-JNK (#46715), JNK (#4252), p-I κ B- α (#9242), p-p38 (#45115), p38 (#92125), p-NF- κ B p65 (#3033), NF- κ B p65 (#8242) sont de Cell Signaling Technology (Beverly, MA). Les anticorps contre ERK (#sc-94) viennent de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Les anticorps anti-COX-2 (#610203) proviennent de BD Transduction Laboratories (Mississauga, ON). L'anticorps contre la périostine est de abcam (abc 152099). Les produits d'électrophorèse et de zymographie (acrylamide, TEMED, APS, SDS) proviennent de Bio-Rad (Mississauga, ON). Les échantillons protéiques sont dosés par micro-BCA

(Pierce, Rockfort, IL). Les tubes de concentration des milieux de culture conditionnés proviennent de Millipore (cat # UFC 501096, Temecula, CA). L'extraction de l'ARN total est effectuée avec du TRIzol (Invitrogen, Burlington, ON). La synthèse d'ADNc à partir de l'ARN total est réalisée avec le kit high capacity cDNA reverse transcription (Applied Biosystems, Foster City, CA) et la mesure des amplicons est effectuée par PCR en temps réel avec du SYBR Green (Bio-Rad, cat. #170-8882, Mississauga, ON). Les autres réactifs proviennent de chez Sigma-Aldrich (Oakville, ON). Les amorces proviennent de la compagnie QIAGEN.

3.2 Les 7 lignées cellulaires dérivées de glioblastomes

La lignée cellulaire U-251, anciennement connue sous le nom de U-373, sont des cellules cancéreuses provenant d'un glioblastome astrocytaire de grade III. Le patient dont originait cette tumeur était de type caucasien et âgé de 61 ans. La lignée cellulaire U-138 provient d'une tumeur définie comme étant un glioblastome classé de grade IV en 2007. Cette tumeur du cerveau appartenait à un individu caucasien de genre masculin âgé de 47 ans. Les lignées cellulaires U-118 et U-138 appartenant à différents individus, ont des motifs VNTR et STR similaires. Elles sont très similaires cytogénétiquement et partagent au moins six chromosomes marqueurs dérivés. La lignée cellulaire U-118 provient d'une tumeur de glioblastome classé de grade IV en 2007. Cette tumeur du cerveau appartenait à un homme caucasien âgé de 50 ans. La lignée cellulaire U-87 provient d'un glioblastome classé de grade IV en 2007. Cette tumeur primaire du cerveau appartenait à une femme caucasienne âgée de 44 ans. Les Hs-683 sont des cellules tumorales issues d'un oligodendrogliome de grade III. Elles proviennent d'un homme caucasien âgé de 76 ans. La lignée cellulaire T-98 provient d'un glioblastome de grade IV d'homme caucasien âgé de 61 ans. Enfin la

lignée cellulaire A-172 est issue d'un glioblastome primaire de grade IV d'un patient âgé de 53 ans.

LIGNÉES CANCEREUSES	TYPE	GRADE	SEXE/ ETHNIE/AGE
U251	Glioblastome astrocytaire	III	homme caucasien , 61 ans .
U138	Glioblastome	IV	homme caucasien 47 ans.
U87	glioblastomes astrocytaire	IV	femme caucasienne 44 ans.
U118	Glioblastome astrocytaire	IV	homme caucasien 50 ans.
A172	Glioblastome	IV	homme 53 ans
HS683	Oligodendrogliome	III	homme caucasien 76 ans.
T98	Glioblastome multiforme	IV	homme caucasien 61 ans .

Tableau 3.1. Informations sur les lignées cellulaires utilisées dans notre travail (ATCC = American Type Culture Collection).

3.3 Méthodes

3.3.1 Culture cellulaire

Les lignées cellulaire U87 et U138 ont été cultivées à 37°C sous une atmosphère humide avec 5 % de CO₂ et 95 % d'air, dans un milieu de culture EMEM (Wisent, #cat 320- 036CL) contenant 10 % (v/v) sérum de veau (SV) (HyClone Laboratories,

Logan, UT SH30541.03), 1 mM de pyruvate de sodium (Sigma-Adrich, Oakville, ON), 2 mM glutamine (Gibco, #cat 25030), 100 unités/ml pénicilline et 100 mg/ml streptomycine (Wisent, #cat 450- 202-EL). Les cellules U251 et U118 ont également été cultivées à 37°C, sous une atmosphère humide à 5 % de CO₂ et 95 % d'air dans un milieu de culture DMEM (Wisent, #cat 319-020CL) contenant 10% (v/v) sérum foetal bovin (FBS) (HyClone Laboratories, Logan, UT SH30396.03), 100 unités/ml pénicilline et 100 mg/ml streptomycine (Wisent, #cat 450-202-EL). Le milieu de culture des lignées cellulaires HS683 et A172 était à une température de 37°C et d'une composition atmosphérique humide contenant 5% de CO₂. Le milieu de culture utilisé est le DMEM (Wisent, #cat 319-020CL) contenant 10 % (v/v) sérum de veau (SV) (HyClone Laboratories, Logan, UT SH30541.03) et 100 mg/ml streptomycine (Wisent, #cat 450-202-EL). Les cellules T98 ont été cultivées à 37°C également, avec une atmosphère contenant 5% de CO₂. Leur milieu de culture était le milieu EMEM (Wisent, #cat 320- 036CL) contenant 10% (v/v) sérum foetal bovin (FBS) (HyClone Laboratories, Logan, UT SH30396.03), 100 unités/ml pénicilline et 100 mg/ml streptomycine (Wisent, #cat 450-202-EL).

3.3.2 Extraction de l'ARN total

Les cellules sont cultivées en monocouche pendant 48h et traitées à 25 µM des différentes molécules phytochimiques (hydroxytyrosol, EGCG, quercétine, delphinidine et curcumin) pendant 24 h. L'ARN total des cellules est isolé en utilisant du TRizol suivant les instructions du fabricant (Invitrogen). 200 µl de chloroforme sont ajoutés au TRizol puis le lysat est centrifugé pendant 15 min à une vitesse de 12 000 g à 4°C. La phase supérieure est ensuite récupérée et 500 µl d'isopropanol y sont ajoutés. Après une période d'incubation de 10 min à

température pièce, le mélange est centrifugé à 12 000 g pour 10 min à 4°C. Le surnageant est enfin remplacé par 1 ml d'éthanol 75% afin de laver le culot d'ARN et le tout est centrifugé une dernière fois durant 10 minutes à 12 000 g à 4°C. L'ARN obtenu est resuspendu dans 20 µl d'eau RNase-free et quantifié par absorbance à une longueur d'onde de 260 nm. L'indicateur de pureté 260/280 de nos échantillons d'ARN était d'une valeur supérieur à 1,8. Enfin, les échantillons sont congelés à -80°C jusqu'à utilisation.

3.3.3 Synthèse d'ADNc et PCR en temps réel

L'ARN obtenu est utilisé pour la synthèse d'ADNc par transcription inverse (RT) à l'aide du « high capacity cDNA reverse transcription kit » (Applied Biosystems, Foster City, CA). Nous effectuons la réaction de RT selon le programme suivant : 25°C pendant 10 min; 37°C pendant 120 min et 85°C pendant 5 sec. L'ADNc est ensuite utilisé pour réaliser la PCR quantitative. Au début de la PCR, les brins complémentaires sont dénaturés en chauffant les échantillons à 95°C pendant 3 min. 40 cycles sont nécessaires pour amplifier les amplicons d'intérêts. Chacun des cycles comprend un chauffage à 95°C pendant 15 sec pour séparer les brins, puis à 62,5 °C pendant 1 min pour permettre l'appariement des amorces sur le brin matrice, et enfin à 72°C durant 30 sec afin de permettre l'élongation du brin complémentaire par la Taq Polymérase. L'amplification des ADNc est mesurée par fluorescence en utilisant un Icyler (Bio-Rad, Hercules, CA). Cet appareil détecte la fluorescence générée par le SYBR Green (Bio-Rad, Hercules, CA) qui s'intercale dans l'ADN double brin formé lors de la réaction de PCR. La quantité relative de l'ARNm du gène cible par rapport au contrôle interne, l'ARNm 18 S ribosomal, est calculée par la méthode (t.Cr). Au cours de la réaction enzymatique, le logiciel d'exploitation

des données IQ5 (Bio-Rad, Hercules, CA) affiche un graphique du signal de fluorescence versus le nombre de cycles au cours de la PCR en temps réel. Les différences (ΔCr) entre les valeurs moyennes en duplicatas et celle des contrôles internes (GAPDH et PPIA) sont également calculées et exprimées en unité relative par le logiciel iQ5 Optical System Software version 2.0 (Biorad, Hercules, CA). Les amorces de la périostine ont été synthétisées par Invitrogen TM, (hPerio-S, cat# 15612-U04FSF4) pour l'amorce sens, et (hPerio-ASI, cat# A15612- U050QMC) pour l'amorce anti sens. Les amorces de GAPDH (Hs_ GAPDH_1_SG), PPIA (Hs_PPIA_4_SG) COX-2 (Hs_PTGS2_1-SG), MMP-9 (Hs_MMP9_1_SG), CSF-1 (Hs_CF1_1_SG), CSF-2 (Hs_CSF2_1_SG), CSF-3 (Hs_CSF3_1_SG), FGF (Hs_FGF2_1_SG), EGF (Hs_EGF_1_SG), PDGF (Hs_PDGF1_1_SG) et VEGF (Hs_VEGFA_6_SG) ont été synthétisés par QIAGEN (Valencia, CA).

3.3.4 Lyse cellulaire et récolte du milieu de culture conditionné

Les cellules sont cultivées pendant 48h, puis traitées pendant 24h au TNF- α à 100 ng/ml ou avec les molécules phytochimiques à une concentration de 25 μ M ou tout simplement sevrées dans un milieu sans sérum. Après plusieurs expériences réalisées avec les molécules phytochimiques dans notre laboratoire, nous avons déterminés une concentration optimale de 25 μ M chez les glioblastomes. Après le traitement, le milieu de culture conditionné est récolté et centrifugé pendant 3 min à 3 000 rpm, puis concentré (1 ,2, 5, X) et cela suivant les instructions du manufacturier (Millipore, Temecula, CA). Les cellules sont par la suite lavées une seule fois à l'aide d'une solution de PBS froid (pH 7.4) contenant dans le cas des protéines phosphorylées 1 mM de NaF et de Na₃VO₄, elles sont ensuite incubées pendant 30 min dans le même tampon. Enfin, les cellules sont décollées avec un

policeman et lysées pendant une durée de 30 min, sur de la glace dans une solution contenant Tris-HCl 10 mM (pH 7.4), NaCl 150 mM, Triton X-100 1%, NP-40 0,5%, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM. Les débris cellulaires sont isolés par une centrifugation à 13 000 rpm de 10 min à 4°C.

3.3.5 Dosage des protéines

Le contenu en protéines des lysats cellulaires a été quantifié par le procédé microBCA selon les instructions du fabricant (Pierce). En effet, la quantité de protéines est dosée en utilisant différentes concentrations d'albumine sérique bovine (BSA) afin de tracer la courbe standard. Cela consiste à mettre dans des plaques de 96 puits 150 µl de chaque échantillon, 150 µl des solutions standard et le réactif de MicroBCA. La plaque a ensuite été incubée à 37°C pendant 2 h. Finalement, le produit de réaction pourpre formé par une liaison de coordination entre les ions cuivre II (Cu^{2+}) et les protéines qui possèdent au moins 4 liaisons peptidiques. L'intensité de la couleur est proportionnelle à la concentration en protéines et été mesuré à une longueur d'onde de 562 nm.

3.3.6 Électrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE)

Une même quantité protéines (25 µg) pour chaque échantillon est mise en suspension dans un tampon réducteur contenant 62,5 mM Tris-Hel (pH 6.8), 10% glycérol, 2% SDS, 5% 13-mercapto-éthanol et 0,00625% bromophénol. Les échantillons sont chauffés à 95°C pendant 5 minutes avant d'être soumis à l'électrophorèse. Les gels d'entassement sont composés de 3,8% de

polyacrylamide/bisacrylamide dissout dans une solution tampon 0,125 M de Tris-Hcl (pH 6.8), 0,1% SDS, 1 µl/ml de TEMED et 0,5 mg/ml d'APS. Le pourcentage de polyacrylamide/bisacrylamide varie pour les gels de séparation en fonction du poids moléculaire de la protéine d'intérêt. Le tampon de séparation est composé de 0,375 M Tris-Hel (pH 8.8), 0,1% SDS, 1 µl/ml de TEMED et 0,5 mg/ml d'APS. Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane de PVDF après la migration à l'aide du Trans-Blot Turbo RTA transfer Kit (Biorad, CA). La membrane est alors bloquée une heure à température pièce dans une solution de TBST contenant 5% de lait en poudre.

3.3.7 Immunodétection des protéines d'intérêt

Après trois lavages consécutifs de 15 minutes dans du TBST 0,3%, les membranes sont incubées dans une dilution de l'anticorps primaire dirigé contre la protéine d'intérêt toute la nuit à 4°C ou bien 1h à température ambiante. Après une nouvelle série de trois lavages consécutifs de 15 minutes des membranes, celles ci sont incubées avec l'anticorps secondaire respectif dilué à 1/2500 dans du TBST avec 5% lait en poudre pendant une heure à température ambiante. Les protéines sont détectées à l'aide d'une solution de ECL (Amersham, Biosciences, Baie d'Urfée, QC) ou d'ECL pro (Perkin Elmer) sur un film d'autoradiographie.

3.3.8 Migration cellulaire en temps réel

La migration des 7 lignées cellulaires est effectuée à l'aide du Real-Time Cell Analyzer (RTCA) dual-plate (DP), avec le system xCELLigence (Roche Diagnostics,

QC). Après 24 h de sevrage des lignées cellulaires dans un milieu sans sérum, les cellules ont été trypsinisées puisensemencées sur des plaques 16 puits CIM-plates 16 (Roches diagnostics). Chaque plaque est constituée de deux chambres: une supérieure et une inférieure. Elles sont toutes les deux préalablement couvertes de gélatine (0,15%) (p/v), lavées dans une solution de PBS. La première chambre contient les cellules (250 000 cellules/ml) et la deuxième détient le chimioattractant (25 μ M de molécules phytochimiques et/ou TNF- α (100 ng/ml). Une membrane poreuse de 8 μ m sépare les deux chambres, contenant sur sa partie inférieure des microélectrodes en or. La migration des cellules se fait de la chambre supérieure à la chambre inférieure par le chimioattractant en traversant la membrane poreuse, et cela provoque une augmentation de l'impédance électrique. Celle-ci est mesurée en temps réel par le RTCA DP, et est représentée par une unité arbitraire qui est l'indice cellulaire. La migration est mesurée toutes les min pendant 24 h.

3.3.9 Zymographie

La zymographie de gélatine a été utilisée pour évaluer l'étendue de l'activité gélatinolytique de la proMMP-9 et de la proMMP-2. En bref, un aliquot (20 μ l) du milieu de culture a été soumis par SDS-PAGE dans un gel contenant 0,1 mg / gélatine, un substrat qui est efficacement hydrolysé à la fois par proMMP-2 et proMMP-9. Les gels ont ensuite été incubés dans du Triton X-100 à 2,5% et rincés dans de l'eau distillée nanopure. Les gels ont ensuite été incubés à 37 ° C pendant 20 heures dans 20 mM de NaCl, 5 mM de CaCl₂, 0,02% de Brij-35, 50 mM de tampon Tris-HCl, pH 7,6, puis colorés avec 0,1% de Coomassie Brilliant Blue R-250 et décolorés dans 10% d'acide acétique, 30% de méthanol dans de l'eau. L'activité gélatinolytique a été détectée sous forme de bandes non colorées sur fond bleu.

CHAPITRE IV

RÉSULTATS

4.1 Comparaison des biomarqueurs d'intérêt des 7 lignées de glioblastome stimulées par le TNF- α

4.1.1 Comparaison génique

Nous avons procédé à l'analyse de sept lignées cellulaires dérivées de glioblastomes humains: U-251, U-138, A-172, T-98, Hs-683, U-87 et U-118. Avant de procéder à une récolte du milieu de culture conditionné et de récolter l'ARN, les cellules ont étéensemencées, cultivées pendant 48 h, sevrées pendant 24 h dans un milieu sans sérum pour les échantillons contrôles ou traitées avec 100 ng/ml de TNF- α . L'expérience est conclue par une RT-PCR puis d'une q-PCR. Les résultats obtenus, illustrés dans le **Tableau 4.1** montrent la variation de l'expression génique des marqueurs d'intérêts stimulés au TNF- α par rapport au contrôle. Nous remarquons que pour certains marqueurs étudiés, les sept lignées réagissent de la même manière face à l'inflammation. En effet nous observons une augmentation de l'expression génique de COX-2, MMP-9, CSF-2 et CSF-3 chez toutes nos lignées lorsqu'elles sont stimulées par le TNF- α . De même, nous observons que l'expression génique de la périostine diminue tous les glioblastomes stimulés au TNF- α . Toute fois, il y a des différences observées entre nos 7 lignées face à l'inflammation. Effectivement, nous notons par exemple une augmentation de l'expression de VEGF

dans les lignées U-251 et T-98, une diminution de l'expression de celui-ci dans les U-87 et U-118 et aucune différence significative dans les U-138, A-172 et Hs-683 face au TNF- α . Pour FGF, nous constatons une augmentation de son expression génique dans toutes les lignées hormis la lignée A-172 dont l'expression diminue par rapport à la condition basale. Pour l'expression des gènes PDGF et CSF-1, les lignées U-251, U-138, A-172, T-98, Hs-683 et U-118 réagissent toutes par une augmentation lorsqu'elles sont stimulées par le TNF- α . Nous n'observons aucune différence de l'expression de PDGF et de CSF-1 chez les U-87 par rapport au contrôle.

	COX 2	MMP9	PERIOSTIN	VEGF	FGF	EGF	PDGF	CSF1	CSF2	CSF3
U251	↑	↑	↓	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑
U138	↑	↑	↓	=	↑	=	↑	↑	↑	↑
A172	↑	↑	↓	=	↓	=	↑	↑	↑	↑
T98	↑	↑	↓	↑	↑	↓	↑	↑	↑	↑
HS683	↑	↑	↓	=	↑	↓	↑	↑	↑	↑
U87	↑	↑	↓	↓	↑	↓	=	=	↑	↑
U118	↑	↑	↓	↓	↑	↓	↑	↑	↑	↑

= Aucune différence par rapport au contrôle (cellule sans TNF- α)
 ↑ Augmentation par rapport au contrôle
 ↓ Diminution par rapport au contrôle

Tableau 4.1. Expression génique des biomarqueurs d'intérêt chez les 7 lignées cancéreuses. Les résultats expriment s'il y a eu une hausse, une baisse ou aucune différence de l'expression génique par rapport au contrôle (sans TNF- α). Les résultats présentés sont issus de 4 expériences indépendantes et présentées comme moyennes \pm SD. Des graphiques détaillés pour chaque lignée cellulaire sont consultables dans la section **ANNEXE A**.

4.1.2 Comparaison de l'expression des métalloprotéases

Afin d'évaluer la contribution potentielle du TNF- α dans la régulation de l'expression de MMP-9 et MMP-2, nous avons récolté les surnageants de culture et réalisé des zymographies par gélatine, une analyse basée sur les activités de détection des métalloprotéases matricielles représentées par la **figure 4.1**. Le protocole de zymographie débute par une séparation protéique par électrophorèse sur gel SDS-PAGE à la gélatine en condition non-dénaturante. Le substrat contenu dans le gel, la gélatine, est digéré par les gélatinases (MMP-2 et -9) actives prises dans le gel. Une coloration du gel au bleu de Coomassie permet de révéler une bande bleue claire à transparente sur un fond bleu foncé au poids moléculaire correspondant à la MMP. La clarté de la bande est proportionnelle à la concentration de MMP présente dans l'échantillon protéique. Comme contrôle positif, les proenzymes recombinantes humaines purifiées proMMP-2 (72 kDa) et proMMP-9 (92 kDa) ont été séparées en parallèle avec nos échantillons, dans chaque gel effectué. Ainsi, il est attendu que la MMP-9 et la MMP-2 présentes dans nos échantillons migrent plus bas que notre contrôle positif humain, cette expérience à été faite à titre qualitative sans analyse statistique.

Dans les lignées U-251 et Hs-683, nous n'observons aucun changement d'expression avec le TNF- α , il n'y a que la proMMP-2 qui est exprimée. Chez la lignée U-138, nous pouvons remarquer une légère expression de la MMP-9 lorsque celle-ci est stimulée par le TNF- α . Les A-172 expriment proMMP-2, MMP2 et MMP-9 en légère quantité. Comme dans la condition contrôle, la lignée T-98 exprime nettement proMMP-2 et légèrement MMP-9 en condition avec TNF- α . La lignée U-87 exprime quand à elle un peu MMP-9 lorsqu'elle est stimulée par le TNF- α . Enfin, nous n'observons aucune

différence de l'expression des MMP lorsque la lignée U-118 est stimulée par le TNF- α .

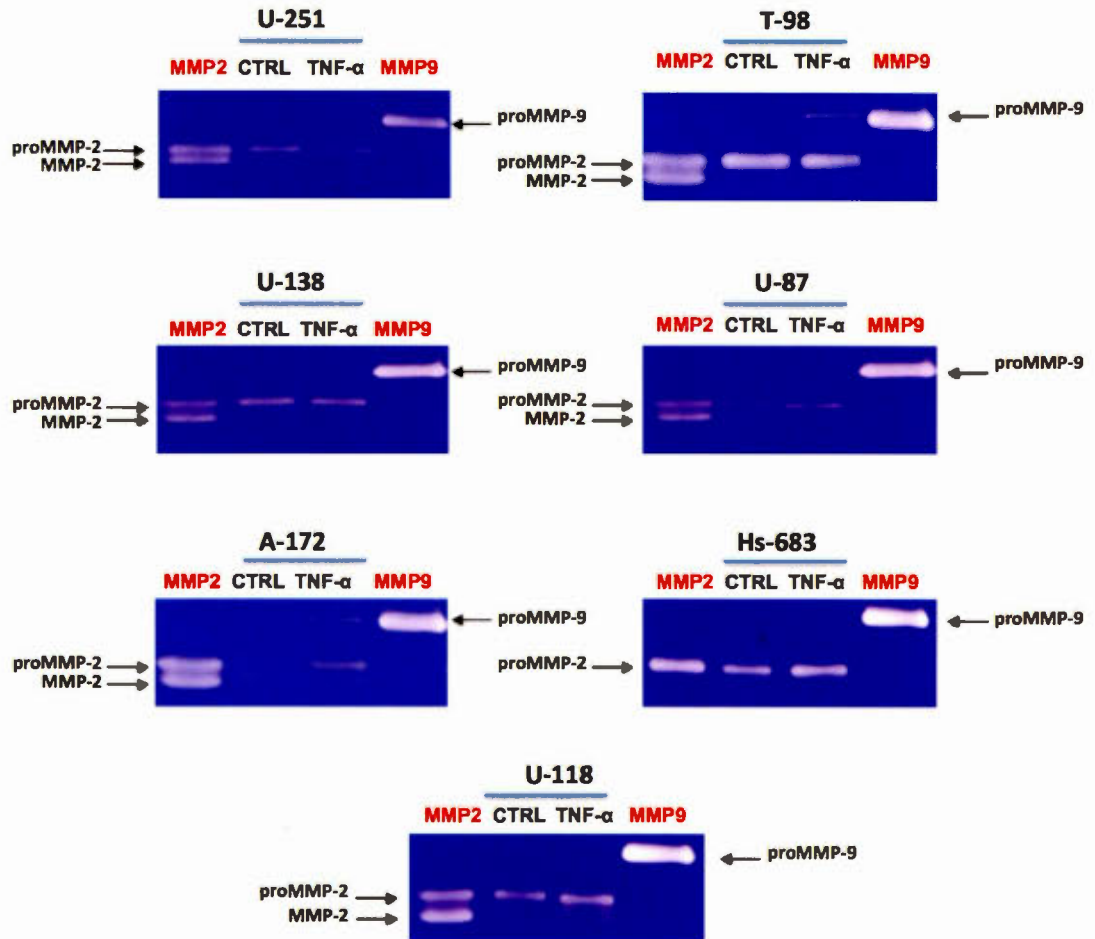


Figure 4.1. Expression des métalloprotéases MMP-9 et MMP-2 en en présence de TNF- α dans les 7 lignées cancéreuses de glioblastomes (n=1).

4.1.3 Etude comparative du pouvoir invasif de 7 lignées de glioblastomes

Afin d'étudier le pouvoir migratoire de nos sept lignées cancéreuses face à une stimulation inflammatoire, nous avons traité les cellules avec 100 ng/ml de TNF- α et mesuré la migration de celles-ci à l'aide du système xCELLigence. Etant donné que les plaques n'avaient pas assez de puits pour y mettre toutes nos conditions, nous avons choisit arbitrairement la lignée cellulaire U-87 comme modèle de comparaison de nos 7 lignées comme illustré dans les figures 4.2 A et 4.2 B. Ces figures nous dévoilent que le TNF- α augmente la capacité migratoire de toutes les lignées cancéreuses. Plus précisément, la figure 4.2 C nous indique que l'intensité de cette capacité migratoire que provoque le TNF- α chez chaque lignée suit une droite de régression au coefficient $R^2 = 0,95813$ ce qui signifie qu'il y a une corrélation quasi-parfaite entre l'inflammation et pouvoir invasif des lignées de glioblastome. De plus, en réalisant un graphique (figure 4.2 C) représentant l'induction de chaque lignée au TNF- α , nous avons pu effectuer un classement dans l'ordre croissant des 7 lignées cellulaires par rapport à leur capacité migratoire en réponse au TNF- α :

U138 < HS683 < T98 < U87 < U251 < A172 < U118

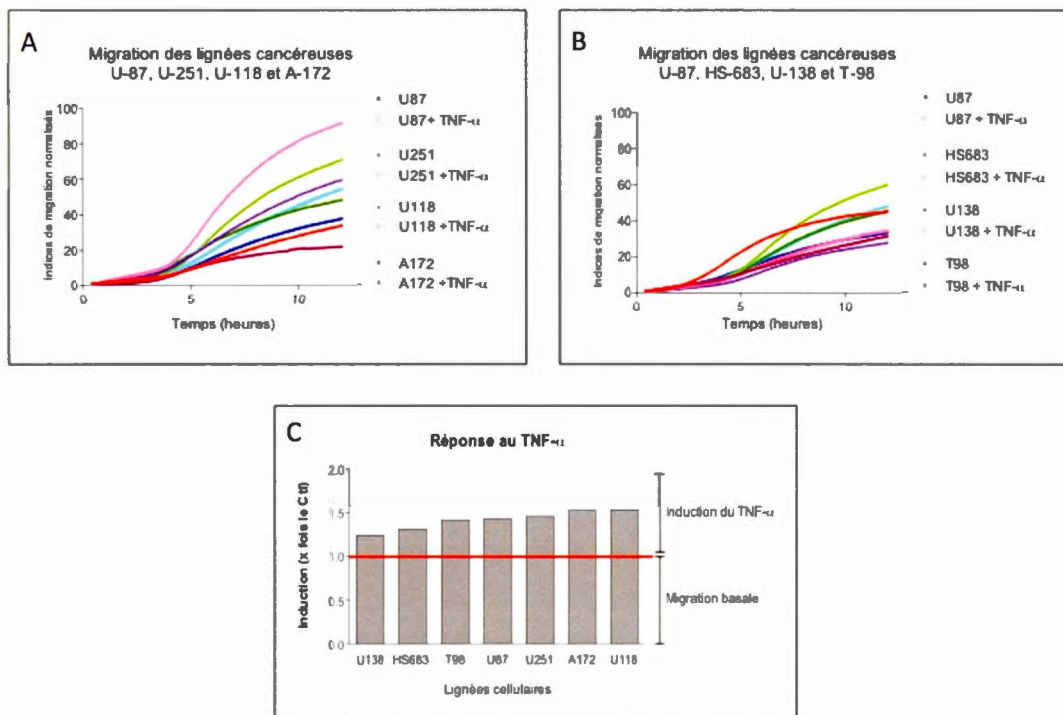


Figure 4.2. Étude de la capacité migratoire des différentes lignées cancéreuses en présence ou non de TNF- α .

(A,B) Indices de migration des différentes lignées en présence ou non de TNF- α . La lignée U87 en absence de TNF- α a servi de référence pour normaliser tous les indices. L'indice de migration est une valeur arbitraire qui reflète la quantité de cellules qui se déplacent de la chambre supérieure à la chambre inférieure en traversant la membrane poreuse. Le passage à travers cette membrane provoque une augmentation de l'impédance électrique. Celle-ci est mesurée en temps réel par le RTCA DP (*Real-Time Cell Analyzer Dual Purpose*) du système xCELLigence, ce qui correspond à l'analyse de la migration des cellules en temps réel. La migration est mesurée toutes les min pendant 24 h. Il y a eu un essai pour chaque lignée ($n = 1$).

(C) Comparaison de la réponse migratoire relative de chaque lignée en présence de TNF- α à $t = 12$ h. Pour chaque lignée, l'absence de TNF- α correspond à la condition contrôle (Ctl) qui correspond à la ligne horizontale tracée en rouge.

4.1.4 Expression des protéines d'intérêt dans une sélection de 4 lignées dérivées de glioblastomes

Après le classement obtenu sur le pouvoir migratoire des lignées cancéreuses induite par le TNF- α . Nous avons décidé de continuer nos expérimentations en sélectionnant deux lignées au pouvoir invasif le plus faible (U-138 et Hs-683), une lignée dont le pouvoir invasif induit par le TNF- α est au centre du classement (U-87) et la lignée dont pouvoir migratoire induit par l'agent pro inflammatoire est le plus important (U-118). Afin d'identifier le niveau de sécrétion et d'expression protéique de nos protéines d'intérêts *in vitro*, nous avons procédé à l'analyse de nos quatre lignées cancéreuses. Avant de procéder à une récolte du milieu de culture conditionné, les cellules ont étéensemencées, cultivées pendant 48 h et sevrées pendant 24 h dans un milieu sans sérum pour les échantillons contrôles, et traitées au TNF- α pendant 5 min et 24h pour les autres échantillons. L'expérience est conclue par une électrophorèse suivie d'un immunobuvardage de type Western. Les résultats obtenus, illustrés dans la **Figure 4.3** montrent que l'expression protéique de COX-2 est plus importante dans les lignées U-118 et Hs-683. P-I κ B semble être phosphorylé dans toutes les lignées mais plus particulièrement dans les U-87 et U-138, sa présence reflète la libération de NF- κ B et la translocation de celui-ci dans le noyau, conséquence de l'inflammation au TNF- α . P-NF- κ B et p-JNK et p-ERK sont estimés présents dans toutes les lignées de la même façon ce qui a pour signification que les cellules réagissent au phénomène inflammatoire au TNF- α . La périostine semble être présente chez les U-118, U-138 et Hs-683 mais cette dernière uniquement en condition basale. Enfin p-p38 est la plus exprimée chez les Hs-683.

CTRL: Conditions basales.

5 min: Traitement au TNF (100 ng/ml) durant 5 min.

24 h: Traitement au TNF (100 ng/ml) durant 24 heures.

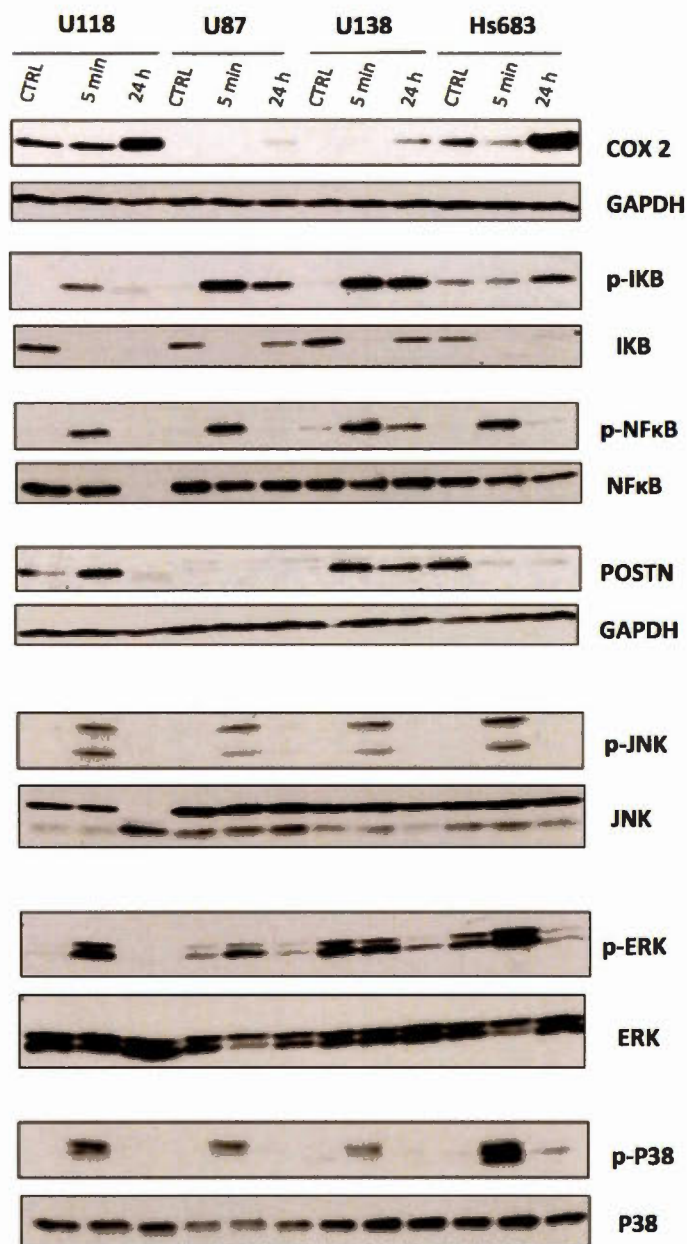


Figure 4.3. Effet de la stimulation des 7 lignées cancéreuses au TNF- α durant 5 min et 24h sur l'expression des différentes protéines d'intérêt (n=1).

4.2 Impact des phytochimiques sur l'inflammation

4.2.1 U-118

4.2.1.1 Effet des molécules phytochimiques sur les biomarqueurs d'intérêts des U-118 stimulés au TNF- α

Nous avons réalisé l'analyse de l'expression génique de nos biomarqueurs d'intérêt de la lignée cellulaire U-118 stimulée au TNF- α , face à des traitements à base des différentes molécules phytochimiques. Avant de procéder à une récolte du milieu de culture conditionné et de récolter l'ARN, les cellules ont étéensemencées et cultivées pendant 48 h. Elles ont été sevrées pendant 24 h dans un milieu sans sérum pour les échantillons contrôles et traitées avec les cinq molécules phytochimiques à une concentration de 25 μ M pour les conditions avec traitement. 1h plus tard, nous avons ajouté le TNF- α à une concentration de 100 ng/ml pour 24h pour les échantillons stimulés par l'inflammation. L'expérience est conclue par une RT-PCR puis par une q-PCR. Les résultats obtenus dans le **Tableau 4.2** illustrent l'effet inhibiteur de la molécule phytochimique sur le biomarqueur d'intérêt stimulé par le TNF- α . La présence d'une marque dans une case signifie que la molécule phytochimique inhibe l'effet du TNF- α sur le biomarqueur de la case correspondante. Prenons comme exemple le traitement des cellules avec l'hydroxytyrosol (HT) : nous remarquons que l'HT a la capacité d'inhiber l'effet du TNF- α sur l'expression des gènes de COX-2, de la périostine, de VEGF, et de EGF. Cela signifie que l'HT permet d'inhiber l'inflammation causée par le TNF- α en réduisant la surexpression de COX-2, le processus pro-angiogénique en réduisant la surexpression de VEGF, la prolifération cellulaire en renversant l'expression de EGF et de la périostine. Les autres molécules phytochimiques EGCG, quercétine,

delphinidine et curcumin agissent également contre l'inflammation induite par le TNF- α en inversant l'expression des biomarqueurs étudiés.

U-118	COX-2	MMP-9	POSTN	VEGF	FGF	EGF	PDGF	CSF-1	CSF-2	CSF-3
HT	✓		✓	✓		✓				
EGCG	✓					✓			✓	✓
Quer		✓	✓	✓		✓				
Dp	✓				✓				✓	✓
Cur	✓	✓	✓	✓		✓				

Tableau 4.2. Effet des molécules phytochimiques sur l'expression des biomarqueurs d'intérêt de la lignée cellulaire U-118 stimulée au TNF- α .

Les marques représentées dans les cases signifient que la molécule phytochimique contre l'effet du TNF- α sur le biomarqueur sélectionné. Tous les graphiques qui ont permis de dresser ce tableau sont dans l'ANNEXE B.

4.2.1.2 Action des molécules phytochimiques sur la capacité invasive des U-118 stimulés au TNF- α

Afin d'étudier l'effet de nos cinq molécules phytochimiques sur le pouvoir migratoire de notre lignée dans les conditions basales et inflammatoires, nous avons traité les cellules avec 100 ng/ml de TNF- α et 25 μ M de chaque molécule phytochimiques. Nous avons mesuré la migration de celles-ci à l'aide du système xCELLigence. La **figure 4.4 A** illustre la migration de toutes les conditions étudiées en fonction du temps (sur 12h). Comme attendu, nous remarquons que les cellules traitées au TNF- α ont une capacité de migration plus importante que ceux qui n'en ont pas. De plus,

pour la condition ayant uniquement l'induction inflammatoire au TNF- α , nous remarquons que celle-ci possède la capacité migratoire la plus importante. Nous observons également que toutes les molécules phytochimiques réduisent la capacité migratoire de U-118 stimulée par le TNF- α . Plus précisément, certaines d'entre elles réduisent également la capacité migratoire des cellules cancéreuses U-118 même dans les conditions basales. Le graphique de la **figure 4.4 B** nous expose ce phénomène avec plus de précision et représente la moyenne de deux expériences réalisée dans les mêmes conditions. Nous avons réalisé un classement des molécules phytochimiques selon leur capacité inhibitrice au temps t fixé à 10h, de la plus forte inhibition à la plus faible.

En condition basale : Curcumin > EGCG > Quercetine > Delphinidine.

Avec le TNF- α : Quercetine>EGCG >Delphinidine > Curcumin>Hydroxytyrosol

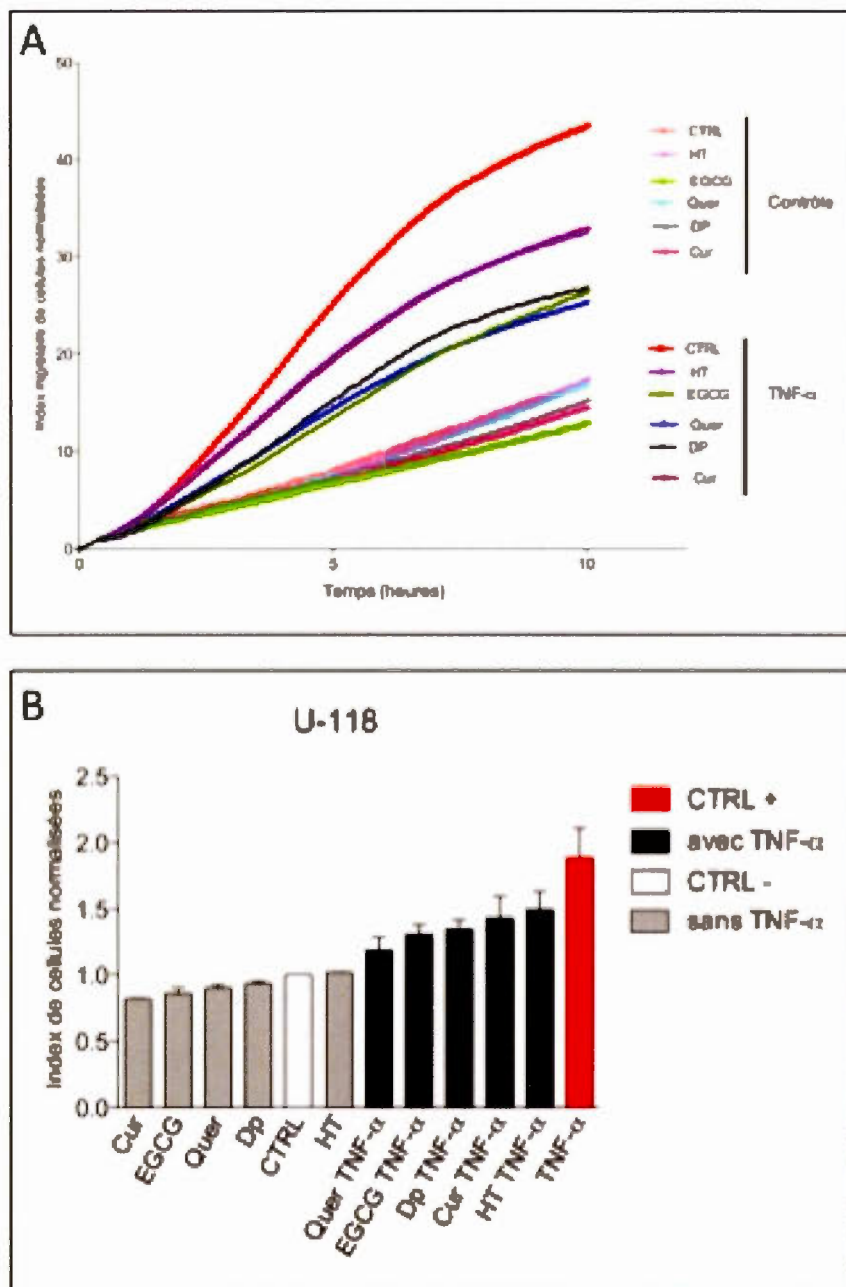


Figure 4.4. Impact des molécules phytochimiques sur la migration des cellules U-118.

A. Graphique représentatif de l'effet des molécules phytochimiques sur le pouvoir migratoire des cellules cancéreuses U-118 lorsque celles-ci sont stimulées au TNF- α en fonction du temps. B. Classement dans l'ordre croissant de l'inhibition de la migration cellulaire de la lignée U-118 en condition basale et induite par le TNF- α à

t= 10h de migration. Les résultats ont été normalisés et résultent de la moyenne de deux expériences (n = 2) avec leur écart moyen.

4.2.1.3 Aucun changement observé dans l'action des molécules phytochimiques sur la sécrétion des MMPs

Afin d'évaluer la contribution potentielle du TNF- α et l'effet des molécules phytochimiques dans la régulation de l'expression de MMP-9 et MMP-2, nous avons récolté les milieux de culture conditionnés et réalisé des zymographies par gélatine représentées par la **figure 4.5**.

Nous n'observons aucun changement d'expression avec le TNF- α ni avec les molécules phytochimiques, il n'y a que la proMMP-2 et MMP2 qui sont exprimées dans toutes les conditions.

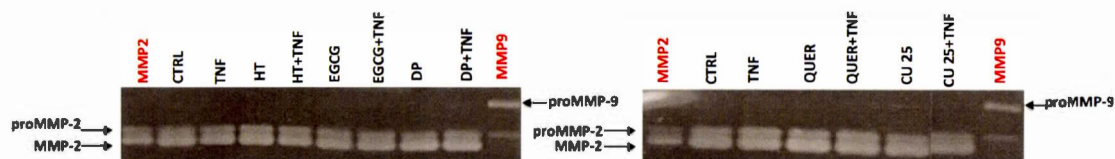


Figure 4.5. Action des molécules phytochimiques sur l'expression des MMPs des U-118 stimulées au TNF- α (n=1).

Le protocole de zymographie débute par une séparation protéique par électrophorèse sur gel SDS-PAGE à la gélatine. Le substrat contenu dans le gel, la gélatine, est digéré par les gélatinases (MMP-2 et -9) actives prises dans le gel. Une coloration du gel au bleu de Coomassie permet de révéler une bande bleue claire à transparente sur un fond bleu foncé au poids moléculaire correspondant à la MMP. La clarté de la bande est proportionnelle à la concentration de MMP présente dans l'échantillon protéique. Comme contrôle positif, les proenzymes recombinantes

humaines purifiées proMMP-2 (72 kDa) et proMMP-9 (92 kDa) ont été séparées en parallèle avec nos échantillons.

4.2.1.4 Effet des molécules phytochimiques sur l'expression des protéines d'intérêt des U-118 stimulées au TNF- α

Afin de visualiser l'effet de nos traitements à base des mêmes molécules naturelles, par rapport au niveau de sécrétion et d'expression protéique des protéines d'intérêts, nous avons procédé à l'analyse par une électrophorèse suivie d'un immunobuvardage de type Western de nos échantillons. Avant de procéder à une récolte du milieu de culture conditionné, les cellules ont étéensemencées, cultivées pendant 48 h et sevrées pendant 24 h dans un milieu sans sérum pour les échantillons contrôles, traitées avec 25 μ M de chacun de nos traitements et traitées au TNF- α pendant 5 min et 24h. Les résultats obtenus, illustrés dans la **Figure 4.6** montrent que l'expression protéique de COX-2, lorsque les cellules sont traitées avec les molécules phytochimique, n'est pas modifiée par rapport à la condition contrôle ce qui insinue qu'au niveau protéique les molécules phytochimique ne diminuent pas l'inflammation dans cette lignée cellulaire .

Nous ne remarquons pas non plus de grandes différences significatives de l'expression de p-I κ B dans nos échantillons. p-NF- κ B est présent dans toutes les conditions lorsque la lignée a été traitée avec le TNF- α durant 5 min. Toutefois nous pouvons nous apercevoir que cette expression diminue dans les cellules traitées avec l'HT et l'EGCG. Il ne semble pas y avoir de grandes modifications de l'expression de p-JNK, p-ERK et p-p38 non plus dans les cellules traitées avec les molécules phytochimique

CTRL: Conditions basales.
5 min: Traitement au TNF (100 ng/ml) durant 5 min.
24 h: Traitement au TNF (100 ng/ml) durant 24 heures.

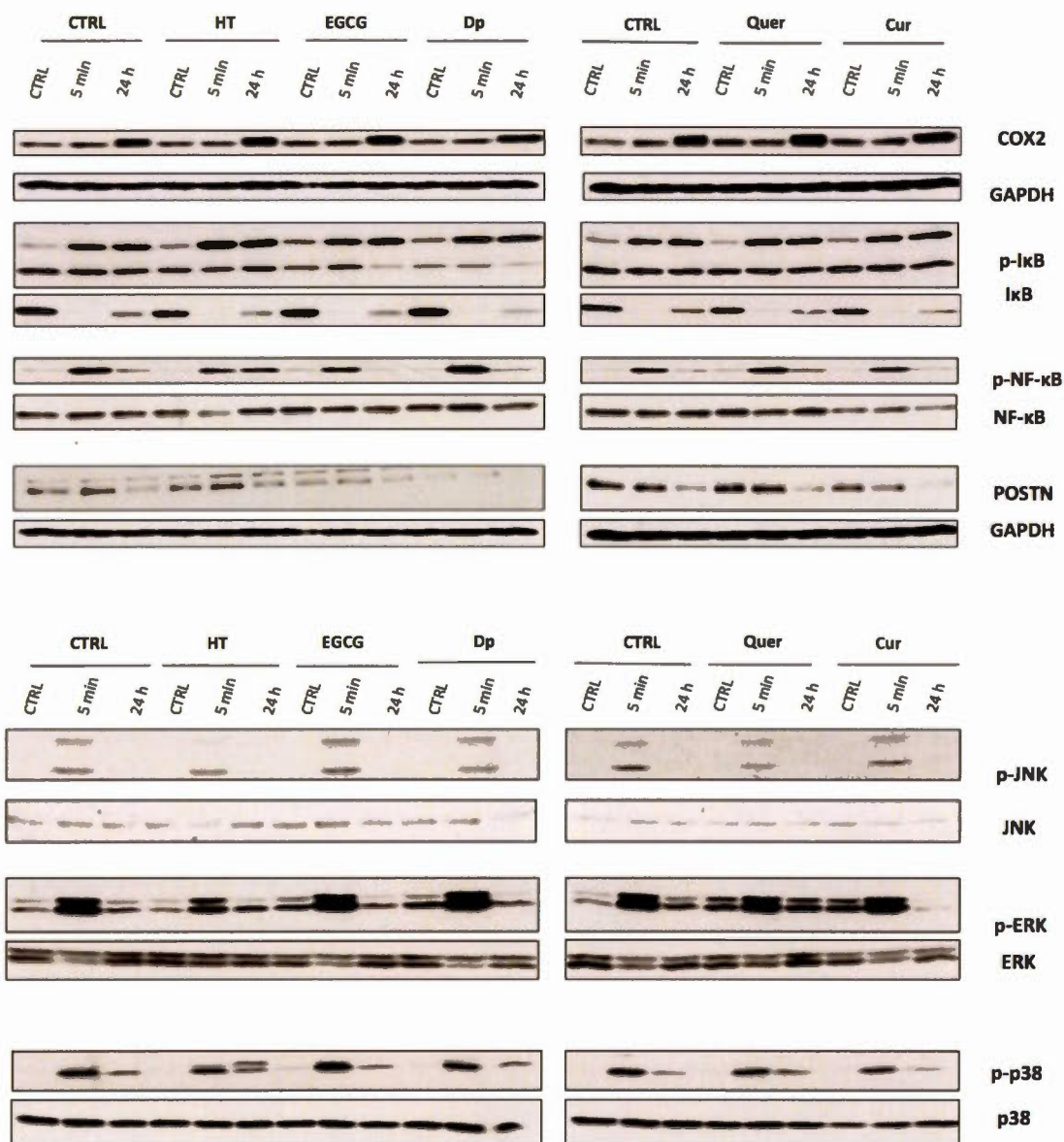


Figure 4.6. Impact des molécules phytochimiques sur l'expression des protéines de signalisations de la lignée U-118 stimulée au TNF- α pendant 5 min et 24h (n=1).

4.2.2 U-138

4.2.2.1 Effet des molécules phytochimiques sur les biomarqueurs d'intérêts des U-138 stimulées au TNF- α

Tout comme pour les U-118, nous avons réalisé les mêmes expériences pour déterminer quel était l'effet de nos molécules phytochimiques sur la lignée U-138 dans les conditions basales ou stimulée au TNF- α . Nous avons donc effectué l'analyse de l'expression génique de nos biomarqueurs d'intérêt. Les résultats obtenus par q-PCR dans le **Tableau 4.3** illustrent l'effet inhibiteur de la molécule phytochimique sur le biomarqueur d'intérêt stimulé par le TNF- α . La présence d'une marque dans une case signifie que la molécule phytochimique inhibe l'effet du TNF- α sur le biomarqueur de la case correspondante. Pour le cas du traitement des cellules avec l'HT, nous remarquons qu'il a la capacité d'inhiber l'effet du TNF- α sur l'expression du gène de la périostine uniquement. Les autres molécules phytochimiques EGCG, quercétine, delphinidine et curcumin agissent également en inversant l'expression des biomarqueurs stimulée pas le TNF- α . Nous remarquons toutefois qu'aucune de nos molécules n'inhibe l'augmentation de l'expression de COX-2 induite par le TNF- α et qu'il n'y a que la quercétine et la delphinidine qui inhibent l'expression du VEGF dans les U-138.

U-138	COX-2	MMP-9	POSTN	VEGF	FGF	EGF	PDGF	CSF-1	CSF-2	CSF-3
HT			✓							
EGCG			✓		✓				✓	
Quer		✓		✓	✓				✓	✓
Dp				✓	✓				✓	
Cur		✓			✓				✓	

Tableau 4.3. Effet des molécules phytochimiques sur l'expression des biomarqueurs d'intérêt de la lignée cellulaire U-138 stimulée au TNF- α .

Les marques représentées dans les cases signifient que la molécule phytochimique contre l'effet du TNF- α sur le biomarqueur sélectionné. Tous les graphiques qui ont permis de dresser ce tableau sont dans l'ANNEXE C.

4.2.2.2 Action des molécules phytochimiques sur la capacité invasive des U-138 stimulées au TNF- α

Nous nous sommes penchés sur l'effet de nos cinq molécules phytochimiques sur le pouvoir migratoire des U-138 dans les conditions basales et inflammatoires. Pour cela, nous avons traité les cellules avec 100 ng/ml de TNF- α et 25 μ M de chaque molécule phytochimique. Nous avons mesuré la migration de celles-ci à l'aide du système xCELLigence. La **figure 4.7 A** illustre la migration de toutes les conditions étudiées en fonction du temps (sur 12h) de l'expérience n=1. Comme attendu, nous remarquons aussi dans cette lignée que les échantillons ayant du TNF- α ont une capacité migratoire plus importante que celles qui n'en ont pas. De plus, pour la condition ayant uniquement l'induction inflammatoire au TNF- α , nous remarquons que celle-ci possède la capacité migratoire la plus importante. Nous observons également que toutes les molécules phytochimiques réduisent la capacité migratoire de U-138 stimulée par le TNF- α . Le graphique de la **figure 4.7 B** nous

donne plus de détails de cette inhibition sous forme d'un classement croissant des molécules phytochimiques selon leur capacité inhibitrice au temps t fixé à 10h. Cette figure représente la moyenne de deux expériences réalisée dans les mêmes conditions n=1 et n=2.

En condition basale : EGCG > Curcumin.

Avec le TNF- α : Curcumin > EGCG > Delphinidine > Quercetine > Hydroxytyrosol.

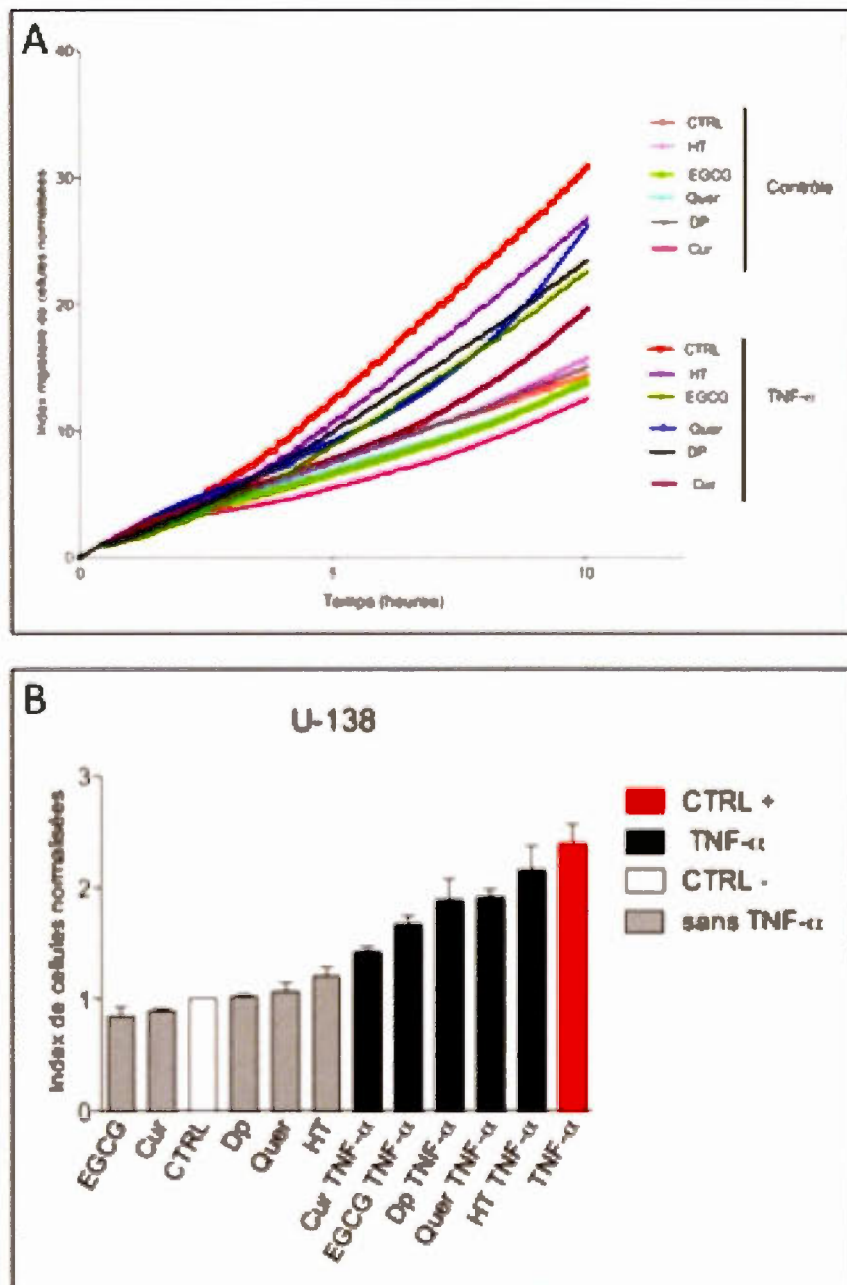


Figure 4.7. Impact des molécules phytochimiques sur la migration des cellules U-138.

A. Graphique représentatif de l'effet des molécules phytochimiques sur le pouvoir migratoire des cellules cancéreuses U-138 lorsque celles-ci sont stimulées au TNF- α

en fonction du temps. B. Classement dans l'ordre croissant de l'inhibition de la migration cellulaire de la lignée U-138 en condition basale et induite par le TNF- α à $t=10$ h de migration. Les résultats ont été normalisés et résultent de la moyenne de deux expériences ($n=2$) avec leur écart moyen.

4.2.2.3 Action des molécules phytochimiques sur la sécrétion des MMPs chez les U-138

Afin de déterminer la contribution potentielle du TNF- α et l'effet des molécules phytochimiques dans la régulation de l'expression de MMP-9 et MMP-2, nous avons récolté les surnageants de culture et réalisé des zymographies par gélatine représentées par la **figure 4.8**. Comme observé précédemment, la stimulation de la lignée U-138 par le TNF- α induit l'expression de MMP-9. Nous ne détectons aucun changement d'expression de celle-ci avec les molécules phytochimiques mis à part pour le traitement avec la delphinide. En effet, la delphinidine permet l'expression de MMP-2 de la lignée cancéreuse en condition basale et stimulée par le TNF- α .

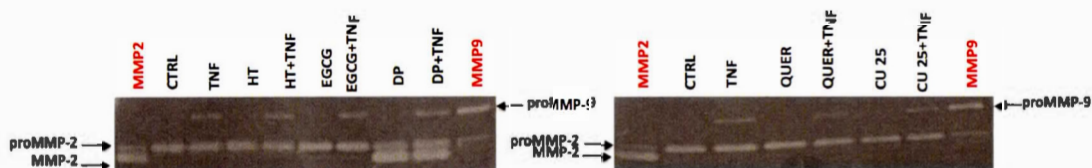


Figure 4.8. Action des molécules phytochimiques sur l'expression des MMPs des U-138 stimulées au TNF- α ($n=1$).

4.2.2.4 Effet des molécules phytochimiques sur l'expression des protéines d'intérêt des U-138 stimulées au TNF- α

Afin de visualiser l'effet de nos traitements à base des mêmes molécules naturelles, par rapport au niveau de sécrétion et d'expression protéique des protéines d'intérêts, nous avons procédé à l'analyse par une électrophorèse suivie d'un immunobuvardage de type Western de nos échantillons. Avant de procéder à une récolte du milieu de culture conditionné, les cellules ont étéensemencées, cultivées pendant 48 h et sevrées pendant 24 h dans un milieu sans sérum pour les échantillons contrôles, traitées avec 25 μ M de chacun de nos traitements et traitées au TNF- α pendant 5 min et 24h. Les résultats obtenus, illustrés dans la **Figure 4.9** montrent que l'expression protéique de COX-2, lorsque les cellules sont traitées avec les molécules phytochimiques, est plus forte que dans la condition contrôle. En effet nous remarquons que l'intensité des lignées exprimant COX-2 est plus forte que la condition contrôle, et plus précisément lorsque les cellules sont traitées avec l'hydroxytyrosol, l'EGCG, la delphinidine et la quercétine. La delphinidine semble être la molécule phytochimique qui exprime le plus COX-2 par rapport à la condition basale, suivit de l'EGCG, la quercétine puis de l'HT. Seul le traitement au curcumin semble diminuer l'expression de COX-2.

Il n'y a pas de différences significatives de l'expression de p-I κ B dans nos échantillons avec traitement par rapport à la condition basale. p-NF- κ B est présent dans toutes les conditions lorsque la lignée a été traitée avec le TNF- α durant 5 min mais semble être augmenté lorsque les cellules sont traitées avec les molécules phytochimiques. Malheureusement, nous ne pouvons faire de bonnes déductions avec la périostine car la détection n'est pas de bonne qualité. p-JNK semble légèrement augmenté par rapport à la condition basale lorsque les cellules sont

traitées à l'hydroxytyrosol, l'EGCG, la delphinidine et la quercétine. Le curcumin ne semble pas modifier l'expression de p-JNK par rapport à la condition basale. pERK est exprimé dans toutes les conditions lorsque la lignée est stimulée au TNF- α durant 5 min. Les molécules phytochimiques ne semblent pas en modifier l'expression. L'expression de p-p38 semble diminuée légèrement lorsque les cellules sont traitées avec l'hydroxytyrosol, l'EGCG et le curcumin. La quercétine par contre augmente l'expression de p-p38.

CTRL: Conditions basales.

5 min: Traitement au TNF (100 ng/ml) durant 5 min.

24 h: Traitement au TNF (100 ng/ml) durant 24 heures.

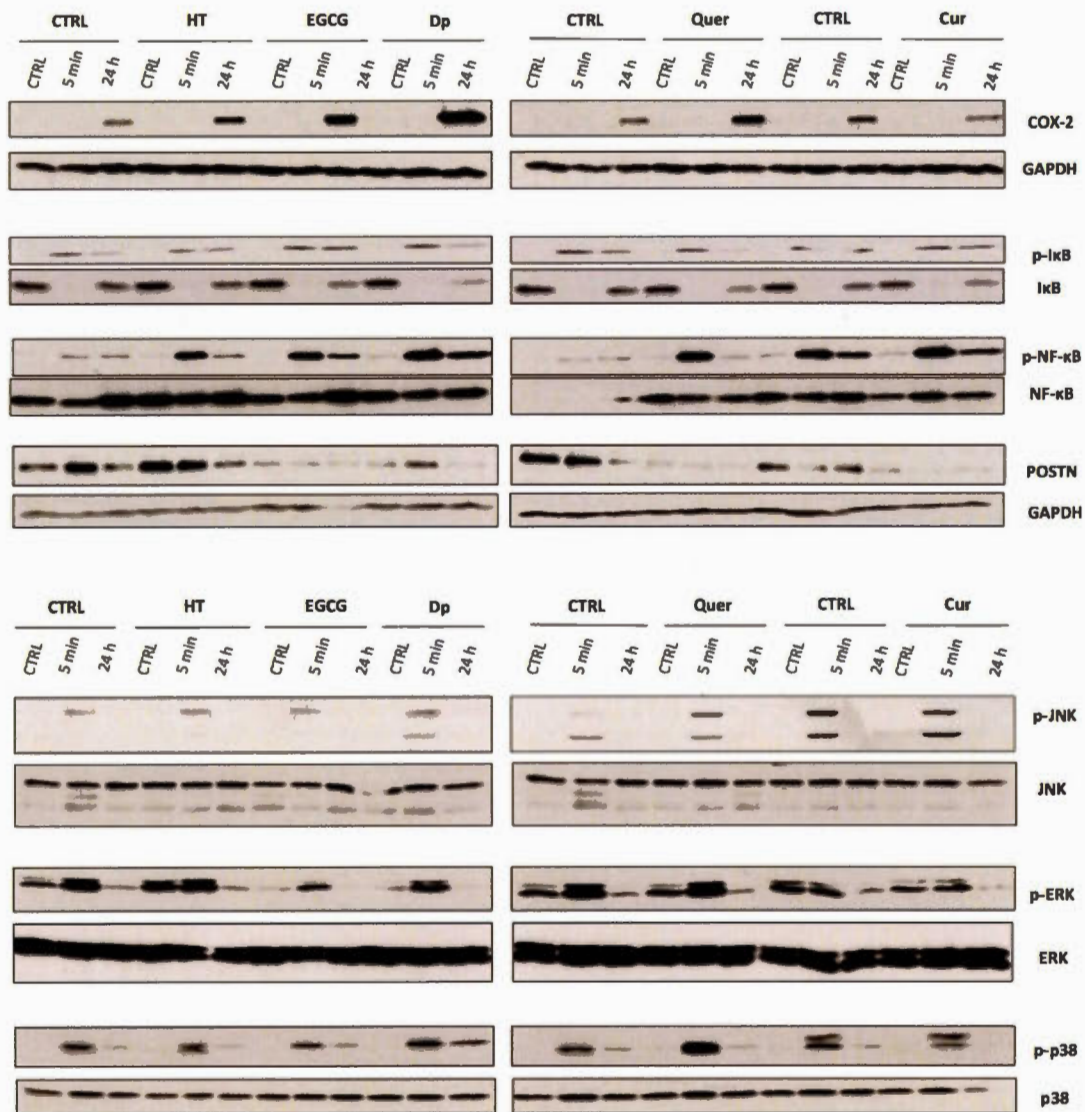


Figure 4.9. Impact des molécules phytochimiques sur l'expression des protéines de signalisation de la lignée U-138 stimulée au TNF- α pendant 5 min et 24h (n=1).

4.2.3 U-87

4.2.3.1 Effet des molécules phytochimiques sur les biomarqueurs d'intérêts des U-87 stimulés au TNF- α

Comme vu ultérieurement, nous avons réalisé exactement la même expérience que précédemment afin de déterminer quel effet nos molécules phytochimiques provoquent sur l'expression génique de nos marqueurs sur la lignée U-138 stimulée au TNF- α . Les résultats obtenus par q-PCR dans le **Tableau 4.4** résument l'effet inhibiteur de la molécule phytochimique sur le biomarqueur d'intérêt stimulé par le TNF- α . Nous constatons que l'hydroxytyrosol ne parvient pas à renverser aucun des effets provoqués par le TNF- α chez les biomarqueurs étudiés. Le curcumin ne parvient qu'à renverser l'effet du TNF- α sur CSF-1. Les molécules EGCG, quercétine et delphinidine parviennent à inhiber l'effet du TNF- α sur le proangiogénique VEGF et les facteurs de croissance CSF-2 et CSF-3. La quercétine et la delphinidine sont les seules à pouvoir renverser l'effet inducteur du TNF- α sur MMP-9. Nous notons toutefois qu'aucune de nos molécules n'inhibe l'augmentation de l'expression de COX-2 induite par le TNF- α .

U-87	COX-2	MMP-9	POSTN	VEGF	FGF	EGF	PDGF	CSF-1	CSF-2	CSF-3
HT										
EGCG				✓	✓				✓	✓
Quer		✓		✓					✓	✓
Dp		✓		✓				✓	✓	✓
Cur								✓		

Tableau 4.4. Effet des molécules phytochimiques sur l'expression des biomarqueurs d'intérêt de la lignée cellulaire U-87 stimulée au TNF- α . Les marques représentées dans les cases signifient que la molécule phytochimique contre l'effet

du TNF- α sur le biomarqueur sélectionné. Tous les graphiques qui ont permis de dresser ce tableau sont dans l'ANNEXE D.

4.2.3.2 Action des molécules phytochimiques sur la capacité invasive des U-87 stimulés au TNF- α

Nous nous sommes intéressés à l'effet que provoquent nos cinq molécules phytochimiques sur le pouvoir migratoire de la lignée U-87 dans les conditions basales et inflammatoires. Pour cela, nous avons traité les cellules avec 100 ng/ml de TNF- α et 25 μ M de chaque molécule phytochimiques. Nous avons mesuré la migration de celles-ci à l'aide du système xCELLigence. La **figure 4.10 A** illustre la migration de toutes les conditions étudiées en fonction du temps (sur 12h) de l'expérience n=1. Comme nous l'avons remarqué avec les lignées précédentes, les cellules traitées au TNF- α ont une capacité migratoire plus importante que celles qui n'en ont pas. La condition ayant uniquement l'induction inflammatoire au TNF- α possède la capacité migratoire la plus importante. Nous remarquons néanmoins que la delphinidine n'a pas la capacité d'inhiber la capacité migratoire des U-87 en condition basale pourtant celles-ci l'inhibent lorsque la lignée est stimulée par le TNF- α . Nous observons tout de même que toutes les molécules phytochimiques réduisent la capacité migratoire des U-138 stimulées par le TNF- α . Le graphique de la **figure 4.10 B** nous donne plus de détails de cette inhibition sous forme d'un classement des molécules phytochimiques selon leur capacité inhibitrice au temps t fixé à 10h, de la plus forte à la plus faible inhibition. Cette figure représente la moyenne de deux expériences n=1 et n=2 réalisées dans les mêmes conditions. Le classement effectué pour la condition basale considère l'écart-type.

En condition basale : Hydroxytyrosol > EGCG > Quercétine > curcumin.

Avec le TNF- α : Hydroxytyrosol > EGCG > Quercetine > Delphinidine > Curcumin.

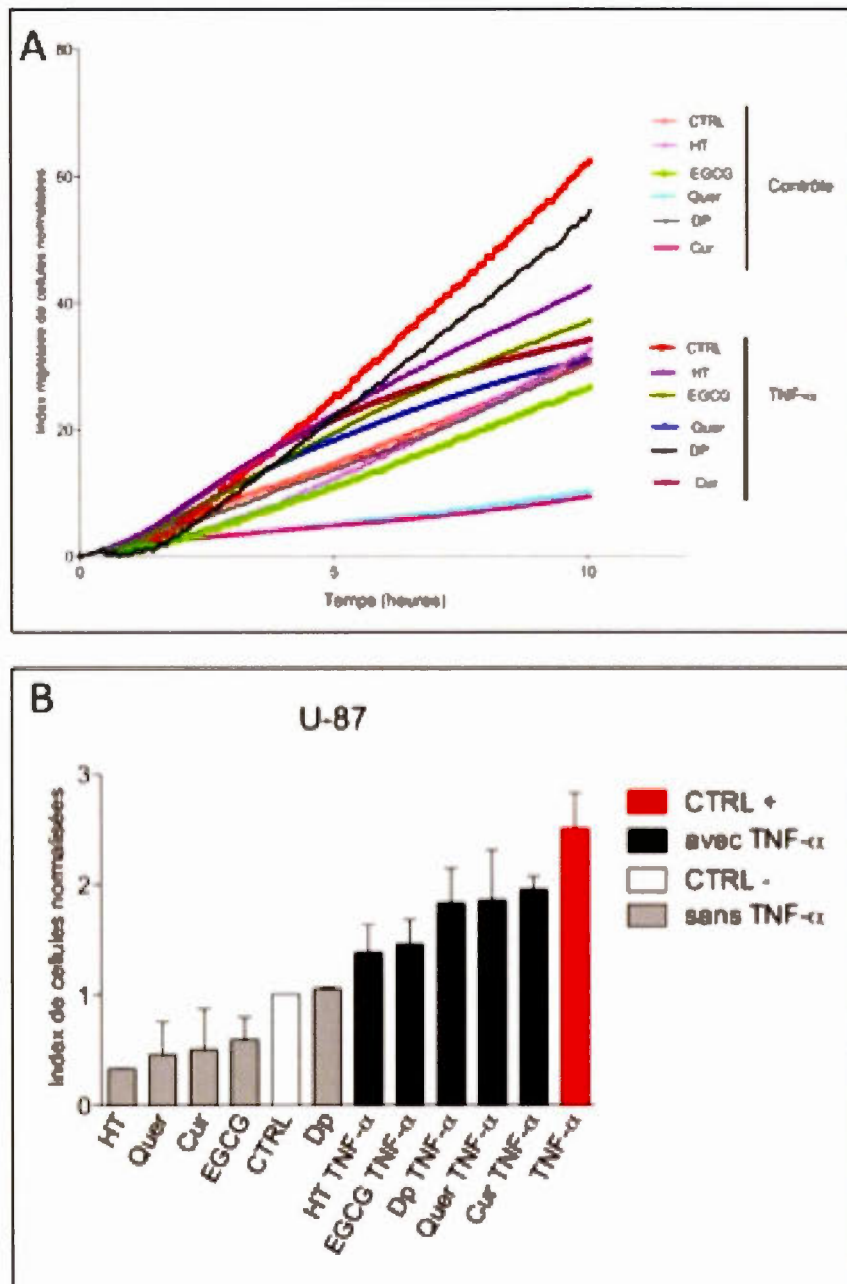


Figure 4.10. Impact des molécules phytochimiques sur la migration des cellules U-87.

A. Graphique représentatif de l'effet des molécules phytochimiques sur le pouvoir migratoire des cellules cancéreuses U-87 lorsque celles-ci sont stimulées au TNF- α en fonction du temps. B. Classement dans l'ordre croissant de l'inhibition de la migration cellulaire de la lignée U-87 en condition basale et induite par le TNF- α à $t=10$ h de migration. Les résultats ont été normalisés et résultent de la moyenne de deux expériences ($n = 2$) avec leur écart moyen.

4.2.3.3 Action des molécules phytochimiques sur la sécrétion des MMPs dans les U-87

Afin d'évaluer la contribution potentielle du TNF- α et l'effet des molécules phytochimiques dans la régulation de l'expression de MMP-9 et MMP-2, nous avons récolté les surnageants de culture et réalisé des zymographies par gélatine représentées par la **figure 4.11**. Nous n'observons aucun changement d'expression avec le TNF- α ni avec les molécules phytochimiques. Il n'y a que la proMMP-2 et MMP2 qui sont exprimées dans toutes les conditions.

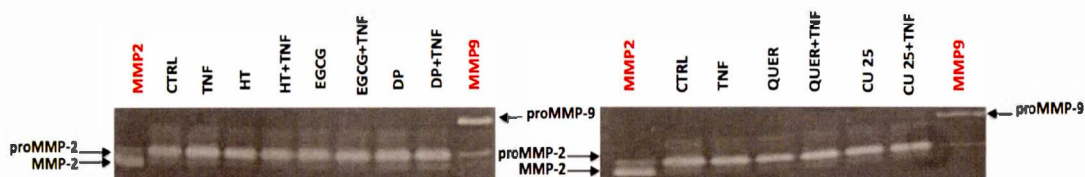


Figure 4.11. Action des molécules phytochimiques sur l'expression des MMPs des U-87 stimulées au TNF- α ($n=1$).

4.2.3.4 Effet des molécules phytochimiques sur l'expression des protéines d'intérêt des U-87 stimulées au TNF- α

L'effet de nos traitements aux molécules phytochimiques au niveau de la sécrétion et de l'expression protéique des protéines d'intérêts a également été étudié dans la lignée U-87. Les résultats obtenus, illustrés dans la **Figure 4.12**, montrent que l'expression protéique de COX-2, lorsque les cellules sont traitées avec les molécules phytochimiques, est plus forte que la condition contrôle pour les traitements avec l'hydroxytyrosol, EGCG, quercétine et curcumin. La delphinidine semble être la seule à diminuer l'expression de COX-2 induite par le TNF- α . Nous remarquons aussi que l'EGCG, la delphinidine, la quercétine et la curcumine augmentent l'expression de p- κ B. p-NF- κ B est présent dans toutes les conditions lorsque la lignée a été traitée avec le TNF- α durant 5 min, mais son expression ne semble pas être modifiée lorsque les cellules sont traitées avec les molécules phytochimiques. Malheureusement, nous ne pouvons faire de bonnes déductions avec la périostine car la détection n'est pas de bonne qualité. p-JNK semble légèrement augmentée par rapport à la condition basale lorsque les cellules sont traitées à l'hydroxytyrosol et l'EGCG. La quercétine ne semble pas modifier l'expression de p-JNK par rapport à la condition basale mais le curcumin semble la diminuer un peu. pERK est diminué fortement lorsque les cellules U-87 sont traitées avec l'hydroxytyrosol et semble être diminuée également avec les autres molécules phytochimiques lorsque la lignée est stimulée au TNF- α durant 5 min. L'expression de p-p38 semble diminuée légèrement lorsque les cellules sont traitées avec l'EGCG, la delphinidine et le curcumin. La quercétine et l'hydroxytyrosol augmentent l'expression de cette protéine.

CTRL: Conditions basales.

5 min: Traitement au TNF (100 ng/ml) durant 5 min.

24 h: Traitement au TNF (100 ng/ml) durant 24 heures.

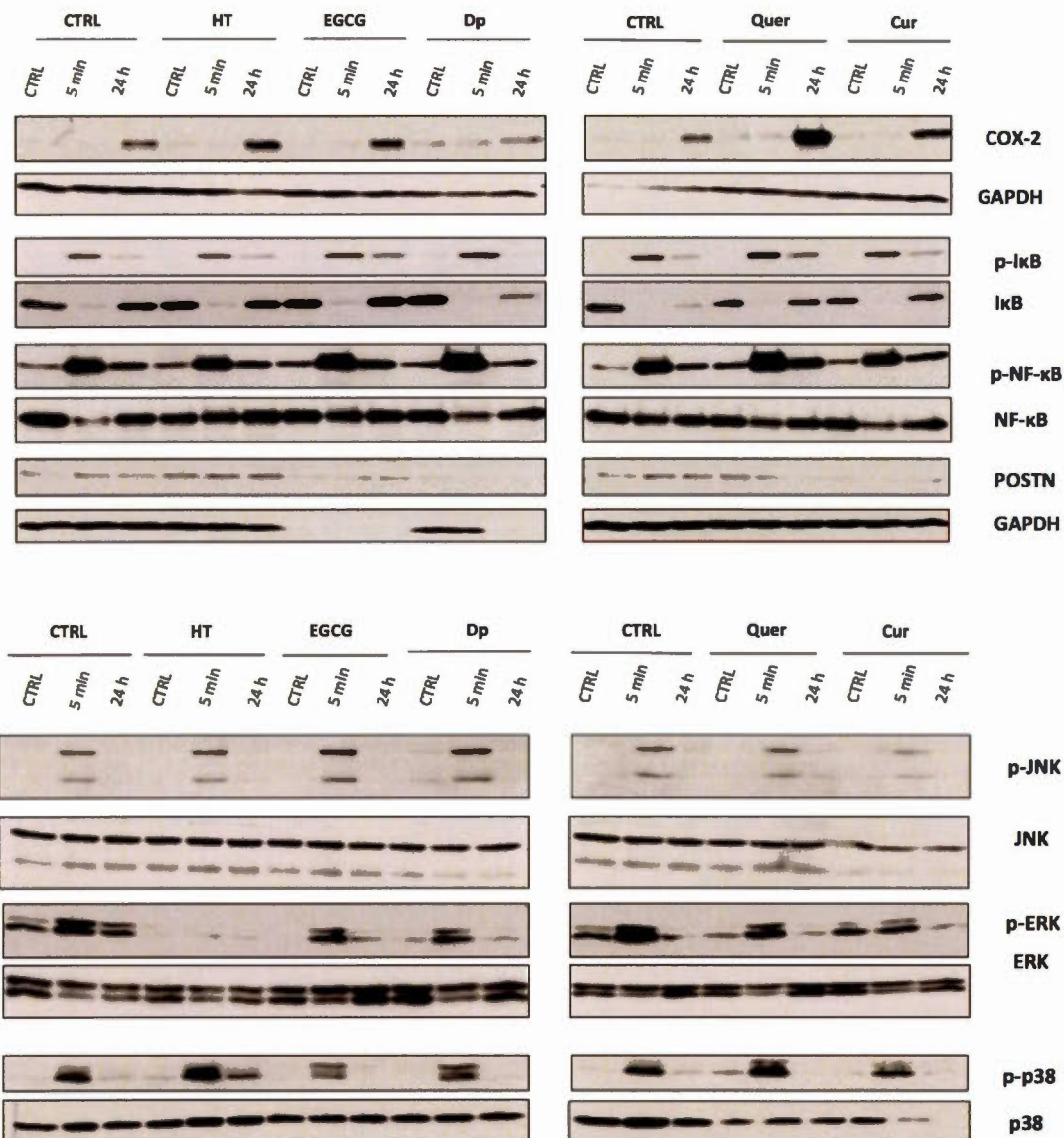


Figure 4.12. Impact des molécules phytochimiques sur l'expression des protéines de signalisations de la lignée U-87 stimulée au TNF- α pendant 5 min et 24h (n=1).

4.2.4 HS-683

4.2.4.1 Effet des molécules phytochimiques sur les biomarqueurs d'intérêts des Hs-683 stimulées au TNF- α

Tout comme pour les trois lignées précédentes, nous avons réalisé les mêmes expériences pour déterminer quel était l'effet de nos molécules phytochimiques sur la lignée Hs-683 dans les conditions basales et stimulées au TNF- α . Les résultats obtenus par q-PCR dans le **Tableau 4.5** illustrent l'effet inhibiteur de la molécule phytochimique sur le biomarqueur d'intérêt stimulé par le TNF- α . Nous remarquons que tous les traitements ont la capacité d'inhiber l'effet du TNF- α sur l'expression du gène de la périostine. Seule la delphinidine permet d'inverser l'effet que provoque le TNF- α sur VEGF et PDGF, et seule la molécule phytochimique EGCG agit en inversant l'expression de COX-2 stimulée par le TNF- α .

HS-683	COX-2	MMP-9	POSTN	VEGF	FGF	EGF	PDGF	CSF-1	CSF-2	CSF-3
HT			✓							
EGCG	✓		✓			✓				
Quer		✓	✓							
Dp			✓	✓			✓			
Cur			✓							

Tableau 4.5. Effet des molécules phytochimiques sur l'expression des biomarqueurs d'intérêt de la lignée cellulaire Hs-683 stimulée au TNF- α .

Les marques représentées dans les cases signifient que la molécule phytochimique contre l'effet du TNF- α sur le biomarqueur sélectionné. Tous les graphiques qui ont permis de dresser ce tableau sont dans l'ANNEXE E.

4.2.4.2 Action des molécules phytochimiques sur la capacité invasive des Hs-683 stimulées au TNF- α

Pour cette lignée également, nous avons cherché quels étaient les effets de nos cinq molécules phytochimiques sur le pouvoir migratoire des Hs-683 dans les conditions basales et inflammatoires. Nous avons traité les cellules avec 100 ng/ml de TNF- α et 25 μ M de chaque molécule phytochimique. Nous avons mesuré la migration de celles-ci à l'aide du système xCELLigence. La **figure 4.13 A** illustre la migration de toutes les conditions étudiées en fonction du temps (sur 12h). Comme anticipé nous remarquons aussi dans cette lignée que les cellules ayant du TNF- α ont une capacité migratoire plus importante que celles qui n'en ont pas. De plus, pour la condition ayant uniquement l'induction inflammatoire au TNF- α , nous remarquons que celle-ci possède la capacité migratoire la plus importante. Nous observons également que toutes les molécules phytochimiques réduisent la capacité migratoire de Hs-683 stimulée par le TNF- α ainsi qu'en condition basale. Le graphique de la **figure 4.13 B** nous donne plus de détails de cette inhibition sous forme d'un classement des molécules phytochimiques selon leur capacité inhibitrice au temps t fixé à 10h, de la plus forte à la plus faible inhibition. Cette figure représente la moyenne de deux expériences n=1 et n=2 réalisées dans les mêmes conditions. Le classement effectué pour la condition basale considère l'écart-type.

En condition basale : EGCG >Quercetine > Hydroxytyrosol >Curcumin >Delphinidine.

Avec le TNF- α : EGCG > Hydroxytyrosol > Quercetine > Curcumin >Delphinidine.

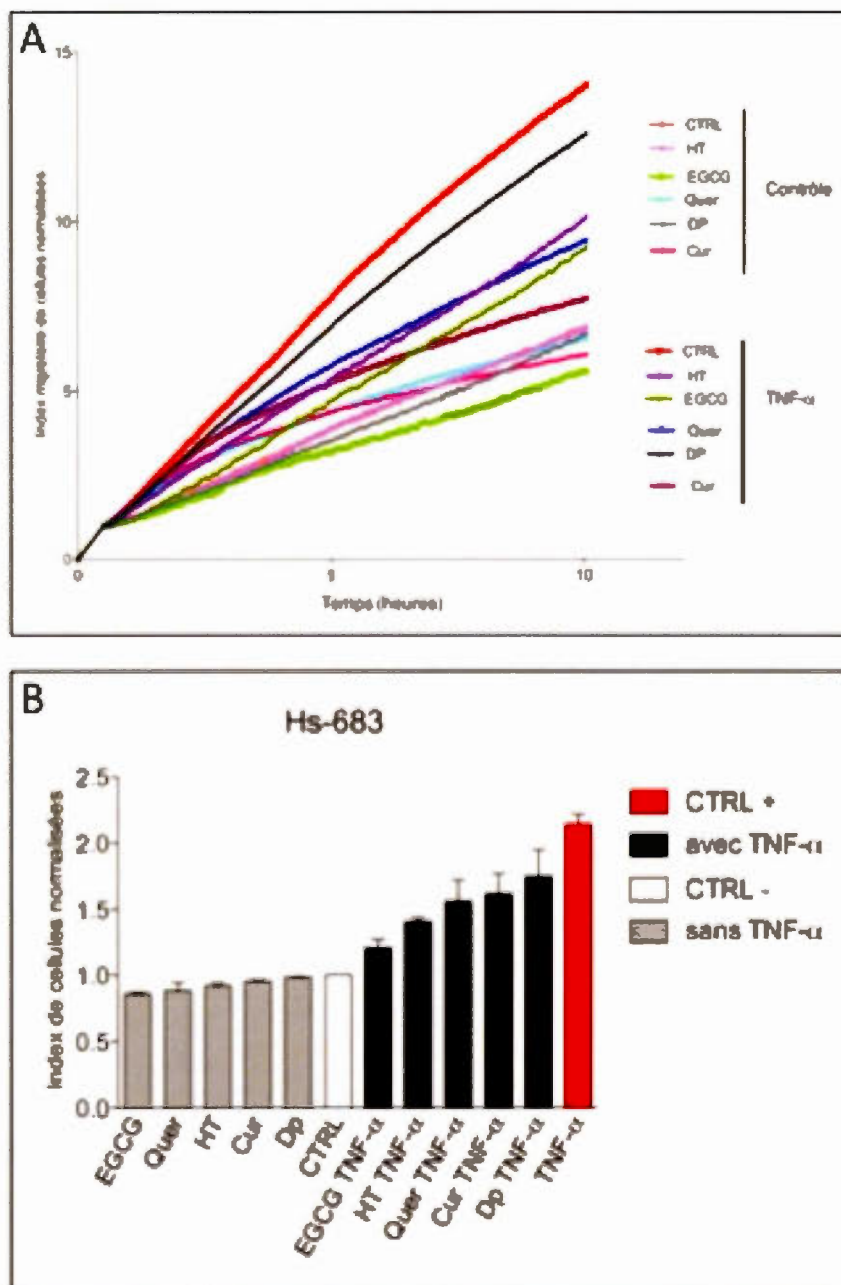


Figure 4.13. Impact des molécules phytochimiques sur la migration des cellules Hs-683.

A. Graphique représentatif de l'effet des molécules phytochimiques sur le pouvoir migratoire des cellules cancéreuses Hs-683 lorsque celles-ci sont stimulées au TNF- α

en fonction du temps. B. Classement dans l'ordre croissant de l'inhibition de la migration cellulaire de la lignée Hs-683 en condition basale et induite par le TNF- α à t= 10h de migration. Les résultats ont été normalisés et résultent de la moyenne de deux expériences (n = 2) avec leur écart moyen.

4.2.4.3 Action des molécules phytochimiques sur la sécrétion des MMPs chez les Hs-683

Afin d'évaluer la contribution potentielle du TNF- α et l'effet des molécules phytochimiques sur la régulation de l'expression de MMP-9 et MMP-2, nous avons récolté les surnageants de culture, et réalisé des zymographies par gélatine représentées par la **figure 4.14**. Nous n'observons aucun changement d'expression avec le TNF- α ni avec les molécules phytochimiques, il n'y a que la proMMP-2 qui est exprimée dans toutes les conditions.

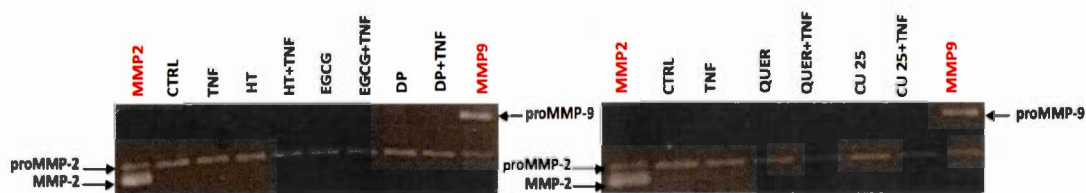


Figure 4.14. Action des molécules phytochimiques sur l'expression des MMPs des Hs-683 stimulées au TNF- α (n=1).

4.2.4.4 Effet des molécules phytochimiques sur l'expression des protéines d'intérêt des Hs-683 stimulées au TNF- α

Afin de visualiser l'effet de nos traitements à base des mêmes molécules naturelles,

par rapport au niveau de sécrétion et d'expression des protéines d'intérêts, nous avons procédé à l'analyse par électrophorèse suivie d'un immunobuvardage de type Western de nos échantillons. Les résultats illustrés dans la **Figure 4.15** montrent que l'expression protéique de COX-2, lorsque les cellules sont traitées avec les molécules phytochimiques n'est pas modifiée dans la condition contrôle mis à part pour le traitement au curcumin qui semble en diminuer l'expression. Il semble qu'il y a eu une inversion des puits entre les échantillons au TNF- α t=5 min et t= 24h pour la piste représentant l'expression de p-I κ B. Seuls la delphinidine et la quercétine semblent diminuer l'expression de celle-ci. p-NF- κ B est présent dans toutes les conditions lorsque la lignée a été traitée avec le TNF- α durant 5 min au même niveau. Malheureusement, nous ne pouvons faire de bonnes déductions avec la périostine car la détection n'est pas de bonne qualité. Il semble que le traitement avec l'hydroxytyrosol augmente l'expression de p-JNK. De plus, il n'y a pas de différences significatives de l'expression de p-JNK dans nos échantillons avec traitement à l'EGCG et à la delphinidine par rapport à la condition basale. Toutefois la quercétine et le curcumin semblent en diminuer l'expression. pERK est exprimé dans toutes les conditions lorsque la lignée est stimulée au TNF- α durant 5 min. Les molécules phytochimiques ne semblent pas en modifier l'expression. L'expression de p-p38 semble diminuer légèrement lorsque les cellules sont traitées avec la delphinidine et le curcumin.

CTRL: Conditions basales.

5 min: Traitement au TNF (100 ng/ml) durant 5 min.

24 h: Traitement au TNF (100 ng/ml) durant 24 heures.

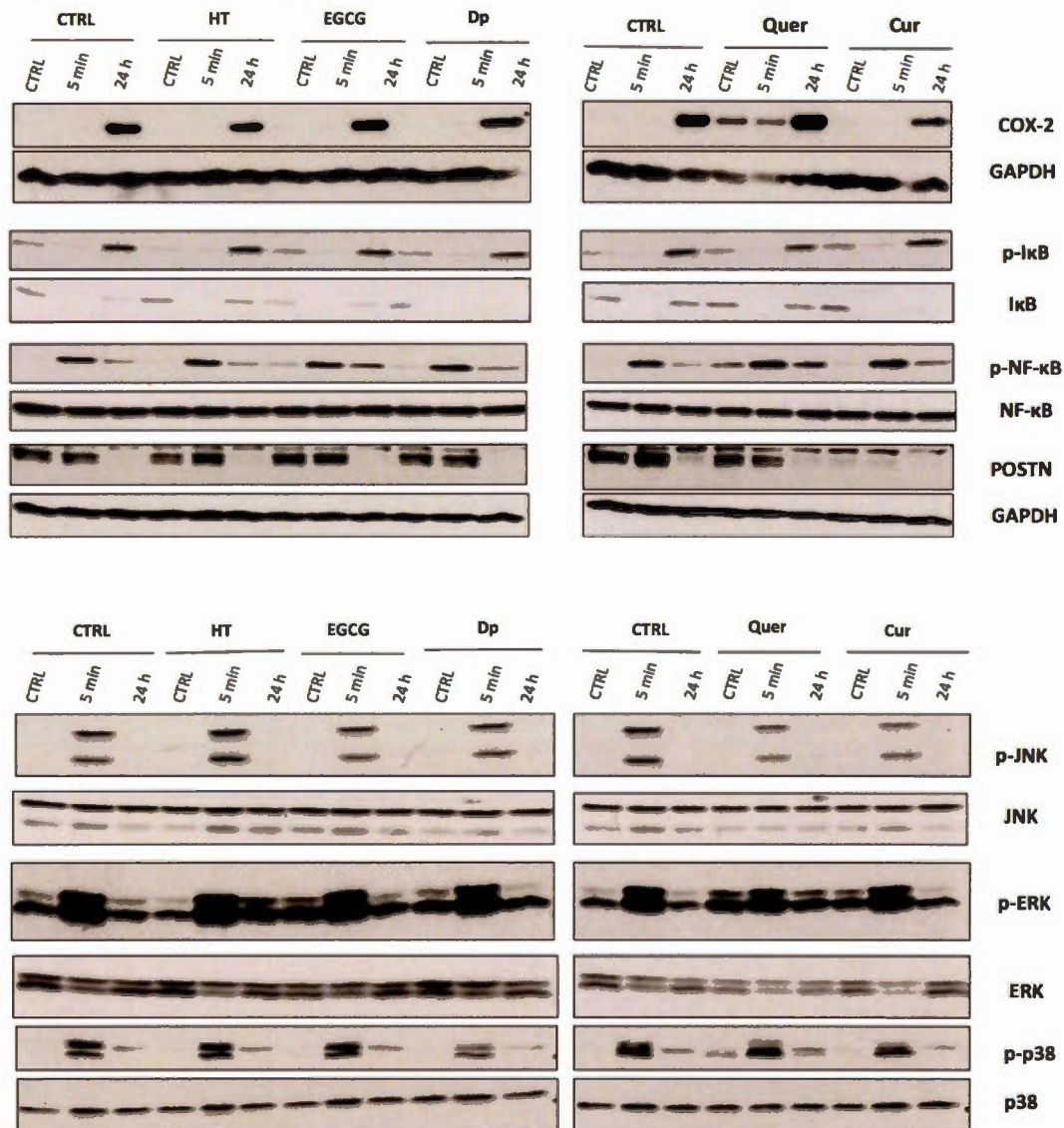


Figure 4.15. Impact des molécules phytochimiques sur l'expression des protéines de signalisations de la lignée Hs-683 stimulée au TNF- α pendant 5 min et 24h (n=1).

CHAPITRE V

DISCUSSION

Les glioblastomes multiformes sont les tumeurs cérébrales les plus invasives et les plus répandues chez l'adulte (Figarella-Branger *et al.*, 2010; Giese et Westphal, 1996). Le traitement de ce type de cancer se compose le plus souvent d'une ablation de la tumeur, d'une radiothérapie suivie d'une chimiothérapie (Parsons *et al.*, 2008). Malheureusement, malgré les progrès médicaux accomplis, ce type de cancer a conservé son mauvais pronostic (Shakur *et al.*, 2013). Une des principales causes à cela, est la présence de la barrière hémato-encéphalique qui sépare le sang du parenchyme cérébral et limite le passage de la plupart des médicaments dans le système nerveux central (Regina *et al.*, 2008). De plus, il existe des hétérogénéités génétiques inter-tumorales mais également intra-tumorales au sein même de la tumeur qui réduisent les chances de parvenir à une guérison avec les moyens actuels utilisés. Le recours à une médecine personnalisée pour chaque individu semble alors plus qu'indispensable pour combattre ce fléau. Les agents pharmaceutiques seraient adaptés pour cibler les différences patient à patient mais également pour la diversité de mutations au sein même de la tumeur de chaque patient (Ene et Holland, 2015; Huse *et al.*, 2013). De nouvelles approches thérapeutiques sont donc nécessaires pour la prévention et le traitement de cette maladie.

Depuis plusieurs années, les chercheurs se sont intéressés au développement et à l'utilisation de traitements à base de composés naturels, dérivés de notre alimentation pour combattre la progression et le développement du cancer (Aggarwal et Shishodia, 2006). Ce choix de se diriger vers ces composés découle de leur faible toxicité et de leur nombreuses propriétés antioxydantes et anti-tumorales (Aggarwal et Shishodia, 2006).

Mon projet de recherche avait pour but d'évaluer et de caractériser de façon qualitative dans un premier temps sept lignées cellulaires de glioblastomes en réponse à une inflammation provoquée par le TNF- α . Puis, dans un deuxième temps, de déterminer le potentiel d'utilisation de cinq molécules phytochimiques face à l'inflammation qui sont : l'hydroxytyrosol, l'EGCG, la quercétine, la delphinidine et le curcumin. Les expériences ont été réalisées de façon qualitative sans analyse statistique mais peuvent nous renseigner approximativement des tendances de variation des GBM face à l'inflammation et aux traitements phytochimiques.

Les résultats de ce mémoire démontrent que:

- 1) Il existe des similarités et des différences d'expression génique et protéique au sein des sept lignées cancéreuses étudiées, face à l'inflammation provoquée par le TNF- α .
- 2) L'inflammation tumorale provoque une augmentation de la capacité invasive chez les sept lignées cancéreuses.
- 3) Les traitements à base de composés phytochimiques administrés à nos lignées cancéreuses ne leur provoquent pas la même réaction face à l'inflammation.
- 4) Toutes les molécules phytochimiques réduisent la capacité migratoire des glioblastomes stimulé par l'inflammation.

5.1 Similarités et différences d'expression observées dans les 7 lignées de glioblastomes face à l'inflammation

Au cours de nos travaux, nous avons d'abord observé l'effet de l'inflammation provoqué par le TNF- α sur l'expression génétique de biomarqueurs au sein de nos sept lignées de glioblastomes. Nous avons remarqué que le TNF- α déclenche chez toutes nos lignées cellulaires une augmentation de l'expression génique de COX-2, MMP-9, des facteurs de croissance CSF-1, CSF-2 et CSF-3 et une diminution de la périostine. Ces résultats nous indiquent que les GBM répondent bien au stress provoqué par le TNF- α et réagissent toutes de la même façon pour l'expression des biomarqueurs cités plus haut, mais dans des intensités différentes (**Annexe A**) : elles produisent des prostaglandines via l'activation de COX-2, dégradent la MEC via la production de MMP-9 pour introduire les processus d'angiogenèse et de prolifération cellulaire. Ces processus sont amplifiés avec la surexpression des facteurs de croissances et la diminution de la périostine qui a pour conséquence l'annihilation de la capacité à maintenir l'intégrité des cellules et d'augmenter la sévérité et l'étendue de la maladie (Padial-Molina *et al.*, 2013; Vaillancourt-jean, 2012). Cependant il existe des différences d'expression notables parmi les lignées en ce qui concerne l'expression génique de VEGF, FGF et EGF et PDGF marqueurs angiogéniques qui coordonnent la formation de nouveaux vaisseaux sanguins et dont le ciblage thérapeutique pourrait représenter une approche potentielle pour le traitement de ces tumeurs (Reardon et Wen, 2006). Ces marqueurs sont connus pour être fréquemment surexprimés ou mutés dans les gliomes (Lee *et al.*, 2006). De même, pour l'expression protéique, l'environnement inflammatoire initié par le TNF- α ne provoque pas le même effet chez les biomarqueurs étudiés dans nos différents GBM et en raison d'une telle variabilité, on comprend qu'il soit très

difficile d'établir une stratégie de traitement à la fois complète, standardisée et adaptée à chaque patient.

Cela nous confirme également que les GBM sont très hétérogènes et les cellules qui les composent ont un très grand nombre de phénotypes différents et réagissent face à l'inflammation en utilisant des voies de signalisation différentes et adaptatives. Le potentiel cancéreux de la tumeur n'est pas restreint à une seule et population clonale de cellules au sein de la tumeur; de plus en plus de tumeurs sont rapportées comme contenant des «cellules souches cancéreuses » (cancer stem cells ou CSCs) définies en référence aux propriétés que partagent ces cellules tumorales avec les cellules souches normales. Ces cellules ne représenteraient qu'un faible pourcentage de la masse tumorale, mais seraient responsables de nombreuses rechutes de cancer (Reya *et al.*, 2001). L'existence de ces cellules dans la tumeur peut jouer également un rôle dans la réaction de la tumeur face à l'inflammation et pourrait expliquer les différents comportements des GBM face à leur microenvironnement. Toutefois, dans notre cas expérimental, les lignées cancéreuses étudiées ne contiennent pas de CSCs et ce n'est donc pas la cause des différences d'expressions de biomarqueurs géniques et protéiques relevées. Cette différence serait plutôt le reflet des multiples mutations génétiques des cellules cancéreuses.

Cette caractérisation nous a également permis de confirmer que l'inflammation provoquée par le TNF- α avait la capacité d'augmenter le pouvoir invasif de nos 7 lignées de glioblastomes selon une intensité graduative. La cytokine TNF- α qui est impliquée généralement dans le maintien et l'homéostasie du système immunitaire, de l'inflammation et dans la défense de l'hôte possède un côté plus obscur qui l'implique dans les processus pathologiques tels que l'inflammation chronique, l'auto-immunité et, en contradiction avec son nom, la maladie maligne (Balkwill,

2006). En effet, le TNF- α est un des principaux médiateurs chimiques associé à l'inflammation impliquée dans le cancer et il existe des preuves substantielles que le TNF- α soit impliqué dans la promotion et la progression des cancers expérimentaux et humains, les voies conduisant à l'activation des complexes de facteur de transcription NF- κ B et AP-1 étant des liaisons intracellulaires clés (Balkwill, 2002; Wu et Zhou, 2010). Les sept GBM de notre étude réagissent tous au TNF- α par une augmentation de leur capacité migratoire suivant une corrélation quasi linéaire. Nous sommes parvenus à réaliser un classement croissant de la capacité migratoire de nos lignées dans les conditions basales et inflammatoires. En condition basale le classement des lignées selon leur capacité migratoire est le suivant : **A-172 < U-138 < T-98 < U-87 < Hs-683 < U-251 < U-118**. Lorsque nos cellules sont stimulées au TNF- α dans leur microenvironnement, le classement est le suivant : **U-138 < Hs-683 < T-98 < U-87 < U-251 < A-172 < U-118**. Ces classements restent semblables mis à part la lignée A-172 qui en condition basale est la dernière du classement, mais lorsque celle-ci est stimulée au TNF- α , elle devient la deuxième lignée la plus invasive du classement. L'influence du TNF- α , est plus forte pour la lignée cancéreuse A-172 que pour les autres lignées, manifeste l'importance du microenvironnement dans le développement de la tumeur et met en évidence le rôle indéniable du microenvironnement inflammatoire de la tumeur. On peut se questionner de la raison pour laquelle la lignée A-172 réagit plus fortement que les autres lignées cellulaires face au TNF- α au niveau de son pouvoir invasif. Lorsqu'on regarde plus en détail l'effet du TNF- α sur l'expression de nos biomarqueurs étudiés, nous remarquons que le TNF- α augmente très fortement l'expression de MMP-9 et de CSF-2 (plus de 20 fois la condition contrôle) et on pourrait penser que c'est la raison pour laquelle cette lignée est plus sensible au TNF- α que les autres. Toutefois, nous observons également chez les lignées U-251, U-138, U-118 et T-98 une augmentation similaire des mêmes biomarqueurs sans que cela modifie leur

sensibilité au TNF- α , cela n'est donc pas la raison de l'effet pro-invasif du TNF- α sur la lignée A-172. La raison qui expliquerait pourquoi la lignée A-172 est plus sensible à son microenvironnement pourrait être due aux mutations génétiques opérées sur cette lignée. Le microenvironnement joue en effet un rôle dans l'acquisition de propriétés des GBM leur permettant d'acquérir ou de préserver leur multipotence et leur capacité d'auto-renouvellement et de prolifération (Soeda *et al.*, 2009). Il est certain qu'une cellule cancéreuse, pour être tumorigénique, ne présente pas un ensemble de caractéristiques intrinsèques mais ne soit aussi fortement soumise au microenvironnement (Godard, 2013). Bien comprendre son rôle tumorigène est important pour mieux appréhender la tumeur dans son ensemble. Comprendre les mécanismes sous-jacents aux métastases à médiation par l'inflammation révélera de nouvelles cibles thérapeutiques pour la prévention et le traitement du cancer.

5.2 Potentiel anti-inflammatoire des cinq molécules phytochimiques dans la progression des glioblastomes

Au cours de notre étude, nous avons constaté que les molécules phytochimiques issues d'aliments connues pour leurs bienfaits sur la santé, avaient la capacité de réduire ou d'inverser l'expression génique de marqueurs stimulés par une inflammation par le TNF- α chez les différentes lignées de glioblastomes. Néanmoins, ces composés phytochimiques ne procurent pas le même effet chez ces lignées. En effet dans les quatre lignées de glioblastomes U-87, U-138, Hs-683 et U-118, l'hydroxytyrosol par exemple, ne permet de renverser aucune des stimulations provoquées par l'inflammation chez les U-87. Chez les U-138 et les Hs-683, cette molécule ne renverse que l'expression de la périostine, et chez les U-118,

l'hydroxytyrosol permet de renverser l'expression de COX-2, périostine, VEGF et FGF. Au niveau protéique nous remarquons également que l'hydroxytyrosol ne réagit pas de la même manière face à l'Inflammation chez nos lignées cellulaires et cela est de même pour l'effet des autres composés phytochimiques expérimentés sur nos lignées. Dépendamment de la lignée, les molécules phytochimiques répondent plus ou moins bien. Comme constaté durant nos expérimentations, la lignée U-118 est celle qui réagit le plus aux molécules phytochimiques. Ceux qui ont plus la capacité de renverser les effets provoqués par l'inflammation que pour la lignée U-87 par exemple. Ces différentes influences des molécules phytochimiques face aux différents glioblastomes peuvent s'expliquer par l'hétérogénéité cellulaire et moléculaire des glioblastomes et soutient l'intérêt de mettre en place une médecine plus personnalisée pour chaque patient, et ce même au niveau préventif, afin de proposer des thérapies plus ciblées comme par exemple pour éviter les récurrences : la prévention serait plus individualisée puisque la personne est surveillée dans le cadre de la pathologie dont elle souffre. Nos résultats nous permettent également d'envisager l'idée d'une prévention individuelle permettant à chaque individu d'adapter ses comportements alimentaires en fonction de ses forces, de ses faiblesses et de son environnement.

Nous avons également mis en évidence la capacité des molécules phytochimiques à réduire le pouvoir invasif des glioblastomes stimulés par le TNF- α . Chez nos quatre lignées cancéreuses, les traitements à base de molécules phytochimiques ont inhibé leur pouvoir métastatique selon une efficacité plus ou moins modulée. Un classement décroissant du pouvoir inhibiteur des composés phytochimiques sur la migration métastatique de chaque lignée a été réalisé, et nous avons pu remarquer que la molécule extraite du thé vert l'EGCG, était parmi les meilleurs molécules au pouvoir inhibiteur le plus important et cela dans toutes les lignées. L'EGCG étant

déjà documenté pour sa capacité à inhiber l'invasion métastatique cancéreuse (Annabi *et al.*, 2005), se révèle être la molécule la plus puissante des composés phytochimiques expérimentés chez les GBM. En effet, cette molécule a pour propriété de prohiber l'action des métalloprotéinases MMP-2 et MMP-9 dans les cellules cancéreuses et les cellules endothéliales. Malheureusement, nous n'avons pas pu mettre en évidence l'inhibition des MMPs par l'EGCG en vérifiant son expression génique ou protéique. Le fait que l'EGCG puisse inhiber toutes les lignées de glioblastome lors de l'inflammation suggère que celle-ci agit sur des mécanismes communs des GBM. De plus, l'EGCG est également dans le top deux des de composés phytochimiques testés ayant le plus le pouvoir d'inhiber la migration cellulaire à l'état basale chez toutes nos lignées étudiées. Ces résultats nous confortent avec l'idée des propriétés bénéfiques de L'EGCG sur l'incapacité des tumeurs à créer des métastases et qu'un traitement à base de cette molécule serait bénéfique pour tous les patients ayant un glioblastome. Toutefois, les autres composés phytochimiques ont également la capacité de réduire la capacité migratoire des GBM d'une efficacité plus ou moins importante dépendamment de la lignée traitée. En effet, nous avons pu remarquer que lorsque toutes les lignées sont stimulées au TNF- α , l'hydroxytyrosol, la molécule phytochimique majoritairement présente dans l'huile d'olive et connue pour ses puissantes actions anti-inflammatoires, antibactériennes et antioxydantes (Fabiani *et al.*, 2002), est celle qui inhibe le plus la capacité migratoire chez les lignées U-87 et Hs-683, mais face aux lignées U-138 et U-118, cette molécule est celle qui a le pouvoir inhibiteur le plus faible. L'épice étudiée n'y échappe pas non plus. en effet, le curcuma dont les vertus sont appréciées pour ses effets bénéfiques contre le cancer en bloquant spécifiquement des régulateurs clé de la réponse inflammatoire (Béliveau et Gingras, 2014) ne réalise pas la même qualité d'inhibition chez nos lignées étudiées. Notre étude nous a renseigné que le curcumin est le composé phytochimique qui

permet le plus d'inhiber la capacité migratoire de la lignée U-138 stimulée au TNF- α , or pour les lignées U-118, U-87 et Hs-683. Ce composé phytochimique est classé dans les derniers en terme d'efficacité pour inhiber la migration cancéreuse de celles-ci. Ces différences d'inhibition des composés phytochimiques sur le pouvoir invasif que procure le TNF- α chez les GBM reflètent la diversité de comportement des GBM et donc de la variété de mutations que possèdent ces types de tumeurs. Malgré le potentiel antitumoral et antiprolifératif observé chez les 5 composés phytochimique étudiés, nous avons pu mettre en lumière que leurs effets étaient plus ou moins efficaces dépendamment de la lignée étudiée. Cela nous conforte d'autant plus dans l'idée qu'il soit nécessaire de modifier la façon de combattre ce genre de cancer et d'envisager des moyens de prévention plus personnalisés, adaptés à chaque patient, selon ce qui est le plus efficace pour lui.

CHAPITRE VI

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les glioblastomes font l'objet de recherches minutieuses dont le but primordial sont d'éclaircir les mécanismes oncogéniques mis en jeu, et ce, pour proposer des thérapies plus ciblées et personnalisées pour chaque individu. Du fait de la complexité de la pathologie, de la gravité de son pronostic et de l'hétérogénéité des populations cellulaires au sein d'une même tumeur, les défis lancés pour combattre ce cancer ne sont pas des moindres. De plus, le risque de récurrence des GBM est extrêmement élevé et la progression de ces tumeurs infiltrantes est quasiment inévitable chez la majorité des patients. Bien que l'association de la chirurgie, de la radiothérapie et de la chimiothérapie ait permis d'augmenter la survie associée au glioblastome, sa guérison demeure toujours hors de portée. Les dernières recherches s'investissent, de ce fait, davantage dans des stratégies basées sur la prévention et l'intervention en amont de la maladie, tout en maintenant l'amélioration et l'exploration d'éventuelles pistes thérapeutiques. La prévention par un contrôle de l'hygiène de vie notamment par le recours à une alimentation saine et équilibrée, constituent des pistes intéressantes et ouvrent des horizons prometteurs dans le but d'inhiber le développement de certains cancers.

Les principaux résultats qualitatifs de notre recherche mettent en évidence la caractérisation de la réaction de sept lignées de glioblastomes lors d'une inflammation provoquée avec du TNF- α face à l'expression de biomarqueurs au

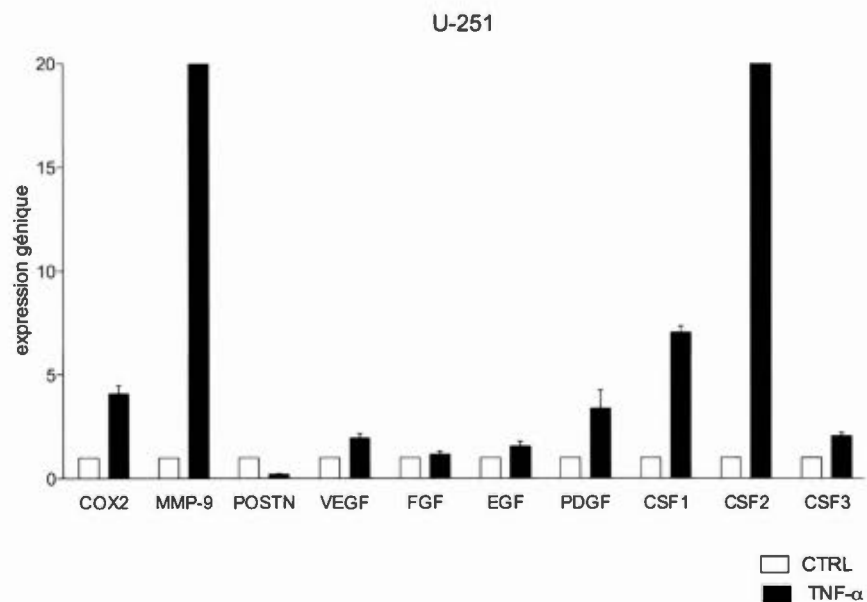
niveau génique et protéique et face à leur capacité invasive. Nous avons constaté l'importance du microenvironnement dans le développement de la tumeur et mis en lumière le rôle indéniable du microenvironnement inflammatoire de la tumeur sur celle-ci. Il existe des similarités et des différences d'expression génique et protéique au sein des sept lignées cancéreuses étudiées, face à l'inflammation provoquée par le TNF- α . En effet, les lignées cancéreuses étudiées ne présentent pas un ensemble de caractéristiques communes pour tous les biomarqueurs étudiés et sont fortement soumises à leur milieu de vie. Il semble crucial que d'avantages d'études soient réalisées en croisant plusieurs de ces marqueurs pour pouvoir identifier une population de glioblastome spécifique. Il est également nécessaire d'identifier des différentes classes de GBM et de comprendre leur rôle au sein de la tumeur. D'avantages d'analyses génétiques sont requises parallèlement aux analyses phénotypiques pour mieux caractériser ces cellules. Nous avons également constaté que l'inflammation tumorale provoque une augmentation de la capacité invasive de tous les glioblastomes et que tous les composés phytochimiques ont la capacité de réduire cette capacité stimulée par le TNF- α mais selon une efficacité plus ou moins importante selon la lignée. Toutefois, la molécule phytochimique extraite du thé vert, l'EGCG, est celle qui a la capacité à réduire le plus le pouvoir migratoire induit par le TNF- α et cela dans toutes les lignées cancéreuses. Cela nous conforte dans l'idée des propriétés bénéfiques de l'EGCG sur sa capacité à réduire la métastase et qu'un traitement à base de cette molécule serait bénéfique pour tous les patients ayant un glioblastome.

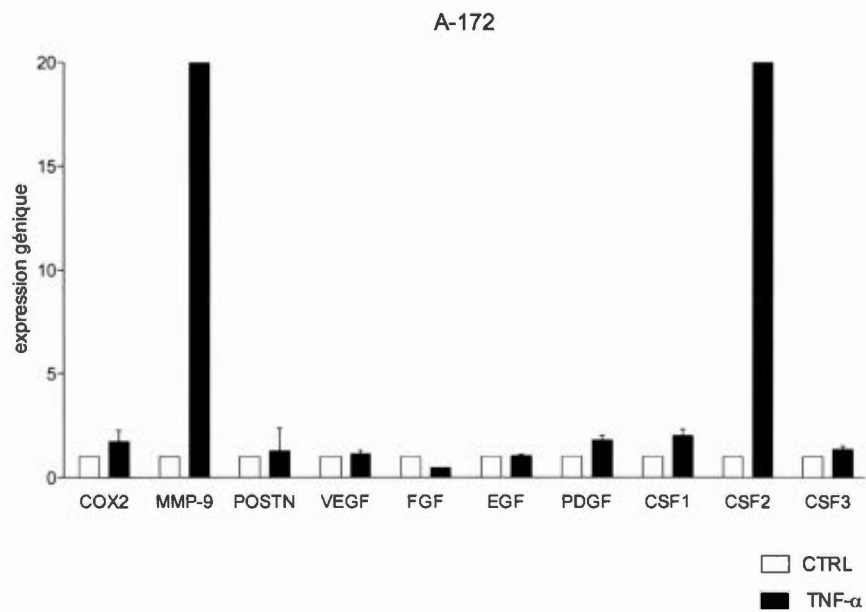
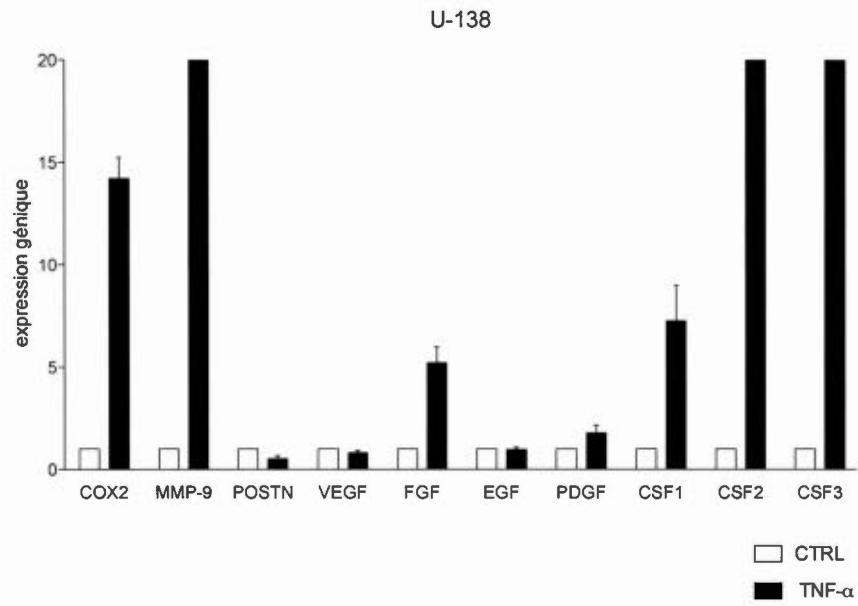
Nos résultats montrent que les molécules phytochimiques issues d'aliments connus pour leurs bienfaits sur la santé, ont la capacité à réduire ou à inverser l'expression génique de marqueurs stimulés par une inflammation induite par le TNF- α chez les différentes lignées de glioblastomes, mais ne procurent pas le même effet chez ces

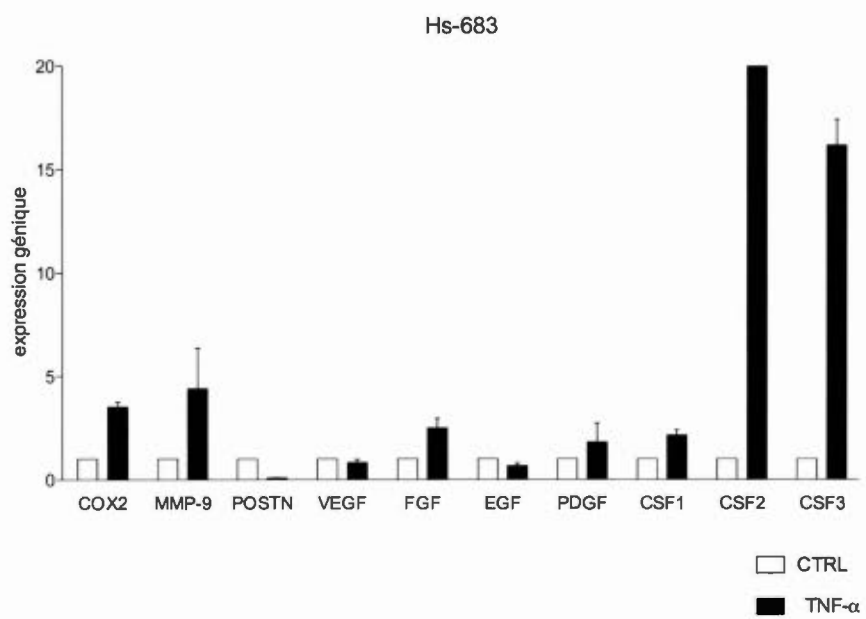
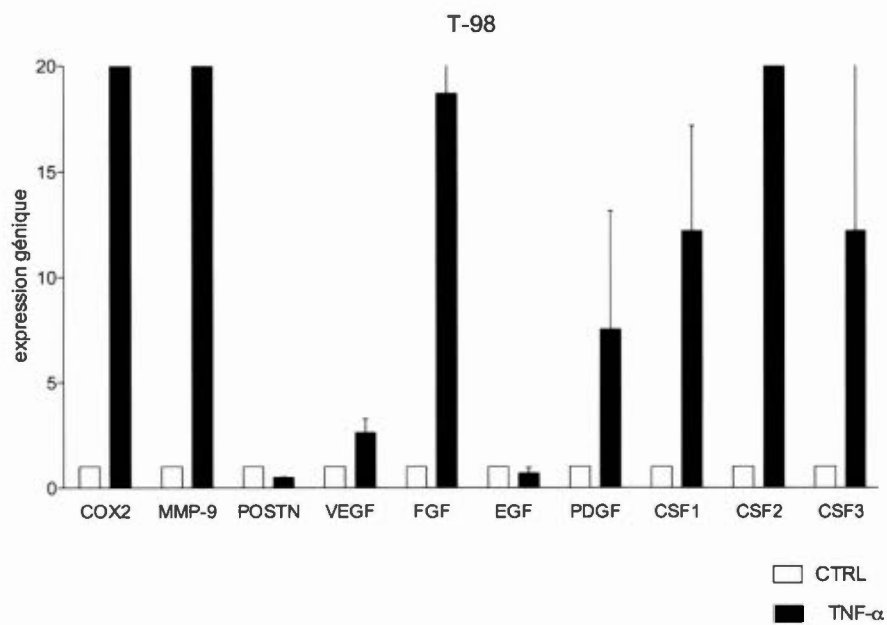
lignées. De ce fait, la vision orientée vers une prévention basée sur le contrôle de l'hygiène de vie notamment par une thérapie préventive personnalisée par les aliments, semble la plus judicieuse. L'approche préventive est, de toutes les approches, celle qui gagne à être envisagée particulièrement si on sait que cette dernière s'articule principalement sur le simple recours à une alimentation saine. Une telle approche est doublement justifiée d'une part parce qu'elle permet d'agir en amont de la maladie, ce qui limite l'impact de cette dernière, et d'autre part parce qu'elle garantit l'absence d'effets secondaires, ce qui peut être immédiatement vérifié puisqu'il s'agit de recours à des molécules naturelles.

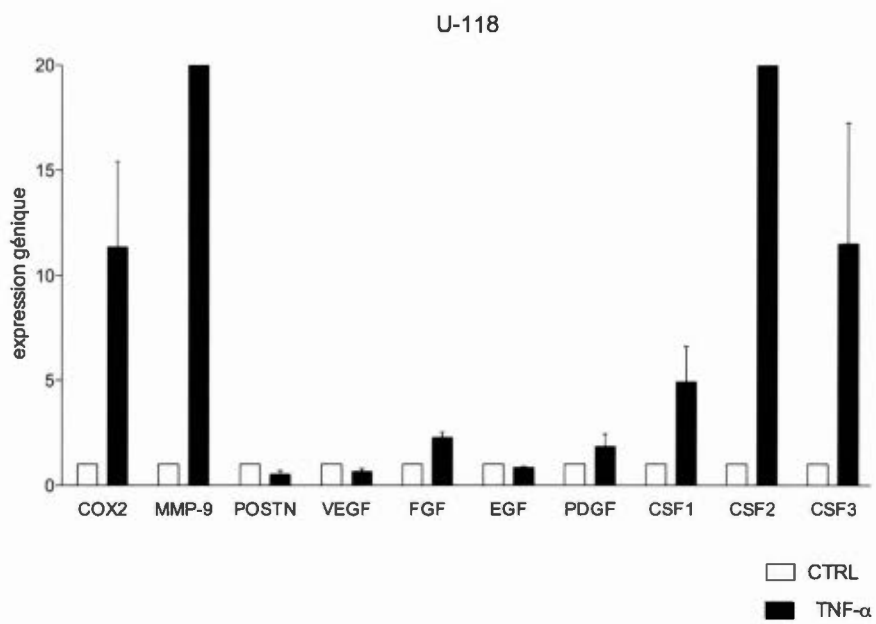
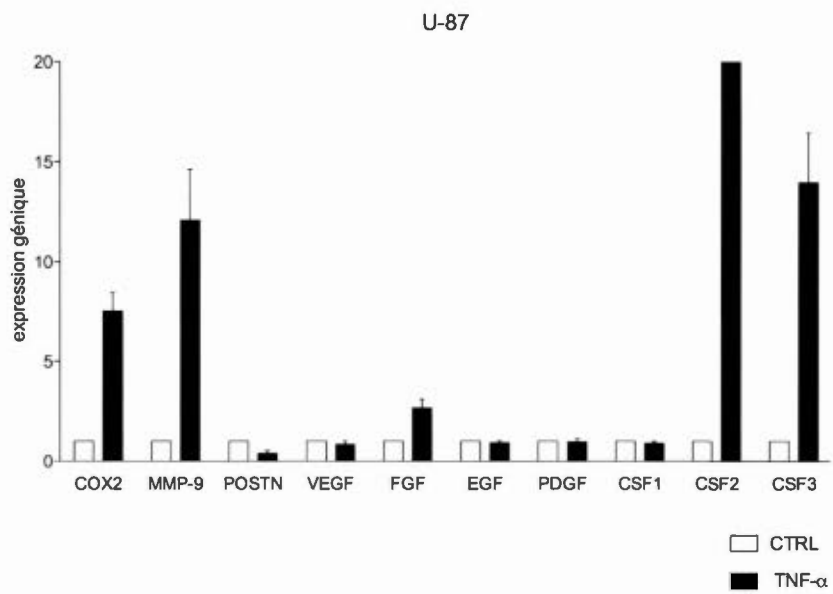
ANNEXES

Annexe A : Graphiques représentatifs de l'expression génique de 10 biomarqueurs d'intérêt chez les 7 GBMs face à une stimulation proinflammatoire. Les cellules sont cultivées pendant 48 h, puis sevrées 24 h dans un milieu traité au TNF- α (100 ng/ml). L'expérience est conclue par une RT-PCR puis d'une q-PCR. Les résultats obtenus, illustrés dans ces différents graphiques montrent la variation de l'expression génique des marqueurs d'intérêts stimulés au TNF- α en comparaison de la condition contrôle sans traitement au TNF- α . Les résultats présentés sont issus de 4 expériences indépendantes et présentées comme moyennes avec leur écart moyen afin de mesurer la dispersion des données. Les variations observées ont été regroupées sous forme de tableau pour avoir un meilleur vu d'ensemble et faciliter l'interprétation des résultats (voir **tableau 4.1**).

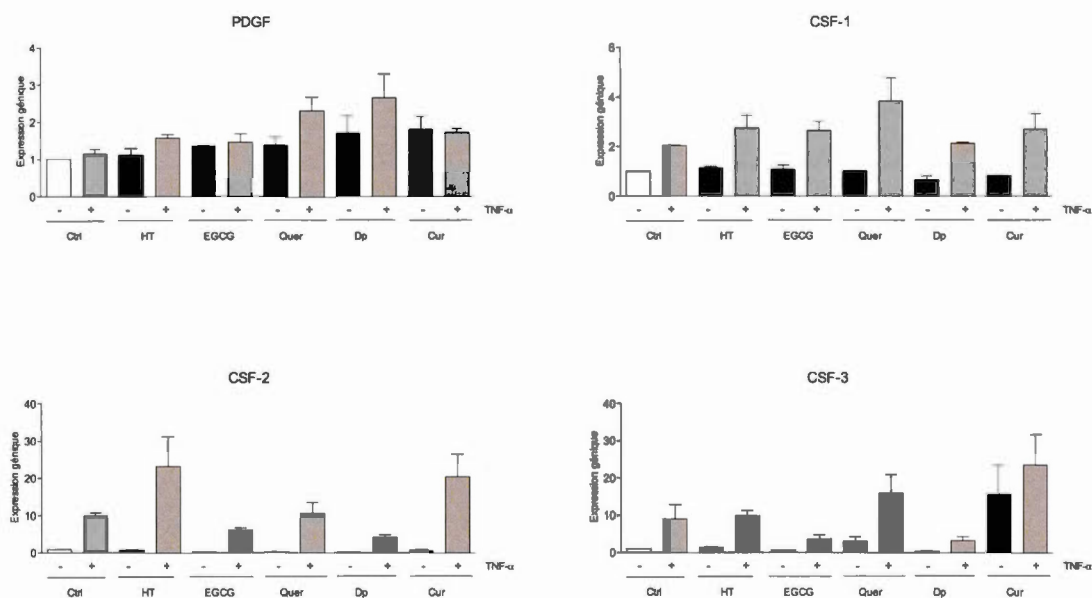


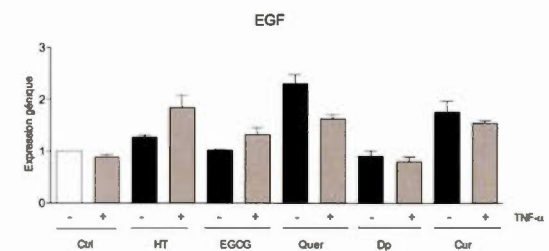
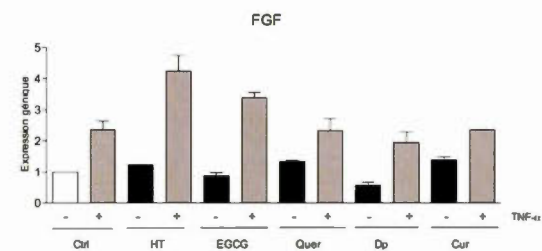
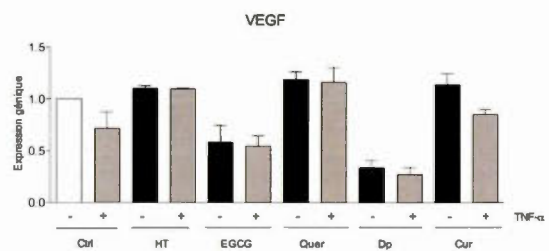
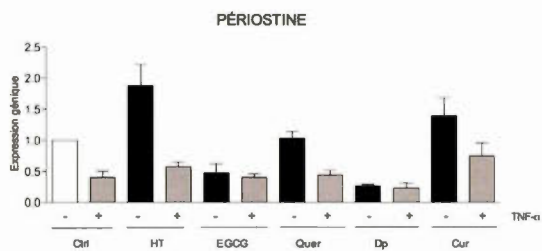
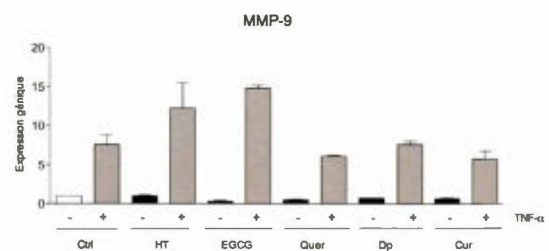
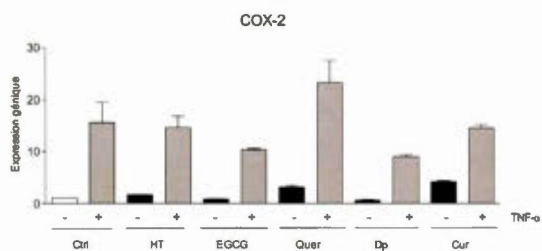




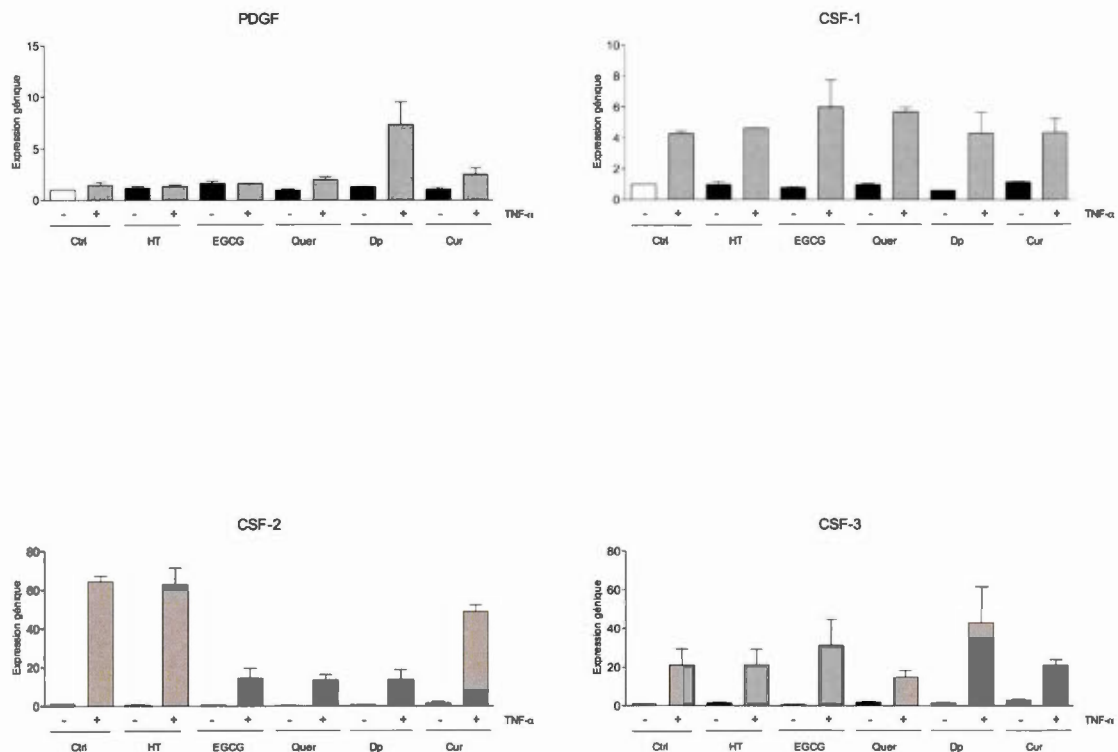


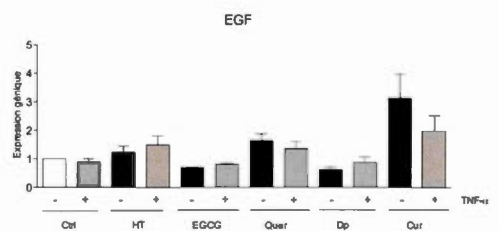
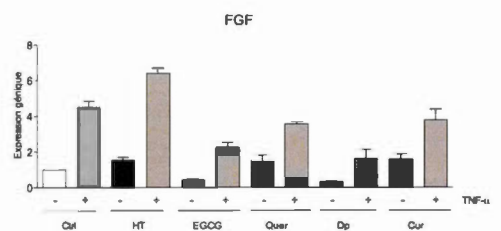
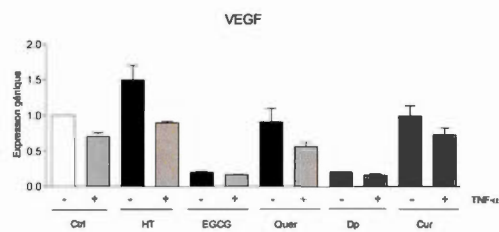
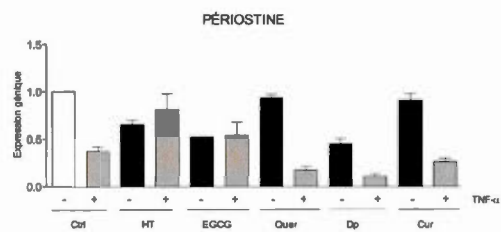
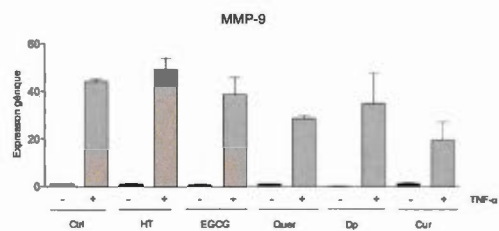
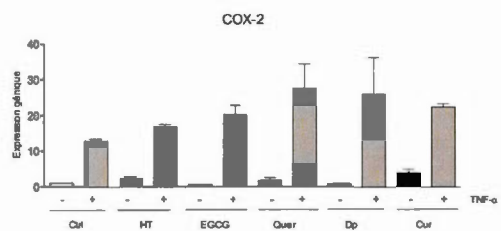
Annexe B : Expression génique des biomarqueurs d'intérêt dans la lignée cellulaire U-118 stimulée par le TNF- α et avec traitement à base des molécules phytochimiques. Les cellules U-118 sont cultivées pendant 48 h, puis sevrées 24 h dans un milieu traité au TNF- α (100 ng/ml) et aux différentes molécules phytochimiques à une concentration de 25 μ M. L'expérience est conclue par une RT-PCR puis d'une q-PCR. Les résultats obtenus, illustrés dans ces différents graphiques montrent la variation de l'expression génique des marqueurs d'intérêts stimulés au TNF- α avec les molécules phytochimique en comparaison de la condition contrôle sans traitement au TNF- α . Les résultats présentés sont issus de 2 expériences indépendantes et présentées comme moyennes avec leur écarts moyens afin de mesurer la dispersion des données.



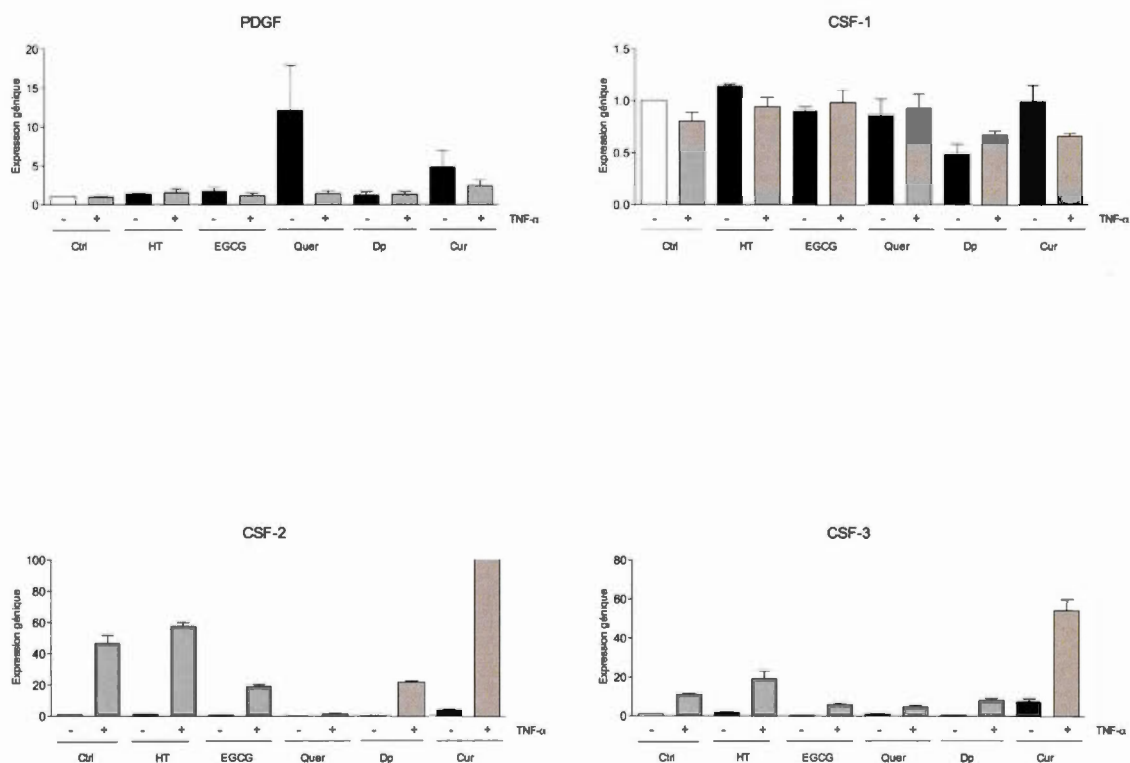


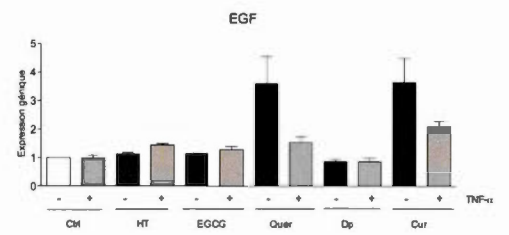
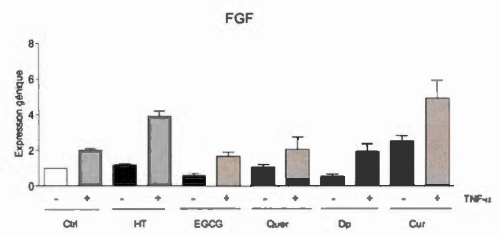
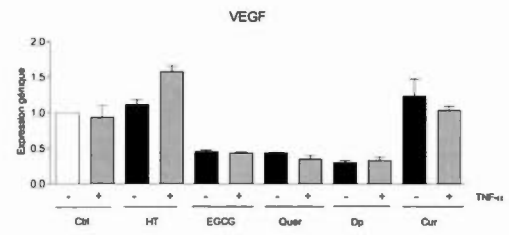
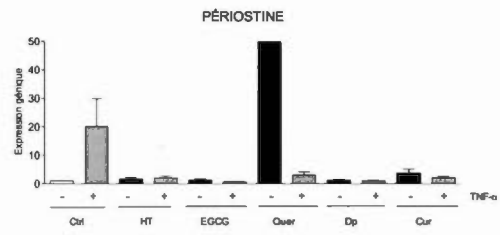
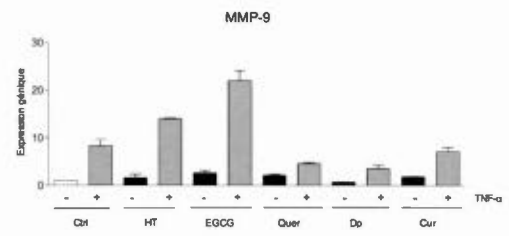
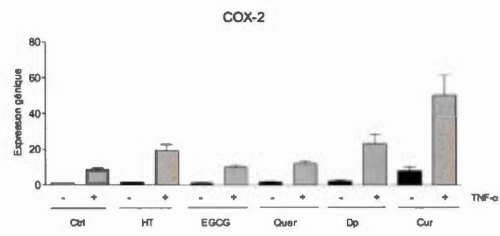
Annexe C : Expression génique des biomarqueurs d'intérêt dans la lignée cellulaire U-138 stimulée par le TNF- α et avec traitement à base des molécules phytochimiques. Les cellules de la lignée U-138 sont cultivées pendant 48 h, puis sevrées 24 h dans un milieu traité au TNF- α (100 ng/ml) et aux différentes molécules phytochimiques à une concentration de 25 μ M. L'expérience est conclue par une RT-PCR puis d'une q-PCR. Les résultats obtenus, illustrés dans ces différents graphiques montrent la variation de l'expression génique des marqueurs d'intérêts stimulés au TNF- α avec les molécules phytochimique en comparaison de la condition contrôle sans traitement au TNF- α . Les résultats présentés sont issus de 2 expériences indépendantes et présentées comme moyennes avec leur écart moyen afin de mesurer la dispersion des données.



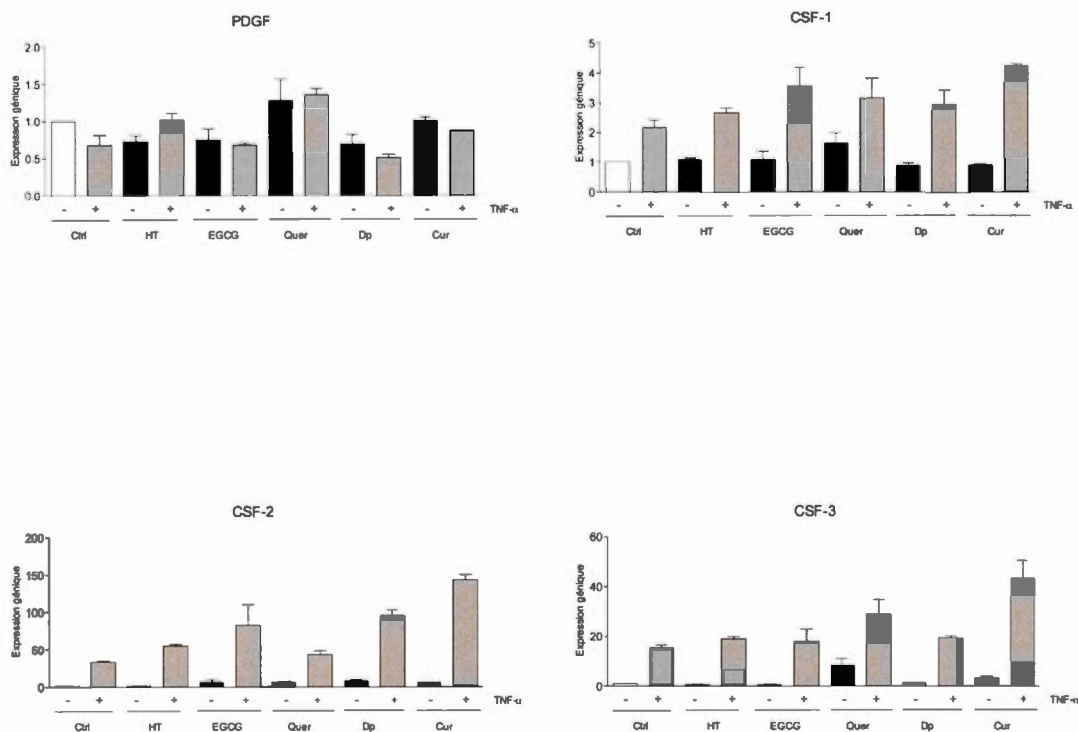


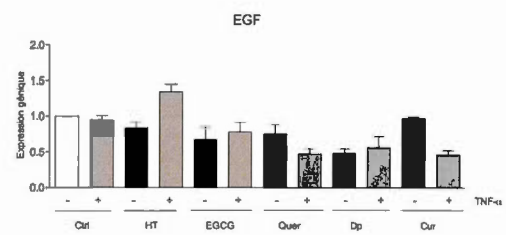
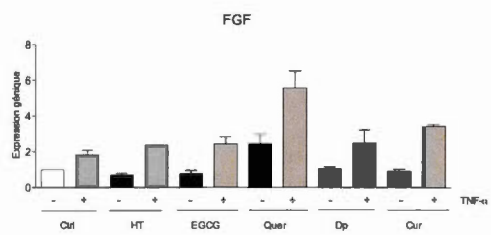
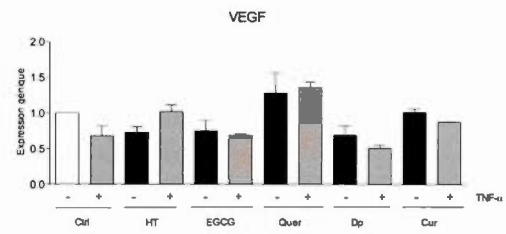
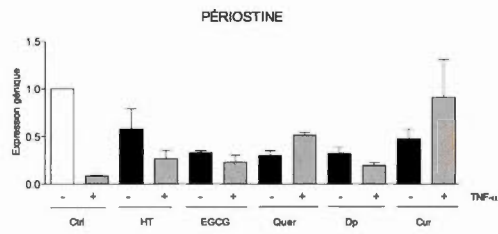
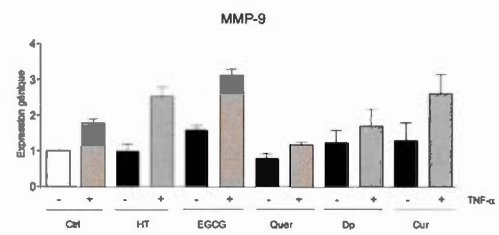
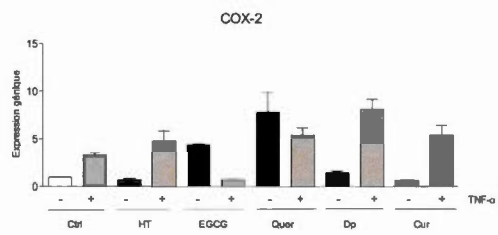
Annexe D : Expression génique des biomarqueurs d'intérêt dans la lignée cellulaire U-87 stimulée par le TNF- α et avec traitement à base des molécules phytochimiques. Les U-87 sont cultivées pendant 48 h, puis sevrées 24 h dans un milieu traité au TNF- α (100 ng/ml) et aux différentes molécules phytochimiques à une concentration de 25 μ M. L'expérience est conclue par une RT-PCR puis d'une q-PCR. Les résultats obtenus, illustrés dans ces différents graphiques montrent la variation de l'expression génique des marqueurs d'intérêts stimulés au TNF- α avec les molécules phytochimique en comparaison de la condition contrôle sans traitement au TNF- α . Les résultats présentés sont issus de 2 expériences indépendantes et présentées comme moyennes avec leur écarts moyens afin de mesurer la dispersion des données.





Annexe E : Expression génique des biomarqueurs d'intérêt dans la lignée cellulaire Hs-683 stimulée par le TNF- α et avec traitement à base des molécules phytochimiques. Les cellules Hs-683 sont cultivées pendant 48 h, puis sevrées 24 h dans un milieu traité au TNF- α (100 ng/ml) et aux différentes molécules phytochimiques à une concentration de 25 μ M. L'expérience est conclue par une RT-PCR puis d'une q-PCR. Les résultats obtenus, illustrés dans ces différents graphiques montrent la variation de l'expression génique des marqueurs d'intérêts stimulés au TNF- α avec les molécules phytochimique en comparaison de la condition contrôle sans traitement au TNF- α . Les résultats présentés sont issus de 2 expériences indépendantes et présentées comme moyennes avec leur écarts moyens afin de mesurer la dispersion des données.





BIBLIOGRAPHIE

- Abrahams, E. et Silver, M. (2009). The Case for Personalized Medicine. *J Diabetes Sci Technol*, 3(4), 680-684.
- Afaq, F., Syed, D.N., Malik, A., Hadi, N., Sarfaraz, S., Kweon, M.H., Khan, N., Zaid, M.A. et Mukhtar, H. (2007). Delphinidin, an anthocyanidin in pigmented fruits and vegetables, protects human HaCaT keratinocytes and mouse skin against UVB-mediated oxidative stress and apoptosis. *J Invest Dermatol*, 127(1), 222-232. doi: 10.1038/sj.jid.5700510
- Aggarwal, B.B. et Gehlot, P. (2009). Inflammation and cancer: how friendly is the relationship for cancer patients? *Curr Opin Pharmacol*, 9(4), 351-369. doi: 10.1016/j.coph.2009.06.020
- Aggarwal, B.B., Gupta, S.C. et Kim, J.H. (2012). Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: 25 years later, a golden journey. *Blood*, 119(3), 651-665. doi: 10.1182/blood-2011-04-325225
- Aggarwal, B.B. et Shishodia, S. (2006). Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer. *Biochem Pharmacol*, 71(10), 1397-1421. doi: 10.1016/j.bcp.2006.02.009
- Andrew, K., Vinod, S. et Mahesh, C.S. (2009). Inflammation, Microenvironment, and the Immune System in Cancer Progression. *Current Pharmaceutical Design*, 15(17), 1949-1955. doi: <http://dx.doi.org/10.2174/138161209788453167>
- Annabi, B., Bouzeghrane, M., Moumdjian, R., Moghrabi, A. et Beliveau, R. (2005). Probing the infiltrating character of brain tumors: inhibition of RhoA/ROK-mediated CD44 cell surface shedding from glioma cells by the green tea catechin EGCg. *J Neurochem*, 94(4), 906-916. doi: 10.1111/j.1471-4159.2005.03256.x
- Annabi, B., Currie, J.C., Moghrabi, A. et Beliveau, R. (2007). Inhibition of HuR and MMP-9 expression in macrophage-differentiated HL-60 myeloid leukemia

- cells by green tea polyphenol EGCg. *Leuk Res*, 31(9), 1277-1284. doi: 10.1016/j.leukres.2006.10.001
- Araujo, C.C. et Leon, L.L. (2001). Biological activities of *Curcuma longa* L. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 96(5), 723-728.
- Asano, Y., Okamura, S., Ogo, T., Eto, T., Otsuka, T. et Niho, Y. (1997). Effect of (-)-epigallocatechin gallate on leukemic blast cells from patients with acute myeloblastic leukemia. *Life Sci*, 60(2), 135-142.
- Asif, M. (2012). Phytochemical study of polyphenols in *Perilla Frutescens* as an antioxidant. *Avicenna J Phytomed*, 2(4), 169-178.
- Astill, C., Birch, M.R., Dacombe, C., Humphrey, P.G. et Martin, P.T. (2001). Factors Affecting the Caffeine and Polyphenol Contents of Black and Green Tea Infusions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(11), 5340-5347. doi: 10.1021/jf010759+
- Auladell, C., de Lemos, L., Verdaguer, E., Ettcheto, M., Busquets, O., Lazarowski, A., Beas-Zarate, C., Olloquequi, J., Folch, J. et Camins, A. (2017). Role of JNK isoforms in the kainic acid experimental model of epilepsy and neurodegeneration. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 22, 795-814.
- Badger, A.M., Cook, M.N., Lark, M.W., Newman-Tarr, T.M., Swift, B.A., Nelson, A.H., Barone, F.C. et Kumar, S. (1998). SB 203580 inhibits p38 mitogen-activated protein kinase, nitric oxide production, and inducible nitric oxide synthase in bovine cartilage-derived chondrocytes. *J Immunol*, 161(1), 467-473.
- Bagchi, D., Sen, C.K., Bagchi, M. et Atalay, M. (2004). Anti-angiogenic, antioxidant, and anti-carcinogenic properties of a novel anthocyanin-rich berry extract formula. *Biochemistry (Mosc)*, 69(1), 75-80, 71 p preceding 75.
- Baldi, I., Huchet, A., Bauchet, L. et Loiseau, H. (2010). [Epidemiology of glioblastoma]. *Neurochirurgie*, 56(6), 433-440. doi: 10.1016/j.neuchi.2010.07.011
- Balkwill, F. (2002). Tumor necrosis factor or tumor promoting factor? *Cytokine Growth Factor Rev*, 13(2), 135-141.

- Balkwill, F. (2006). TNF-alpha in promotion and progression of cancer. *Cancer Metastasis Rev*, 25(3), 409-416. doi: 10.1007/s10555-006-9005-3
- Belgore, F., Blann, A., Neil, D., Ahmed, A.S. et Lip, G.Y. (2004). Localisation of members of the vascular endothelial growth factor (VEGF) family and their receptors in human atherosclerotic arteries. *J Clin Pathol*, 57(3), 266-272.
- Beliveau, R. et Gingras, D. (2007). Role of nutrition in preventing cancer. *Can Fam Physician*, 53(11), 1905-1911.
- Béliveau, R. et Gingras, D. (2006). *Cuisiner avec les aliments contre le cancer*. (Trécarré éd.).
- Béliveau, R. et Gingras, D. (2014). *Prévenir le cancer : Comment réduire les risques*. (Trécarré éd.).
- Belkaid, A., Fortier, S., Cao, J. et Annabi, B. (2007). Necrosis induction in glioblastoma cells reveals a new "bioswitch" function for the MT1-MMP/G6PT signaling axis in proMMP-2 activation versus cell death decision. *Neoplasia*, 9(4), 332-340.
- Biau, J., Dalloz, P., Durando, X., Hager, M.O., Ouédraogo, Z.G., Khalil, T., Lemaire, J.J., Chautard, E. et Verrelle, P. (2015). Elderly patients with glioblastoma: State of the art. [Article]. *Bulletin du Cancer*, 102(3), 277-286. doi: 10.1016/j.bulcan.2015.02.002
- Birt, D.F., Hendrich, S. et Wang, W. (2001). Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids. *Pharmacol Ther*, 90(2-3), 157-177.
- Bomser, J., Madhavi, D.L., Singletary, K. et Smith, M.A. (1996). In vitro anticancer activity of fruit extracts from *Vaccinium* species. *Planta Med*, 62(3), 212-216. doi: 10.1055/s-2006-957862
- Boots, A.W., Haenen, G.R. et Bast, A. (2008). Health effects of quercetin: from antioxidant to nutraceutical. *Eur J Pharmacol*, 585(2-3), 325-337. doi: 10.1016/j.ejphar.2008.03.008
- Brasileiro de Aguiar, G., Campos Paiva, A.L., Veiga, J.C.E., Badke, G.L. et Panagopoulos, A.T. (2014). *Brain metastasis from primary peritoneal carcinoma*. (Revista Chilena de Neurocirugía) (Vol. 40).

- Brenner, M. et Hearing, V.J. (2008). The protective role of melanin against UV damage in human skin. *Photochem Photobiol*, 84(3), 539-549. doi: 10.1111/j.1751-1097.2007.00226.x
- Buscà, R., Pouysségur, J. et Lenormand, P. (2016). ERK1 and ERK2 Map Kinases: Specific Roles or Functional Redundancy? *Front Cell Dev Biol*, 4. doi: 10.3389/fcell.2016.00053
- Butts, C., Kamel-Reid, S., Batist, G., Chia, S., Blanke, C., Moore, M., Sawyer, M.B., Desjardins, C., Dubois, A., Pun, J., Bonter, K. et Ashbury, F.D. (2013). Benefits, issues, and recommendations for personalized medicine in oncology in Canada. *Curr Oncol*, 20(5), e475-483. doi: 10.3747/co.20.1253
- Byrne, A.M., Bouchier-Hayes, D.J. et Harmey, J.H. (2005). Angiogenic and cell survival functions of vascular endothelial growth factor (VEGF). *J Cell Mol Med*, 9(4), 777-794.
- Carmeliet, P. et Jain, R.K. (2011). Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature*, 473(7347), 298-307. doi: 10.1038/nature10144
- Cerella, C., Sobolewski, C., Dicato, M. et Diederich, M. (2010). Targeting COX-2 expression by natural compounds: a promising alternative strategy to synthetic COX-2 inhibitors for cancer chemoprevention and therapy. *Biochem Pharmacol*, 80(12), 1801-1815. doi: 10.1016/j.bcp.2010.06.050
- Charoenprasert, S. et Mitchell, A. (2012). Factors influencing phenolic compounds in table olives (*Olea europaea*). *J Agric Food Chem*, 60(29), 7081-7095. doi: 10.1021/jf3017699
- Chatterjee, A., Saluja, M., Agarwal, G. et Alam, M. (2012). Green tea: A boon for periodontal and general health. *J Indian Soc Periodontol*, 16(2), 161-167. doi: 10.4103/0972-124x.99256
- Cheng, A.L., Hsu, C.H., Lin, J.K., Hsu, M.M., Ho, Y.F., Shen, T.S., Ko, J.Y., Lin, J.T., Lin, B.R., Ming-Shiang, W., Yu, H.S., Jee, S.H., Chen, G.S., Chen, T.M., Chen, C.A., Lai, M.K., Pu, Y.S., Pan, M.H., Wang, Y.J., Tsai, C.C. et Hsieh, C.Y. (2001). Phase I clinical trial of curcumin, a chemopreventive agent, in patients with high-risk or pre-malignant lesions. *Anticancer Res*, 21(4b), 2895-2900.

- Cheng, I., Liu, X., Plummer, S.J., Krumroy, L.M., Casey, G. et Witte, J.S. (2007). COX2 genetic variation, NSAIDs, and advanced prostate cancer risk. *Br J Cancer*, 97(4), 557-561. doi: 10.1038/sj.bjc.6603874
- Cheng, X., Chen, V.W., Steele, B., Ruiz, B., Fulton, J., Liu, L., Carozza, S.E. et Greenlee, R. (2001). Subsite-specific incidence rate and stage of disease in colorectal cancer by race, gender, and age group in the United States, 1992-1997. *Cancer*, 92(10), 2547-2554.
- Chintala, S.K., Kyritsis, A.P., Mohan, P.M., Mohanam, S., Sawaya, R., Gokslan, Z., Yung, W.K., Steck, P., Uhm, J.H., Aggarwal, B.B. et Rao, J.S. (1999). Altered actin cytoskeleton and inhibition of matrix metalloproteinase expression by vanadate and phenylarsine oxide, inhibitors of phosphotyrosine phosphatases: modulation of migration and invasion of human malignant glioma cells. *Mol Carcinog*, 26(4), 274-285.
- Cho, S.H., Jeon, J. et Kim, S.I. (2012). Personalized Medicine in Breast Cancer: A Systematic Review. *J Breast Cancer*, 15(3), 265-272. doi: 10.4048/jbc.2012.15.3.265
- Cobb, M.H. et Goldsmith, E.J. (1995). How MAP kinases are regulated. *J Biol Chem*, 270(25), 14843-14846.
- Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. (2008). *Nature*, 455(7216), 1061-1068. doi: 10.1038/nature07385
- Cooper, R., Morre, D.J. et Morre, D.M. (2005). Medicinal benefits of green tea: Part I. Review of noncancer health benefits. *J Altern Complement Med*, 11(3), 521-528. doi: 10.1089/acm.2005.11.521
- Coulthard, L.R., White, D.E., Jones, D.L., McDermott, M.F. et Burchill, S.A. (2009). p38(MAPK): stress responses from molecular mechanisms to therapeutics. *Trends Mol Med*, 15(8), 369-379. doi: 10.1016/j.molmed.2009.06.005
- Coussens, L.M. et Werb, Z. (2002). Inflammation and cancer. *Nature*, 420(6917), 860-867. doi: 10.1038/nature01322

- Craxton, A., Shu, G., Graves, J.D., Saklatvala, J., Krebs, E.G. et al., C.E. (1998). p38 MAPK Is Required for CD40-Induced Gene Expression and Proliferation in B Lymphocytes. *The Journal of Immunology*.
- Cross, M.J. et Claesson-Welsh, L. (2001). FGF and VEGF function in angiogenesis: signalling pathways, biological responses and therapeutic inhibition. *Trends in Pharmacological Sciences*, 22(4), 201-207. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0165-6147\(00\)01676-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0165-6147(00)01676-X)
- Da Silva, J., Pierrat, B., Mary, J.L. et Lesslauer, W. (1997). Blockade of p38 mitogen-activated protein kinase pathway inhibits inducible nitric-oxide synthase expression in mouse astrocytes. *J Biol Chem*, 272(45), 28373-28380.
- Davis, R.J. (1994). MAPKs: new JNK expands the group. *Trends Biochem Sci*, 19(11), 470-473.
- Davis, R.J. (2000). Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell*, 103(2), 239-252.
- de Bock, M., Thorstensen, E.B., Derraik, J.G., Henderson, H.V., Hofman, P.L. et Cutfield, W.S. (2013). Human absorption and metabolism of oleuropein and hydroxytyrosol ingested as olive (*Olea europaea* L.) leaf extract. *Mol Nutr Food Res*, 57(11), 2079-2085. doi: 10.1002/mnfr.201200795
- Dhanasekaran, D.N. et Reddy, E.P. (2008). JNK Signaling in Apoptosis. *Oncogene*, 27(48), 6245-6251. doi: 10.1038/onc.2008.301
- Dhillon, A.S., Hagan, S., Rath, O. et Kolch, W. (2007). MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene*, 26(22), 3279-3290. doi: 10.1038/sj.onc.1210421
- Di Domenico, F., Foppoli, C., Coccia, R. et Perluigi, M. (2012). Antioxidants in cervical cancer: Chemopreventive and chemotherapeutic effects of polyphenols. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1822(5), 737-747. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2011.10.005>
- Dixon, D.A., Blanco, F.F., Bruno, A. et Patrignani, P. (2013). Chapter 2: Mechanistic Aspects of COX-2 Expression in Colorectal Neoplasia. *Recent Results Cancer Res*, 191, 7-37. doi: 10.1007/978-3-642-30331-9_2

- Dolecek, T.A., Propp, J.M., Stroup, N.E. et Kruchko, C. (2012). CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2005-2009. *Neuro Oncol*, 14 Suppl 5, v1-49. doi: 10.1093/neuonc/nos218
- Durbin, A.D., Hannigan, G.E. et Malkin, D. (2009). Oncogenic ILK, tumor suppression and all that JNK. *Cell Cycle*, 8(24), 4060-4066. doi: 10.4161/cc.8.24.10093
- Durbin, A.D., Somers, G.R., Forrester, M., Pienkowska, M., Hannigan, G.E. et Malkin, D. (2009). JNK1 determines the oncogenic or tumor-suppressive activity of the integrin-linked kinase in human rhabdomyosarcoma. *J Clin Invest*, 119(6), 1558-1570. doi: 10.1172/jci37958
- Ene, C.I. et Holland, E.C. (2015). Personalized Medicine for Gliomas. *Surg Neurol Int*, 6(Suppl 1), S89-95. doi: 10.4103/2152-7806.151351
- Espinosa, L., Cathelin, S., D'Altri, T., Trimarchi, T., Statnikov, A., Guiu, J., Rodilla, V., Inglés-Esteve, J., Nomdedeu, J., Bellosillo, B., Besses, C., Abdel-Wahab, O., Kucine, N., Sun, S.C., Song, G., Mullighan, C.C., Levine, R.L., Rajewsky, K., Aifantis, I. et Bigas, A. (2010). The Notch/Hes1 pathway sustains NF- κ B activation through CYLD repression in T cell leukemia. *Cancer Cell*, 18(3), 268-281. doi: 10.1016/j.ccr.2010.08.006
- Fabiani, R., De Bartolomeo, A., Rosignoli, P., Servili, M., Montedoro, G.F. et Morozzi, G. (2002). Cancer chemoprevention by hydroxytyrosol isolated from virgin olive oil through G1 cell cycle arrest and apoptosis. *Eur J Cancer Prev*, 11(4), 351-358.
- Fernandes-Alnemri, T., Armstrong, R.C., Krebs, J., Srinivasula, S.M., Wang, L., Bullrich, F., Fritz, L.C., Trapani, J.A., Tomaselli, K.J., Litwack, G. et Alnemri, E.S. (1996). In vitro activation of CPP32 and Mch3 by Mch4, a novel human apoptotic cysteine protease containing two FADD-like domains. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(15), 7464-7469.
- Figarella-Branger, D., Colin, C., Tchoghandjian, A., Baeza, N. et Bouvier, C. (2010). [Glioblastomas: gliomagenesis, genetics, angiogenesis, and microenvironment]. *Neurochirurgie*, 56(6), 441-448. doi: 10.1016/j.neuchi.2010.07.010

- Frémin, C., Saba-El-Leil, Marc K., Lévesque, K., Ang, S.-L. et Meloche, S. Functional Redundancy of ERK1 and ERK2 MAP Kinases during Development. *Cell Reports*, 12(6), 913-921. doi: 10.1016/j.celrep.2015.07.011
- Fuchs, S.Y., Adler, V., Buschmann, T., Yin, Z., Wu, X., Jones, S.N. et Ronai, Z. (1998). JNK targets p53 ubiquitination and degradation in nonstressed cells. *Genes Dev*, 12(17), 2658-2663.
- Garcia-Closas, R., Gonzalez, C.A., Agudo, A. et Riboli, E. (1999). Intake of specific carotenoids and flavonoids and the risk of gastric cancer in Spain. *Cancer Causes Control*, 10(1), 71-75.
- Gialeli, C., Theocharis, A.D. et Karamanos, N.K. (2011). Roles of matrix metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting. *Febs j*, 278(1), 16-27. doi: 10.1111/j.1742-4658.2010.07919.x
- Giese, A. et Westphal, M. (1996). Glioma invasion in the central nervous system. *Neurosurgery*, 39(2), 235-250; discussion 250-232.
- Gillan, L., Matei, D., Fishman, D.A., Gerbin, C.S., Karlan, B.Y. et Chang, D.D. (2002). Periostin secreted by epithelial ovarian carcinoma is a ligand for alpha(V)beta(3) and alpha(V)beta(5) integrins and promotes cell motility. *Cancer Res*, 62(18), 5358-5364.
- Godard, V. (2013). *Two news markers of glioblastomas : prognosis value, expression profile, involvement in the vasculature and resistance to the angiogenesis inhibitors*. Université Sciences et Technologies - Bordeaux I. Récupéré de *Star*
- Granado-Serrano, A.B., Martin, M.A., Bravo, L., Goya, L. et Ramos, S. (2006). Quercetin induces apoptosis via caspase activation, regulation of Bcl-2, and inhibition of PI-3-kinase/Akt and ERK pathways in a human hepatoma cell line (HepG2). *J Nutr*, 136(11), 2715-2721.
- Guan, Z., Buckman, S.Y., Pentland, A.P., Templeton, D.J. et Morrison, A.R. (1998). Induction of cyclooxygenase-2 by the activated MEKK1 --> SEK1/MKK4 --> p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *J Biol Chem*, 273(21), 12901-12908.
- Gupta, A., Zhou, C.Q. et Chellaiah, M.A. (2013). Osteopontin and MMP9: Associations with VEGF Expression/Secretion and Angiogenesis in PC3

- Prostate Cancer Cells. *Cancers (Basel)*, 5(2), 617-638. doi: 10.3390/cancers5020617
- Gupta, S.C., Kim, J.H., Prasad, S. et Aggarwal, B.B. (2010). Regulation of survival, proliferation, invasion, angiogenesis, and metastasis of tumor cells through modulation of inflammatory pathways by nutraceuticals. *Cancer Metastasis Rev*, 29(3), 405-434. doi: 10.1007/s10555-010-9235-2
- Gupta, S.C., Patchva, S. et Aggarwal, B.B. (2013). Therapeutic Roles of Curcumin: Lessons Learned from Clinical Trials. *Aaps j*, 15(1), 195-218. doi: 10.1208/s12248-012-9432-8
- Gupta, S.C., Patchva, S., Koh, W. et Aggarwal, B.B. (2012). Discovery of curcumin, a component of golden spice, and its miraculous biological activities. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 39(3), 283-299. doi: 10.1111/j.1440-1681.2011.05648.x
- Gupta, S.C., Sundaram, C., Reuter, S. et Aggarwal, B.B. (2010). Inhibiting NF-kappaB activation by small molecules as a therapeutic strategy. *Biochim Biophys Acta*, 1799. doi: 10.1016/j.bbagr.2010.05.004
- Gutsche, K., Randi, E.B., Blank, V., Fink, D., Wenger, R.H., Leo, C. et Scholz, C.C. (2016). Intermittent hypoxia confers pro-metastatic gene expression selectively through NF-kB in inflammatory breast cancer cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 101, 129-142. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.10.002>
- Hanahan, D. et Weinberg, R.A. (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell*, 100(1), 57-70. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81683-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81683-9)
- Harborne, J.B. et Williams, C.A. (2000). Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, 55(6), 481-504.
- Helbig, G., Christopherson, K.W., 2nd, Bhat-Nakshatri, P., Kumar, S., Kishimoto, H., Miller, K.D., Broxmeyer, H.E. et Nakshatri, H. (2003). NF-kappaB promotes breast cancer cell migration and metastasis by inducing the expression of the chemokine receptor CXCR4. *J Biol Chem*, 278(24), 21631-21638. doi: 10.1074/jbc.M300609200
- Henkart, P.A. et Grinstein, S. (1996). Apoptosis: mitochondria resurrected? *J Exp Med*, 183(4), 1293-1295.

- Hibasami, H., Komiya, T., Achiwa, Y., Ohnishi, K., Kojima, T., Nakanishi, K., Akashi, K. et Hara, Y. (1998). Induction of apoptosis in human stomach cancer cells by green tea catechins. *Oncol Rep*, 5(2), 527-529.
- Ho, Y.C., Yang, S.F., Peng, C.Y., Chou, M.Y. et Chang, Y.C. (2007). Epigallocatechin-3-gallate inhibits the invasion of human oral cancer cells and decreases the productions of matrix metalloproteinases and urokinase-plasminogen activator. *J Oral Pathol Med*, 36(10), 588-593. doi: 10.1111/j.1600-0714.2007.00588.x
- Holmes, K., Roberts, O.L., Thomas, A.M. et Cross, M.J. (2007). Vascular endothelial growth factor receptor-2: structure, function, intracellular signalling and therapeutic inhibition. *Cell Signal*, 19(10), 2003-2012. doi: 10.1016/j.cellsig.2007.05.013
- Horiuchi, K., Amizuka, N., Takeshita, S., Takamatsu, H., Katsuura, M., Ozawa, H., Toyama, Y., Bonewald, L.F. et Kudo, A. (1999). Identification and characterization of a novel protein, periostin, with restricted expression to periosteum and periodontal ligament and increased expression by transforming growth factor beta. *J Bone Miner Res*, 14(7), 1239-1249. doi: 10.1359/jbmr.1999.14.7.1239
- Hou, D.X. (2003). Potential mechanisms of cancer chemoprevention by anthocyanins. *Curr Mol Med*, 3(2), 149-159.
- Huse, J.T., Holland, E. et DeAngelis, L.M. (2013). Glioblastoma: molecular analysis and clinical implications. *Annu Rev Med*, 64, 59-70. doi: 10.1146/annurev-med-100711-143028
- Hwang, E.Y., Jeong, M.S., Park, E.K., Kim, J.H. et Jang, S.B. (2014). Structural characterization and interaction of periostin and bone morphogenetic protein for regulation of collagen cross-linking. *Biochem Biophys Res Commun*, 449(4), 425-431. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.05.055
- Israël, A. (1991). Les protéines NF-KB, Dorsal et Rel Une nouvelle classe de facteurs de transcription. *MINI-SYNTÈSE*, 7, 67-70.
- Jung, Y.D., Kim, M.S., Shin, B.A., Chay, K.O., Ahn, B.W., Liu, W., Bucana, C.D., Gallick, G.E. et Ellis, L.M. (2001). EGCG, a major component of green tea, inhibits

- tumour growth by inhibiting VEGF induction in human colon carcinoma cells. *Br J Cancer*, 84(6), 844-850. doi: 10.1054/bjoc.2000.1691
- Kalinski, P. (2012). Regulation of immune responses by prostaglandin E2. *J Immunol*, 188. doi: 10.4049/jimmunol.1101029
- Karin, M. (2009). NF- κ B as a Critical Link Between Inflammation and Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 1(5). doi: 10.1101/cshperspect.a000141
- Kesari, S. (2011). Understanding glioblastoma tumor biology: the potential to improve current diagnosis and treatments. *Semin Oncol*, 38 Suppl 4, S2-10. doi: 10.1053/j.seminoncol.2011.09.005
- Key, T.J., Schatzkin, A., Willett, W.C., Allen, N.E., Spencer, E.A. et Travis, R.C. (2007). Diet, nutrition and the prevention of cancer. *Public Health Nutrition*, 7(1a). doi: 10.1079/phn2003588
- Khan, N., Afaq, F., Saleem, M., Ahmad, N. et Mukhtar, H. (2006). Targeting multiple signaling pathways by green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate. *Cancer Res*, 66(5), 2500-2505. doi: 10.1158/0008-5472.can-05-3636
- Klein, G., Vellenga, E., Fraaije, M.W., Kamps, W.A. et de Bont, E.S. (2004). The possible role of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in cancer, e.g. acute leukemia. *Crit Rev Oncol Hematol*, 50(2), 87-100. doi: 10.1016/j.critrevonc.2003.09.001
- Knekt, P., Kumpulainen, J., Jarvinen, R., Rissanen, H., Heliovaara, M., Reunanen, A., Hakulinen, T. et Aromaa, A. (2002). Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *Am J Clin Nutr*, 76(3), 560-568.
- Kudo, Y., Siriwardena, B.S., Hatano, H., Ogawa, I. et Takata, T. (2007). Periostin: novel diagnostic and therapeutic target for cancer. *Histol Histopathol*, 22(10), 1167-1174.
- Kyriakis, J.M. et Avruch, J. (2001). Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev*, 81(2), 807-869.
- Lagarde, P. (2001). *Cancer, progrès de la prévention et du traitement*. (Association Nutrition et Prévention éd.). NUTRANEWS.

- Lamy, S., Blanchette, M., Michaud-Levesque, J., Lafleur, R., Durocher, Y., Moghrabi, A., Barrette, S., Gingras, D. et Beliveau, R. (2006). Delphinidin, a dietary anthocyanidin, inhibits vascular endothelial growth factor receptor-2 phosphorylation. *Carcinogenesis*, 27(5), 989-996. doi: 10.1093/carcin/bgi279
- Lamy, S., Gingras, D. et Beliveau, R. (2002). Green tea catechins inhibit vascular endothelial growth factor receptor phosphorylation. *Cancer Res*, 62(2), 381-385.
- Lee, J., Kotliarova, S., Kotliarov, Y., Li, A., Su, Q., Donin, N.M., Pastorino, S., Purow, B.W., Christopher, N., Zhang, W., Park, J.K. et Fine, H.A. (2006). Tumor stem cells derived from glioblastomas cultured in bFGF and EGF more closely mirror the phenotype and genotype of primary tumors than do serum-cultured cell lines. *Cancer Cell*, 9(5), 391-403. doi: 10.1016/j.ccr.2006.03.030
- Li, M.J., Yin, Y.C., Wang, J. et Jiang, Y.F. (2014). Green tea compounds in breast cancer prevention and treatment. *World J Clin Oncol*, 5(3), 520-528. doi: 10.5306/wjco.v5.i3.520
- Liang, H., Liang, Y., Dong, J., Lu, J., Xu, H. et Wang, H. (2007). Decaffeination of fresh green tea leaf (*Camellia sinensis*) by hot water treatment. *Food Chemistry*, 101(4), 1451-1456. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.03.054>
- Lila, M.A. (2004). Anthocyanins and Human Health: An In Vitro Investigative Approach. *J Biomed Biotechnol*, 2004(5), 306-313. doi: 10.1155/s111072430440401x
- Liu, J. et Lin, A. (2007). Wiring the cell signaling circuitry by the NF-kappa B and JNK1 crosstalk and its applications in human diseases. *Oncogene*, 26(22), 3267-3278. doi: 10.1038/sj.onc.1210417
- Liu, J. et Lin, A. (2015). Role of JNK activation in apoptosis: A double-edged sword.
- Louis, D.N., Ohgaki, H., Wiestler, O.D., Cavenee, W.K., Burger, P.C., Jouvett, A., Scheithauer, B.W. et Kleihues, P. (2007). The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol*, 114(2), 97-109. doi: 10.1007/s00401-007-0243-4

- Lu, H., Ouyang, W. et Huang, C. (2006). Inflammation, a key event in cancer development. *Mol Cancer Res*, 4(4), 221-233. doi: 10.1158/1541-7786.mcr-05-0261
- Luqman, S. et Pezzuto, J.M. (2010). NFkappaB: a promising target for natural products in cancer chemoprevention. *Phytother Res*, 24(7), 949-963. doi: 10.1002/ptr.3171
- Mannaioni, P.F., Di Bello, M.G. et Masini, E. (1997). Platelets and inflammation: Role of platelet-derived growth factor, adhesion molecules and histamine. [journal article]. *Inflammation Research*, 46(1), 4-18. doi: 10.1007/pl00000158
- Mendoza, M.C., Vilela, M., Juarez, J.E., Blenis, J. et Danuser, G. (2015). ERK reinforces actin polymerization to power persistent edge protrusion during motility. *Sci Signal*, 8(377), ra47. doi: 10.1126/scisignal.aaa8859
- Michaylira, C.Z., Wong, G.S., Miller, C.G., Gutierrez, C.M., Nakagawa, H., Hammond, R., Klein-Szanto, A.J., Lee, J.S., Kim, S.B., Herlyn, M., Diehl, J.A., Gimotty, P. et Rustgi, A.K. (2010). Periostin, a cell adhesion molecule, facilitates invasion in the tumor microenvironment and annotates a novel tumor-invasive signature in esophageal cancer. *Cancer Res*, 70(13), 5281-5292. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-0704
- Mini, E. et Nobili, S. (2009). Pharmacogenetics: implementing personalized medicine. *Clin Cases Miner Bone Metab*, 6(1), 17-24.
- Miro-Casas, E., Covas, M.I., Fito, M., Farre-Albadalejo, M., Marrugat, J. et de la Torre, R. (2003). Tyrosol and hydroxytyrosol are absorbed from moderate and sustained doses of virgin olive oil in humans. *Eur J Clin Nutr*, 57(1), 186-190.
- Neergheen, V.S., Bahorun, T., Taylor, E.W., Jen, L.S. et Aruoma, O.I. (2010). Targeting specific cell signaling transduction pathways by dietary and medicinal phytochemicals in cancer chemoprevention. *Toxicology*, 278(2), 229-241. doi: 10.1016/j.tox.2009.10.010
- Nichenametla, S.N., Taruscio, T.G., Barney, D.L. et Exon, J.H. (2006). A review of the effects and mechanisms of polyphenolics in cancer. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 46(2), 161-183. doi: 10.1080/10408390591000541

Nitiss, J.L. (2009). Targeting DNA topoisomerase II in cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer*, 9(5), 338-350. doi: 10.1038/nrc2607

Niyazi, M., Geisler, J., Siefert, A., Schwarz, S.B., Ganswindt, U., Garny, S., Schnell, O., Suchorska, B., Kreth, F.W., Tonn, J.C., Bartenstein, P., la Fougere, C. et Belka, C. (2011). FET-PET for malignant glioma treatment planning. *Radiother Oncol*, 99(1), 44-48. doi: 10.1016/j.radonc.2011.03.001

Nutrition et Cancer Rapport d'expertise collective 2011. : anses.

Oh, S., Han, A.R., Park, H.R., Jang, E.J., Kim, H.K., Jeong, M.G., Song, H., Park, G.H., Seo, E.K. et Hwang, E.S. (2014). Suppression of Inflammatory cytokine production by ar-Turmerone isolated from *Curcuma phaeocaulis*. *Chem Biodivers*, 11(7), 1034-1041. doi: 10.1002/cbdv.201300397

Olivera, A., Moore, T.W., Hu, F., Brown, A.P., Sun, A., Liotta, D.C., Snyder, J.P., Yoon, Y., Shim, H., Marcus, A.I., Miller, A.H. et Pace, T.W.W. (2012). Inhibition of the NF- κ B signaling pathway by the curcumin analog, 3,5-Bis(2-pyridinylmethylidene)-4-piperidone (EF31): anti-inflammatory and anti-cancer properties. *Int Immunopharmacol*, 12(2), 368-377. doi: 10.1016/j.intimp.2011.12.009

Organisation Mondiale De La Santé. (2016). Récupéré de <http://www.who.int/gho/fr/>

Oshima, A., Tanabe, H., Yan, T., Lowe, G.N., Glackin, C.A. et Kudo, A. (2002). A novel mechanism for the regulation of osteoblast differentiation: transcription of periostin, a member of the fasciclin I family, is regulated by the bHLH transcription factor, twist. *J Cell Biochem*, 86(4), 792-804. doi: 10.1002/jcb.10272

Ouanouki, A., Lamy, S. et Annabi, B. (2016). Anthocyanidins inhibit epithelial-mesenchymal transition through a TGFbeta/Smad2 signaling pathway in glioblastoma cells. *Mol Carcinog*. doi: 10.1002/mc.22575

Owen, R.W., Giacosa, A., Hull, W.E., Haubner, R., Spiegelhalder, B. et Bartsch, H. (2000 a). The antioxidant/anticancer potential of phenolic compounds isolated from olive oil. *Eur J Cancer*, 36(10), 1235-1247.

- Owen, R.W., Giacosa, A., Hull, W.E., Haubner, R., Wurtele, G., Spiegelhalder, B. et Bartsch, H. (2000 b). Olive-oil consumption and health: the possible role of antioxidants. *Lancet Oncol*, *1*, 107-112.
- Padial-Molina, M., Volk, S.L., Rodriguez, J.C., Marchesan, J.T., Galindo-Moreno, P. et Rios, H.F. (2013). Tumor necrosis factor-alpha and Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharides decrease periostin in human periodontal ligament fibroblasts. *J Periodontol*, *84*(5), 694-703. doi: 10.1902/jop.2012.120078
- Parsons, D.W., Jones, S., Zhang, X., Lin, J.C.H., Leary, R.J., Angenendt, P., Mankoo, P., Carter, H., Siu, I.M., Gallia, G.L., Olivi, A., McLendon, R., Rasheed, B.A., Keir, S., Nikolskaya, T., Nikolsky, Y., Busam, D.A., Tekleab, H., Diaz, L.A., Hartigan, J., Smith, D.R., Strausberg, R.L., Marie, S.K.N., Shinjo, S.M.O., Yan, H., Riggins, G.J., Bigner, D.D., Karchin, R., Papadopoulos, N., Parmigiani, G., Vogelstein, B., Velculescu, V.E. et Kinzler, K.W. (2008). An Integrated Genomic Analysis of Human Glioblastoma Multiforme. *Science*, *321*(5897), 1807. doi: 10.1126/science.1164382
- Paving the Way for Personalized Medicine*. 2013. : U.S FOOD AND DRUG ADMINISTRATION.
- Pietersma, A., Tilly, B.C., Gaestel, M., de Jong, N., Lee, J.C., Koster, J.F. et Sluiter, W. (1997). p38 mitogen activated protein kinase regulates endothelial VCAM-1 expression at the post-transcriptional level. *Biochem Biophys Res Commun*, *230*(1), 44-48. doi: 10.1006/bbrc.1996.5886
- Pietta, P.G. (2000). Flavonoids as antioxidants. *J Nat Prod*, *63*(7), 1035-1042.
- Pujol, J.P. (1988). [Cytokines, growth factors and inflammation]. *Rev Rhum Mal Osteoartic*, *55*(6), 430-434.
- Pulido-Moran, M., Moreno-Fernandez, J., Ramirez-Tortosa, C. et Ramirez-Tortosa, M. (2016). Curcumin and Health. *Molecules*, *21*(3), 264. doi: 10.3390/molecules21030264
- Rahmani, A.H., Al shabrimi, F.M., Allemailem, K.S., Aly, S.M. et Khan, M.A. (2015). Implications of Green Tea and Its Constituents in the Prevention of Cancer via the Modulation of Cell Signalling Pathway. *Biomed Res Int*, 2015. doi: 10.1155/2015/925640

- Raingaud, J., Gupta, S., Rogers, J.S., Dickens, M., Han, J., Ulevitch, R.J. et Davis, R.J. (1995). Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. *J Biol Chem*, 270(13), 7420-7426.
- Ramaswamy, N.T., Ronai, Z.e. et Pelling, J.C. (1998). Rapid activation of JNK1 in UV-B irradiated epidermal keratinocytes. *Oncogene*, 16, 1501-1505.
- Reardon, D.A. et Wen, P.Y. (2006). Therapeutic advances in the treatment of glioblastoma: rationale and potential role of targeted agents. *Oncologist*, 11(2), 152-164. doi: 10.1634/theoncologist.11-2-152
- Regina, A., Demeule, M., Che, C., Lavallee, I., Poirier, J., Gabathuler, R., Beliveau, R. et Castaigne, J.P. (2008). Antitumour activity of ANG1005, a conjugate between paclitaxel and the new brain delivery vector Angiopep-2. *Br J Pharmacol*, 155(2), 185-197. doi: 10.1038/bjp.2008.260
- Reya, T., Morrison, S.J., Clarke, M.F. et Weissman, I.L. (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*, 414(6859), 105-111. doi: 10.1038/35102167
- Ricard, D., Idbaih, A., Ducray, F., Lahutte, M., Hoang-Xuan, K. et Delattre, J.Y. (2012). Primary brain tumours in adults. *Lancet*, 379(9830), 1984-1996. doi: 10.1016/s0140-6736(11)61346-9
- Rietjens, S.J., Bast, A., de Vente, J. et Haenen, G.R. (2007). The olive oil antioxidant hydroxytyrosol efficiently protects against the oxidative stress-induced impairment of the NObullet response of isolated rat aorta. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 292(4), H1931-1936. doi: 10.1152/ajpheart.00755.2006
- Roberts, P.J. et Der, C.J. (2007). Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene*, 26(22), 3291-3310. doi: 10.1038/sj.onc.1210422
- Ross, J.A. et Kasum, C.M. (2002). Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annu Rev Nutr*, 22, 19-34. doi: 10.1146/annurev.nutr.22.111401.144957
- Ruan, K., Bao, S. et Ouyang, G. (2009). The multifaceted role of periostin in tumorigenesis. *Cell Mol Life Sci*, 66(14), 2219-2230. doi: 10.1007/s00018-009-0013-7

- Schaffer, S., Podstawa, M., Visioli, F., Bogani, P., Muller, W.E. et Eckert, G.P. (2007). Hydroxytyrosol-rich olive mill wastewater extract protects brain cells in vitro and ex vivo. *J Agric Food Chem*, 55(13), 5043-5049. doi: 10.1021/jf0703710
- Sgambato, A. et Cittadini, A. (2010). Inflammation and cancer : A multifaceted link. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 263-268.
- Shakur, S.F., Bit-Ivan, E., Watkin, W.G., Merrell, R.T. et Farhat, H.I. (2013). Multifocal and multicentric glioblastoma with leptomeningeal gliomatosis: a case report and review of the literature. *Case Rep Med*, 2013, 132679. doi: 10.1155/2013/132679
- Shao, R., Bao, S., Bai, X., Blanchette, C., Anderson, R.M., Dang, T., Gishizky, M.L., Marks, J.R. et Wang, X.F. (2004). Acquired Expression of Periostin by Human Breast Cancers Promotes Tumor Angiogenesis through Up-Regulation of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2 Expression. *Molecular and Cellular Biology*, 24(9), 3992-4003. doi: 10.1128/mcb.24.9.3992-4003.2004
- Shlipak, M.G. (2002). Elevations of Inflammatory and Procoagulant Biomarkers in Elderly Persons With Renal Insufficiency. *Circulation*, 107(1), 87-92. doi: 10.1161/01.cir.0000042700.48769.59
- Sirica, A.E., Almenara, J.A. et Li, C. (2014). Periostin in intrahepatic cholangiocarcinoma: pathobiological insights and clinical implications. *Exp Mol Pathol*, 97(3), 515-524. doi: 10.1016/j.yexmp.2014.10.007
- Soeda, A., Park, M., Lee, D., Mintz, A., Androutsellis-Theotokis, A., McKay, R.D., Engh, J., Iwama, T., Kunisada, T., Kassam, A.B., Pollack, I.F. et Park, D.M. (2009). Hypoxia promotes expansion of the CD133-positive glioma stem cells through activation of HIF-1alpha. *Oncogene*, 28(45), 3949-3959. doi: 10.1038/onc.2009.252
- Sottile, V., Thomson, A. et McWhir, J. (2003). In vitro osteogenic differentiation of human ES cells. *Cloning Stem Cells*, 5(2), 149-155. doi: 10.1089/153623003322234759
- Spear, B.B., Heath-Chiozzi, M. et Huff, J. (2001). Clinical application of pharmacogenetics. *Trends Mol Med*, 7(5), 201-204.

- Statistiques canadiennes sur le cancer*. 2015. : Comité consultatif de la Société canadienne du cancer
- Sudan, S. et Rupasinghe, H.P. (2014). Quercetin-3-O-glucoside induces human DNA topoisomerase II inhibition, cell cycle arrest and apoptosis in hepatocellular carcinoma cells. *Anticancer Res*, 34(4), 1691-1699.
- Svatek, R.S., Lee, J.J., Roehrborn, C.G., Lippman, S.M. et Lotan, Y. (2008). Cost-effectiveness of prostate cancer chemoprevention: a quality of life-years analysis. *Cancer*, 112(5), 1058-1065. doi: 10.1002/cncr.23276
- Tachamo, N., Nazir, S., Lohani, S., Le, B. et Alweis, R. (2016). Glioblastoma management: challenges in the elderly population. *J Community Hosp Intern Med Perspect*, 6(5), 32372. doi: 10.3402/jchimp.v6.32372
- Takada, Y., Sethi, G., Sung, B. et Aggarwal, B.B. (2008). Re: Flavopiridol suppresses tumor necrosis factor-induced activation of activator protein-1, c-Jun N-terminal kinase, p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK), p44/p42 MAPK, and Akt, inhibits expression of antiapoptotic gene products, and enhances apoptosis through cytochrome c release and caspase activation in human myeloid cells *Mol Pharmacol*, 90(1), 63. doi: 10.1124/mol.115.041350retraction
- Tan, A.C., Konczak, I., Sze, D.M. et Ramzan, I. (2011). Molecular pathways for cancer chemoprevention by dietary phytochemicals. *Nutr Cancer*, 63(4), 495-505. doi: 10.1080/01635581.2011.538953
- Tecchio, C. et Cassatella, M.A. (2016). Neutrophil-derived chemokines on the road to immunity. *Semin Immunol*, 28(2), 119-128. doi: 10.1016/j.smim.2016.04.003
- Uchimiya, M., Ni, X. et Wang, M.L. (2016). Structure-reactivity relationships between the fluorescent chromophores and antioxidant activity of grain and sweet sorghum seeds. *Food Sci Nutr*, 4(6), 811-817. doi: 10.1002/fsn3.350
- Vaillancourt-jean, E. (2012). *CIBLAGE PHARMACOLOGIQUE DU PHÉNOTYPE INVASIF ET INFLAMMA TOIRE DANS LES CELLULES DE MÉDULLOBLASTOMES*. Université du Québec à Montréal.
- Van den Steen, P.E., Dubois, B., Nelissen, I., Rudd, P.M., Dwek, R.A. et Opdenakker, G. (2002). Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix

- metalloproteinase-9 (MMP-9). *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 37(6), 375-536. doi: 10.1080/10409230290771546
- van Horsen, R., Ten Hagen, T.L. et Eggermont, A.M. (2006). TNF-alpha in cancer treatment: molecular insights, antitumor effects, and clinical utility. *Oncologist*, 11(4), 397-408. doi: 10.1634/theoncologist.11-4-397
- Vauzour, D., Rodriguez-Mateos, A., Corona, G., Oruna-Concha, M.J. et Spencer, J.P.E. (2010). Polyphenols and Human Health: Prevention of Disease and Mechanisms of Action. *Nutrients*, 2(11), 1106-1131. doi: 10.3390/nu2111106
- Vazquez-Martin, A., Fernández-Arroyo, S., Cufí, S., Oliveras-Ferraros, C., Lozano-Sánchez, J., Vellón, L., Micol, V., Joven, J., Segura-Carretero, A. et Menendez, J.A. (2012). Phenolic Secoiridoids in Extra Virgin Olive Oil Impede Fibrogenic and Oncogenic Epithelial-to-Mesenchymal Transition: Extra Virgin Olive Oil As a Source of Novel Antiaging Phytochemicals. *Rejuvenation Res*, 15(1), 3-21. doi: 10.1089/rej.2011.1203
- Verma, M. (2012). Personalized Medicine and Cancer. *J Pers Med*, 2(1), 1-14. doi: 10.3390/jpm2010001
- Visioli, F. et Galli, C. (2001). The role of antioxidants in the Mediterranean diet. *Lipids*, 36 Suppl, S49-52.
- Wang, L.N., Yao, M., Yang, J.P., Peng, J., Peng, Y., Li, C.F., Zhang, Y.B., Ji, F.H., Cheng, H., Xu, Q.N., Wang, X.Y. et Zuo, J.L. (2011). Cancer-induced bone pain sequentially activates the ERK/MAPK pathway in different cell types in the rat spinal cord. *Mol Pain*, 7, 48. doi: 10.1186/1744-8069-7-48
- Wang, L.S. et Stoner, G.D. (2008). Anthocyanins and their role in cancer prevention. *Cancer Lett*, 269(2), 281-290. doi: 10.1016/j.canlet.2008.05.020
- Weber, C.E. et Kuo, P.C. (2012). The tumor microenvironment. *Surg Oncol*, 21(3), 172-177. doi: 10.1016/j.suronc.2011.09.001
- Wen, P.Y. et Kesari, S. (2008). Malignant gliomas in adults. *N Engl J Med*, 359(5), 492-507. doi: 10.1056/NEJMra0708126

- Whitmarsh, A.J. et Davis, R.J. (1996). Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways. *J Mol Med (Berl)*, 74(10), 589-607.
- Wiseman, S.M., Melck, A., Masoudi, H., Ghaidi, F., Goldstein, L., Gown, A., Jones, S.J. et Griffith, O.L. (2008). Molecular phenotyping of thyroid tumors identifies a marker panel for differentiated thyroid cancer diagnosis. *Ann Surg Oncol*, 15(10), 2811-2826. doi: 10.1245/s10434-008-0034-8
- Wu, Y. et Zhou, B.P. (2010). TNF- α /NF- κ B/Snail pathway in cancer cell migration and invasion. *Br J Cancer*, 102(4), 639-644. doi: 10.1038/sj.bjc.6605530
- Xia, Z., Dickens, M., Raingeaud, J., Davis, R.J. et Greenberg, M.E. (1995). Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science*, 270(5240), 1326-1331.
- Yamamoto, Y. et Gaynor, R.B. (2001). Therapeutic potential of inhibition of the NF-kappaB pathway in the treatment of inflammation and cancer. *J Clin Invest*, 107. doi: 10.1172/jci11914
- Yance, D.R. et Sagar, S.M. (2006). Targeting Angiogenesis With Integrative Cancer Therapies. *INTEGRATIVE CANCER THERAPIES*.
- Yao, M., Kargman, S., Lam, E.C., Kelly, C.R., Zheng, Y., Luk, P., Kwong, E., Evans, J.F. et Wolfe, M.M. (2003). Inhibition of cyclooxygenase-2 by rofecoxib attenuates the growth and metastatic potential of colorectal carcinoma in mice. *Cancer Res*, 63(3), 586-592.
- Yao, Z. et Seger, R. (2009). The ERK signaling cascade--views from different subcellular compartments. *Biofactors*, 35(5), 407-416. doi: 10.1002/biof.52
- Yun, J.M., Afaq, F., Khan, N. et Mukhtar, H. (2009). Delphinidin, an anthocyanidin in pigmented fruits and vegetables, induces apoptosis and cell cycle arrest in human colon cancer HCT116 cells. *Mol Carcinog*, 48(3), 260-270. doi: 10.1002/mc.20477
- Zarubin, T. et Han, J. (2005). Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. *Cell Research*, 15, 11-18.

- Zaveri, N.T. (2006). Green tea and its polyphenolic catechins: medicinal uses in cancer and noncancer applications. *Life Sci*, 78(18), 2073-2080. doi: 10.1016/j.lfs.2005.12.006
- Zheng, C., Yin, Q. et Wu, H. (2011). Structural studies of NF-kappaB signaling. *Cell Res*, 21(1), 183-195. doi: 10.1038/cr.2010.171
- Zhou, J., Li, L., Fang, L., Xie, H., Yao, W., Zhou, X., Xiong, Z., Wang, L., Li, Z. et Luo, F. (2016). Quercetin reduces cyclin D1 activity and induces G1 phase arrest in HepG2 cells. *Oncol Lett*, 12(1), 516-522. doi: 10.3892/ol.2016.4639
- Zhou, W., Ke, S.Q., Huang, Z., Flavahan, W., Fang, X., Paul, J., Wu, L., Sloan, A.E., McLendon, R.E., Li, X., Rich, J.N. et Bao, S. (2015). Periostin secreted by glioblastoma stem cells recruits M2 tumour-associated macrophages and promotes malignant growth. *Nat Cell Biol*, 17(2), 170-182. doi: 10.1038/ncb3090