

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

CARACTÉRISATION DES PROPRIÉTÉS ANTIPROLIFÉRATIVES DES EXTRAITS DE BAIES  
ET FLEURS DE SUREAU SUR DES MODÈLES DE CELLULES CANCÉREUSES ET  
ENDOTHÉLIALES DE CERVEAU

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAÎTRISE EN BIOCHIMIE

PAR

EVELYNE MUHIRE

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.10-2015). 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 ne saurai présenter mon mémoire sans prendre d'abord le temps de remercier les gens qui ont pu rendre ce travail possible, mais également ceux qui m'ont permis d'apprécier ces deux dernières années. En tout premier lieu, je tiens à remercier le Pr Borhane Annabi et la Dre Sylvie Lamy, pour l'accueil chaleureux parmi l'équipe, mais surtout pour le support moral, l'investissement et la confiance qu'ils ont placé en moi. Sylvie, merci aussi de m'avoir fait savoir que tu étais toujours disponible pour moi, que ce soit pour discuter du projet ou pour simplement des aléas de la vie. Il m'est également impossible de passer sous silence l'implication de Mme Annie Levert, en qui j'ai trouvé une oreille attentive et une interlocutrice aguerrie, avec qui j'ai autant parlé de science que de suggestions films ou de sorties 5@7 !

Nelly, je louange le Ciel de t'avoir mis sur mon chemin ! Tu ne sais pas à quel point ta présence quotidienne m'a fait du bien. Merci d'avoir ensoleillé mes journées et de continuer à le faire. Un immense merci à tous mes autres collègues, ce fut un honneur et un bonheur d'évoluer comme scientifique et comme humain parmi vous : Amira Ouanouki, Cyndia Charfi, Alain Zgheib, Jean-Christophe Currie, Marbelis Francisco Fernandez, Michel Demeule, Alain Laroque, Nicolas Heddebaut, Pascale Gagné, Samuel Sheehy et Samuel Burke-Nanni. Un spécial clin d'œil à Amélie Vézina : *What happens in New Orleans stays in New Orleans !* Un grand merci aussi à Denis Flippo : vos conseils et conversations m'ont grandement aidé. Finalement, il m'est impossible de ne pas souligner ici le Dr Richard Béliveau, pour son esprit rassembleur et sa foi en son équipe. C'est également l'occasion pour moi de remercier en bonne et due forme une femme remarquable, qui est non seulement une pionnière du laboratoire, mais aussi un peu une deuxième mère pour moi. Julie Poirier, je te dois un peu – beaucoup – pour la scientifique et l'amie que je suis. Merci également à la Fondation de l'UQAM et à la Chaire de recherche en prévention et traitement du cancer pour le soutien financier.

Je prends également le temps de remercier certains de mes amis proches, sans qui la vie serait bien grise : Emmanuelle, j'adore notre nous plus que tout; Raphaëlle et Sophie, merci d'être mon chez-moi; Delphine et Marie-Claude, d'être là après tout ce temps; Sandrine, Mégane et Laurence, votre créativité, vos passions et votre courage de les poursuivre m'inspirent; Renaud, pour l'indien et d'être mon technicien informatique de service préféré.

Ma famille. Vous ne savez pas à quel point vous comptez pour moi. Vous êtes mon ancrage, mon pilier, là où je retourne pour me ressourcer. Nathalie & Gérald, votre ouverture sur le monde et les gens m'épate; Manon & Dominic, votre amour inconditionnel pour vos proches m'émeut à chaque fois; Papi, je serai à jamais reconnaissant du temps et de l'amour que tu mets quotidiennement dans ta petite famille. Ma Myriam, vraie, belle, forte et fragile à la fois, merci d'être si bonne avec moi. Mon père & ma sœur, je vous dois bien plus que ces deux dernières années : le temps et les épreuves passent et je retrouve toujours en vous mon noyau solide, ma source de réconfort, le temps d'un souper ou d'un café. Je vous aime, Oswald et Cécile Muhire, ce mémoire est pour vous.

## DÉDICACE

À ma mère Lyne.

À ma grand-mère Murielle.

À ceux qui continuent de se battre sans elles et pour elles.

## TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES.....	vi
LISTE DES TABLEAUX.....	viii
LISTE DES ABBRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES .....	ix
RÉSUMÉ.....	x
INTRODUCTION .....	1
1. Le cancer .....	1
1.1. Généralités.....	1
1.2. Tumeurs des cellules gliales.....	
2. Prolifération cellulaire et sa régulation dans les tumeurs gliales .....	11
2.1. Phases du cycle cellulaire.....	12
3. Nutrition et cancer .....	16
3.1. Généralités / prévention.....	16
3.2. Composés phytochimiques.....	18
3.3. Le sureau .....	21
CHAPITRE I	
PROJET DE RECHERCHE .....	2
1.1. Problématique et contexte .....	2
1.2. Hypothèse de travail .....	25
1.3. Objectifs de la recherche et approche méthodologique.....	25
CHAPITRE II	
ANTIPROLIFERATIVE EFFICACY OF ELDERBERRIES AND ELDERFLOWERS EXTRACTS ( <i>SAMBUCUS CANADENSIS</i> ) ON GLIOMA AND BRAIN ENDOTHELIAL CELLS UNDER NORMOXIC AND HYPOXIC CONDITIONS .....	25
2.1. Abstract .....	29
2.3. Materials and Methods.....	32
2.4. Results.....	37
2.5. Discussion.....	42
2.6. References.....	47
2.7. Figure Legends .....	55
CHAPITRE III	
DISCUSSION .....	68
CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....	70
RÉFÉRENCES.....	83

## LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 : Caractéristiques acquises par la cellule cancéreuse. Figure adaptée (Hanahan & Weinberg, 2011).....	1
Figure 1.2 : Étapes de développement de la cellule cancéreuse. Une cellule saine acquière initialement des lésions à l'ADN et, suite à des séries de mutations subséquentes et pressions de sélection, la cellule progresse en une tumeur maligne, cliniquement détectable. Figure adaptée (Roomi, Shanker, Niedwiecki, & Rath, 2016).....	4
Figure 1.3 : Structures de la barrière hématoencéphalique. Les capillaires sanguins, formés de cellules endothéliales et de péricytes et entourés des pieds des astrocytes, permettent l'entrée et la sortie des substances du sang au cerveau. Figure adaptée (Noback, Strominger, Desmarest, & Ruggiero, 2005).....	7
Figure 1.4 : Une perte de balance appropriée entre les facteurs anti et pro-angiogéniques provoque une angiogenèse pathologique. Ce « switch » angiogénique est fréquemment observé dans les tumeurs solides. Figure adaptée (Bergers & Benjamin, 2003).....	8
Figure 1.5 : Rôle de l'hypoxie dans l'induction de l'angiogenèse. De faibles tensions d'oxygène induisent, par l'intermédiaire du facteur de transcription HIF-1 $\alpha$ , l'expression plusieurs gènes responsables de l'activation de l'angiogenèse. Figure adaptée (Carmeliet & Jain, 2000).....	10
Figure 1.6 : Complexes et interactions protéiques régulant les phases du cycle cellulaire. La progression à travers les phases de croissance (G1, G2), de réplication de l'ADN (S) et de mitose (M) est contrôlée par des complexes activateurs (Cycline-CDK) et les protéines inhibitrices de celles-ci. Figure adaptée de (Abukheir & Park, 2009). .....	12
Figure 1.7 : Le cation flavylum est la structure de base de l'anthocyanidine. On dénombre 6 principaux types d'anthocyanidines selon les différents groupements hydroxyle et méthoxyle. Figure tirée de (Extrasynthese, 2017).....	21

Figure 2.1: Hypoxia culture condition validation in human brain tumor and brain endothelial cell lines .....	58
Figure 2.2: Inhibition of human glioma and brain endothelial cell proliferation by elderberry and elderflower extracts.....	60
Figure 2.3: Elderberry and elderflower extracts effects on cell cycle regulation.....	62
Figure 2.4: Elderberry extracts affect human glioma and brain endothelial cell viability .....	63
Figure 2.5: Inhibition of human glioma and brain endothelial cell proliferation by phenolic compounds .....	65



## LISTE DES TABLEAUX

Table 2.1 : Comparative overview of IC <sub>50</sub> values of elderberry and elderflower extracts on cell proliferation.....	66
Table 2.2 : Percent values of cell cycle phase as monitored by flow cytometry after treatment with elderberry and elderflower extracts.....	67

## LISTE DES ABBRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES

ADN	Acide désoxyribonucléique
Ang	<i>Angiopoietin</i>
ATR	<i>Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein</i>
BHE	Barrière hématoencéphalique
BBB	<i>blood-brain barrier</i>
CDK	<i>Cyclin-dependant kinase</i>
CKI	<i>Cyclin-dependant kinase inhibitor</i>
Cy-3-gal	<i>Cyanidin-3-O-galactoside chloride</i>
Cy-3-rut	<i>Cyanidin-3-O-rutinoside chloride</i>
Cy-3-sam-5-glu	<i>Cyanidin-3-O-sambubioside-5-O-glucoside chloride</i>
Dp-3-rut	<i>Delphinidin-3-O-rutinoside chloride</i>
ERK	<i>Extracellular signal-related kinase</i>
GAPDH	<i>Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>
GBM	Glioblastome multiforme
GLUT-1	Transporteur de glucose-1
HBMEC	Cellules microvasculaires de l'endothélium cérébral humain
HIF-1 $\alpha$	<i>Hypoxia-inducible factor 1<math>\alpha</math></i>
MAP kinase	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
O <sub>2</sub>	Oxygène
OMS	Organisation mondiale de la santé
p21	Protéine tumorale 21
p27	Protéine tumorale 27
p53	Protéine tumorale 53
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PI	Iodure de propidium
pRb	Protéine du rétinoblastome
Que-3-rut	<i>Quercetin-3-O-rutinoside</i>
ROS	Espèces réactives d'oxygène

SNC

Système nerveux central

VEGF

Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire

## RÉSUMÉ

Les gliomes sont la cause la plus importante de décès reliés aux tumeurs malignes du système nerveux central chez l'adulte. Parmi les plus agressives, on retrouve le glioblastome multiforme, un astrocytome de grade IV, et l'oligodendrogliome de grade III. La croissance accrue de ces tumeurs aboutit, par manque de perfusion sanguine, à des foyers nécrotiques et hypoxiques. L'apport nécessaire en oxygène et en nutriments est subséquentement fourni par l'induction du processus d'angiogenèse tumorale, marquée par la prolifération des cellules endothéliales des microvaisseaux cérébraux. Cette néovascularisation rend ces tumeurs résistantes aux traitements traditionnels : la prévention est donc primordiale et débute par l'adoption d'une saine hygiène de vie, qui inclut une diète abondante en végétaux. Les baies de sureau regorgent de polyphénols, des phytochimiques réputés pour leur puissant pouvoir antioxydant. On note parmi ceux-ci les anthocyanes, responsables des pigments violacés des baies et les flavonols, présents également dans les fleurs. Même si les propriétés chimiopréventives de ces molécules sont connues, les baies et les fleurs du sureau blanc du Canada (*Sambucus canadensis*) n'ont pas été testées sur des cellules cancéreuses.

L'objectif de ce mémoire de recherche est de caractériser, pour la première fois, le pouvoir antiprolifératif du sureau du Canada sur trois lignées de gliomes et une lignée endothéliale microvasculaire cérébrale en conditions normoxiques et hypoxiques. Nous avons démontré que trois extraits de baies (extrait concentré à froid et extraits des cultivars Kent et Scotia) ainsi qu'un extrait de fleurs (Scotia) inhibent la prolifération des cellules U-87 MG, U-138 MG, Hs 683 et HBMEC dans les deux conditions de culture. Ces effets antiprolifératifs se sont traduits par la perturbation des phases G0/G1, S et G2/M du cycle cellulaire. L'expression protéique des complexes régulant le cycle cellulaire, dont les cyclines D1 et D3, les CDK2, -4 et -6 et les CKI p21 et p27, a été affectée, expliquant les changements dans la distribution des phases et l'induction subséquente de l'apoptose. Cinq composés phénoliques majeurs présents dans les baies et/ou les fleurs ont démontré un pouvoir antiprolifératif sur l'ensemble des lignées cellulaires à l'étude. Cependant, un effet synergique a été observé lorsque ces molécules sont mises ensemble et renforce l'idée que l'on doit privilégier la consommation des aliments dans leur entièreté pour en obtenir tous les effets bénéfiques.

Collectivement, nos résultats indiquent que les molécules présentes dans les extraits de baies et des fleurs du sureau du Canada pourraient être en mesure d'altérer certains mécanismes moléculaires en contrôlant la croissance des tumeurs, en ciblant à la fois les gliomes et les cellules endothéliales du compartiment vasculaire.

**Mots clés :** Cellules endothéliales cérébrales; Baies; Fleurs; Gliomes; Hypoxie, Prolifération cellulaire; Chimioprévention; Sureau du Canada.

## INTRODUCTION

### 1. Le cancer

#### 1.1. Généralités

Le corps humain est un ensemble hiérarchisé d'organes, de tissus et de cellules, où ces dernières possèdent un rôle bien précis afin de maintenir l'homéostasie, processus visant l'équilibre et le bon fonctionnement d'un système entier. Le cancer, où des cellules transformées sont ultimement amenées à proliférer de façon incontrôlée est un parfait exemple de bris d'homéostasie (Banfalvi, 2013). La prolifération anormale n'est cependant pas la seule caractéristique des cellules tumorales. En effet, six capacités distinctes et complémentaires définissent le cancer, soit la présence de signaux de prolifération soutenus; l'évasion des suppresseurs de croissance, l'invasion et la formation de métastases; la réplication cellulaire infinie; l'induction de l'angiogenèse et la résistance à la mort cellulaire (Figure 1.1) (Hanahan & Weinberg, 2011).

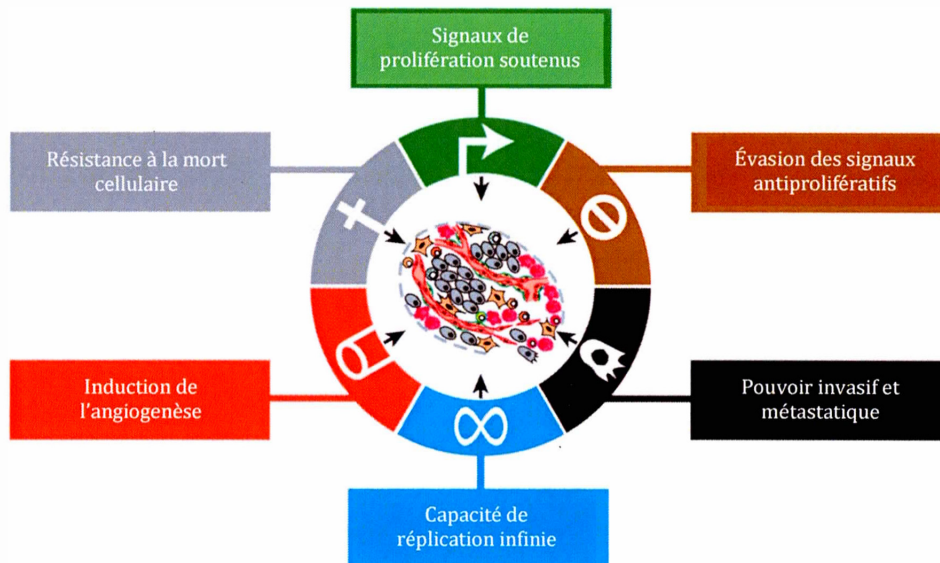


Figure 1.1 : Caractéristiques acquises par la cellule cancéreuse. Figure adaptée de (Hanahan & Weinberg, 2011).

La transformation de la cellule saine à la cellule cancéreuse comporte plusieurs étapes, dont trois principales, étudiées et établies au fil du temps (Berenblum & Shubik, 1947) (Foulds, 1954). Elles sont l'initiation, la promotion et la progression (Figure 1.2) (Baba & Câtoi, 2007). L'initiation représente le moment où une cellule saine devient anormale de façon spontanée ou sous l'influence d'agents initiateurs. Ces derniers, de nature physique, chimique ou biologique, peuvent causer des dommages irréversibles à la cellule, que ce soit des modifications génétiques ou épigénétiques. Bien souvent, la cause exacte de mutations demeure inconnue. Le système de réparation de dommages à l'ADN que met en branle la cellule n'est pas infaillible et si les lésions ne sont pas réparées ou si la cellule endommagée n'est pas éliminée, ces mutations seront transmises à la prochaine génération de cellules (Ruddon, 2007) (Société canadienne du cancer, 2017).

Une fois la cellule initiée, des étapes de mutagenèse successives sont nécessaires afin de poursuivre l'évolution tumorale. Des promoteurs, des hormones ou des médicaments par exemple, agissent pour la plupart au niveau de la membrane cellulaire plutôt qu'au niveau de l'ADN, rendant les cellules initiées indépendantes des signaux de différenciation et de prolifération qui régulent étroitement les cellules saines (Baba & Câtoi, 2007), souvent par l'activation de proto-oncogènes ou par l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs (Weston & Harris, 2003). Les agents promoteurs, qui ne sont pas carcinogènes en eux-mêmes, agissent en promouvant la sélection clonale et la prolifération des cellules initiées. La phase de promotion est potentiellement réversible par l'action d'agents anticancer (Ruddon, 2007) et plusieurs tumeurs n'acquerront jamais le phénotype malin et resteront bénignes, soit non-agressives.

La phase de progression survient finalement lorsque les cellules transformées acquièrent, avec le temps, les caractéristiques associées aux tumeurs malignes. La masse de cellules, en plus d'être autonome et autosuffisante, devient très instable et hétérogène d'un point de vue génique (Weston & Harris, 2003), en plus d'échapper désormais aux mécanismes de défense de l'hôte (Ruddon, 2007). La tumeur, ou néoplasme, peut même progresser jusqu'au stade métastatique lorsque les cellules se

détachent de la tumeur primaire et envahissent les tissus et organes sains par le biais de la circulation sanguine ou lymphatique (Wong & Hynes, 2006). De ce fait, les métastases représentent la principale cause de décès par cancer (Organisation mondiale de la santé, 2017).

Le cancer, de façon générale, est considéré comme une maladie non transmissible et chronique. La chronicité étant caractérisée par une évolution lente et par une persistance dans l'organisme. Seulement 5 à 10% des cancers sont considérés comme héréditaires (Nagy, Sweet, & Eng, 2004), la portion restante étant une conséquence de notre mode de vie et de notre environnement (Amand et al., 2008). Les cinq principaux facteurs de risque attribuables à notre mode de vie que l'on peut modifier sont le tabagisme, la consommation excessive d'alcool, l'alimentation, la sédentarité et la surcharge de poids. On considère d'ailleurs que plus d'un décès sur trois relié au cancer est associé à l'un de ces facteurs (Islami, et al., 2017). Le vieillissement représente également un facteur de risque évident, puisque la période d'exposition à notre environnement et la période de latence des tumeurs augmentent avec le temps. De ce fait, le cancer constituait à lui seul déjà la deuxième cause de mortalité au monde en 2015 et son incidence devrait augmenter de 70% d'ici les deux prochaines décennies (Organisation mondiale de la santé, 2017). Les facteurs environnementaux étant potentiellement modifiables, la prévention est donc de mise pour aspirer à gagner la guerre au cancer, lutte que l'on ne cesse de perdre malgré plus de 40 ans de recherche intensive (Amand et al., 2008).

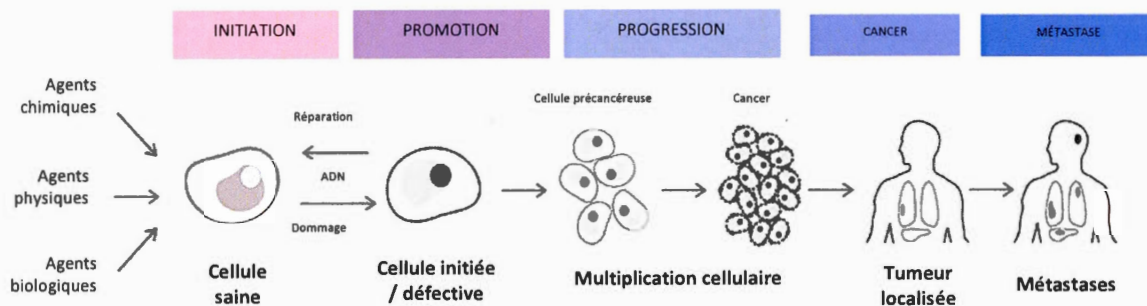


Figure 1.2 : Étapes de développement de la cellule cancéreuse. Une cellule saine acquiert initialement des lésions à l'ADN et, suite à des séries de mutations subséquentes et pressions de sélection, la cellule progresse en une tumeur maligne, cliniquement détectable. Figure adaptée (Roomi, Shanker, Niedwiecki, & Rath, 2016).

## 1.2. Tumeurs des cellules gliales

### 1.2.1. Généralités

Les cellules gliales forment un tissu appelé glie (venant de *glue* en anglais) qui compose l'environnement des neurones. Elles détiennent un rôle de soutien, de protection et de nutrition pour ces derniers. On distingue trois principaux types de cellules qui composent la glie du système nerveux central (SNC) : les astrocytes, les oligodendrocytes et les épendymocytes. Les cancers du cerveau prennent généralement forme à partir de ces cellules et sont nommés gliomes (Société canadienne du cancer, 2017). Ils sont d'ailleurs la cause la plus importante de décès reliés aux tumeurs malignes du SNC. Les astrocytomes, tumeurs dérivées des astrocytes, sont les plus fréquentes, soit de 60 à 70%, alors que les oligodendrogliomes et les épendymomes représentent de 5 à 30% et moins de 10% des gliomes, respectivement (Mrugala, 2013). Chaque type de tumeur associé aux différentes cellules est classé selon un système de grades qui en définissent la gravité. Plusieurs études ont identifié certains facteurs de risque potentiels des cancers gliaux, incluant les radiations ionisantes et la génétique. L'impact des radiations non-ionisantes provenant entre autres de téléphones portables restent encore controversé par la communauté scientifique (Reni, Mazza, Zanon, Gatta, & Vecht, 2017)



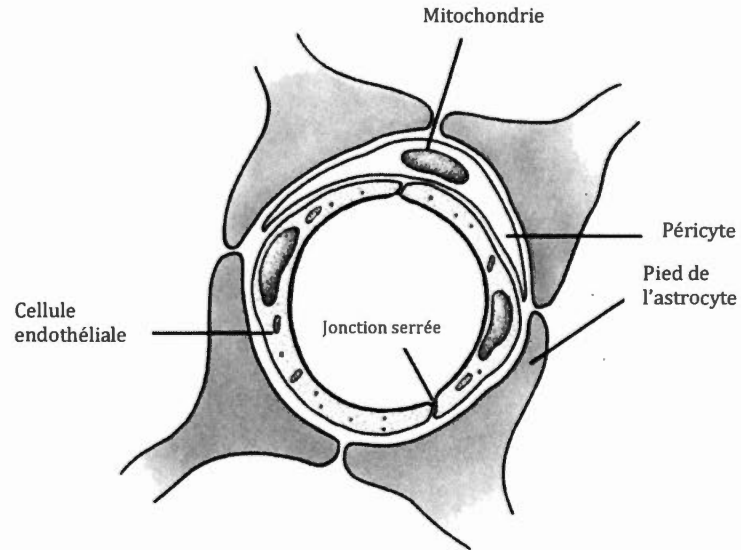
Les astrocytomes se divisent en quatre grades selon l'Organisation mondiale de la santé (OMS). Les tumeurs de grade I et II sont considérées comme de bas grades, les cellules étant encore différenciées et de croissance lente. La tumeur de grade I, l'astrocytome pilocytique, se présente généralement sous forme de kystes non invasifs qui ne récidivent pas une fois enlevés. À partir du grade II, les astrocytomes sont dits infiltrants, ou diffus. La tumeur de grade II est potentiellement maligne : son pouvoir invasif est modeste, mais le cancer peut récidiver si enlevé ou encore évoluer en grade plus élevé. Les néoplasmes de grade III, comme l'astrocytome anaplasique, et de grade IV, tel que le glioblastome multiforme (GBM), sont des tumeurs malignes de haut grade et posent un problème de santé plus sérieux. La croissance des cellules est très rapide, les tumeurs sont invasives et les cellules présentent une morphologie anormale et non différenciée (Société canadienne du cancer, 2017) (Xie, Mittal, & Berens, 2014). La vasculature, le réseau de vaisseaux sanguins qui alimente la tumeur, devient également beaucoup plus dense comparativement au reste du cerveau. Cela est particulièrement remarquable chez les GBM, qui représentent de 50 à 60% de tous les astrocytomes, où l'on peut distinguer une hyperplasie microvasculaire près des foyers de nécrose. Cette forme d'angiogenèse est induite par les cellules (pseudo-palissadiques) hypoxiques (Kaur, Tan, Brat, Post, & Van Meir, 2004). De faibles tensions d'oxygène représentent un puissant activateur de ce processus : les cellules produisent de fortes concentrations de cytokines proangiogéniques, dont le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF), entraînant la prolifération des cellules endothéliales des vaisseaux sanguins adjacents (Kaur, Tan, Brat, Post, & Van Meir, 2004).

Les tumeurs dérivées des oligodendrocytes sont classées selon l'OMS en deux grades : l'oligodendrogliome de bas grade (II) et l'oligodendrogliome anaplasique, de haut grade (III) (Branle, et al., 2002). La tumeur de grade II progresse lentement, pouvant prendre plusieurs années avant de causer des symptômes apparents. Au contraire, l'oligodendrogliome de grade III présente des cellules de morphologie anormale (anaplasie) et évolue rapidement (Société canadienne du cancer, 2017).

### 1.2.2.Barrière hématoencéphalique

Le cerveau humain est alimenté par un réseau de capillaires sanguins dont la longueur s'estime à 600 km chez l'adulte (Zlokovic, 2005). Certaines fonctions des artérioles et veinules se distinguent de celle des autres capillaires du corps. Ce réseau de capillaire, appelé barrière hématoencéphalique (BHE), est effectivement critique pour réguler le passage des molécules que contient le sang jusqu'au cerveau et vice-versa (Wong, Ye, Levy, Rothstein, Bergles , & Searson, 2013).

Les cellules endothéliales, principales composantes de cette barrière, tapissent l'intérieur des vaisseaux sanguins de façon étroite et sont liées les unes aux autres grâce aux jonctions serrées (Zhao, Nelson, Betsholtz, & Zlokovic, 2015). La capacité de sélectionner ou d'exclure les molécules chimiques est reliée à la membrane plasmique des cellules de l'endothélium. Elle laisse passer par diffusion simple l'oxygène vers le cerveau et le dioxyde de carbone vers le sang. Certaines molécules comme le glucose, et autres composés passent par diffusion facilitée, ayant chacun leur transporteur respectif (Zhao, Nelson, Betsholtz, & Zlokovic, 2015). Le glucose, par exemple, se rend par le transporteur GLUT-1 (*Glucose transporter 1*), une protéine d'ailleurs régulée à la hausse en condition d'hypoxie (Joseph, et al., 2015). Cependant, les toxines et autres molécules étrangères, incluant la plupart des composés thérapeutiques, sont rejetées dans le sang par transport actif via des pompes à efflux, rendant le cerveau pharmaco-résistant (Zhao, Nelson, Betsholtz, & Zlokovic, 2015).



*Figure 1.3 : Structures de la barrière hématoencéphalique. Les capillaires sanguins, formés de cellules endothéliales et de péricytes et entourés des pieds des astrocytes, permettent l'entrée et la sortie des substances du sang au cerveau. Figure adaptée (Noback, Strominger, Desmarest, & Ruggiero, 2005).*

Environ 20% de l'endothélium est directement recouvert de péricytes, cellules provenant de la lignée des cellules musculaires lisses. De par leur propriété de contraction, les péricytes et les cellules endothéliales régulent le flot sanguin en diminuant ou en augmentant le diamètre de la lumière. Les cellules endothéliales et les péricytes sont incorporés dans une membrane basale, composée principalement de laminine, de collagène de type IV, de protéoglycanes, de sulfate d'héparane et de fibronectine (Fricker, Ott, & Mahringer, 2014). À cette structure s'associent les pieds des astrocytes, comme démontré à la Figure 1.3 (Noback, Strominger, Desmarest, & Ruggiero, 2005).

### 1.2.3. Angiogenèse tumorale

Le processus par lequel de nouveaux vaisseaux sanguins sont formés à partir de vaisseaux préexistants se nomme l'angiogenèse, à l'opposé de la vasculogenèse, qui implique la formation de vaisseaux sanguins de toute pièce à partir de cellules progénitrices (Dudley, 2012). L'angiogenèse physiologique, essentielle au développement embryonnaire et à la réparation de tissus lésés, est finement régulée

grâce à une balance entre des facteurs pro et antiangiogéniques (Bergers & Benjamin, 2003). Ce déséquilibre induit une angiogenèse pathologique (Figure 1.4) et la croissance des nouveaux capillaires devient incontrôlée ou insuffisante (Bergers & Benjamin, 2003). On l'observe dans plusieurs maladies et désordres inflammatoires endothéliaux, incluant le cancer, l'athérosclérose, l'obésité ou encore le diabète de type 2 (Cao, 2010). L'angiogenèse tumorale se reflète par une vasculature désorganisée et chaotique (Carmeliet & Jain, 2000) et est causée par la tumeur elle-même (Metges, Volant, Pera, & Robaszkiewicz, 2005). Ce switch angiogénique, qui peut survenir à n'importe quel stade de la progression du cancer, dépend du type de tumeur et de son microenvironnement et est parfois associé à l'agressivité de la tumeur, comme c'est le cas pour les glioblastomes (Bergers & Benjamin, 2003). Les cellules des tumeurs gliales sont parmi les plus sensibles aux niveaux d'oxygène et dès l'instant où le réseau de capillaires sanguins ne supporte plus les demandes en nutriments et en oxygène nécessaires à la croissance de celles-ci, la nécrose qui en résulte provoque l'induction de l'angiogenèse (Shweiki, Itin, Soffer, & Keshet, 1992). La restauration de l'apport en nutriments et de l'oxygénation rend la tumeur particulièrement agressive et proliférative (Bergers & Benjamin, 2003).

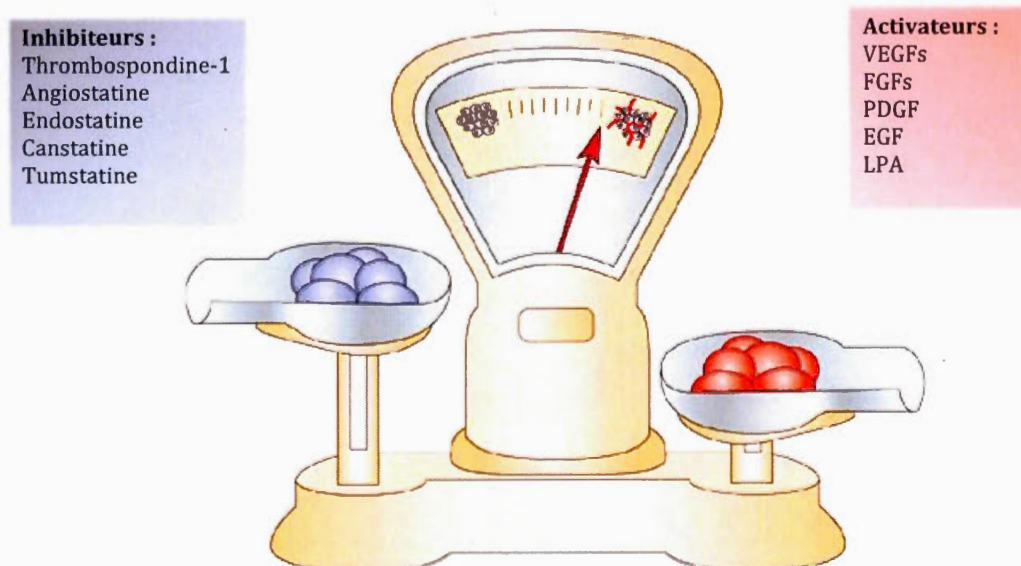


Figure 1.4 : Une perte de balance appropriée entre les facteurs anti et pro-angiogéniques provoque une angiogenèse pathologique. Ce « switch » angiogénique est fréquemment observé dans les tumeurs solides. Figure adaptée (Bergers & Benjamin, 2003).

On distingue deux types d'angiogenèse : par bourgeonnement (*sprouting*) et par intussusception (*splitting*) (Carmeliet & Jain, 2000). Dans le premier cas, la matrice extracellulaire est dégradée par des protéases pour permettre la prolifération des cellules endothéliales et la formation de la lumière du nouveau vaisseau sanguin. Se forme ensuite la membrane basale, puis les cellules musculaires et les péricytes sont recrutés afin de compléter le nouveau vaisseau sanguin (Kaur, Tan, Brat, Post, & Van Meir, 2004). L'intussusception, que l'on pourrait traduire par « scission », est un processus plus rapide que celui précédemment expliqué et qui consiste en la division d'un capillaire pour en former deux autres (Carmeliet & Jain, 2000)). Les deux types sont retrouvés dans l'angiogenèse tumorale.

Chez l'adulte, en condition physiologique, on estime que plus de 99% des cellules endothéliales qui composent la vasculature ne prolifèrent pas (Carmeliet & Jain, 2000). L'endothélium, caractérisé comme un organe fonctionnel, dynamique et hautement spécialisé, répond et s'adapte selon les signaux qui lui sont envoyés (Dudley, 2012). Plusieurs stimuli peuvent induire l'angiogenèse, dont l'inflammation, le stress mécanique causé par la pression des cellules en prolifération ou encore par des mutations dans les gènes impliqués dans le processus (Carmeliet & Jain, 2000). Le stress métabolique, incluant de faibles tensions d'oxygène, consiste en un autre puissant activateur de l'angiogenèse et représente un phénomène particulièrement pertinent dans la croissance des tumeurs. Les familles des VEGF et Ang (*Angiopoietin*) sont de puissants facteurs proangiogéniques qui activent la prolifération des cellules endothéliales (Figure 1.5) (Carmeliet & Jain, 2000). Il y a déjà plus de 45 ans que l'hypothèse selon laquelle la croissance des tumeurs et la formation de métastases dépendent de l'angiogenèse a été formulée, ouvrant la voie à une nouvelle cible thérapeutique anticancer (Folkman, 1971). Encore aujourd'hui, ce processus est accepté unanimement par la communauté scientifique (Hanahan & Weinberg, 2011) (Bienlenberg & Zetter, 2015).

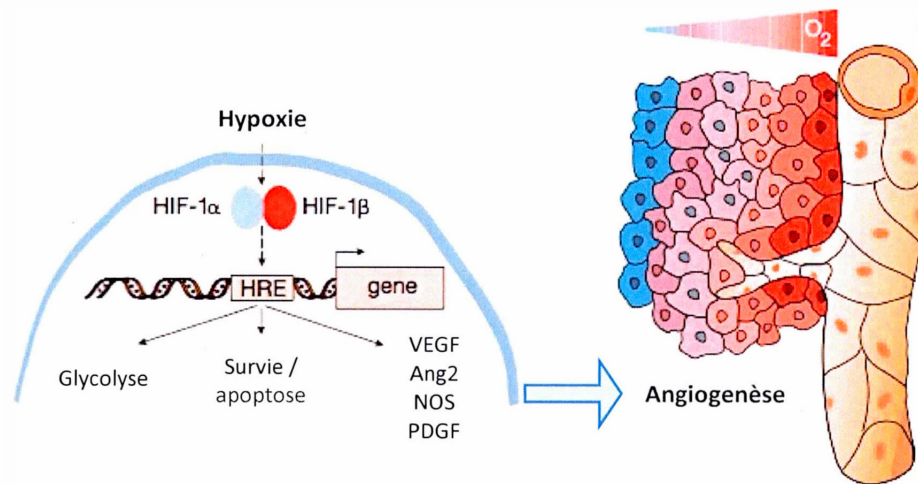


Figure 1.5 : Rôle de l'hypoxie dans l'induction de l'angiogenèse. De faibles tensions d'oxygène induisent, par l'intermédiaire du facteur de transcription HIF-1 $\alpha$ , l'expression plusieurs gènes responsables de l'activation de l'angiogenèse. Figure adaptée (Carmeliet & Jain, 2000).

#### 1.2.4. Inefficacité des thérapies traditionnelles

Les traitements standards des tumeurs cérébrales incluent, lorsque possible, la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie. Malheureusement, les gliomes et principalement les GBM sont difficilement curables pour des raisons intrinsèquement liées à leur localisation et leurs caractéristiques. Ils sont hautement prolifératifs, possèdent un pouvoir invasif puissant et atteignent parfois des régions du cerveau trop importantes, ce qui rend leur résection complète souvent impossible (Mrugala, 2013). En plus d'induire une néoangiogenèse massive, le caractère hypoxique des gliomes provoque également des changements moléculaires majeurs dans les cellules cancéreuses, par l'activation de facteurs de transcription, et permet ainsi leur adaptation à leur microenvironnement (Amberger-Murphy, 2009). Aussi, il est intéressant de noter que les cellules en hypoxie sont de 2.5 à 3 fois plus résistantes à la radiothérapie (Moeller, Richardson, & Dewhirst, 2007).

La néoangiogenèse massive, induite par le caractère hypoxique de la tumeur, contribue également à son agressivité et donc à la résistance naturelle à la radiothérapie et à la chimiothérapie (Veliz, Loo, Castillo, Karachaliou, Olga, & Rosell, 2015). La présence de la BHE, telle que mentionnée plus haut, ajoute également à la chimiorésistance.

## 2. Prolifération cellulaire et sa régulation dans les tumeurs gliales

Une cellule normale se réplique essentiellement lorsqu'elle en reçoit le signal, généralement via des facteurs extracellulaires de croissance ou de survie. D'ailleurs, chez l'adulte, la majorité des cellules ne se divisent pas. On dit qu'elles sont quiescentes si leur état est transitoire ou sénescents si celui-ci est permanent. C'est également le cas pour les cellules qui ont terminé leur différenciation (Otto & Sicinski, 2007). Les raisons d'entrer et de progresser dans le cycle cellulaire incluent le remplacement des cellules qui sont rapidement éliminées, comme celles de la peau et du système digestif, l'activation du système immunitaire adaptatif, l'hématopoïèse et la réparation des tissus lésés par une blessure (Jacob & Cook, 2016). Dans tous les cas, la cellule doit recevoir un signal externe qui lui indique de se diviser.

Pour répliquer son ADN et se diviser, la cellule passe par ce que l'on nomme le cycle cellulaire, processus finement régulé afin de conserver l'intégrité de la cellule. Quatre grandes étapes sont nécessaires : les phases  $G_1$ , S,  $G_2$  et M (Figure 1.6). Les cellules en quiescence, qui ne se répliquent pas, sont considérées comme étant hors du cycle cellulaire, en phase  $G_0$ . Les phases qui servent à préparer la cellule à entrer en mitose ( $G_1$ , S et  $G_2$ ) peuvent aussi être regroupées dans une grande phase, nommée interphase, où les chromosomes sont difficilement visibles au microscope (Karp, 2009) (Alberts, et al., 2013). Les processus de régulation impliquent plusieurs familles de protéines, dont deux principales, qui orchestrent la progression à travers toutes les phases du cycle : les cyclines et les kinases dépendantes des cyclines (CDK). Les CDK, une fois activées par les cyclines, forment un complexe avec celles-ci et permettent la phosphorylation de plusieurs substrats, le principal étant la protéine du gène du rétinoblastome (pRb), un gène suppresseur de tumeur particulièrement étudié et fonctionnellement inactivé dans la plupart des cancers humains (Giancinti & Giordano, 2006). Pleinement phosphorylé, pRb se dissocie des facteurs de transcription E2F et permet à ceux-ci de transcrire les gènes nécessaires à la transition  $G_1/S$  et à l'entrée en phase S (Seville, Shah, Westwell, & Chan, 2005). Les différents complexes cyclines-CDK sont formés à des moments précis du cycle.





(Giancinti & Giordano, 2006). Ce sont les facteurs de croissance extérieurs ou mitogènes qui stimulent la cellule et l'incitent à proliférer. Ce signal est nécessaire dans les deux premiers tiers de la phase G1 et met en branle une panoplie de réactions qui mèneront à la division de la cellule. Les mitogènes activent les cyclines, qui activent à leur tour les CDK. Vers le milieu de la phase G1, le complexe CyclineD-CDK4/6 est formé et activé, tandis que le complexe CyclineE-CDK2 est fonctionnel vers la fin de la phase. La protéine Rb, substrat de ces complexes, subira de multiples phosphorylations pour induire sa dissociation des facteurs de transcription E2F, permettant ainsi à ces derniers d'induire l'expression des gènes qui permettent la progression en phase S (Morgan, 2007). La protéine Rb maintiendra un niveau de phosphorylation élevé jusqu'à la fin de la phase M (Giancinti & Giordano, 2006).

De plus, la décision de répliquer l'ADN étant irréversible, il est donc primordial que celui-ci soit intact (Jacob & Cook, 2016). Les dommages mineurs à l'ADN sont généralement rapidement réparés sans avoir recours à la réponse aux dommages à l'ADN (*DNA damage response*, DDR), contrairement aux lésions majeures telles que les cassures double-brins, par exemple. Selon le cas, un arrêt de la progression de la cellule peut survenir, résultant de l'accumulation de phosphorylation inhibitrice sur CDK2. On peut également observer, dans la phase retardée, une augmentation et une activation du produit d'un autre gène suppresseur de tumeurs, p53, qui encode un suppresseur de tumeur à l'image de pRb. Celui-ci induit entre autres une hausse d'expression de l'inhibiteur de CDK (CKI) p21, qui inhibe le complexe CycE-CDK2. Cette phase induit souvent la mort par apoptose lorsque les lésions sont irréparables et que l'arrêt en phase G1 est prolongé (Morgan, 2007). Fait intéressant, les protéines p21 et p27, initialement découvertes comme inhibiteurs des complexes cyclines-CDK, ont également des fonctions anti-apoptotique et proliférative. Des études récentes ont démontré qu'elles pouvaient activer, par une régulation positive de ces complexes, le cycle cellulaire (Abbas & Dutta, 2009). La décision entre ces fonctions opposées serait due aux différents motifs de phosphorylation sur les protéines (Abukheir & Park, 2009).

### 2.1.2. Phase S

La phase S est la phase de réplication d'ADN et de la duplication des chromosomes, S signifiant en anglais *synthesis*. L'initiation dépend, comme mentionnée précédemment, du complexe CycE-CDK2 mais la progression dans la phase est régulée par la cycline A et son interaction avec CDK2. Durant la phase de réplication, des lésions présentes dans l'ADN à dupliquer provoquent, entre autres, un arrêt à la fourche de réplication et l'inhibition de l'activité aux origines de réplifications. Cette réponse, en activant la protéine kinase ATR, assure non seulement la réparation des lésions, mais envoie également des signaux inhibiteurs à la kinase CDK1 et aux cyclines qui lui sont associées en G2 (cycline A) et en M (cycline B), qui régulent la progression du cycle vers la mitose (Morgan, 2007).

### 2.1.3. Phase G2 et la progression en phase M

La phase G2 est une période de croissance et de synthèse protéique, où la cellule se prépare à entrer en mitose et où elle doit donc acquérir assez de métabolites pour se diviser. À l'instar de la phase G1, la phase G2 comporte un point de régulation (checkpoint G2/M) qui assure que le matériel génétique précédemment répliqué de la cellule soit intact (Morgan 2007). La régulation peut être dépendante ou non de la protéine p53 et implique également la protéine p21, connue pour inhiber CDK1. Bien que les points de régulation en phase S et en phase G2 aient comme objectif de bloquer l'entrée en mitose, la finalité des deux événements est différente. En effet, les cellules ayant de l'ADN endommagé arrêteront complètement leur progression du cycle (Taylor & Stark, 2001). L'initiation de la mitose est régulée par l'augmentation de la cycline B, à la fin de l'intervalle G2, et permet l'activation de son partenaire d'interaction CDK1 (Giancinti & Giordano, 2006).

#### 2.1.4. Phase M

La mitose, ou phase M, est divisée en deux grands événements : la division du noyau et la cytokinèse (séparation de toutes les constituantes pour former deux cellules-filles distinctes). La division du noyau comprend cinq phases distinctes : la prophase, la prométaphase, la métaphase, l'anaphase et la télophase (Morgan, 2007). Le troisième point de contrôle du cycle survient durant la métaphase et s'assure du bon alignement des chromosomes sur le fuseau mitotique (Kops, Weaver, & Cleveland, 2005). Celui-ci consiste en un système dynamique (polymérisation et dépolymérisation des microtubules) permettant la répartition correcte des chromosomes dans les deux cellules-filles (Walczak & Heald, 2008).

#### 2.1.5. Cycle cellulaire et cancer

La cellule cancéreuse en général, caractérisée par son aptitude à proliférer indépendamment des signaux de croissance et par sa capacité à survivre malgré des signaux de mort cellulaire, possède des mutations dans pratiquement toutes les étapes du cycle cellulaire. Les proto-oncogènes, qui regroupent l'ensemble des gènes qui favorisent la croissance des cellules comme les récepteurs de mitogènes, deviennent oncogéniques une fois mutés (Morgan, 2007). Ces mutations sont d'ailleurs souvent dominantes. À l'inverse, les produits des gènes suppresseurs de tumeurs, qui détectent ou réparent les dommages à l'ADN ou encore qui induisent un arrêt prolifératif le temps de la réparation, deviennent inactifs une fois mutés, ce qui cause une poursuite du cycle cellulaire malgré des conditions défavorables (Morgan, 2007). Les cellules cancéreuses deviennent ainsi indépendantes des signaux de prolifération ou d'arrêt du cycle et progressent malgré des lésions à l'ADN (Hartwell & Kastan, 1994). Par exemple, une mutation au gène produisant la protéine CDK1 dans la levure *Schizosaccharomyces pombe* rend celle-ci capable d'entrer en mitose malgré une réplication de l'ADN incomplète (Enoch & Nurse, 1990) et les glioblastomes ont souvent des mutations dans les proto-oncogènes tels que CDK4 (Kaur, Tan, Brat, Post, & Van Meir, 2004). Les

protéines contrôlant le cycle cellulaire sont normalement régulées par ubiquitination et par dégradation via le protéasome, processus devenant dérégulés lors de la transformation cancéreuse. Ainsi, l'expression de p27 est graduellement diminuée plus l'anaplasie cellulaire augmente et la protéine est pratiquement absente chez les astrocytomes de grade IV, ne pouvant plus inhiber efficacement la progression des cellules en phase S (Vlachostergios, Voutsadakis, & Papandreou, 2012). Concernant le cycle cellulaire des GBM, il est intéressant de noter que des tensions pathologiques d'oxygène, soit une hypoxie prolongée, ne causent pas l'arrêt de la progression des cellules, pas plus qu'un changement dans l'expression de p21, montrant que ce sont des tumeurs particulièrement agressives et prolifératives, même en hypoxie (Richards, Jenkinson, Haylock, & See, 2016).

Le contrôle du cycle cellulaire est donc central à la prévention et au traitement des tumeurs des cellules gliales et une des approches prometteuses est la neutraceutique. L'impact de la nutrition sur le cancer est détaillé à la prochaine section.

### 3. Nutrition et cancer

#### 3.1. Généralités / prévention

D'un point de vue historique, le lien entre l'alimentation et la maladie ne date pas d'hier. En effet, déjà en 168 avant J.-C., le médecin grec Claude Galien proposait l'idée que la nourriture était non seulement nécessaire, mais avait un pouvoir thérapeutique et bénéfique pour notre corps (Rocca, 2003) (Mayne, Playdon, & Rock, 2016). Il s'est accumulé depuis une quantité impressionnante de données abondant dans ce sens, autant épidémiologiques, cliniques ou provenant d'expériences en laboratoire. C'est d'ailleurs en 1981, dans *The Causes of Cancer*, que les épidémiologistes Richard Doll et Richard Peto évaluent l'impact de l'alimentation aux États-Unis sur la formation de cancers à 35% (Richard & Richard Peto, 1981). À ce jour encore, on estime que 30 à 35% des cancers seraient attribuables à l'alimentation et il est même estimé que 70% des cancers colorectaux chez la population américaine pourraient être prévenus par une modification du mode de vie (Platz, Willet, Colditz, Rimm, Spiegelman, &

Giovannucci, 2000). Plusieurs raisons, directes et indirectes, expliquent l'impact de la diète sur la formation de tumeurs. D'une part, la diète occidentale et le mode de vie qui lui est associé ont un impact considérable sur la surcharge pondérale et l'obésité, ce qui crée un microenvironnement inflammatoire propice au développement de cellules tumorales. Cela inclut entre autres une consommation excessive de gras saturés et trans, de sucre et de céréales raffinés ainsi que de viande rouge et transformée (Amand et al., 2008). D'autre part, la consommation de végétaux, incluant fruits, légumes, épices et grains entiers, est nettement sous-représentée dans l'alimentation occidentale. Pourtant, ces aliments fournissent une quantité phénoménale de composés bioactifs, ou phytochimiques, dont des études récentes soulignent le potentiel chimiopréventif (Kristo, Klimis-Zacas, & Sikalidis, 2016), en plus de fournir une faible teneur en gras *trans* et saturé (Tuso, Ismail, Ha, & Bartolotto, 2013). On retrouve, par exemple, dans l'écorce des agrumes, du d-limonène, une molécule de la famille des terpénoïdes connue entre autres pour son potentiel antiprolifératif et ses capacités à moduler le système immunitaire (Miller, Thompson, Hakim, Sherry Chow, & Thomson, 2011). À l'instar des agrumes, les crucifères représentent également une famille de légumes contenant plusieurs composés bioactifs, dont le sulforaphane, connu entre autres pour ses propriétés anti-apoptotique et anti-inflammatoire (Mokhtari, et al., 2017).

D'autres facteurs mettent également en lumière le besoin criant de prévention, à commencer par la stable augmentation de diagnostics de cancers (Mayne, Playdon, & Rock, 2016). Certains agents chimiothérapeutiques utilisés aujourd'hui de façon prophylactique existent et réduisent efficacement le risque chez des personnes cibles, mais comportent souvent de sérieux effets secondaires, surtout si on considère la prise à long terme de ces médicaments chez des personnes à priori en santé. De ceux-ci, on note le Tamoxifène, qui inhibe de 50% l'apparition de cancers du sein chez des femmes considérées à risque, mais qui peut provoquer des caillots sanguins, des troubles oculaires et des cancers de l'utérus (Kramer & Brown, 2004). Le Finasteride, qui réduit de 25% les cancers de la prostate chez les hommes à haut risque, est un médicament ayant comme effets secondaires la diminution de la fonction érectile et de la libido, l'impotence et la gynécomastie (Hamdy & Rouprêt, 2008). Le besoin d'agents préventifs

sécuritaires, efficaces et peu coûteux est bien réel, et l'intérêt grandissant pour la nutraceutique le démontre bien (Amand et al., 2008).

### 3.2. Composés phytochimiques

De façon générale, les phytochimiques sont des molécules non-nutritives retrouvées dans les végétaux, auxquelles on associe les bienfaits sur la santé. Certains agissent à titre de défense contre les agressions chimiques et biologiques, étant le résultat d'un long processus évolutif permettant la préservation des plantes (Dillard & German, 2000) et d'autres sont responsables de la pigmentation ou des propriétés organoleptiques des fruits et légumes, comme les caroténoïdes chez la carotte (Khoo, Prasad, Kong, Jiang, & Ismail, 2011) ou l'odeur caractéristique de l'ail causée par les composés organosulfurés (Iciek, Kwiecien, & Wlodek, 2009). La liste inclut les polyphénols, la plus grande famille de phytochimiques. Comme le nom l'indique, ces molécules organiques sont constituées de plusieurs groupements phénols (groupements hydroxyle sur un ou plusieurs benzènes). Les propriétés antioxydantes et antiinflammatoires qu'on leur associe font de ces molécules des candidats fort pertinents pour la lutte au cancer par le biais de l'alimentation (Kristo, Klimis-Zacas, & Sikalidis, 2016).

#### 3.2.1. Polyphénols et flavonoïdes

Les polyphénols sont des métabolites secondaires des plantes impliqués dans la défense contre diverses agressions, incluant les changements de conditions climatiques, la pollution, les pathogènes et le stress oxydatif (Tsao, 2010). Les polyphénols, dénombrés à plus de 8 000 molécules, se déclinent en plusieurs sous-groupes selon la structure chimique de leur forme aglycone. En effet, ils sont généralement glycosylés dans leur état naturel (Tsao, 2010). Il est possible de diviser les polyphénols en deux grands groupes, soit les composés non flavonoïdes, qui incluent les acides phénoliques, les stilbènes et les lignanes, et les composés comportant un squelette flavonoïde (Goszcz,

Deakin, Duthie, Stewart, Leslie, & Megson, 2015). La classification de ces derniers est également complexe, d'autant plus qu'il en existe plus de 6 000 (Kristo, Klimis-Zacas, & Sikalidis, 2016). De manière générale, les flavonoïdes sont connus pour leur potentiel préventif envers diverses maladies, autant chroniques comme les cancers et les maladies cardiovasculaires que les infections virales (González-Vallinas, González-Castejon, Rodriguez-Casado, & Ramirez de Molina, 2013).

Parmi ces derniers, les flavonols sont les plus ubiquitaires de notre alimentation. La quercétine, retrouvée dans une grande variété d'aliments comme les oignons, les pommes, les poireaux, le brocoli et les bleuets, est un exemple de flavonol particulièrement étudié pour ses propriétés anti-inflammatoires (Manach, Scalbert, Morand, Rémésy, & Jiménez, 2004). Tel que mentionné, on retrouve la quercétine sous une forme glycosylée, la rutine et la quercétrine en sont quelques exemples (González-Vallinas, González-Castejon, Rodriguez-Casado, & Ramirez de Molina, 2013). L'apport quotidien de flavonols est estimé à 20-35mg (Manach, Williamson, Morand, Augustin, & Rémésy, 2005).

Les anthocyanidines, la forme aglycone des anthocyanes, représentent une autre des sept classes de flavonoïdes. L'intérêt pour cette famille de composés polyphénoliques ne cesse de croître, autant du côté de la communauté scientifique que du grand public. Ce sont des pigments hydrosolubles, présents dans les vacuoles cellulaires, qui donnent aux végétaux incluant fruits, légumes, feuilles, fleurs et certaines céréales comme le riz noir, une couleur violacée caractéristique (Lee & Finn, 2007). Leur structure de base est un cation flavylum, soit un cycle aromatique fusionné à un hétérocycle portant un oxygène, le tout relié à un troisième cycle aromatique. Selon les différents groupements hydroxyle et méthoxyle, on dénombre six principaux types d'anthocyanidines, dont la cyanidine, la delphinidine, la pélargonidine, la malvidine, la péonidine et la pétunidine (Figure 1.7) (Barcena, Chen, & Tuachi, 2015). À leur état naturel, les anthocyanidines sont glycosylées, généralement en position C3 du squelette de base, et la nomenclature change pour les anthocyanes. Celles-ci peuvent également être acylées (Milbury, Cao, Prior, & Blumberg, 2002) et complexées à d'autres flavonoïdes, toutes ces interactions

leur conférant une résistance à l'oxydation et à la dégradation par la lumière et le pH. Dans notre diète, les anthocyanes composent la pelure de certains légumes tels que l'aubergine, le chou rouge et le radis. Toutefois, ils abondent particulièrement dans les petits fruits, incluant le bleuet, le cassis et la mûre, et sont parfois présents à même la chair des fruits, comme c'est le cas pour les cerises et les fraises (Manach, Scalbert, Morand, Rémésy, & Jiménez, 2004). Avec l'ajout des sucres sur le squelette des six anthocyanidines, on compte plus de 500 anthocyanes, la majorité étant dérivée de la cyanidine, de la delphinidine et de la pélagonidine (Tsao, 2010).

Les petits fruits et les anthocyanes en général font l'objet de recherches intensives depuis les dernières décennies concernant leur extraction, leur absorption et leur métabolisme, mais également pour leurs effets bénéfiques sur la santé (Lin, Gong, Song, & Cui, 2016). Leurs propriétés antioxydantes et anti-inflammatoire, observées à la fois sur des modèles *in vitro*, *in vivo* ou en essais cliniques chez l'humain, font des anthocyanes d'excellentes molécules à utiliser en prévention de maladies chroniques associées au stress oxydatif et à l'inflammation telles que le diabète de type 2 (Guo & Ling, 2015), les maladies cardiovasculaires et le cancer (Barcena, Chen, & Tuachi, 2015). À ces propriétés s'ajoutent également des fonctions bactériostatiques, antivirales, antiviellissement et anticancer (Lin, Gong, Song, & Cui, 2016). Plusieurs études s'intéressent également aux baies comme nourriture entière plutôt que d'examiner leurs effets bénéfiques par la prise de molécules synthétiques seules (Kristo, Klimis-Zacas, & Sikalidis, 2016). D'ailleurs, à cet effet, le *World Cancer Research Fund International* recommande, dans un effort pour prévenir le cancer, de maximiser l'apport nutritionnel par l'alimentation seule et d'éviter la prise de suppléments (WCRF International, 2017).



### 3.3. Le sureau

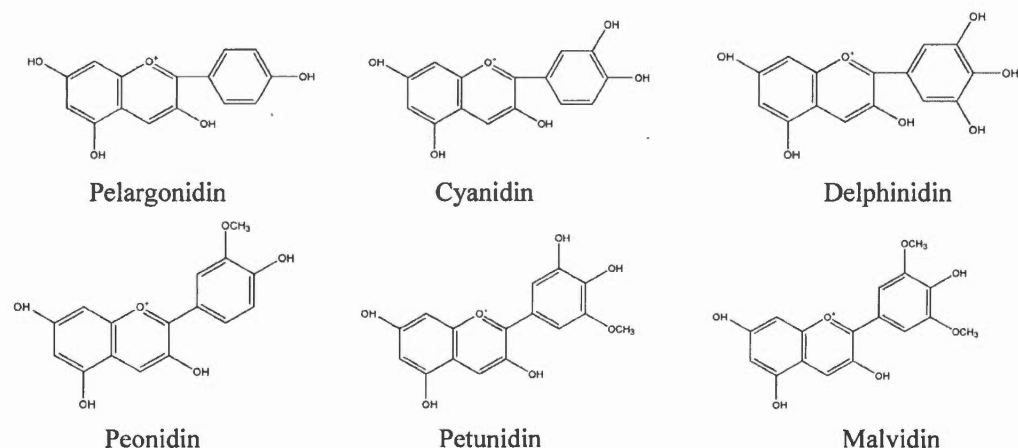


Figure 1.7 : Le cation flavylium est la structure de base de l'anthocyanidine. On dénombre 6 principaux types d'anthocyanidines selon les différents groupements hydroxyle et méthoxyle. Figure tirée de (Extrasynthese, 2017)

Le sureau est un petit arbre de la famille des Caprifoliacées (Schmelzer & Gurib-Fakim, 2008), maintenant classé dans la famille des Adoxaceae selon la classification phylogénétique APG (The Angiosperm Phylogeny Group, 2009). On le retrouve principalement dans l'hémisphère nord du globe, soit en Europe, en Amérique du Nord et centrale et en Afrique du Nord (Schmelzer & Gurib-Fakim, 2008). L'arbuste colonise naturellement les endroits où vivent les oiseaux comme les bords des routes et les lisières de forêt, les fruits étant attrayants pour ceux-ci. Avec ses grappes de baies d'un mauve profond et ses fleurs blanches, le sureau est également populaire comme ornement décoratif. Les fruits cultivés pour la consommation sont généralement d'un mauve foncé, mais plusieurs variétés d'arbres possèdent des baies de couleur rouge ou bleue (Lee & Finn, 2007). La production de fruits sert à confectionner non seulement confitures, tartes, gâteaux et pâtisseries, mais également des jus pouvant servir de colorant naturel. Les fleurs, au goût évoquant le miel, sont délicieuses dans les boissons ou pour sucrer le yogourt et la crème glacée (Mikulic-Petkovsek, Samoticha, Eler, Stampar, & Veberic, 2015).

Le genre *Sambucus* comprend neuf espèces, dont l'espèce *nigra*, elle-même divisée en six sous-espèces. On appelle également *Sambucus nigra* le sureau noir ou le sureau européen (Schmelzer & Gurib-Fakim, 2008). De façon générale, le sureau, autant les baies, les fleurs, l'écorce que les racines (Lee & Finn, 2007), est reconnu pour ses propriétés médicinales depuis plusieurs millénaires chez des populations natives d'Amérique contre certaines infections virales telles l'herpès et maladies inflammatoires comme l'asthme ou l'arthrite (Thole, et al., 2006). Par exemple, au Gabon, les fleurs de sureau sont utilisées comme onguent calmant pour la peau (Schmelzer & Gurib-Fakim, 2008) et en Europe, un produit mis en vente du nom de Sambucol est en mesure d'activer *in vitro* le système immunitaire contre plusieurs souches du virus de l'Influenza (Barack, Halperin, & Kalickman, 2001). Le sureau noir contient une quantité impressionnante d'anthocyanes, pouvant totaliser jusqu'à 1% de sa masse sèche. La majorité de ceux-ci sont dérivés de la cyanidine, les quatre plus abondantes étant la Cy-3-*O*-sambubioside-5-*O*-glucoside, la Cy-3-*O*-sambubioside, la Cy-3-*O*-glucoside et la Cy-3,5-*O*-diglucoside. Plusieurs autres flavonoïdes sont retrouvés dans le sureau, incluant la quercétine-3-*O*-rutinoside nommée rutine (Milbury, Cao, Prior, & Blumberg, 2002) (Thole, et al., 2006).

La sous-espèce *Sambucus nigra subsp. canadensis* est souvent élevée au rang d'espèces, sa nomenclature devenant simplement *Sambucus canadensis* (Schmelzer & Gurib-Fakim, 2008). Beaucoup moins caractérisé et cultivé que le sureau noir d'Europe, le sureau du Canada, appelé également sureau blanc, se décline en plusieurs cultivars ou génotypes, recherchés commercialement pour leurs différences dans le contenu d'anthocyanes ou de vitamine C ou encore pour leur adaptation à l'environnement et aux conditions climatiques (Agri-Réseau, 2009). La majorité des cultivars de *S. canadensis* ont été développés il y a de ça quelques décennies seulement aux États-Unis (New York Agricultural Experiment Station) et en Nouvelle-Écosse au Canada (Agri-Food Canada). À ce jour, les fruits et fleurs vendus et consommés en Amérique du Nord proviennent généralement encore de sureau poussant à l'état sauvage, comparativement à la culture commerciale qui se fait dans plusieurs pays d'Europe (Finn, Thomas, Byers, & Serçe, 2008). Le sureau du Canada contient une gamme d'anthocyanes plus diversifiée,

ouvrant une toute nouvelle voie aux vertus nutraceutiques de la plante (Thole, et al., 2006). Contrairement à celles du sureau noir, les anthocyanes du sureau du Canada sont également acylées, rendant les composés beaucoup plus stables et les baies, des fruits de meilleure qualité (Lee & Finn, 2007). La composition phénolique des baies de sureau blanc, majoritaire en anthocyanes, en fait un aliment particulièrement antioxydant, comme c'est aussi le cas des petits fruits à chair foncée comme la mûre (Ozgen, Scheerens, Reese, & Miller, 2010). Bien que le pouvoir antioxydant est souvent associé à la concentration élevée d'anthocyanes des fruits et légumes hautement pigmentés, plusieurs autres polyphénols et flavonoïdes sont reconnus pour leur capacité antioxydante (Yao, et al., 2013). Les fleurs de sureau, quoique non pigmentées, contiennent en effet plusieurs de ces composés bioactifs, dont la quercétine et ses dérivés glycosylés tels que la rutine (quercétine-3-rutinoside) (Thi Ho, Wangenstein, & Barsett, 2017). Il a également été démontré que les anthocyanes d'extraits de baies de sureau (*S. nigra*) sont absorbés par l'humain et sont détectables entre autres dans le plasma et l'urine (Guohua & Prior, 1999) (Milbury, Cao, Prior, & Blumberg, 2002).

Comparativement au sureau d'Europe, peu d'études ont démontré le potentiel chimiopréventif des baies et des fleurs de sureau du Canada. Un groupe de chercheurs a démontré l'impact prometteur d'extraits de ces deux espèces de sureau sur plusieurs complexes enzymatiques impliqués dans les différentes étapes de la carcinogenèse (Thole, et al., 2006), mais aucune donnée n'est encore disponible concernant les bienfaits du sureau blanc sur la santé dans des modèles *in vitro* ou *in vivo*.

## CHAPITRE I

### PROJET DE RECHERCHE

#### 1.1. Problématique et contexte

Malgré le développement constant de nouveaux traitements et de technologies de diagnostic, le cancer voit son incidence annuelle augmenter de façon stable et représente la deuxième cause de mortalité au monde. Les tumeurs des cellules gliales, et particulièrement les glioblastomes, font partie des cancers les plus agressifs et invasifs et représentent la première cause de décès reliée aux tumeurs malignes du SNC. Outre le fait qu'ils soient isolés de la voie traditionnelle de chimiothérapie par la BHE, leur caractère infiltrant et hypoxique, qui permet l'induction d'une néoangiogenèse chaotique, les rend particulièrement difficiles à traiter. La survie médiane d'un patient atteint d'un GBM se situe entre 12 et 14 mois, bien que la survie varie en fonction de l'âge du patient et du grade de la tumeur. Malgré le fait qu'il existe de la chimiothérapie préventive, un réel besoin pour des produits abordables et sécuritaires à long terme demeure, expliquant l'intérêt grandissant pour la nutraceutique depuis les dernières décennies. Les données épidémiologiques, cliniques et fondamentales sont d'ailleurs formelles à ce sujet : il est possible de prévenir l'apparition de cancers en modifiant sa diète et en incluant une majorité d'aliments provenant de végétaux. Ces aliments fonctionnels fournissent une quantité impressionnante de composés bioactifs nommés phytochimiques, dont la large et diversifiée famille des polyphénols. Certaines molécules, telles que les anthocyanes et les flavonols, sont intensivement étudiées pour les propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires et anticancer qu'elles apportent à certains aliments, comme celles retrouvées dans les petits fruits. Les bienfaits potentiels des baies sont souvent corrélés à la concentration de ces molécules qu'elles possèdent.

## 1.2. Hypothèse de travail

Sachant que les petits fruits et les anthocyanes ont un effet antiprolifératif et antiangiogénique sur plusieurs lignées de cellules cancéreuses (Lamy et al., 2006) (Boivin D., Blanchette, Barrette, Moghrabi, & Béliveau, 2007) (Lamy et al., 2008) (Lamy, Akla, Ouanouki, Lord-Dufour, & Béliveau, 2012), nous nous sommes intéressés à l'impact des baies et des fleurs du sureau du Canada sur des cellules tumorales et endothéliales cérébrales. Les fruits du sureau du Canada possèdent une quantité impressionnante d'antioxydants tels les polyphénols, dont une grande proportion d'anthocyanes et de rutine, tandis que les fleurs, non pigmentées, contiennent principalement de la rutine. Ces molécules sont également capables de traverser la BHE (Andres-Lacueva, Shukitt-Hale, Galli, Jauregui, Lamuela-Raventos, & Joseph, 2005). Nous avons donc émis l'hypothèse que les extraits de baies et de fleurs inhibent *in vitro* la prolifération de trois lignées de gliomes et d'une lignée de cellules endothéliales microvasculaires cérébrales humaines.

## 1.3. Objectifs de la recherche et approche méthodologique

Le principal objectif de la recherche consiste à comparer et à caractériser le potentiel antiprolifératif des extraits de sureau provenant de deux cultivars, Kent et Scotia, sur deux lignées cellulaires de GBM et une lignée d'oligodendrogliome anaplasique, ainsi que sur une lignée de cellules endothéliales cérébrales du compartiment vasculaire. Toutes les expériences ont été réalisées en normoxie (20% d'O<sub>2</sub>) et en hypoxie (O<sub>2</sub> < 2%), la dernière condition à servi à mimer les faibles tensions d'oxygène qui surviennent chez les glioblastomes et les tumeurs solides en général.

De façon plus détaillée, trois extraits de baies (Kent, Scotia, un concentré de baies Kent/Scotia) et un extrait de fleurs (Scotia) ont été analysés sur la prolifération cellulaire. Les perturbations des phases du cycle cellulaire, l'induction de l'apoptose ainsi que les niveaux d'expression des protéines impliquées dans la progression du

cycle cellulaire ont été étudiés. En complément, cinq molécules naturelles présentes dans les baies et/ou les fleurs, soit quatre anthocyanes et une quercétine ont été étudiées pour leur propriété antiproliférative sur les quatre lignées cellulaires à l'étude.

## CHAPITRE II

### ANTIPROLIFERATIVE EFFICACY OF ELDERBERRIES AND ELDERFLOWERS EXTRACTS (*SAMBUCUS CANADENSIS*) ON GLIOMA AND BRAIN ENDOTHELIAL CELLS UNDER NORMOXIC AND HYPOXIC CONDITIONS

Lamy, S., Muhire, E, & Annabi, B. (2018). Antiproliferative efficacy of elderberries and elderflowers (*Sambucus canadensis*) on glioma and brain endothelial cells under normoxic and hypoxic conditions. *Journal of Functional Food*, 40, 164-179.

#### Contributions des co-auteurs

Muhire : Réalisation des expériences, analyse et interprétation des résultats, montage des figures, rédaction du manuscrit.

Lamy : Analyse et interprétation des résultats, montage des figures, rédaction du manuscrit, conception du projet.

Annabi : Rédaction du manuscrit, conception et financement du projet.

## 2. Antiproliferative efficacy of elderberries and elderflowers (*Sambucus canadensis*) extracts on glioma and brain endothelial cells under normoxic and hypoxic conditions

Evelyne Muhire<sup>§</sup>, Sylvie Lamy<sup>§</sup>, Borhane Annabi\*

*Authors' Affiliation:* Laboratoire d'Oncologie Moléculaire, Centre de Recherche BioMed, Université du Québec à Montréal, C.P. 8888, Succ. Centre-ville, Montréal, Québec, Canada H3C 3P8

*E-mail address :*

Evelyne Muhire: muhire.evelyne@courrier.uqam.ca

Sylvie Lamy: lamy.sylvie@uqam.ca

Borhane Annabi: annabi.borhane@uqam.ca

*\*Corresponding Author:* Borhane Annabi, Laboratoire d'Oncologie Moléculaire, Université du Québec à Montréal, C.P. 8888, Succ. Centre-ville, Montréal, Québec, Canada, H3C 3P8. Phone: +1 (514) 987-3000x7610; E-mail: annabi.borhane@uqam.ca

*§These authors contributed equally to this work*

*Financial support:* This study was funded by the Institutional Research Chair in Cancer Prevention and Treatment held by Dr. Borhane Annabi at UQAM and by the Innovation and Technologies Directorate of *Ministère de l'agriculture, des pêcheries et de l'alimentation* (Québec, QC).

*Running title:* Elderberry inhibits glioma and brain endothelial cells

*Abbreviations :* BBB, blood-brain barrier; Cy-3-gal, cyanidin-3-O-galactoside chloride; Cy-3-rut, cyanidin-3-O-rutinoside chloride; Cy-3-sam-5-glu, cyanidin-3-O-sambubioside-5-O-glucoside chloride; Dp-3-rut, delphinidin-3-O-rutinoside chloride; GAPDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; GLUT-1, glucose transporter-1; HBMEC, human brain microvascular endothelial cells; PI, propidium iodide; Que-3-rut, quercetin-3-O-rutinoside; ROS, reactive oxygen species; VEGF, vascular endothelial growth factor; WHO, World Health Organization



## 2.1. Abstract

Epidemiological studies have consistently confirmed that consumption of fruits and vegetables with high phenolic compound contents reduces the incidence of certain cancers. As low circulating plasma antioxidant levels contribute to solid tumour malignancy, and since elderberries are among the richest sources of anthocyanins with strong antioxidant capacity, we evaluated their effects against the tumoral and the angiogenic vascular compartments. We assessed the antiproliferative properties of berry and flower extracts from two Canadian elderberry cultivars, Kent and Scotia, against human brain tumor-derived cell lines (U-87 MG, U-138 MG and Hs 683) and brain microvascular endothelial cells (HBMEC) under both normoxic and hypoxic culture conditions. Both extracts inhibited cell proliferation in a dose-dependent manner with berry extracts being more efficient. The antiproliferative effects resulted in cell cycle arrest at G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, S or G<sub>2</sub>/M phases with concomitant effects on cell cycle checkpoint protein expression as well as on apoptosis. Among the major compounds identified within elderberry and elderflower extracts, anthocyanins (cyanidin derivatives) and flavonol glycosides (rutin) efficiently inhibited cell proliferation alone or in synergy. The fact that berries are more potent than flowers suggests that anthocyanins are major contributors since these molecules are absent from the flower extracts. Given that brain tumors are characterized by hypoxic and necrotic areas which contribute to therapy resistance, this is the first molecular evidence highlighting brain tumor and brain endothelial cell proliferation inhibitory activity by Canadian elderberry cultivar extracts.

**Keywords:** Cell proliferation; Elderberry; Elderflower; Endothelial cells; Glioma; Hypoxia

**Chemical compounds studied in this article:** Cyanidin-3-O-galactoside chloride (PubChem CID: 176457); Cyanidin-3-O-rutinoside chloride (PubChem CID: 441674); Delphinidin-3-O-rutinoside chloride (PubChem CID: 44256887); Quercetin-3-O-rutinoside (PubChem CID: 5280805); Cyanidin-3-O-sambubioside-5-O-glucoside chloride (PubChem CID: 44256731).

## 2.2. Introduction

Malignant brain tumors are among the most feared types of cancer, not only for their poor prognosis, but also because of their direct repercussions on quality of life and cognitive function. The World Health Organization (WHO) classification of tumors of the central nervous system establishes a grading of human tumors, and groups gliomas into 4 histological grades [1]. WHO grade III and grade IV tumors are the most common type of primary malignant gliomas, of which glioblastoma multiforme is the most aggressive form.

Growth of gliomas is characterized by the development of a heterogeneous vascularization. Indeed, at an early phase of tumor growth, the vessels are small, sparsely branched, well organized and well perfused under normoxic conditions [2]. However, when the tumor increases in size, the neovascularization becomes morphologically and functionally unsuitable with irregular blood flow creating hypoxic areas [3]. This hypoxic microenvironment is a powerful stimulus for the expression of genes involved in tumor cell proliferation and angiogenesis including hypoxia inducible factor-1 $\alpha$ , transforming growth factor- $\beta$  and vascular endothelial growth factor (VEGF) [4], which stimulate vasculature development in order to rapidly supply oxygen to malignant cells. These tumor cells acquire resistance to treatment and successfully treating gliomas becomes challenging. Hence, more insight into chemopreventive agent properties against tumor cell proliferation is needed.

Over the past few years, there has been a growing interest in nutraceutical intervention against different types of tumors, including brain tumors [5-7]. This approach uses the chemopreventive properties of naturally occurring phytochemicals, especially those from diet- derived vegetables, spices and fruits [8, 9]. Among them, anthocyanins exhibit beneficial effects against mechanisms involved in the progression of various diseases [10, 11]. These flavonoids are a ubiquitous group of water-soluble natural pigments responsible for the blue, purple, red and intermediate colors of leaves, flowers, vegetables and fruits [11].

Canadian elderberry or American elder [*Sambucus nigra* L. subsp. *canadensis* (L.) R. Bolli; syn. *S. canadensis* L.] is native to eastern North America. Although its European cousin [*Sambucus nigra* L. subsp. *Nigra* (L.), syn. *S. nigra* L] is relatively well developed as a horticultural crop, more than twenty different cultivars have been developed either at the New York Agricultural Experiment Station or at Agriculture and Agri-Food Canada in Nova Scotia for their ornamental qualities or high quality of berries [12]. In fact, edible purple-black fruits of the cultivated elderberry are considered one of the richest sources of anthocyanins and phenolic compounds, which contribute to the high antioxidant activity of these berries [13-15]. The fruits and flowers are used to produce juices, jams, jellies, syrup, wines, pies, colorants, and infusions [16]. Recently, there has been increasing demand for nonfermented elderberry juice concentrates as a nutraceutical or dietary supplement [17].

The native *Sambucus canadensis* is well known by the Amerindian peoples and herbalists as a medicinal plant. Various parts of the plant have been used for their laxative, diuretic, expectorant, or purgative properties to treat respiratory and pulmonary disorders as well as fever and rheumatism [18]. Recently, extracts of the berries from some varieties of both European and Canadian elderberry demonstrated significant chemopreventive potential against the initiation and promotion stages of carcinogenesis [14]. However, more information is required in order to understand the mechanistic and molecular aspects of their antitumor activities. In the current study, we investigated the *in vitro* molecular effects of berry and flower extracts from two Canadian elderberry cultivars, Kent and Scotia, developed from Agriculture and Agri-Food Canada, on human glioma and brain microvascular endothelial cell proliferation.

## 2.3. Materials and Methods

### *Materials*

Cyanidin-3-O-galactoside chloride (Cy-3-gal) [purity  $\geq$  97%], cyanidin-3-O-rutinoside chloride (Cy-3-rut) [purity  $\geq$  96%], cyanidin-3-O-sambubioside-5-O-glucoside chloride (Cy-3-sam-5-glu) [purity  $\geq$  90%], delphinidin-3-O-rutinoside chloride (Dp-3-rut) [purity  $\geq$  95%] and quercetin-3-O-rutinoside also called rutin (Que-3-rut) [purity  $\geq$  99%] were purchased from Extrasynthese (Lyon, France). Concentrated elderberry extract (IMMUNIA™) was obtained from Fruitomed Inc. (Thetford Mines, QC). Electrophoresis reagents were purchased from Bio-Rad (Mississauga, ON). The monoclonal antibody against glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was from Advanced Immunochemical Inc. (Long Beach, CA). Polyclonal antibodies against CDK2, CDK4, p27, p21, and monoclonal antibodies against CDK6, cyclin D1 and cyclin D3 were from Cell Signaling Technology (Beverly, MA). Anti-mouse and anti-rabbit horseradish peroxidase (HRP)-linked secondary antibodies were purchased from Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA), and enhanced chemiluminescence (ECL) reagents were from Denville Scientific Inc. (Metuchen, NJ). Micro bicinchoninic acid protein assay reagents were from Thermo Scientific (Rockford, IL). All other reagents were from Sigma-Aldrich (Oakville, ON).

### *Plant materials*

Fresh fruits and dried flowers from two genotypes of *S. canadensis*, Kent and Scotia, were obtained from Au Versant du Sureau (Adstock, QC). Fruits were stored at -80°C until use.

### *Preparation of berry and flower extracts*

Berry extracts: 100 g of berries were stored at 4°C and processed within 24 h. Extracts were prepared in a cold room by processing the berries through a hand blender. The puree obtained was clarified by centrifugation at 200,000 x g for 30 min at 4°C. The

supernatant was then sterilized by filtration through a 0.22  $\mu\text{m}$  filter and aliquots were immediately frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$ . Scotia elderflower extracts: One teaspoon of dried flowers was infused in 250 mL of  $85^{\circ}\text{C}$  distilled water for 15 min [19]. The infusion was cooled and then filtered through a 0.22  $\mu\text{m}$  filter; aliquots were immediately frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### *Cell culture*

The human glioblastoma U-87 MG and U-138 MG, and glioma Hs 683 cell lines were purchased from the American Type Culture Collection and maintained in modified Eagle's Minimum Essential Medium (Wisent, 320-036-CL) or in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (319-005-CL), respectively, containing 10% calf serum (HyClone Laboratories, SH30541.03), 1 mM sodium pyruvate (Sigma-Aldrich, P2256), 2 mM L-glutamine, 100 units/mL penicillin and 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  streptomycin (Wisent, 450-202-EL). Human brain microvascular endothelial cells (HBMEC) were from ScienCell<sup>TM</sup> Research Laboratories (Carlsbad, CA) and maintained in RPMI Medium (Wisent, 350-007-CL) containing 10% fetal bovine serum (Life Technologies, 12483-020), Nuserum<sup>TM</sup> (VWR, CACB355500), endothelial cell growth supplement (EMD Millipore Corporation, 02-102) and 1 mM sodium pyruvate (Sigma-Aldrich, P2256). HBMEC used in this study were restricted to between 4 and 8 passages. Cells were cultured at  $37^{\circ}\text{C}$  under a humidified 95%–5% (v/v) mixture of air and  $\text{CO}_2$ . Hypoxic conditions were performed by incubation of cells in an hypoxia workstation (BioSpherix, Parish, NY). The oxygen concentration ( $< 2\%$ ) was fixed with a gas mixture containing 5%  $\text{CO}_2$  and balance of nitrogen. For experimental purposes, after 24 h of cell seeding in complete medium, cells were serum-starved under normoxic or hypoxic conditions to induce a quiescent cell state and to condition them to hypoxic conditions before treatment with extracts. After 24 h, the medium was removed and replaced by fresh complete medium containing (or lacking) extracts for 48 h.

### *Cell proliferation assay*

Cells were seeded in 96-well plates at 5,000 cells/well (Hs 683, HBMEC) or 7,500

cells/well (U-87 MG, U-138 MG) in 200  $\mu$ L complete medium and incubated at 37°C under normoxic or hypoxic culture conditions according to the protocol described previously. Cells were treated with 100  $\mu$ L complete medium containing berry extracts (0 – 200  $\mu$ L/mL) or flower extracts (0 – 500  $\mu$ L/mL) or IMMUNIA™ (0 – 200  $\mu$ L/mL), or 200  $\mu$ M of Cy-3-sam-5-glu, cy-3-gal, cy-3-rut, Dp-3- rut, Que-3-rut or a combination of these five compounds. Cell proliferation was determined by assaying the mitochondrial metabolic activity of cells, after 48 h of treatment with extracts, using the highly sensitive water-soluble tetrazolium salt (WST-1) assay. Briefly, 10  $\mu$ L WST-1 reagent (Roche, Laval, QC) was added to each well and the soluble formazan dye produced by metabolically active cells was monitored for at least 45 min at 37°C. The absorbance at 450 nm was measured using a SpectraMax Plus reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Since high concentrations of the berry extract color interfered with the assay, reference values from the samples containing extract only were deducted from the readings of the treated cell sample.

#### *Cell cycle analysis*

Cells were incubated in complete medium containing a specified concentration of extract for 48 h as described previously. At the end of treatment, the cells were collected by mild trypsin digestion, washed with ice-cold phosphate-buffered saline (PBS) and fixed in 70% ethanol in PBS overnight at -20°C. Cells were then centrifuged at 10,000 rpm for 10 min, followed by careful removal of the supernatant. Three volumes of staining solution in PBS, containing propidium iodide (PI, 40  $\mu$ g/mL; Calbiochem, San Diego, CA) and DNase-free RNase (100  $\mu$ g/mL), were added for at least 30 min at 37°C in the dark before analysis. The proportion of the cell population in each phase of the cell cycle was determined as a function of the DNA content using a BD Accuri C6 flow cytometer (BD Biosciences, Mississauga, ON). Cell cycle analysis was performed with the BD Accuri™ C6 software (version 1.0.264.21). For each measurement, at least 10,000 cells were counted.

### *Western blot analysis*

Cells were treated as described above for cell cycle analysis but solubilized on ice in lysis buffer [150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 1 mM ethyleneglycol-O, O'-bis(2-aminoethyl)-N, N, N', N'-tetraacetic acid (EGTA), 0.5% (vol/vol) Nonidet P-40 and 1% (vol/vol) Triton X-100]. Lysates (25 µg) were solubilized in Laemmli sample buffer [125 mM Tris-HCl (pH 6.8), 20% glycerol, 4% SDS, 10% β-mercaptoethanol, and 0.00125% bromophenol blue], boiled for 5 min, and separated by sodium dodecyl sulfate- polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). After electrophoresis, proteins were transferred to polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes which were then blocked for 1 h at 4°C with 5% non-fat dry milk in Tris-buffered saline/Tween 20 (TBS-T; 147 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, and 0.1% Tween 20). Membranes were further washed in TBS-T and incubated overnight with an appropriate primary antibody in TBS-T containing 3% bovine serum albumin (BSA) and 0.01% sodium azide (NaN<sub>3</sub>), followed by a 1 h incubation with an HRP- conjugated anti-mouse or anti-rabbit secondary antibody in TBS-T containing 5% non-fat dry milk. Immunoreactive material was visualized with an ECL detection system. The immunoreactive bands were quantified using ImageJ software (NIH).

### *Apoptosis analysis*

Apoptotic and dead cell counts were performed using the FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit II (BD Biosciences, Mississauga, ON) and PI staining by flow cytometry. Both the floating and the adherent cells were collected by mild trypsin digestion and resuspended in the provided binding buffer (51-66121E) at a concentration of  $1 \times 10^6$  cells/mL; then 100 µL of cell suspension was added to 5 µL of FITC Annexin V (51-65874X) and 5 µL of PI (50 µg/mL; 51- 66211E) and mixed for 15 min in the dark at room temperature. Next, 400 µL of binding buffer (1X) was added to the solution and fluorescence was measured using a BD Accuri C6 flow cytometer. Data collection and analysis were performed with FlowJo 10.1 software. At least 10,000 cells were counted for each measurement. The following controls were used to set up gates: unstained

cells, cells with FITC Annexin V only and cells with PI only.

*Total RNA isolation, cDNA synthesis and real-time quantitative PCR*

Total RNA was extracted from cell monolayers using TRIzol reagent (Life Technologies, Gaithersburg, MD). For cDNA synthesis, 1 µg of total RNA was reverse-transcribed into cDNA using a high capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems, Foster City, CA). cDNA was stored at -80°C prior to PCR. Gene expression was quantified by real-time quantitative PCR using Sso Fast EvaGreen Supermix (BIO-RAD, Hercules, CA). DNA amplification was carried out using a CFX Connect Real-Time System (Bio-Rad) and product detection was performed by measuring the binding of the fluorescent dye EvaGreen to double-stranded DNA. The following primer sets were provided by QIAGEN (Valencia, CA): glucose transporter-1 (GLUT-1; QT00068957), VEGF (QT01682072), ribosomal protein S18 (RPS18; QT02323251), RPS28 (QT02310203). The relative quantities of target gene mRNA against an internal control, RPS18/RPS28 RNA, were measured by following a  $\Delta C_t$  method employing an amplification plot (fluorescence signal vs. cycle number). The difference ( $\Delta C_t$ ) between the mean values in the triplicate samples of target gene and those of RPS18/RPS28 RNA were calculated using CFX Manager Software version 3.0 (BIO-RAD) and the relative quantified value (RQV) was expressed as  $2^{-\Delta C_t}$ . Semi-quantitative PCR was also performed to validate single amplification products which were resolved on 1.8% agarose gels containing 4-6 µL GreenGlo™ Safe DNA Dye, 20,000X in water (Denville Scientific Inc., Holliston, MA) per 100 mL of agarose (not shown).

*Statistical analyses*

Statistical analyses were assessed with Student's t-test when one group was compared with the control group. To compare two or more groups with the control group, one-way analysis of variance (ANOVA) with Dunnett's post hoc test was used. Differences with  $P < 0.05$  were considered significant. All statistical analyses and graphs were performed using the GraphPad Prism software version 5.0b (San Diego, CA).



## 2.4. Results

### *Hypoxia culture condition validation in human brain tumor and brain endothelial cell lines*

In order to validate our experimental normoxic and hypoxic culture conditions, we assessed the expression of two genes known to be induced under hypoxic conditions, i.e. VEGF and GLUT-1 [20-22]. VEGF is a key regulating factor of angiogenesis in cancer, provides nutrients to tumor cells for their growth, as well as access to the host vasculature to form metastases. GLUT-1 transports glucose across the plasma membrane, supporting the metabolic needs of rapidly dividing tumor cells. Cells were incubated for 24 h in complete medium. The medium was then replaced with serum-free medium and the cells were incubated under normoxic or hypoxic conditions to induce a quiescent state in these cells. After 24 h, the medium was removed and replaced by fresh complete medium for 48 h. Under these conditions, hypoxia caused a marked increase in VEGF (Fig. 2.1A) and GLUT-1 (Fig. 2.1B) mRNA levels in the brain cancer (U-87 MG, U-138 MG, Hs 683) and microvascular endothelial (HBMEC) cell lines tested, confirming that these cells were responsive to hypoxic culture conditions.

### *Inhibition of human glioma and brain endothelial cell proliferation by elderberry and elderflower extracts*

Berry extracts from two genotypes of *S. canadensis*, Kent and Scotia, were prepared with a hand blender and clarified by centrifugation, whereas flower extracts from the Scotia variety were obtained by infusion in distilled water. These two types of extracts were then sterilized by filtration. Concentrated elderberry extract (IMMUNIA™; Fruitomed Inc.) was obtained from a proprietary mix of berries from both the Kent and Scotia cultivars through a cold concentration process. These four extracts were tested in human brain tumor and endothelial cell line proliferation assays under normoxic or hypoxic culture conditions. After 24 h of cell seeding in 96-well plates with complete medium, cells were serum-starved under normoxic or hypoxic culture conditions for 24 h. Then, the medium was removed and replaced by fresh complete medium containing

(or lacking) extracts for 48 h. As shown in Fig. 2.2, all the extracts tested reduced cell proliferation in a dose-dependent manner but the extent of inhibition was different between the berry and flower extracts. Kent, Scotia and concentrated elderberry extracts exhibited the greatest ability to inhibit proliferation with half-maximal inhibition concentration ( $IC_{50}$ ) values ranging from 12 – 49  $\mu\text{L}/\text{mL}$  compared to 167 – 277  $\mu\text{L}/\text{mL}$  for elderflower extracts (Table 2.1). Kent and Scotia elderberry extracts more efficiently inhibited the proliferation of glioblastoma cells (U-87 MG and U-138 MG) than brain endothelial cells under normoxic and hypoxic conditions (Fig. 2.2A, 2B). However, even though these two extracts also affect the proliferation of gliomas (Hs 683) under normoxic conditions, they were less effective under hypoxic conditions. Moreover, Scotia extracts were the most potent inhibitor under normoxic conditions (Fig. 2.2A), while Kent extracts were better inhibitors of cell proliferation in HBMEC, U-138 MG and Hs 683 cells under hypoxic conditions (Fig. 2.2B). Interestingly, flower extracts were ineffective in reducing cell proliferation under hypoxic conditions (Fig. 2.2C). Overall, concentrated elderberry extracts exhibited the best antiproliferative effects.

#### *Elderberry and elderflower extracts effect on cell cycle regulation*

To further investigate the molecular mechanism of extract-mediated cell growth inhibition, the effect on cell cycle regulation was evaluated by flow cytometry as described in the Methods section. FACS analyses were conducted under the same normoxic or hypoxic conditions as for cell proliferation using extract concentrations at which cell growth was strongly inhibited. Briefly, cells were treated with either 50  $\mu\text{L}/\text{mL}$  concentrated elderberry extract or 100  $\mu\text{L}/\text{mL}$  elderberry extract or 500  $\mu\text{L}/\text{mL}$  elderflower extract, fixed, stained and subjected to flow cytometry analyses. The FACS results showed that berry extracts increased the proportion of U-87 MG cells, Hs 683 cells and HBMEC in the S phase (~22%, ~62%, ~231%) and the G2/M phase (~33%, ~102%, ~31%), and reduced the proportion of cells in the G0/G1 phase under normoxic conditions as compared to cells treated with vehicle alone (Fig. 3.3A; Table 2.2). Similar effects were observed in the G0/G1 and G2/M phases under hypoxic conditions (Fig.

3.3B). However, the distribution of U-87 MG and Hs 683 cells in the S phase was higher by ~78% and ~267%, respectively, whereas it was reduced by ~176% for HBMEC (Table 2.2). Inversely, berry extracts increased the accumulation of U-138 MG cells in the G0/G1 phase by ~21%, associated with a diminution in the G2/M phase under hypoxic conditions (Table 2.2). No significant changes in the S phase were observed. Moreover, berry extracts did not significantly alter the cell cycle phase of U-138 MG cells under normoxic conditions. Compared to berry extracts, flower extracts induced an increased accumulation of U-87 MG, U-138 MG and Hs 683 cells in the G2/M phase (~119%, ~60%, ~417%) associated with a diminution in the S and G0/G1 phases under normoxic conditions (Fig. 2.3A; Table 3.2). The same effects were observed under hypoxic conditions except for U-138 MG cells, where elderflower extracts induced an increased number of cells in the G0/G1 phase by ~14% and reduced the G2/M phase distribution (Fig. 2.3B; Table 2.2). No significant changes in the cell cycle phase of HBMEC were observed. Overall, these results suggest that berry and flower extracts alter cell cycle regulation, thereby inhibiting cell proliferation.

*Elderberry and elderflower extracts affect the protein expression of cell cycle promoters*

Cell cycle progression is regulated by cyclins, cyclin-dependent kinases (CDKs) and cyclin-dependent kinase inhibitors (CKIs) [23, 24]. To investigate cell cycle arrest induced by berry or flower extracts in the four cell lines tested, the expression of cell cycle regulatory proteins was examined. We found that berry extract treatments primarily decreased the protein levels of cyclin D1/D3, CDK4/6 and CDK2 under both oxygenation conditions (Fig. 2.3C). On the other hand, flower extract treatment produced more variable effects on the expression levels of these proteins. Cyclin D1 expression was upregulated in U-138 MG cells and HBMEC under both oxygenation conditions as was cyclin D3 expression in U-138 MG cells under hypoxic conditions. In the other cell lines, both cyclins were downregulated. CDK4 expression was significantly downregulated in U-87 MG cells and HBMEC but slightly increased in U-138 MG and Hs 683 cells under normoxic conditions; its expression was unchanged in U-87 MG cells and downregulated in other cell lines under hypoxic conditions. The expression of CDK6

and CDK2 were generally reduced except in U-138 MG cells for CDK6 under both culture conditions. Since inhibitory mechanism of extracts on cell proliferation might also affect the expression of CKIs, we evaluated p21 and p27 protein expression, which bind to the CDK-cyclin complex to negatively regulate CDK activity [25, 26]. Treatment with berry extracts decreased the expression of p21 in U-87 MG, U-138 MG and HBMEC cells but induced it in Hs 683 cells (Fig. 2.3C). The results also demonstrated a downregulation of p27 protein levels, except for U-87 MG and Hs 683 cells where upregulation was observed under normoxic or hypoxic conditions, respectively. Interestingly, Scotia elderberry extracts caused greater inhibition of p21 or p27 as compared to other berry extracts in U-87 MG cells. Moreover, the treatment with concentrated elderberry extract resulted in a marked increase in CKI expression in U-87 MG and U-138 MG cells. Flower extract treatments generally induced upregulation of p21 except in U-87 MG cells (hypoxic conditions) or Hs 683 cells (both culture conditions). Finally, p27 protein levels were downregulated in U-138 MG and HBMEC, and upregulated in U-87 MG and Hs 683 cells under both culture conditions.

#### *Elderberry extracts affect human glioma and brain endothelial cell viability*

In any given cell population, cell growth is a process resulting from balance of cell proliferation and cell death. The inhibition of cell proliferation by elderberry and elderflower extracts could also be the result of a direct cytotoxic effect at higher concentrations. This was assayed using the FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit II and PI staining. As shown in Fig. 2.4, treatment with either 50  $\mu\text{L}/\text{mL}$  concentrated elderberry extract or 100  $\mu\text{L}/\text{mL}$  elderberry extract for 48 h induced apoptosis under normoxic (Fig. 2.4A) or hypoxic conditions (Fig. 2.4B). However, treatment with 500  $\mu\text{L}/\text{mL}$  elderflower extract did not affect cell viability as compared to control. Under normoxic conditions, treatment of U-87 MG, U-138 MG, Hs 683 and HBMEC with berry extracts resulted in 4.2-fold, 1.9-fold, 1.7-fold and 3-fold increases in apoptosis, respectively (Fig. 2.4A). Under hypoxic conditions, berry extracts resulted in 3.7-fold, 3.2-fold, 1.7-fold and 4-fold increases in U-87 MG, U-138 M, Hs 683 and HBMEC apoptosis (Fig. 2.4B). Interestingly, concentrated elderberry extract had comparable

effects on viability as had Kent or Scotia elderberry extracts.

*Inhibition of human glioma and brain endothelial cell proliferation by phenolic compounds*

The inhibitory effects of elderberry and elderflower extracts on cell proliferation may be, in part, due to the action of specific compounds present in these extracts. Their content in anthocyanins and other phenolic compounds was analyzed by HPLC-UV and by UPLC-MS/MS, and performed by INAF (Institute of Nutrition and Functional Foods, Québec, QC; confidential data). Analyses revealed that elderberry extracts contain mainly anthocyanins and flavonols while only flavonols are found in elderflower extracts. Therefore, the five most prominent compounds, namely four anthocyanins (Dp-3-rut, Cy-3-gal, Cy-3-rut, Cy-3-sam-5-glu) and one flavonol glycoside (Que-3-rut also named rutin) (Fig. 2.5A), were tested alone or together at 200  $\mu$ M under normoxic or hypoxic conditions. The choice of concentration was based on a study that had been done with some of these anthocyanins on the proliferation of various cell lines [27].

Our results indicate that all of the phenolic compounds inhibited cell proliferation when compared to their vehicle controls (Fig. 2.5B-C). Under normoxic conditions, Cy-3-sam-5-glu was the most effective compound at inhibiting U-87 MG, U-138 MG and HBMEC proliferation by 29.9%, 44% and 33.6%, respectively (Fig. 2.5B). For Hs 683 cells, Cy-3-gal was a better inhibitor than Cy-3-sam-5-glu with 19.2% inhibition as compared to 14.6% inhibition. Under hypoxic conditions, Cy-3-sam-5-glu was also able to affect the proliferation of U-138 MG and Hs 683 by 39.7% and 17.3%, respectively (Fig. 2.5C). Moreover, Que-3-rut was the best compound for inhibiting U-87 MG proliferation by 27.5%, HBMEC by 27.5% and Hs 683 by 14.8% under hypoxic conditions (Fig. 2.5C). For all compounds tested, Dp-3-rut was the one which showed the weakest inhibitory effect. Interestingly, the combination of the five compounds exhibited a more potent inhibitory effect than did the individual compounds at equal concentrations indicating that compounds present in berry extracts work synergistically at inhibiting the growth of glioma and brain microvascular endothelial cells.

## 2.5. Discussion

Malignant gliomas, and particularly glioblastomas, are characterized by aggressive invasiveness, a high proliferative rate, abundant vascularization, and the presence of extensive areas of hypoxia. Interaction with the tumor microenvironment is necessary for glioma cell growth, which is limited by the emergence of new blood vessels via angiogenesis [28]. Hypoxia is well known to drive neovascularization resulting in migration of endothelial cells towards the tumor and proliferation to induce an angiogenic cascade [29]. Tumor hypoxia also leads to recurrence of cancers, resistance to cancer therapies and poor prognosis for patients with solid tumors such as glioblastomas [30, 31]. It is thus of great importance to find and characterize agents that are effective at targeting hypoxic glioma cells. Since angiogenesis in gliomas is correlated with the grade of malignancy [32], we have therefore targeted the proliferation of grade IV (U-87 MG and U-138 MG) and grade III (Hs 683) glioma cells as well as of HBMEC under normoxic and hypoxic conditions. Over the years, researchers have confirmed that dietary polyphenols are capable of inhibiting cell proliferation and inducing cell cycle arrest as well as apoptosis in a number of solid tumor cell lines [33, 34]. However, to the best of our knowledge, no studies have yet investigated the effect of elderberry, a rich source of polyphenols, on glioma and brain endothelial cell line models.

Here we documented for the first time the anticancer properties of two varieties of Canadian elderberry, Kent and Scotia. Berry and flower extracts caused a dose-dependent cancer and endothelial cell growth inhibition, and this antiproliferative effect appeared to be due to its ability to trigger cell cycle arrest and apoptotic cell death. Our results have shown that, of the extracts tested, concentrated elderberry extract is the most potent inhibitor of cell proliferation followed by Scotia and Kent elderberry under both culture conditions, whereas Scotia is less potent under hypoxic conditions. Moreover, HBMEC were less sensitive to the inhibitory effect of Kent or Scotia berries compared to glioma cell lines. Even though flowers attenuated cell proliferation, particularly that of glioblastoma cells, berries still remained more effective.

Remarkably, elderberries can target cell proliferation not only under normoxic conditions but also under hypoxic conditions. Since  $O_2$  tension in solid tumors ranges from 2.5%-5.3% (physiological levels) to pathological values below 0.1% in necrotic regions [35], it is safe to speculate that the circulating plasma levels of polyphenols derived from elderberry consumption may target the mechanisms regulating glioma cell proliferation.

To investigate the relationship of cell growth inhibition by extracts to cell cycle changes, cell cycle analysis was performed. We found that elderberry causes different effects on cell cycle dependant on cell type and extract, and the cell cycle arrest was further accompanied by alterations in the levels of various cell cycle-regulated protein expression. Interestingly, the stage of cell cycle arrest triggered by extracts can indicate the molecular mechanisms of action. For example, it is well known that cells arrested in G1 phase can result from the inhibition of CDK4 and/or CDK6 complexes with cyclin D, whereas S phase arrest can be caused by inhibition of cyclin A and cyclin E complexes with CDK2 [36]. Arrest of cell division in G2/M phase can be caused by inactivation of cyclin A with CDK2 in early G2 phase [37] or with CDK1 in late G2 phase [24], or also by cyclin B/ CDK1 complexes through p53 activation in the early events of mitosis [36, 38]. All these cell cycle phase arrests could result from the activation of CKIs such as p21 or p27 [39]. Since elderberry and elderflower extracts modulate the expression of several cell cycle checkpoint proteins, we hypothesize that such mechanisms could be involved in the inhibitory effect of elderberry to suppress the cell cycle progression. Additionally, several studies illustrate that CDK/cyclin complexes influence the decision of whether a cell lives or dies [40-43]. Functional failure of these control points can lead to apoptosis [44]. The fact that elderberries, but not elderflowers, induced cell apoptosis, especially in HBMEC, suggests that this mechanism may also be involved in the inhibitory action by berries. However, further investigation is essential to determine the specific molecular mechanisms of each extract.

Low antioxidant levels in the brain were reported to be correlated with the malignancy levels of brain tumors [7]. This results in the accumulation of considerable amounts of

oxidative stress products including free radicals known to damage brain tissue [7, 45]. Dietary supplementation with antioxidants are believed to reduce these effects. Among common small fruits, elderberries are a rich source of phenolic compounds with antioxidant properties [13]. Depending on the method used to measure antioxidative activity, some studies showed comparable activity of elderberries to blackberries, black raspberries and other dark-fleshed small fruits [13] or to chokeberry, and they had a much higher potential than had cranberry and blueberry, two fruits praised for their high antioxidant capacity [15]. Interestingly, elderflowers are also recognized as valuable sources of bioactive polyphenols and they have moderate antioxidant activity compared to elderberries [46].

The antioxidant properties of elderberries are mainly attributed to the presence of anthocyanins, specifically cyanidin derivatives which are major pigments [47]. Analysis of eight different genotypes of *S. canadensis* (including 'Scotia') grown in the United States has shown the predominant presence of Cy-3-sam-5-glu, followed by cyanidin 3-5-diglucoside, cyanidin 3-sambubioside as well as acylated anthocyanins, namely cyanidin 3-(Z)-p-coumaroyl-sambubioside-5-glucoside, cyanidin 3-p-coumaroyl-glucoside, cyanidin 3-(E)-p-coumaroyl-sambubioside-5-glucoside and cyanidin 3-p-coumaroyl-sambubioside [48]. The fact that Cy-3-sam-5-glu is also the major anthocyanin compound in concentrated elderberry extract (mixture of Kent and Scotia cultivars grown in Québec) is consistent with this study. However, the anthocyanin profile indicates that the concentrated elderberry extract contains Dp-3-rut, cy-3-gal and cy-3-rut, which are undetectable or only found in trace levels in *S. canadensis* from the USA [48]. Nevertheless, phenolic compounds such as chlorogenic acid and rutin (glycosylated conjugate quercetin) were found in greater quantities in both *S. canadensis*. It should be noted that rutin is also the main flavonoid in our flower extracts as reported by another study [49]. The variability of anthocyanin composition (and content) observed in these elderberries could be explained by the type of cultivars, degree of ripeness, growing regions as well as environmental and climatic conditions [50]. It is well known that dietary anthocyanins or anthocyanin-enriched extracts reduce the actions of oxidative stress, proliferation, inflammation, and angiogenesis, all



processes involved in cancer progression [51-54]. It has been reported that the incorporation of anthocyanins by endothelial cells enhanced their resistance to the damaging effects of reactive oxygen species (ROS) [55]. In addition, anthocyanin extracts from black soybean increased the survival of U-87 MG cells accompanied by decreased levels of ROS [56]. Here, one may envision that the presence of these antioxidant molecules in our extracts could scavenge the free radicals and other ROS [57], thereby sensitizing glioma and brain endothelial cells to elderberry and elderflower treatment. In agreement with this, our data obtained with individual anthocyanins and rutins confirms their efficacy at inhibiting cell proliferation. For most of the cell lines tested, Cy-3-sam-5-glu and rutin were the best inhibitors, suggesting that they are involved in the inhibitory action of berry or flower extracts.

When a combination of two or more compounds exhibits a more potent effect than the addition of the effects from the individual compounds at equal concentrations, the effect is considered synergistic [58]. In this study, we tested whether the major bioactive compounds found in elderberry extracts can act synergistically to better inhibit the growth of glioma and brain endothelial cells than elderflower extracts where anthocyanins are not present. The results showed that the combination of the five compounds (Dp-3-rut, Cy-3-gal, Cy-3-rut, Que-3-rut, Cy- 3-sam-5-glu) exhibited a greater inhibitory effect than did the individual compounds for most cell lines tested, suggesting that the anti-proliferative effects of elderberries results in part from interactions between bioactive components. In support of this, it has been reported that phytochemicals contained in fruits and vegetables often work collaboratively to achieve health benefits [59, 60].

Several epidemiologic and experimental studies have demonstrated the health-promoting benefits provided by regular berry consumption, including some against the incidence of certain cancers [48, 61, 62]. Depending on the diet, the daily intake of anthocyanins in humans has been estimated to range from several milligrams to hundreds of milligrams [63]. For example, the total mean intake of anthocyanins from a Western diet was estimated at 12.5 mg/d [64] comparatively to 64.9 mg/d from a

Mediterranean diet [65]. An enhanced intake of dietary anthocyanins may be occurring with the consumption of commercially available anthocyanin extract. Indeed, 14.5 mg of anthocyanins can be obtained in one single teaspoon (5 mL) of concentrated elderberry extract (IMMUNIA™). Oral consumption of berry phytochemicals can directly be absorbed in the oral cavity and in the stomach as well as in the gastrointestinal tract [11, 62, 66]. In addition, anthocyanins can be taken up by human vascular endothelial cells [55, 67] and have demonstrated ability to cross the blood-brain barrier (BBB) [68-70]. It is also worth pointing out the ability of flavonol rutin to also pass through the BBB [71]. Moreover, anthocyanins are rapidly detected in plasma after consumption of elderberry extract [72]. Thus, integration of elderberries in the diet might be a comprehensive strategy for preventing the molecular events involved in chronic disease progression such as cancer. Human clinical trials demonstrating the chemopreventive effects of berry preparations have focused mainly on black raspberries [73]. However, it is likely that other berry types such as elderberries may also be effective for chemoprevention in humans. Future studies are required to better understand the molecular mechanisms of action and effectiveness *in vivo*, as elderberry and elderflower extracts have potential indications as cancer chemopreventive agents.

#### Conflict of interest

The authors have no conflicts of interest.

#### Acknowledgements

The authors thank the companies “Au Versant du Sureau” and “Fruitomed Inc.” for providing fruits, flowers and IMMUNIA™. We thank also Annie Levert for her technical support. This work was funded by the Institutional Research Chair in Cancer Prevention and Treatment held by Dr. Borhane Annabi at UQAM. We would like to thank the Innovation and Technologies Directorate of *Ministère de l'agriculture, des pêcheries et de l'alimentation* (MAPAQ, Québec, QC) for their financial support.

## 2.6. References

- [1] Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta neuropathologica*. 2007;114:97-109.
- [2] Hendriksen EM, Span PN, Schuurin J, Peters JP, Sweep FC, van der Kogel AJ, et al. Angiogenesis, hypoxia and VEGF expression during tumour growth in a human xenograft tumour model. *Microvascular research*. 2009;77:96-103.
- [3] Jensen RL. Brain tumor hypoxia: tumorigenesis, angiogenesis, imaging, pseudoprogression, and as a therapeutic target. *Journal of neuro-oncology*. 2009;92:317-35.
- [4] Kaur B, Khwaja FW, Severson EA, Matheny SL, Brat DJ, Van Meir EG. Hypoxia and the hypoxia-inducible-factor pathway in glioma growth and angiogenesis. *Neuro-oncology*. 2005;7:134-53.
- [5] Rooprai HK, Christidou M, Pilkington GJ. The potential for strategies using micronutrients and heterocyclic drugs to treat invasive gliomas. *Acta Neurochir (Wien)*. 2003;145:683-90.
- [6] Ramachandran C, Nair SM, Escalon E, Melnick SJ. Potentiation of etoposide and temozolomide cytotoxicity by curcumin and turmeric force in brain tumor cell lines. *Journal of complementary & integrative medicine*. 2012;9:Article 20.
- [7] Sheweita SA, Sheikh BY. Can dietary antioxidants reduce the incidence of brain tumors? *Current drug metabolism*. 2011;12:587-93.
- [8] Wiseman M. The second World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research expert report. Food, nutrition, physical activity, and the prevention of cancer: a global perspective. *Proc Nutr Soc*. 2008;67:253-6.
- [9] Surh YJ. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nature reviews*

Cancer. 2003;3:768- 80.

[10] Hou DX. Potential mechanisms of cancer chemoprevention by anthocyanins. *Curr Mol Med*. 2003;3:149-59.

[11] He J, Giusti MM. Anthocyanins: natural colorants with health-promoting properties. *Annual review of food science and technology*. 2010;1:163-87.

[12] Finn CE, Thomas AL, Byers PL, Serce S. Evaluation of American (*Sambucus canadensis*) and European (*S. nigra*) Elderberry Genotypes Grown in Diverse Environments and Implications for Cultivar Development. *HortScience*. 2008;43:1385-91.

[13] Ozgen M, Scheerens JC, Reese RN, Miller RA. Total phenolic, anthocyanin contents and antioxidant capacity of selected elderberry (*Sambucus canadensis* L.) accessions. *Pharmacognosy magazine*. 2010;6:198-203.

[14] Thole JM, Kraft TF, Sueiro LA, Kang YH, Gills JJ, Cuendet M, et al. A comparative evaluation of the anticancer properties of European and American elderberry fruits. *Journal of medicinal food*. 2006;9:498- 504.

[15] Wu X, Gu L, Prior RL, McKay S. Characterization of anthocyanins and proanthocyanidins in some cultivars of *Ribes*, *Aronia*, and *Sambucus* and their antioxidant capacity. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2004;52:7846-56.

[16] Thomas AL, Byers PL, Ellersieck MR. Productivity and Characteristics of American Elderberry in Response to Various Pruning Methods. *HortScience*. 2009;44:671-7.

[17] Thomas AL, Byers PL, Gu S, Avery JD, Jr., Kaps M, Datta A, et al. Occurrence of Polyphenols, Organic Acids, and Sugars among Diverse Elderberry Genotypes Grown in Three Missouri (USA) Locations. *Acta horticulturae*. 2015;1061:147-54.

[18] Charlebois D, Byers PL, Finn CE, Thomas AL. Elderberry: Botany, Horticulture, Potential. *Horticultural Reviews*. 2010;37:213-80.

- [19] Viapiana A, Wesolowski M. The Phenolic Contents and Antioxidant Activities of Infusions of *Sambucus nigra* L. *Plant Foods Hum Nutr*. 2017.
- [20] Liu Y, Cox SR, Morita T, Kourembanas S. Hypoxia regulates vascular endothelial growth factor gene expression in endothelial cells. Identification of a 5' enhancer. *Circulation research*. 1995;77:638-43.
- [21] Chen C, Pore N, Behrooz A, Ismail-Beigi F, Maity A. Regulation of glut1 mRNA by hypoxia-inducible factor-1. Interaction between H-ras and hypoxia. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276:9519-25.
- [22] Harris AL. Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth. *Nature reviews Cancer*. 2002;2:38-47.
- [23] Musgrove EA, Caldon CE, Barraclough J, Stone A, Sutherland RL. Cyclin D as a therapeutic target in cancer. *Nature reviews Cancer*. 2011;11:558-72.
- [24] Canavese M, Santo L, Raje N. Cyclin dependent kinases in cancer: potential for therapeutic intervention. *Cancer biology & therapy*. 2012;13:451-7.
- [25] Harper JW, Elledge SJ, Keyomarsi K, Dynlacht B, Tsai LH, Zhang P, et al. Inhibition of cyclin-dependent kinases by p21. *Molecular biology of the cell*. 1995;6:387-400.
- [26] Koff A. How to decrease p27Kip1 levels during tumor development. *Cancer cell*. 2006;9:75-6.
- [27] Zhang Y, Vareed SK, Nair MG. Human tumor cell growth inhibition by nontoxic anthocyanidins, the pigments in fruits and vegetables. *Life sciences*. 2005;76:1465-72.
- [28] Dvorak HF, Weaver VM, Tlsty TD, Bergers G. Tumor microenvironment and progression. *Journal of surgical oncology*. 2011;103:468-74.
- [29] Hardee ME, Zagzag D. Mechanisms of glioma-associated neovascularization. *The American journal of pathology*. 2012;181:1126-41.

- [30] Zhou J, Schmid T, Schnitzer S, Brune B. Tumor hypoxia and cancer progression. *Cancer letters*. 2006;237:10-21.
- [31] Alves TR, Lima FR, Kahn SA, Lobo D, Dubois LG, Soletti R, et al. Glioblastoma cells: a heterogeneous and fatal tumor interacting with the parenchyma. *Life sciences*. 2011;89:532-9.
- [32] Lakka SS, Rao JS. Antiangiogenic therapy in brain tumors. *Expert review of neurotherapeutics*. 2008;8:1457-73.
- [33] Zhou Y, Zheng J, Li Y, Xu DP, Li S, Chen YM, et al. Natural Polyphenols for Prevention and Treatment of Cancer. *Nutrients*. 2016;8.
- [34] Amin AR, Kucuk O, Khuri FR, Shin DM. Perspectives for cancer prevention with natural compounds. *J Clin Oncol*. 2009;27:2712-25.
- [35] Ljungkvist AS, Bussink J, Kaanders JH, van der Kogel AJ. Dynamics of tumor hypoxia measured with bioreductive hypoxic cell markers. *Radiat Res*. 2007;167:127-45.
- [36] Malumbres M, Barbacid M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nature reviews Cancer*. 2009;9:153-66.
- [37] Goldstone S, Pavey S, Forrest A, Sinnamon J, Gabrielli B. Cdc25-dependent activation of cyclin A/cdk2 is blocked in G2 phase arrested cells independently of ATM/ATR. *Oncogene*. 2001;20:921-32.
- [38] Taylor WR, DePrimo SE, Agarwal A, Agarwal ML, Schonthal AH, Katula KS, et al. Mechanisms of G2 arrest in response to overexpression of p53. *Molecular biology of the cell*. 1999;10:3607-22.
- [39] Abukhdeir AM, Park BH. P21 and p27: roles in carcinogenesis and drug resistance. *Expert Rev Mol Med*. 2008;10:e19.
- [40] Kasten MM, Giordano A. pRb and the cdks in apoptosis and the cell cycle. *Cell Death*

Differ. 1998;5:132-40.

[41] Gil-Gomez G, Berns A, Brady HJ. A link between cell cycle and cell death: Bax and Bcl-2 modulate Cdk2 activation during thymocyte apoptosis. *EMBO J.* 1998;17:7209-18.

[42] Meikrantz W, Gisselbrecht S, Tam SW, Schlegel R. Activation of cyclin A-dependent protein kinases during apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91:3754-8.

[43] Harvey KJ, Blomquist JF, Ucker DS. Commitment and effector phases of the physiological cell death pathway elucidated with respect to Bcl-2 caspase, and cyclin-dependent kinase activities. *Molecular and cellular biology.* 1998;18:2912-22.

[44] Pucci B, Kasten M, Giordano A. Cell cycle and apoptosis. *Neoplasia.* 2000;2:291-9.

[45] Uttara B, Singh AV, Zamboni P, Mahajan RT. Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Curr Neuropharmacol.* 2009;7:65-74.

[46] Sroka JT, Marshall SM, Putz FE. Antioxidation capacity of fruit and flower extracts from American elderberry (*Sambucus canadensis*). University of Florida/Journal of Undergraduate Research. 2014;15:1- 5.

[47] Sidor A, Gramza-Michałowska. Advanced research on the antioxidant and health benefit of elderberry (*Sambucus nigra*) in food – a review. *J Funct Foods.* 2015;18:941-58.

[48] Lee J, Finn CE. Anthocyanins and other polyphenolics in American elderberry (*Sambucus canadensis*) and European elderberry (*S. nigra*) cultivars. *J Sci Food Agric.* 2007;87:2665-75.

[49] Loizzo MR, Pugliese A, Bonesi M, Tenuta MC, Menichini F, Xiao J, et al. Edible Flowers: A Rich Source of Phytochemicals with Antioxidant and Hypoglycemic Properties. *Journal of agricultural and food chemistry.* 2016;64:2467-74.

- [50] Tomás-Barberán FA, Espín JC. Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality in fruits and vegetables. *J Sci Food Agric*. 2001;81:853-76.
- [51] Wang LS, Stoner GD. Anthocyanins and their role in cancer prevention. *Cancer letters*. 2008;269:281-90.
- [52] Lin BW, Gong CC, Song HF, Cui YY. Effects of anthocyanins on the prevention and treatment of cancer. *British journal of pharmacology*. 2016.
- [53] Lamy S, Blanchette M, Michaud-Levesque J, Lafleur R, Durocher Y, Moghrabi A, et al. Delphinidin, a dietary anthocyanidin, inhibits vascular endothelial growth factor receptor-2 phosphorylation. *Carcinogenesis*. 2006;27:989-96.
- [54] Lamy S, Beaulieu E, Labbe D, Bedard V, Moghrabi A, Barrette S, et al. Delphinidin, a dietary anthocyanidin, inhibits platelet-derived growth factor ligand/receptor (PDGF/PDGFR) signaling. *Carcinogenesis*. 2008;29:1033-41.
- [55] Youdim KA, Martin A, Joseph JA. Incorporation of the elderberry anthocyanins by endothelial cells increases protection against oxidative stress. *Free radical biology & medicine*. 2000;29:51-60.
- [56] Kim YK, Yoon HH, Lee YD, Youn DY, Ha TJ, Kim HS, et al. Anthocyanin Extracts from Black Soybean (*Glycine max* L.) Protect Human Glial Cells Against Oxygen-Glucose Deprivation by Promoting Autophagy. *Biomol Ther (Seoul)*. 2012;20:68-74.
- [57] Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn Rev*. 2010;4:118-26.
- [58] Tallarida RJ. Quantitative methods for assessing drug synergism. *Genes Cancer*. 2011;2:1003-8.
- [59] Seeram NP, Adams LS, Hardy ML, Heber D. Total cranberry extract versus its phytochemical constituents: antiproliferative and synergistic effects against human tumor cell lines. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2004;52:2512-7.



- [60] Liu RH. Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. *The Journal of nutrition*. 2004;134:3479S-85S.
- [61] Zafra-Stone S, Yasmin T, Bagchi M, Chatterjee A, Vinson JA, Bagchi D. Berry anthocyanins as novel antioxidants in human health and disease prevention. *Mol Nutr Food Res*. 2007;51:675-83.
- [62] Bishayee A, Haskell Y, Do C, Siveen KS, Mohandas N, Sethi G, et al. Potential Benefits of Edible Berries in the Management of Aerodigestive and Gastrointestinal Tract Cancers: Preclinical and Clinical Evidence. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2016;56:1753-75.
- [63] Manach C, Williamson G, Morand C, Scalbert A, Remesy C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *The American journal of clinical nutrition*. 2005;81:230S-42S.
- [64] Wu X, Beecher GR, Holden JM, Haytowitz DB, Gebhardt SE, Prior RL. Concentrations of anthocyanins in common foods in the United States and estimation of normal consumption. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2006;54:4069-75.
- [65] Zamora-Ros R, Knaze V, Lujan-Barroso L, Slimani N, Romieu I, Touillaud M, et al. Estimation of the intake of anthocyanidins and their food sources in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study. *Br J Nutr*. 2011;106:1090-9.
- [66] Prior RL, Wu X. Anthocyanins: structural characteristics that result in unique metabolic patterns and biological activities. *Free Radic Res*. 2006;40:1014-28.
- [67] Ziberna L, Tramer F, Moze S, Vrhovsek U, Mattivi F, Passamonti S. Transport and bioactivity of cyanidin 3-glucoside into the vascular endothelium. *Free radical biology & medicine*. 2012;52:1750-9.
- [68] Youdim KA, Qaiser MZ, Begley DJ, Rice-Evans CA, Abbott NJ. Flavonoid permeability across an in situ model of the blood-brain barrier. *Free radical biology & medicine*. 2004;36:592-604.

- [69] Faria A, Meireles M, Fernandes I, Santos-Buelga C, Gonzalez-Manzano S, Duenas M, et al. Flavonoid metabolites transport across a human BBB model. *Food Chem.* 2014;149:190-6.
- [70] Andres-Lacueva C, Shukitt-Hale B, Galli RL, Jauregui O, Lamuela-Raventos RM, Joseph JA. Anthocyanins in aged blueberry-fed rats are found centrally and may enhance memory. *Nutr Neurosci.* 2005;8:111-20.
- [71] Habtemariam S. Rutin as a Natural Therapy for Alzheimer's Disease: Insights into its Mechanisms of Action. *Curr Med Chem.* 2016;23:860-73.
- [72] Cao G, Prior RL. Anthocyanins are detected in human plasma after oral administration of an elderberry extract. *Clin Chem.* 1999;45:574-6.
- [73] Kresty LA, Mallery SR, Stoner GD. Black raspberries in cancer clinical trials: Past, present and future. *J Berry Res.* 2016;6:251-61.

## 2.7. Figure Legends

**Fig. 2.1.** Hypoxia culture condition validation in human brain tumor and brain endothelial cell lines. Cells were incubated for 24 h in complete medium and were then serum-starved under normoxic or hypoxic conditions. After 24 h, the medium was removed and replaced with fresh complete medium for 48 h. Total RNA was isolated from cells following the conditions described above, cDNA synthesis and qPCR were performed to assess (A) VEGF and (B) GLUT-1 gene expression. Values are means  $\pm$ SEM of three independent experiments ( $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$  and  $***p < 0.001$  versus normoxia control).

**Fig. 2.2.** Inhibition of human glioma and brain endothelial cell proliferation by elderberry and elderflower extracts. Cells were seeded into 96-well plates in complete medium. After 24 h, cells were serum-starved under (A) normoxic or (B) hypoxic conditions for another 24 h. Then the medium was removed and replaced with fresh complete medium in the presence or absence of various concentrations of the indicated (A, B) berry or (C) flower extract. After 48 h, cell proliferation was determined as described in the Methods section. Values are means  $\pm$ SEM of four independent experiments performed in quadruplicate [ $***p < 0.001$  versus control for all data in panels A and B except for: Elderberry concentrate at 10  $\mu$ L/mL for U-87 MG cells under normoxic conditions and for U-138 MG cells and HBMEC under hypoxic conditions as well as Kent elderflower at 10  $\mu$ L/mL for Hs 683 cells under hypoxic conditions ( $**p < 0.01$ ); Scotia elderberry at 10 - 25  $\mu$ L/mL for Hs 683 cells and Kent elderberry at 10  $\mu$ L/mL for HBMEC under hypoxic conditions (not significant); ( $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$  and  $***p < 0.001$  versus control) for data in panel C].

**Fig. 2.3.** Elderberry and elderflower extracts effects on cell cycle regulation. After 24 h of cell seeding in culture wells with complete medium, cells were serum-starved under (A) normoxic or (B) hypoxic conditions before treatment with extracts (50  $\mu$ L/mL concentrated elderberry extract or 100  $\mu$ L/mL elderberry extracts or 500  $\mu$ L/mL elderflower extracts) as indicated in the Methods section. (A, B) Histogram distribution

of cells in the G0/G1, S and G2/M phases as determined by flow cytometry analysis. The individual DNA content was determined by fluorescence intensity of incorporated PI. Values are means  $\pm$ SEM of three independent experiments ( $*p < 0.05$  and  $***p < 0.001$  versus control). (C) Western blot and immunodetection of cell cycle regulatory proteins in U-87 MG, U-138 MG, Hs 683 cells and in HBMEC treated under the same normoxic or hypoxic conditions as for FACS analysis. Cells were lysed and the protein expression levels were monitored by immunoblotting using specific antibodies. Immunodetections obtained from representative samples are shown, and data are representative of three independent experiments. GAPDH expression was used as a loading control. The band intensities were analyzed by densitometry using ImageJ software. The relative levels of protein expression were normalized to those seen in the respective control (value = 1) and indicated by x-fold.

**Fig. 2.4.** Elderberry extracts affect human glioma and brain endothelial cell viability. After 24 h of cell seeding in culture wells with complete medium, cells were serum-starved under (A) normoxic or (B) hypoxic conditions before treatment with extracts (50  $\mu$ L/mL concentrated elderberry extract or 100  $\mu$ L/mL elderberry extracts or 500  $\mu$ L/mL elderflower extracts) as indicated in the Methods section. Histogram distribution of live, apoptotic and necrotic cells as determined by flow cytometry analysis. The individual DNA content was determined by fluorescence intensity of incorporated Annexin V/PI. Values are means  $\pm$ SEM of three independent experiments ( $*p < 0.05$  and  $***p < 0.001$  versus control). The proportion of apoptotic cells in the total cell population is indicated in percentage.

**Fig. 2.5.** Inhibition of human glioma and brain endothelial cell proliferation by phenolic compounds. (A) Chemical structures of elderberry and elderflower compounds. (B, C) Cells were seeded into 96-well plates in complete medium. After 24 h, cells were serum-starved under (B) normoxic or (C) hypoxic conditions for another 24 h. Then the medium was removed and replaced by fresh complete medium in the presence or absence of the indicated compounds or the combination of these compounds (Mix) at 200  $\mu$ M. After 48 h, cell proliferation was determined by the WST-1 assay, as described

in the Methods section. Values are means  $\pm$ SEM of two independent experiments performed in quadruplicate (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.001$  versus control).

**Table 2.1.** Comparative overview of IC<sub>50</sub> values of elderberry and elderflower extracts on cell proliferation.

**Table 2.2.** Percent values of cell cycle phase as monitored by flow cytometry after treatment with elderberry and elderflower extracts.

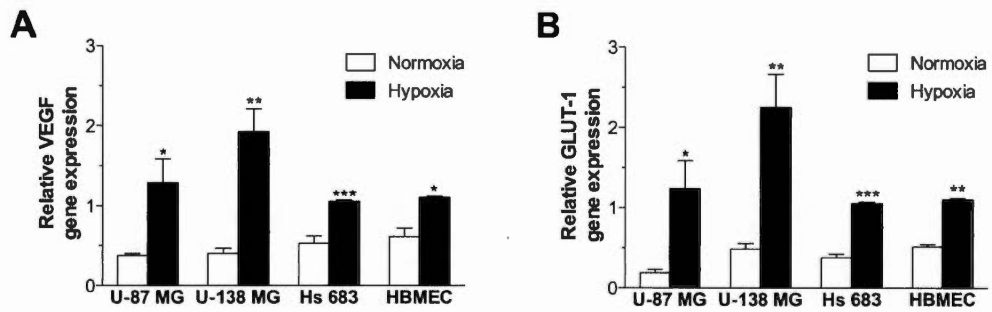
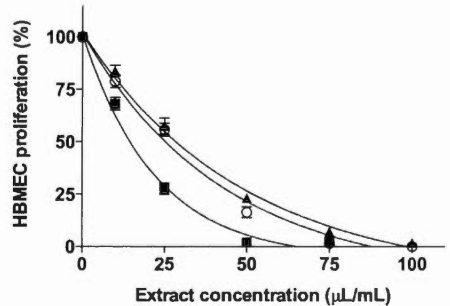
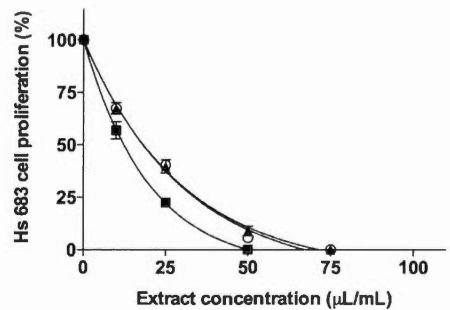
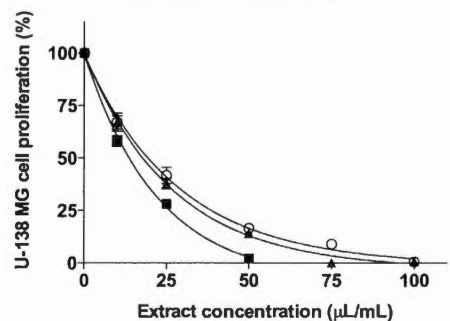
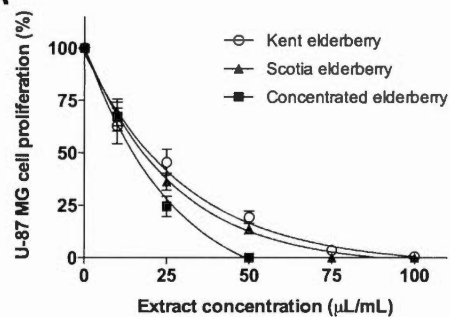
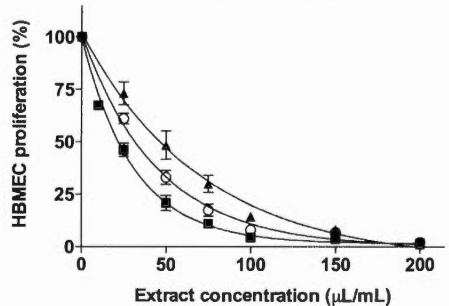
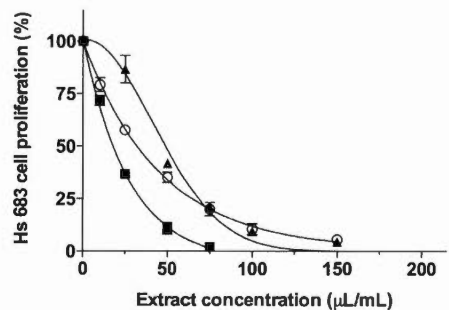
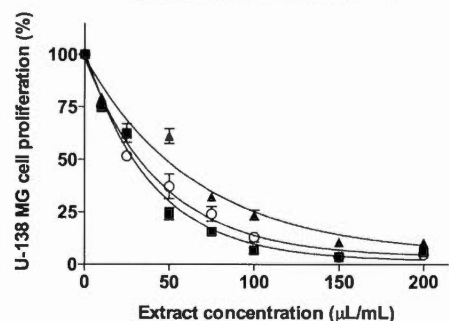
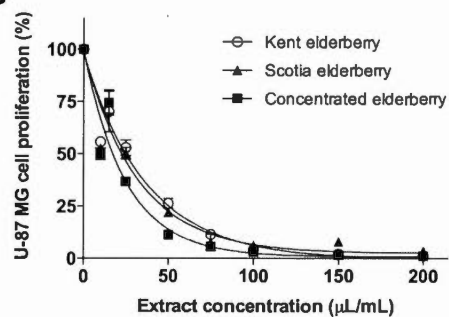


Figure 2.1: Hypoxia culture condition validation in human brain tumor and brain endothelial cell lines

**A****B**

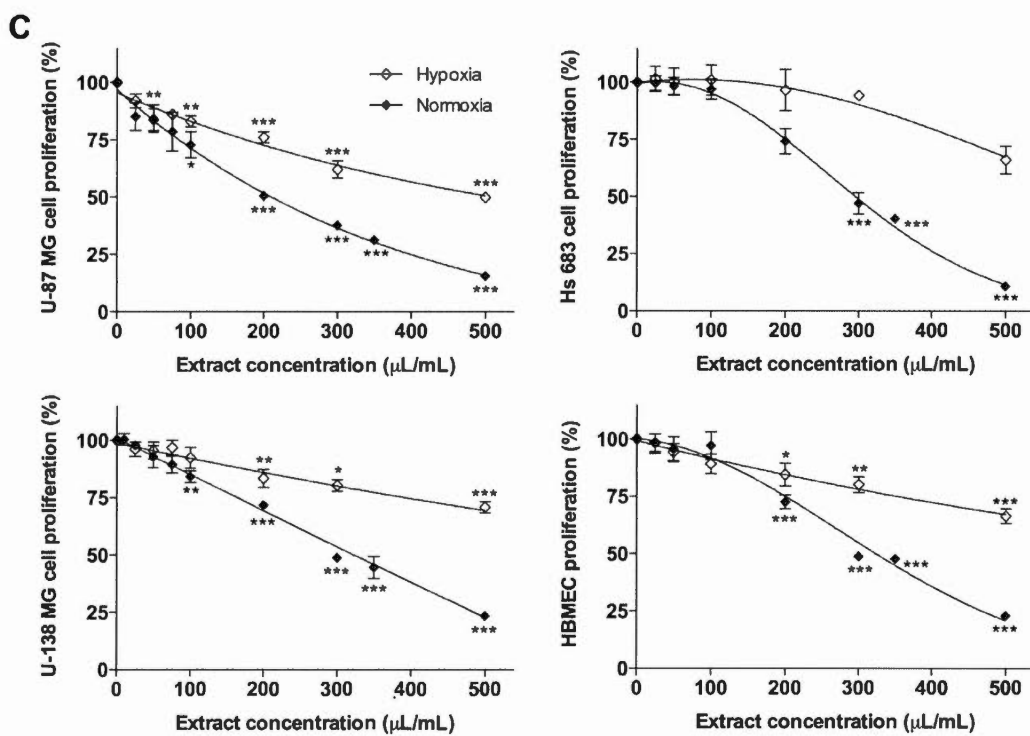
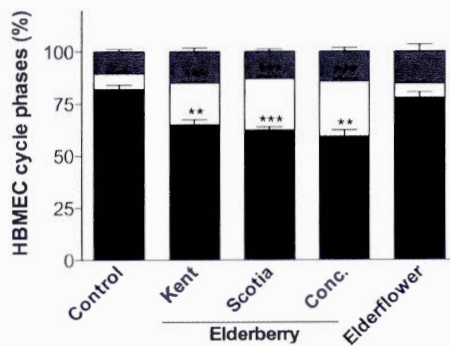
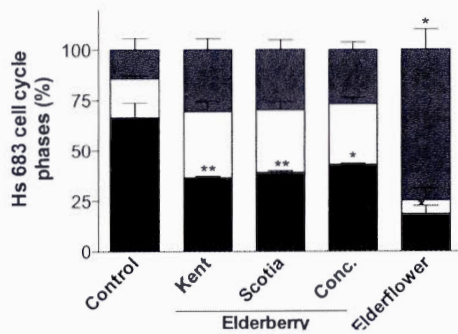
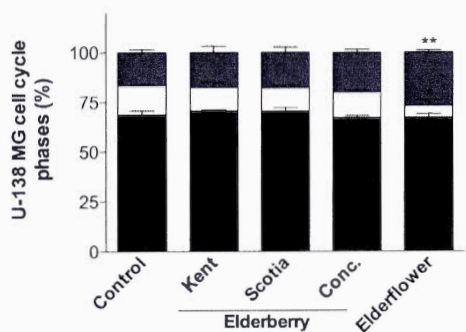
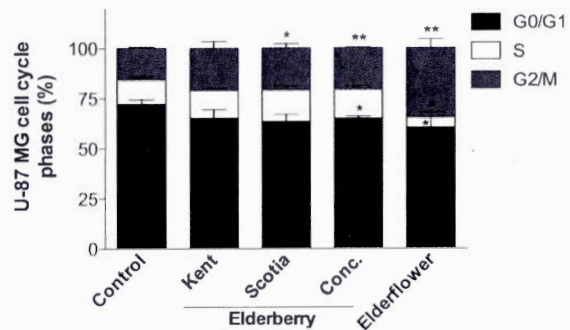


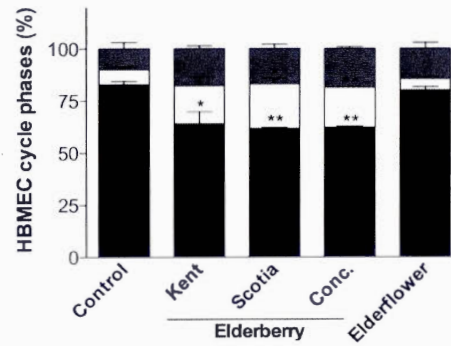
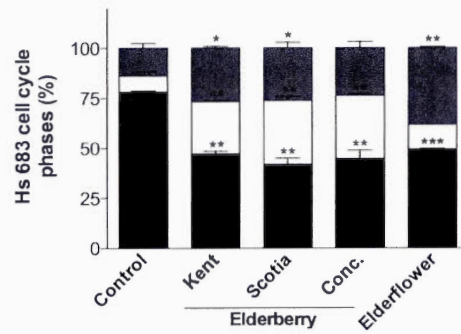
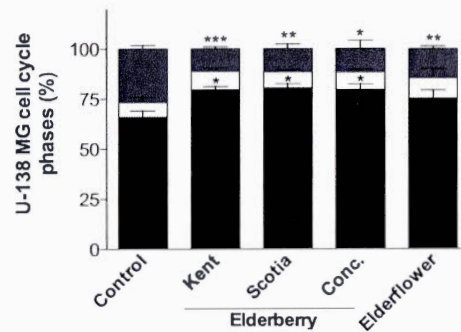
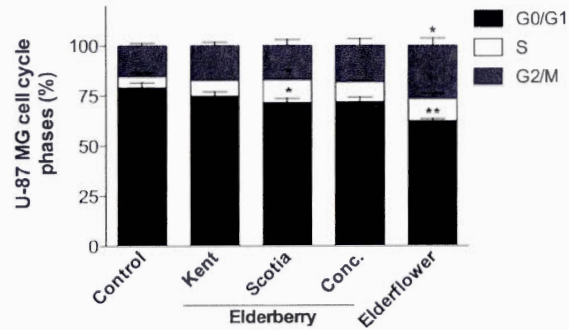
Figure 2.2: Inhibition of human glioma and brain endothelial cell proliferation by elderberry and elderflower extracts



A



B



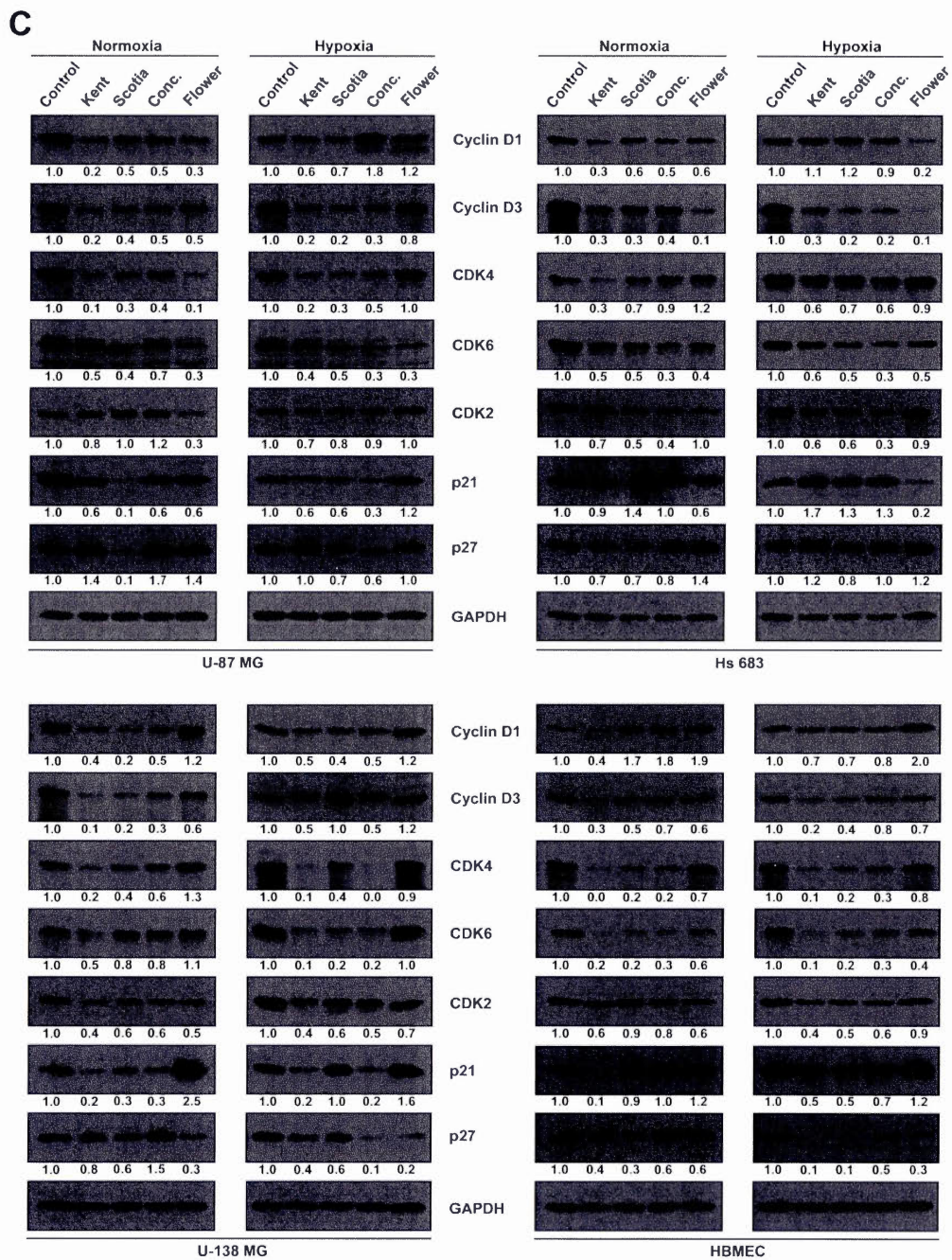


Figure 2.3: Elderberry and elderflower extracts effects on cell cycle regulation

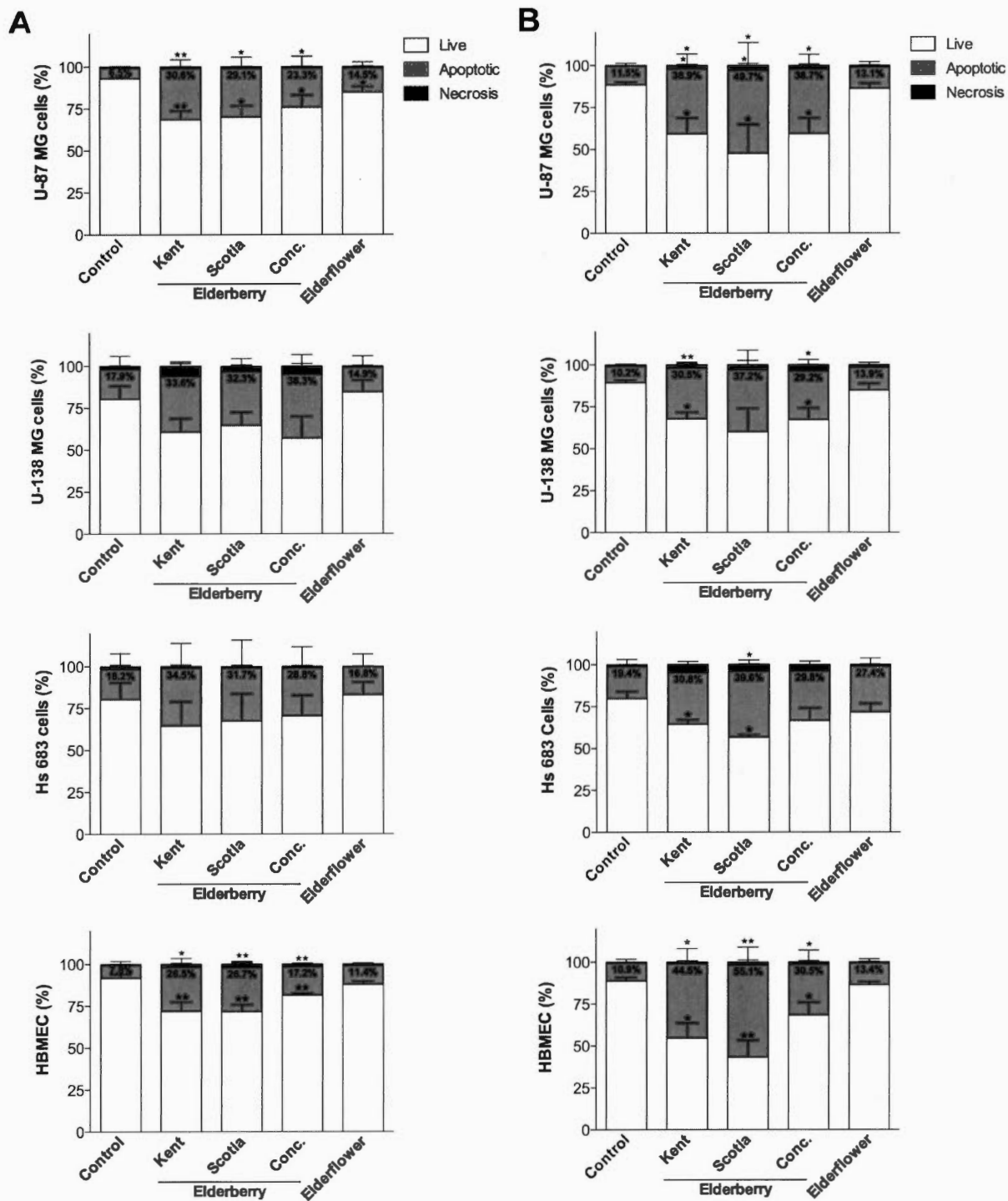
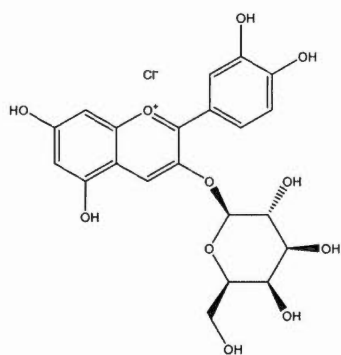
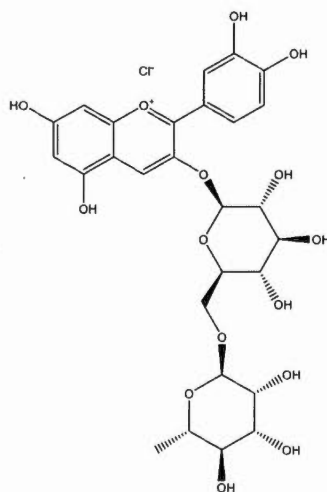
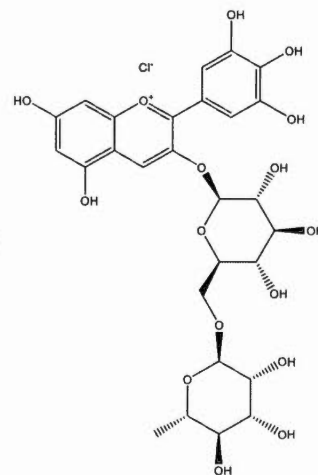
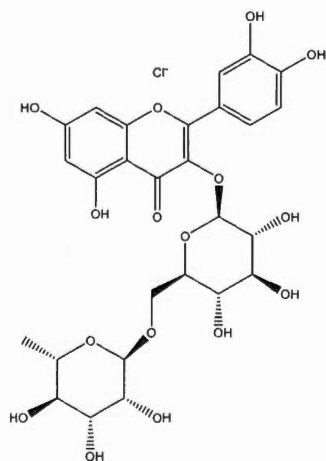
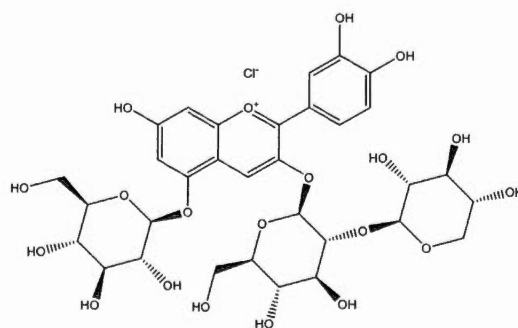


Figure 2.4: Elderberry extracts affect human glioma and brain endothelial cell viability

**A****Cyanidin-3-O-galactoside chloride****Cyanidin-3-O-rutinoside chloride****Delphinidin-3-O-rutinoside chloride****Quercetin-3-O-rutinoside****Cyanidin-3-O-sambubioside-5-O-glucoside chloride**

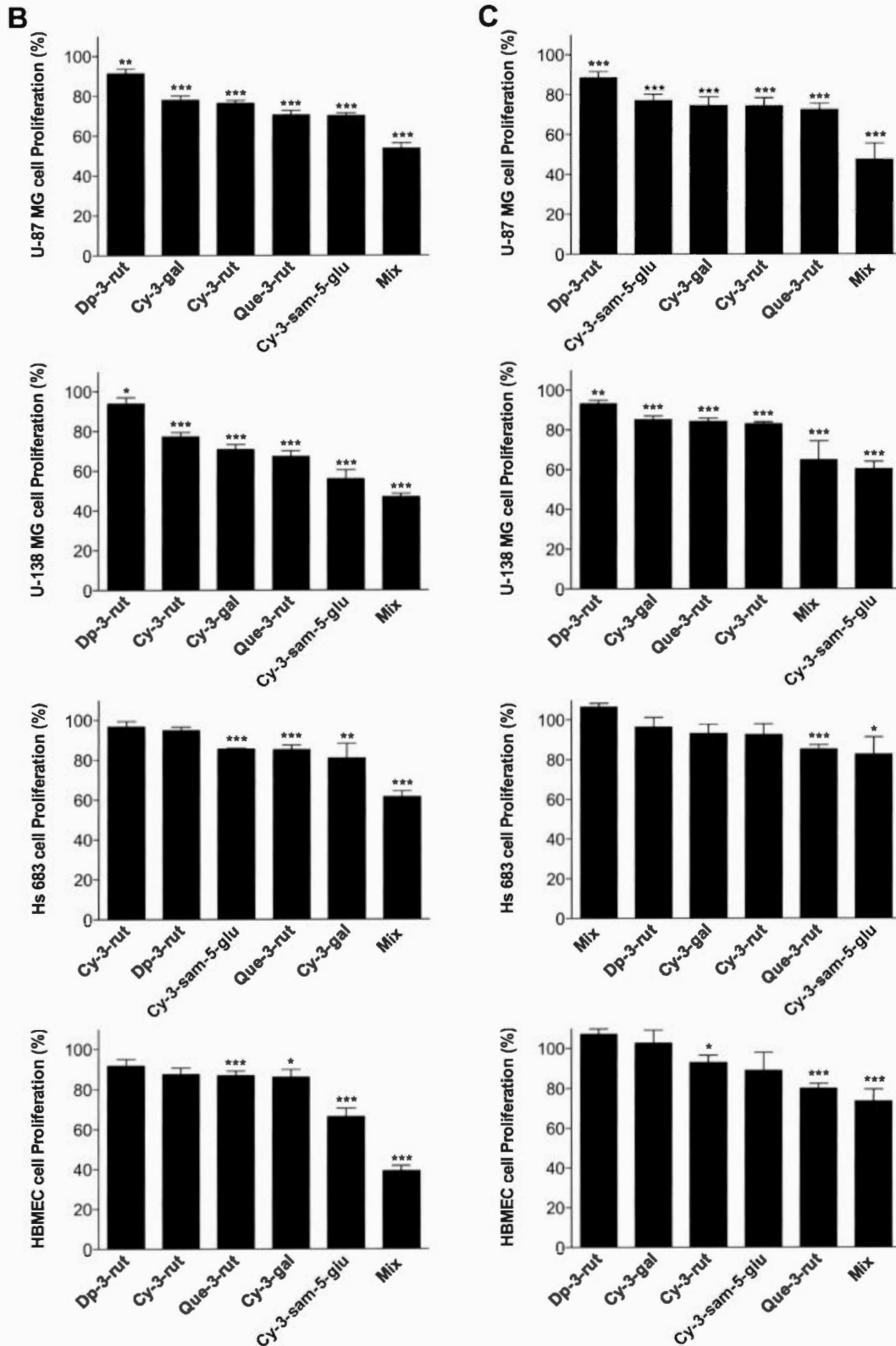


Figure 2.5: Inhibition of human glioma and brain endothelial cell proliferation by phenolic compounds

Table 2.1 : Comparative overview of IC<sub>50</sub> values of elderberry and elderflower extracts on cell proliferation

Extracts	IC <sub>50</sub> (µL/mL)											
	U-87 MG		U-138 MG		Hs 683		HBMEC					
	N	H	N	H	N	H	N	H	N	H		
Kent elderberry	18.3 (1.1) <sup>a1*</sup>	25.0 (2.6) <sup>a1</sup>	19.4 (2.0) <sup>a2§</sup>	30.0 (2.1) <sup>a2</sup>	18.2 (0.5) <sup>a3¶</sup>	31.9 (1.4) <sup>a3</sup>	25.0 (0.4) <sup>a*§¶</sup>	31.8 (3.7) <sup>a</sup>				
Scotia elderberry	17.5 (0.9) <sup>b1*</sup>	22.5 (1.1) <sup>b1*§</sup>	17.5 (2.3) <sup>b2§</sup>	45.0 (2.2) <sup>ab2*§¶</sup>	18.2 (0.5) <sup>b3¶</sup>	48.8 (2.2) <sup>a3¶</sup>	28.3 (2.3) <sup>b4*§¶</sup>	46.8 (2.6) <sup>a4*</sup>				
Concentrated elderberry	15.0 (0.7) <sup>c</sup>	17.5 (1.1) <sup>ab*</sup>	13.8 (1.5) <sup>c2</sup>	26.2 (1.9) <sup>b2*§</sup>	12.2 (0.7) <sup>c3</sup>	18.0 (0.5) <sup>a3§</sup>	14.7 (1.8) <sup>c</sup>	21.8 (0.8) <sup>a*</sup>				
Elderflower	167.5 (9.9) <sup>abc*§</sup>	-	245.0 (5.0) <sup>abc*¶</sup>	-	276.7 (7.7) <sup>abc§¶</sup>	-	275.0 (8.5) <sup>abc*</sup>	-				

NOTE: IC<sub>50</sub> is defined as the concentration at which extracts inhibit 50% of cell proliferation.

The IC<sub>50</sub> values were calculated using dose-response curves for each condition.

The same lower-case letter (within a column) indicating that the values were significantly different between the cultivars; the same lower-case number (within a line) indicating that the values were significantly different between culture conditions in the same cell line, and the same lower-case symbol (within a line) indicating that the values were significantly different in the same culture conditions between cell lines (Bonferroni test,  $p < .05$ ). Values in parenthesis are standard errors. N = Normoxia; H = Hypoxia.

Table 2.2 : Percent values of cell cycle phase as monitored by flow cytometry after treatment with elderberry and elderflower extracts

Cell lines	Cell cycle phases	Berry and flower extracts														
		Control (vehicule)			Kent elderberry			Scotia elderberry			Concentrated elderberry			Elderflower		
		N	H	N	N	H	N	H	N	H	N	H	N	H		
U-87 MG	G0/G1	72.2 (2.9)	79.1 (3.1)	65.1 (5.7)	74.7 (3.1) <sup>a</sup>	63.4 (4.4)	71.4 (2.9) <sup>*</sup>	64.8 (1.2) <sup>*</sup>	71.7 (2.6)	60.2 (6.6) <sup>*</sup>	62.4 (1.4) <sup>**a</sup>					
	S	12.0 (2.1)	5.4 (2.2)	13.7 (1.4)	7.8 (0.6)	15.7 (2.5) <sup>a</sup>	11.3 (0.9) <sup>*</sup>	14.4 (1.6)	9.8 (0.8)	5.2 (3.4) <sup>a</sup>	11.0 (3.4)					
	G2/M	15.8 (0.8)	15.5 (1.7)	21.2 (4.2)	17.5 (2.5)	20.9 (3.0) <sup>*</sup>	17.3 (3.8)	20.8 (0.4) <sup>**</sup>	18.5 (3.4)	34.6 (5.3) <sup>**</sup>	26.7 (4.8) <sup>*</sup>					
U-138 MG	G0/G1	68.7 (2.7)	65.8 (4.4)	70.5 (0.6)	79.6 (2.1) <sup>*</sup>	70.2 (2.7)	80.3 (3.0) <sup>*</sup>	67.1 (1.0)	79.5 (2.9) <sup>*</sup>	67.1 (2.5)	75.1 (5.6)					
	S	14.5 (1.0)	7.4 (3.0)	11.7 (3.7)	9.3 (1.9)	11.7 (1.8)	8.2 (1.1)	12.7 (1.0)	8.8 (1.2)	5.9 (3.8) <sup>*</sup>	10.3 (6.0)					
	G2/M	16.8 (2.0)	26.8 (2.5)	17.8 (4.3)	11.1 (1.4) <sup>***</sup>	18.1 (3.3)	11.5 (2.9) <sup>**</sup>	20.1 (1.5)	11.9 (4.1) <sup>*</sup>	26.9 (1.4) <sup>**</sup>	14.7 (1.7) <sup>**</sup>					
Hs 683	G0/G1	66.4 (7.4)	78.1 (0.4)	36.6 (0.9) <sup>**a</sup>	47.1 (1.4) <sup>**</sup>	39.1 (1.1) <sup>**b</sup>	42.0 (3.8) <sup>**</sup>	43.1 (0.5) <sup>*c</sup>	44.6 (4.2) <sup>**</sup>	18.5 (4.0) <sup>abc</sup>	49.4 (0.4) <sup>***</sup>					
	S	19.2 (1.6)	8.1 (2.1)	32.6 (6.0)	26.1 (0.5) <sup>**a</sup>	31.0 (5.4)	31.7 (2.6) <sup>**b</sup>	29.8 (3.3)	31.4 (1.1) <sup>**c</sup>	6.5 (6.1)	12.4 (0.2) <sup>abc</sup>					
	G2/M	14.5 (5.6)	13.8 (2.5)	30.8 (6.9) <sup>a</sup>	26.8 (1.0) <sup>*</sup>	29.9 (6.3) <sup>b</sup>	26.3 (3.7) <sup>*</sup>	27.1 (3.8) <sup>c</sup>	23.9 (3.2)	75.0 (10.1) <sup>*abc</sup>	38.3 (0.6) <sup>**</sup>					
HBMEC	G0/G1	82.1 (2.6)	82.8 (1.6)	65.1 (3.0) <sup>**</sup>	63.9 (5.9) <sup>*</sup>	62.4 (1.9) <sup>***a</sup>	61.7 (0.5) <sup>**</sup>	59.2 (4.1) <sup>**b</sup>	62.2 (0.5) <sup>**</sup>	77.8 (2.8) <sup>ab</sup>	80.2 (1.5)					
	S	7.1 (1.4)	7.1 (1.5)	19.8 (0.8) <sup>***ab</sup>	18.4 (4.4)	24.5 (1.4) <sup>***b</sup>	21.4 (2.8) <sup>*</sup>	26.3 (2.0) <sup>***a</sup>	19.1 (0.4) <sup>**</sup>	6.6 (0.6) <sup>ab</sup>	5.2 (1.4)					
	G2/M	10.8 (1.5)	10.1 (3.2)	15.1 (2.3)	17.8 (1.6)	13.0 (1.7)	17.0 (2.2)	14.5 (2.2)	18.7 (0.9)	15.6 (3.4)	14.7 (2.9)					

NOTE: N = Normoxia; H = Hypoxia.

Extract concentration: Kent and Scotia elderberries = 100 µL/mL; Concentrated elderberry = 50 µL/mL; Elderflower concentration = 500 µL/mL.

Values are means of three independent experiments (\* p &lt; .05, \*\* p &lt; .01 and \*\*\* p &lt; .001 versus control; ANOVA with Dunnett's post hoc). The same lower-case letter (within a line) indicating that the values were significantly different between the cultivars (Bonferroni test, p &lt; .05). Values in parenthesis are standard errors.

## CHAPITRE III

### DISCUSSION

Les gliomes représentent la cause la plus importante de décès parmi les tumeurs cérébrales. De ceux-ci, les astrocytomes (grades I à IV, OMS) et les oligodendrogliomes (grades II et III, OMS) sont les plus fréquents, totalisant ensemble plus de 90% des tumeurs provenant de la glie. L'astrocytome de grade IV, ou GBM, est le plus fatal de tous dû à sa nature hautement infiltrante, ce qui met en danger les tissus sains essentiels du SNC et rend la résection complète souvent impraticable (Brat & Van Meir, 2004). Suite au diagnostic, la survie relative après cinq ans chez les patients de plus de 55 ans est de seulement 1%. Deux lignées cellulaires dérivant de glioblastomes ont été utilisées pour cette présente recherche, soit les lignées U-87 MG et U-138 MG. L'oligodendrogliome anaplasique, de grade III, possède un meilleur pronostic, avec une survie relative après cinq ans de 23% pour la même tranche d'âge (Société canadienne du cancer, 2017), mais représente également un danger dû au niveau élevé de prolifération et sa nature diffuse (Brat & Van Meir, 2004). Une lignée de ce type a été étudiée, soit les cellules Hs 683. De façon générale, ces deux types de cancers sont naturellement pharmacorésistants et difficilement opérables, en plus d'être hautement vascularisés. Ceci résulte d'une réponse adaptative induite entre autres par HIF-1 $\alpha$ , le facteur 1 $\alpha$  induit par l'hypoxie (*Hypoxia Inducible factor 1 $\alpha$* ). Ce facteur de transcription, induit par de faibles tensions d'oxygène caractéristiques des gliomes, permet l'expression de ses gènes cibles, dont GLUT1 et VEGF. Ce dernier stimule la croissance des cellules endothéliales qui tapissent l'intérieur des vaisseaux sanguins et, conséquemment, la formation de nouveaux vaisseaux sanguins afin d'assurer une meilleure perfusion de la tumeur (Semenza, 2003). À cet effet, une quatrième lignée cellulaire a été utilisée pour l'étude, soit les cellules endothéliales microvasculaires de cerveau, les HMBEC.



Depuis plusieurs années déjà, le lien entre l'augmentation de cancers et la diète est désormais d'une évidence indéniable. D'ailleurs, plusieurs études épidémiologiques se sont penchées sur l'association entre le risque de développer un gliome et l'alimentation, se demandant par exemple si certains composés des viandes rouges et transformées pouvaient l'augmenter, ou encore si les fruits et les légumes pouvaient le diminuer (Boeing, Schlehofer, Blettner, & Wahrendorf, 1993) (Dubrow, et al., 2010) (Li, 2014). De façon générale, la viande étant à éviter, un apport généreux de fruits, légumes, grains entiers et épices est recommandé, car ces aliments contiennent d'importantes proportions de phytochimiques connus pour leurs propriétés anticancer. Parmi celles-ci, la capacité antioxydante d'une diète riche en polyphénols serait un des mécanismes, avec l'induction de l'apoptose, responsables de la modulation de la progression et de l'agressivité des gliomes (Pouliquen, et al., 2008). Les fruits et les fleurs de sureau font partie de cette catégorie d'aliments dits fonctionnels : les baies d'un mauve presque noir possèdent une majorité d'anthocyanes et de flavonoïdes et les fleurs, non pigmentées, contiennent plusieurs flavonols, dont la rutine, toutes des molécules très antioxydantes (Pandey & Rizvi, 2009). Un extrait de fleurs de sureau du Canada (cultivar Scotia) et trois extraits de baies, deux extraits provenant des cultivars Kent et Scotia ainsi qu'un extrait concentré pressé à froid (Immunia™, Fruitomed Inc.) obtenu à partir d'un mélange des baies provenant des deux cultivars ont donc été testés sur trois lignées de gliomes et une lignée de cellules endothéliales cérébrales. Nous avons démontré pour la première fois qu'il était possible de bloquer leur prolifération cellulaire *in vitro* en altérant la régulation de leur cycle cellulaire et en induisant l'apoptose en conditions normoxiques et hypoxiques.

### **Validation des conditions de culture**

Nous avons premièrement validé les conditions normoxiques et hypoxiques en observant l'expression génique de facteurs induits par de faibles tensions d'oxygène. Comme attendu, après incubation de 48h des quatre lignées cellulaires en condition hypoxique, les niveaux d'expression géniques de VEGF et de GLUT1 étaient significativement augmentés par rapport aux cellules cultivées en normoxie. En effet, les oligodendrogliomes anaplasiques sont connus pour leur haut niveau de VEGF et leur

prolifération endothéliale soutenue (Christov & Gherardi, 1999). De plus, le marqueur moléculaire d'hypoxie GLUT1 serait un efficace moyen de prédire le pronostic des patients atteints de cette tumeur (Abraham, Hu, & Jensens, 2012). Les glioblastomes sont également reconnus pour la surexpression de VEGF et de GLUT1 là où les niveaux de HIF-1 $\alpha$  sont les plus élevés, soit dans la zone intermédiaire de la tumeur où se situent les cellules pseudo-palissadiques hypoxiques (Semenza, 2003) (Labak, et al., 2016). Ces hausses d'expression corréleraient également avec le grade de la tumeur, la vascularisation et la mortalité des patients (Semenza, 2003). Pour ce qui est des cellules endothéliales, il est reconnu qu'elles augmentent l'expression de VEGF, mécanisme qui leur permettrait de survivre dans des conditions peu favorables comme le manque de nutriments et d'oxygène (Ueda, Nakagawa, Kubota, Ido, & Sato, 2005). Il est donc clair ici que nos modèles cellulaires, soumis à différents taux d'oxygénation, reflètent ce qui est observé dans la littérature.

### **Inhibition de la prolifération cellulaire par les extraits de baies et de fleurs de sureau du Canada**

Les quatre extraits inhibent la prolifération des quatre lignées cellulaires en fonction de la concentration, à la fois en normoxie et en hypoxie. Cette dernière condition est généralement non viable, mais les réponses adaptatives au stress hypoxique qu'induisent les cellules cancéreuses leur permettent de survivre et même de proliférer, et contribuent au phénotype malin et agressif des cancers. L'hypoxie chronique chez les tumeurs solides rend d'ailleurs ces dernières résistantes à la radiothérapie et à la chimiothérapie (Harris, 2002). L'inhibition ici par les extraits de sureau, à la fois en normoxie et en hypoxie, démontre donc un potentiel intéressant et prometteur contre la croissance des tumeurs solides dans leur microenvironnement réel, soit un ensemble de cellules soumis à un gradient d'oxygène.

Parmi les trois extraits de baies, l'extrait concentré s'est montré le plus efficace dans l'inhibition de la prolifération des quatre lignées cellulaires. Les valeurs d'IC<sub>50</sub> sont toutefois plus faibles en normoxie qu'en hypoxie, démontrant le phénotype résistant

des cellules hypoxiques illustré dans la littérature, ainsi qu'une inhibition préférentielle en condition normale d'oxygène (Table 2.1). De plus, l'effet de l'extrait concentré s'observe sans distinction particulière pour les lignées cellulaires choisies, les courbes d'inhibition et les valeurs d'IC<sub>50</sub> étant sensiblement les mêmes, démontrant que cet extrait peut cibler de façon équivalente la prolifération de gliomes de différents grades. On peut raisonner que puisque cet extrait provient de deux cultivars et qu'il est concentré à froid, celui-ci contient une plus grande concentration de molécules bioactives, potentiellement aptes à bloquer plus efficacement la prolifération, comparativement aux extraits non concentrés. En normoxie, les extraits obtenus des fruits Kent et Scotia ont démontré des effets similaires pour l'ensemble des lignées testées, l'extrait Scotia étant légèrement plus efficace chez les glioblastomes et les cellules endothéliales, mais équivalent à l'extrait Kent chez les cellules Hs 683. En hypoxie, l'extrait Kent s'est montré plus efficace que l'extrait Scotia à inhiber la prolifération de trois des quatre lignées (U-138 MG, Hs 683 et HBMEC). Il semble donc que chaque extrait possède un effet inhibiteur préférentiel selon la condition d'oxygénation et, suivant le même raisonnement mentionné plus haut, il est possible de se demander si, des cultivars Kent et Scotia, un des deux possède des concentrations plus importantes d'anthocyanes individuelles ou totales, ou même de composés phénoliques. Quelques travaux ont comparé la composition en anthocyanes des espèces de sureau (*nigra* vs *canadensis*) où une distinction claire s'établit entre celles-ci (Jordheim, Giske, & Andersen, 2007), mais ce même exercice entre cultivars d'une même espèce est plus ardu. Aussi, plusieurs autres facteurs influencent la composition phénolique des fruits et des extraits de fruits, incluant l'année de récolte et les conditions climatiques, la façon de cultiver les plants, la récolte et l'entreposage, la maturité des baies en plus des techniques d'analyse des composés (Lee & Finn, 2007). Il faut donc analyser les données avec précaution lorsqu'il s'agit de comparer les cultivars de *Sambucus canadensis* entre eux. À cet effet, Lee et Fin (2007) ont rapporté les concentrations totales d'anthocyanes de Scotia pour deux années consécutives et par deux méthodes différentes. Les résultats obtenus étaient considérablement différents les uns des autres, mais démontrant tout de même l'importance de l'année de récolte, peu importe la méthode d'analyse. Aussi, il est établi que le cultivar Kent possède une

concentration d'anthocyanes plus faible que le cultivar Scotia soit 470 mg/100 g comparativement à 598 mg/100 g de baies fraîches (Filière des plantes médicinales biologiques du Québec, 2010). Il serait donc tentant de penser que Scotia possède un pouvoir antiprolifératif plus puissant que le cultivar Kent grâce à ses plus hauts niveaux d'anthocyanes, mais ce dernier étant plus efficace en hypoxie, il est difficile d'en tirer une conclusion. De plus, il aurait été intéressant de comparer les concentrations de phytochimiques autres que les anthocyanes comme les flavonoïdes et les acides phénoliques, mais les données sont absentes de la littérature pour le cultivar Kent. Toutefois, toujours selon Lee et Fin (2007), les données de plusieurs cultivars d'une même espèce sont relativement similaires entre elles. D'autres composés bioactifs pourraient également agir au niveau de la prolifération. En effet, plusieurs autres polyphénols sont contenus dans les baies de sureau et il est raisonnable de penser qu'ils sont également responsables des propriétés anticancer ou qu'ils agissent en synergie avec les anthocyanes. En somme, les extraits de sureau du Canada ont montré des effets antiprolifératifs sur les trois lignées de gliomes testées, ainsi que sur les cellules HBMEC, démontrant un potentiel à prévenir la formation de tumeurs et de leur néovascularisation, à la fois en normoxie et en hypoxie.

Pour ce qui est des fleurs, l'extrait est parvenu à inhiber la prolifération des quatre lignées cellulaires en fonction de la concentration, mais moins efficacement que les extraits de baies. Pour chaque lignée cellulaire, l'inhibition était beaucoup plus grande en normoxie qu'en hypoxie, démontrant encore une fois le caractère résistant des cellules hypoxiques observé également avec les extraits de baies. En comparant les valeurs d'IC<sub>50</sub> en normoxie, on constate que les deux glioblastomes, particulièrement les U-87 MG, sont les plus affectés par l'extrait de fleurs. Par contre, aucune des lignées n'a pu être inhibée à 50% en condition hypoxique. On remarque que les concentrations utilisées pour l'extrait de fleurs sont supérieures à celles utilisées pour les baies, et ce, pour des résultats moins remarquables, suggérant que le potentiel antiprolifératif des baies serait causé par leurs pigments, les anthocyanes. Il y a cependant des molécules bioactives dans les fleurs qui leur permettent de bloquer la prolifération des cellules de façon significative. En effet, la rutine (quercétine -3-rutinoside) représente le composé

phénolique retrouvé majoritairement dans l'extrait concentré de fleurs de sureau du Canada, selon une analyse confidentielle de l'INAF (Qc.). En comparaison, une étude récente fait mention de profils phénoliques différents dans les boissons aqueuses traditionnelles d'Europe du Nord-Est fait à base de fleurs de sureau noir, les dérivés d'acide cinnamique et les flavonols totalisant plus de 98% des polyphénols retrouvés. La rutine représentait plus de 75% des flavonols (Mikulic-Petkovsek, Samoticha, Eler, Stampar, & Veberic, 2015). Il semble donc évident que les bienfaits associés à la fleur de sureau, considérée comme antioxydante, anti-inflammatoire et neuroprotective (Thi Ho, Wangensteen, & Barsett, 2017) (de Rus Jacquet, et al., 2017), soient en partie causés par ce composé. D'autres études ont démontré plusieurs autres activités pharmacologiques de la rutine, incluant des capacités neuro- et cardioprotectives (Ganeshpurkar & Saluja, 2017). Un groupe de chercheurs a même démontré que la rutine peut diminuer la croissance et la taille de tumeurs de leucémie humaine dans un modèle murin de xénogreffe (Lin, et al., 2012). Toutes ces données semblent donc démontrer que la rutine contenue dans notre extrait de fleurs de sureau, ainsi que possiblement d'autres flavonols et acides phénoliques, possède une action antiproliférative et que ceci contribue à l'inhibition des quatre lignées cellulaires tumorales. Cependant, ce travail représente la première étude caractérisant les propriétés antiprolifératives de fleurs de sureau du Canada, il est donc impossible de les comparer avec les données de la littérature.

### **Perturbation du cycle cellulaire et induction de l'apoptose par les extraits de sureau**

L'inhibition de la croissance cellulaire par certains médicaments ou composés naturels peut se faire de façon cytostatique, en bloquant la division des cellules, ou de façon cytotoxique, en altérant leur survie. De ce fait, la division et la mort cellulaire programmée sont les deux principales composantes de l'homéostasie de la croissance cellulaire. C'est donc ce que nous avons voulu investiguer avec les expériences subséquentes. Pour approfondir la compréhension du potentiel antiprolifératif des extraits de sureau du Canada, nous avons étudié les phases et les protéines régulatrices du cycle cellulaire, dont les perturbations induites par des drogues et des extraits

naturels, incluant les polyphénols, précèdent souvent l'induction de l'apoptose (Huschtscha, Bartier, Andersson Ross, & Tattersall, 1996) (Sun & Hai Liu, 2006). Les étapes du cycle cellulaire servent à réguler le processus de division des cellules afin que les générations futures conservent l'intégrité du matériel génétique. Une des façons de bloquer la prolifération est d'altérer les niveaux d'expression et les fonctions des protéines régulatrices du cycle, ce qui empêche les cellules de progresser à travers les phases du cycle. Comme bien d'autres cancers, les glioblastomes accumulent des mutations dans ces gènes, comme celui responsable de la protéine CDK4 (Kaur, Tan, Brat, Post, & Van Meir, 2004). Aussi, restaurer la fonction première des points de contrôle (*checkpoints*) en ciblant et en altérant les protéines qui régulent le cycle, tout comme prévenir les dommages à l'ADN en adoptant une diète antioxydante, constituent des moyens d'éviter l'initiation et la promotion de cancers (Hartwell & Kastan, 1994). Plusieurs études sur le potentiel antiprolifératif d'extraits riches en polyphénols envers diverses lignées tumorales ont été réalisées, démontrant plusieurs mécanismes d'action possibles. Par exemple, les anthocyanes provenant de la myrtille affectent directement l'organisation des microtubules des cellules de cancer du sein, provoquant ainsi l'accumulation des cellules dans la phase G2/M (Nguyen, et al., 2010). D'autres chercheurs ont également démontré une inhibition de la prolifération par des extraits de pommes rouges, causée par un arrêt des cellules en phases S et G2/M, le tout marqué par une induction de p21 et une baisse de la phosphorylation de la MAP kinase ERK (Fiorella, et al., 2015). La prévention des gliomes et l'inhibition de l'angiogenèse tumorale par les aliments font également l'objet de recherches, démontrant entre autres les différents potentiels anticancer de composés dérivés de végétaux, que ce soit *in vitro* ou *in vivo* (Oak, El Bedoui, & Schini-Kerth, 2005) (Liu, et al., 2007) (Hogan, et al., 2010).

De façon générale, les baies ont causé un arrêt des cellules dans les phases S (réplication de l'ADN) et G2/M (croissance et mitose) du cycle cellulaire, conséquemment accompagné d'une diminution des cellules en phase G0/G1. Ceci a été observé en normoxie et en hypoxie pour les lignées U-87 MG, Hs 683 et HBMEC. Pour les cellules U-138 MG en normoxie, les baies n'ont pas provoqué de changement significatif dans la distribution des phases, tandis qu'en hypoxie, contrairement à la tendance remarquée

pour les autres lignées, les extraits de baies ont causé une accumulation des cellules en G0/G1, induisant une diminution des cellules dans la phase G2/M. Il est à noter que les effets des trois extraits de baies sont similaires entre eux, à l'instar de leur potentiel antiprolifératif observé plus haut. De façon globale, la réduction des niveaux d'expression des cyclines D1 et D3 et des CDK-2, -4 et -6 chez ces cellules expliquent en partie la distribution anormale des cellules dans les phases du cycle cellulaire. Les phases S et G2/M sont contrôlées par les complexes formés des cyclines A et B et des kinases CDK1 et CDK2. Les cellules sont bloquées dans ces phases lorsque ces protéines sont diminuées (Malik, Zhao, Schoene, Guisti, Moyer, & Magnuson, 2003) et nous avons pu ici observer une diminution de l'expression de CDK2 dans les deux conditions de culture, chez les Hs 683, les U-138 MG et les HBMEC. La baisse de l'expression des protéines formant le complexe cycline D et CDK4/6 suggère généralement un arrêt des cellules en G1 (Sun & Hai Liu, 2006) (Boivin D. , Blanchette, Barrette, Moghrabi, & Béliveau, 2007), mais il n'est pas anormal dans les cas d'arrêts en phase S et G2/M. Par exemple la cycline D1, active dans la phase G1, doit absolument être inhibée dès l'initiation de la phase S afin que celle-ci puisse débuter, mais doit être induite à nouveau à la phase G2 chez les cellules qui sont toujours engagées dans le cycle (Yang, Hitomi, & Stacey, 2006). Il est donc normal pour des cellules bloquées en phase S d'avoir de bas niveaux de cette protéine, mais il est également possible que ce soit dû au fait que les cellules bloquées dans la phase G2/M, donc désengagées du cycle, en conservent une faible expression. De plus, de façon intéressante, un groupe de chercheurs a démontré que les arrêts prolongés en phase S induits par un stress plutôt que par des lésions à l'ADN peuvent être causés par un mécanisme indépendant de l'induction de p53 et de p21. Ils ont montré une diminution de l'expression de CDK4, de la cycline E, de p21 et de p27 en fonction du temps et une expression stable de la cycline A et de l'activité kinase de CDK2, toutes deux nécessaires à la phase de répliation (Borel, Lacroix, & Margolis, 2002). Puisque les résultats obtenus concernant les niveaux protéiques de p21 et de p27 sont, à première vue, contradictoires, il serait raisonnable de penser qu'un tel mécanisme puisse avoir lieu dans les lignées cellulaires où leur expression est diminuée. D'une autre part, la hausse de l'expression des CKI p21 et p27

chez certaines lignées peut également expliquer la diminution de la prolifération cellulaire.

Les fleurs de sureau, quant à elles, ont principalement causé un arrêt des cellules tumorales dans la phase G2/M tout en faisant diminuer la phase S et la phase G0/G1. Ceci est particulièrement remarquable dans les deux conditions chez les Hs 683 et les U-87 MG et en normoxie chez les U-138 MG. Ces résultats sont soutenus par des perturbations au niveau des protéines régulatrices du cycle, variant selon les lignées cellulaires. Pour les U-87 MG par exemple, les cyclines D1 et D3 ainsi que la kinase CDK2 ont été inhibées de façon plus efficace en normoxie qu'en hypoxie, ce qui pourrait expliquer le plus grand pourcentage de cellules arrêtées en G2/M en normoxie. À l'opposé, les niveaux d'expression protéique des cyclines et de CDK6 ont été grandement affectés dans les deux conditions d'oxygénation chez les Hs 683, en plus de l'induction de p27, expliquant possiblement leur grande sensibilité à l'extrait de fleurs. Aucun changement significatif n'a été observé chez les cellules endothéliales quant à l'analyse des phases du cycle cellulaire, quoique le niveau d'expression de plusieurs protéines est affecté. Fait intéressant, des chercheurs en Chine, où la routine y est considérée comme médecine traditionnelle, ont démontré son activité anticancer sur des cellules de neuroblastome humain, incluant l'inhibition de la prolifération, un arrêt du cycle cellulaire en G2/M ainsi que l'induction de l'apoptose (Chen, et al., 2013).

De plus, l'induction de la mort cellulaire programmée par les extraits de baies et de fleurs de sureau, suite à l'arrêt des cellules cancéreuses dans le cycle cellulaire, est cohérente avec plusieurs traitements d'origine alimentaire (Chen, Chu, Chiou, Chiang, Yang, & Hsieh, 2005) (Jeong, Jang, Kim, Kwon, & Kim, 2010). Parmi nos quatre traitements, les baies de sureau ont été les plus efficaces à induire significativement l'apoptose, comparativement à celle observée par l'extrait de fleurs, démontrant encore l'efficacité des pigments et des autres flavonoïdes contenus dans les baies. L'induction de l'apoptose est donc une raison possible de l'inhibition de la prolifération observée chez certaines lignées.



### **Inhibition de la prolifération cellulaire par les polyphénols du sureau**

Une fois l'activité antiproliférative des extraits de sureau établie et caractérisée, nous avons voulu vérifier si les principales molécules retrouvées dans les baies pouvaient, elles aussi, bloquer la prolifération des quatre mêmes lignées cellulaires. Nous nous sommes servis du profil polyphénolique confidentiel fourni par l'INAF, qui fait état des principaux composés actifs retrouvés dans les extraits concentrés de baies et de fleurs de sureau du Canada. Le profil s'est avéré similaire à ceux retrouvés dans la littérature : les anthocyanes sont majoritaires dans les baies, la cyanidine-3-sambubioside-5-glucoside (et ses dérivés d'acide paracoumarique) étant la plus abondante (Jordheim, Giske, & Andersen, 2007) et les acides cinnamiques et les flavonols sont nombreux (Lee & Finn, 2007). On retrouve parmi ces derniers les acides chlorogénique et néochlorogénique ainsi que plusieurs quercétines glycosylées, dont la rutine. La rutine est également le principal composé de l'extrait concentré de fleurs de sureau du Canada, tout comme les fleurs de *S. nigra* (Mikulic-Petkovsek, Samoticha, Eler, Stampar, & Veberic, 2015).

Les cinq molécules naturelles seules ont su inhiber la prolifération des quatre lignées cellulaires. En normoxie et en hypoxie, les plus efficaces d'entre elles furent la cyanidine-3-sambubioside-5-glucoside et la quercétine-3-rutinoside (rutine). Leur pouvoir antiprolifératif ainsi que leur grande abondance dans les baies ont probablement grandement influencé les résultats obtenus. Un fait intéressant est la grande efficacité de la rutine, composé principal des fleurs de sureau, qui peut sembler surprendre vu l'absence de pigmentation des pétales, mais nous avons clairement démontré ici que la rutine seule était efficace. De plus, dans l'objectif de valider que la consommation d'aliments dans leur entièreté est préférable aux suppléments alimentaires (Halsted, 2003), nous avons combiné les cinq molécules pures ensemble et en avons également évalué la capacité antiproliférative. Tel qu'attendu, le mélange de molécules (*mix*) s'est avéré le traitement le plus probant chez les quatre lignées cellulaires en condition normoxique. En hypoxie, sauf pour les Hs 683 où aucun effet n'a été observé, le mix a également été le plus efficace chez les cellules endothéliales et les deux glioblastomes. Comme nous, plusieurs autres études privilégient les extraits

provenant d'aliments entiers contre diverses lignées cancéreuses et certains ont également démontré que les molécules seules étaient moins efficaces en comparaison aux extraits de fruits (Seeram, Adams, Hardy, & Heber, 2004) (Bontempo, et al., 2007).

## CONCLUSION ET PERSPECTIVES

En somme, nous avons démontré et caractérisé les propriétés antiprolifératives des baies et des fleurs de sureau du Canada envers trois lignées de gliomes et une lignée de cellules endothéliales de microvaisseaux sanguins cérébraux. De par leur contenu riche en anthocyanes, les baies se sont de loin montrées les plus efficaces. Cette inhibition de la prolifération était causée par l'arrêt de la division des cellules, observée par l'accumulation de celles-ci dans les phases du cycle cellulaire, et associée à l'induction de l'apoptose.

Comme d'autres études l'ont démontré, le risque de développer des tumeurs de cellules gliales pourrait être diminué grâce à une diète anti-inflammatoire et antioxydante (Kyritsis, Bondy, & Levin, 2011), et notre recherche s'inscrit dans cette optique de prévention. Nos extraits de sureau, en plus de contenir des molécules reconnues comme étant antioxydantes, ont également montré des capacités anticancer et antiangiogéniques. De plus, en analysant la propriété antiproliférative des molécules pures, nous avons aussi établi l'importance d'inclure des aliments complets et fonctionnels dans notre alimentation quotidienne. Chez l'humain, suivant l'ingestion d'une dose d'aliments ou de boissons riches en anthocyanes (0,7-10,9mg/kg), la concentration plasmatique de ces polyphénols, de l'ordre du nanomolaire (1-100nmol/L), atteint son maximum entre 0,5 et 2h (Prior & Wu, 2006). Malgré une biodisponibilité faible des anthocyanes chez l'humain suivant l'ingestion d'aliments, ces molécules ont vraisemblablement la capacité de traverser la BHE (Passamonti, Vrhovsek, Vanzo, & Mattivi, 2005) (Fang, 2014) afin d'exercer leurs effets bénéfiques au cerveau. Des études chez le rat et le cochon ont d'ailleurs démontré la présence d'anthocyanes dans le cerveau suite à l'ingestion quotidienne de bleuets, et ce malgré une concentration plasmatique d'anthocyanes inexistante dans le cas du cochon (Andres-Lacueva, Shukitt-Hale, Galli, Jauregui, Lamuela-Raventos, & Joseph, 2005) (Kalt, et al., 2008). Concernant les différentes formes glycosylées de quercétine, il semblerait que la rutine soit la moins bien absorbée par notre système digestif. Aussi,

contrairement aux anthocyanes, l'élimination des métabolites de la quercétine est beaucoup moins rapide, ce qui pourrait possiblement augmenter sa biodisponibilité avec un apport quotidien. En effet, le temps de demi-vie des métabolites dérivés de la quercétine varient entre 11 et 28h et des concentrations plasmatiques de l'ordre du micromolaire ont même été observées (Manach, Williamson, Morand, Augustin, & Rémésy, 2005). De plus, il semble que la rutine puisse également traverser la barrière hématoencéphalique, du moins chez le rat, et ainsi délivrer ses actions bénéfiques (Hao, Dong, Huo, Wen, Zhang, & Liang, 2016). Malgré le manque d'études sur la biodisponibilité des polyphénols présents dans les extraits de fleurs de sureau (Thi Ho, Wangenstein, & Barsett, 2017), celle des anthocyanes provenant de baies de sureau d'Europe a été étudiée chez l'humain et les anthocyanes et leurs métabolites sont retrouvés dans le plasma et dans l'urine (Milbury, Cao, Prior, & Blumberg, 2002) (de Ferrars, Cassidy, Curtis, & Kay, 2014). Il est donc raisonnable de croire que les anthocyanes et flavonols du sureau du Canada devraient également être absorbés et disponibles, et pourraient exercer un potentiel chimiopréventif envers les tumeurs cérébrales, gliomes inclus. En plus de découvrir un aliment du terroir québécois et d'encourager le commerce local, il est raisonnable de penser que l'ajout quotidien de sureau du Canada dans notre alimentation soit bénéfique pour la santé.

Pour étudier en profondeur l'impact des extraits de sureau blanc, plusieurs expériences complémentaires pourraient être réalisées. Par exemple, l'induction des processus angiogéniques, tels que la migration et la tubulogénèse des HMVEC par des facteurs de croissance sécrétés par les gliomes pourrait être approfondie, en normoxie et en hypoxie, par plusieurs techniques *in vitro* (xCELLigence) (Lamy et al., 2008). L'effet potentiellement inhibiteur par les extraits de baies et de fleurs sur ces processus pourraient ensuite être établis. Il est certain qu'une fois ce potentiel *in vitro* établi, il serait plus que pertinent d'étudier les baies et les fleurs du sureau du Canada sur les gliomes et sur le compartiment angiogénique *in vivo*. Les modèles *in vivo*, animaux ou humains, représentent des approches essentielles pour une compréhension globale du développement des cellules cancéreuses dans leur environnement, qui inclut toutes les caractéristiques de la pathologie (Genne, 2002). Dans notre cas, un modèle murin de

xénogreffe intracrâniale de gliomes (Kaye, Morstyn, Gardner, & Pyke, 1986) serait pertinent, afin de valider également le passage des molécules bioactives à travers la BHE. La réduction du volume, du poids et de l'angiogenèse par les traitements sont des paramètres à considérer (Perry, Demeule, Régina, Moumdjian, & Béliveau, 2010). Il est également possible d'induire le développement de gliomes par mutagenèse (N-nitroso-N-éthylurée) (Pouliquen, et al., 2008)). Ce groupe de chercheurs a d'ailleurs démontré les bienfaits d'une diète riche en phytochimiques, comparativement aux rats nourris avec la diète contrôle, en observant entre autres une diminution de l'incidence de cancers et une augmentation de la survie, en particulier chez les mâles. Pour ajouter aux expériences futures possibles, des études chez l'humain concernant entre autre le métabolisme et la biodisponibilité des anthocyanes et autres flavonoïdes suite à l'ingestion de baies et extraits de fleurs de sureau blanc seraient intéressantes à réaliser. La comparaison avec le sureau noir pourrait donc être approfondie, concernant entre autre la stabilité *in vivo* des anthocyanes, acylées chez les fruits du sureau blanc.

## RÉFÉRENCES

- Abbas, T., & Dutta, A. (2009). p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. *Nature Reviews Cancer*, 9 (6), 400-414.
- Abraham, S., Hu, N., & Jensens, R. (2012). Hypoxia-inducible factor-1-regulated protein expression and oligodendroglioma patient outcome: comparison with established biomarkers and preoperative UCSF low-grade scoring system. *Journal of Neurooncology*, 108, 459-468.
- Abukheir, A. M., & Park, B. (2009, May 9). p21 and p27 roles in carcinogenesis and drug resistance. *Expert Review in Molecular Medicine*.
- Agri-Réseau. (2009). *Le Bureau du Canada - Guide de production sous régie biologique*. Consulté le March 26, 2017, sur Agri-Réseau Web site:  
<https://www.agrireseau.net/agriculturebiologique/documents/guide-sureau.pdf>
- Alberts, B., Bray, D., Hopkin, K., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., et al. (2013). *Essential Cell Biology* (éd. 4th Edition). New York: Garland Science.
- Amand, P., Kunnumakara, A. B., Sundaram, C., Harikumar, K. B., Tharakan, S. T., Lai, O. S., et al. (2008). Cancer is a Preventable Disease that Requires Major Lifestyle Changes. *Pharmaceutical Research*, 25 (9), 2097-2116.
- Amberger-Murphy, V. (2009). Hypoxia Helps Glioma to Fight Therapy. *Current Cancer Drug Targets*, 9 (3), 381-390.
- Andres-Lacueva, C., Shukitt-Hale, B., Galli, R. L., Jauregui, O., Lamuela-Raventos, R. M., & Joseph, J. A. (2005). Anthocyanins in aged blueberry-fed rats are found centrally and may enhance memory. *Nutritional Neurosciences*, 8 (2), 111-120.
- Baba, A. I., & Cătoi, C. (2007). *Comparative Oncology*. Bucharest: The Publishing House of the Romanian Academy.
- Banfalvi, G. (2013). *Homeostasis - Tumor - Metastasis*. Debrecen: Springer Science & Business Media.

- Barack, V., Halperin, T., & Kalickman, I. (2001). The effect of Sambucol, a black elderberry-based natural product, on the production of human cytokines: I. Inflammatory cytokines. *European Cytokine Network*, 12 (2), 290-296.
- Barcena, H. S., Chen, P., & Tuachi, A. (2015). Synthetic anthocyanidins and their antioxidant properties. *Springer Plus*, 4 (499).
- Berenblum, I., & Shubik, P. (1947). A New, Quantitative, Approach to the Study of the Stages of Chemical Carcinogenesis in the Mouse's Skin. *British Journal of Cancer*, 1 (4), 383-391.
- Bergers, G., & Benjamin, L. E. (2003). Tumorigenesis and the Angiogenic Switch. *Nature Reviews Cancer*, 3, 401-410.
- Bienlenberg, D. R., & Zetter, B. R. (2015). The Contribution of Angiogenesis to the Process of Metastasis. *Cancer Journal*, 21 (4), 267-273.
- Boeing, H., Schlehofer, B., Blettner, M., & Wahrendorf, J. (1993). Dietary carcinogens and the risk for glioma and meningioma in Germany. *International Journal of Cancer*, 50 (3), 561-565.
- Boivin, D., Blanchette, M., Barrette, S., Moghrabi, A., & Béliveau, R. (2007). Inhibition of Cancer Cell Proliferation and Suppression of TNF-induced Activation of NFκB by Edible Berry Juice. *Anticancer Research*, 27, 937-948.
- Boivin, D., Blanchette, M., Barrette, S., Moghrabi, A., & Béliveau, R. (2007). Inhibition of Cancer Cell Proliferation and Suppression of TNF-induced Activation of NFκB by Edible Berry Juice. *Anticancer Research*, 27, 937-948.
- Bontempo, P., Mita, L., Miceli, M., Doto, A., Nebbioso, A., De Bellis, F., et al. (2007). Feijoa sellowiana derived natural Flavone exerts anti-cancer action displaying HDAC inhibitory activities. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39 (10), 1902-1914.
- Borel, F., Lacroix, F. B., & Margolis, R. L. (2002). Prolonged arrest of mammalian cells at the G1/S boundary results in permanent S phase stasis. *Journal of Cell Science*, 115 (14), 2829-2838.
- Branle, F., Lefranc, F., Camby, I., Jeuken, J., Geurts-Moespot, A., Sprenger, S., et al. (2002). Evaluation of the Efficiency of Chemotherapy in In Vivo Orthotopic Models of Human Glioma Cells with and without 1p19q Deletions and in C6 Rat Orthotopic Allografts

- Serving for the Evaluation of Surgery Combined with Chemotherapy. *Cancer*, 95 (3), 641-654.
- Brat, D. J., & Van Meir, E. G. (2004). Vaso-occlusive and prothrombotic mechanisms associated with tumor hypoxia, necrosis, and accelerated growth in glioblastoma. *Laboratory Investigation*, 84, 307-405.
- Cao, Y. (2010). Adipose tissue angiogenesis as a therapeutic target for obesity and metabolic diseases. *Nature Reviews Drug Discovery*, 9, 107-115.
- Carmeliet, P., & Jain, R. K. (2000). Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*, 407, 249-257.
- Charlebois, D. (2007). Elderberry as a Medicinal Plant. (J. Janick, & A. Whipkey, Éds.) *Issues in New Crops and New Uses*, 284-292.
- Chen, H., Miao, Q., Geng, M., Liu, J., Hu, Y., Tian, L., et al. (2013). Anti-Tumor Effect of Rutin on Human Neuroblastoma Cell Lines through Inducing G2/M Cell Cycle Arrest and Promoting Apoptosis. *The Scientific World Journal*, 1-8.
- Chen, P.-N., Chu, S.-C., Chiou, H.-L., Chiang, C.-L., Yang, S.-F., & Hsieh, Y.-S. (2005). Cyanidin 3-Glucoside and Peonidin 3-Glucoside Inhibit Tumor Cell Growth and Induce Apoptosis In Vitro and Suppress Tumor Growth In Vivo. *Nutrition and Cancer*, 53 (2), 232-243.
- Christov, C., & Gherardi, R. K. (1999). Vascular endothelial growth factor (VEGF) likely contributes to oligodendroglioma angiogenesis. *Acta Neuropathologica*, 97, 429-430.
- de Ferrars, R. M., Cassidy, A., Curtis, P., & Kay, C. D. (2014). Phenolic metabolites of anthocyanins following a dietary intervention study in post-menopausal women. *Molecular Nutrition and Food Research*, 58 (3), 490-502.
- de Rus Jacquet, A., Timmers, M., Ying Ma, S., Thieme, A., McCabe, G. P., Vest, J. C., et al. (2017). Lumbee traditional medicine: Neuroprotective activities of medicinal plants used to treat Parkinson's disease-related symptoms. *Journal of Ethnopharmacology*.
- Dillard, C. J., & German, B. (2000). Phytochemicals: nutraceuticals and human health. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 1744-1756.
- Dubrow, R., Darefsky, A. S., Park, Y., Mayne, S. T., Moore, S. C., Kilfoy, B., et al. (2010). Dietary Components Related to N-Nitroso Compound Formation: A Prospective Study of Adult Glioma. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 9 (7), 1709 - 1722.
- Dudley, A. C. (2012). Tumor Endothelial Cells. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 1-18.



- Enoch, T., & Nurse, P. (1990). Mutation of fission yeast cell cycle control genes abolishes dependence of mitosis on DNA replication. *Cell*, *60* (4), 665-673.
- Extrasynthese. (2017). *Anthocyanin Standard Reference Material*. Consulté le April 24, 2017, sur Extrasynthese Web site: <https://www.extrasynthese.com/anthocyanin.html>
- Fang, J. (2014). Bioavailability of anthocyanins. *Drug Metabolism Reviews*, *46* (4), 508-520.
- Filière des plantes médicinales biologiques du Québec. (2010). *Le sureau du Canada, Guide de production sous régie biologique*. Québec.
- Finn, C. E., Thomas, A. L., Byers, P. L., & Serçe, S. (2008). Evaluation of American (*Sambucus canadensis*) and European (*S. nigra*) Elderberry Genotypes Grown in Diverse Environments and Implications for Cultivar Development. *HortScience*, *43* (5).
- Fiorella, S. G., De Santi, M., Brandi, G., Fanelli, M., Bucchini, A., Giamperi, L., et al. (2015). Inhibition of Breast Cancer Cell Proliferation and In Vitro Tumorigenesis by a New Red Apple Cultivar. *Plos One*, 1-17.
- Folkman, J. (1971). Tumor Angiogenesis: Therapeutic Implications. *The New England Journal of Medicine*, *285*, 1182-1186.
- Foulds, L. (1954). The experimental study of tumor progression: a review. *Cancer Research*, *14* (5), 327-339.
- Fricker, G., Ott, M., & Mahringer, A. (2014). *The Blood Brain Barrier (BBB)*. Berlin: Springer.
- Ganeshpurkar, A., & Saluja, A. K. (2017). The Pharmacological Potential of Rutin. *Saudi Pharmaceutical Journal*, *25*, 149-164.
- Genne, P. (2002). Recherche expérimentale en cancérologie : apport des modèles murins. Dans L. c. Servier, *La recherche médicale à l'aube du XXIe siècle - Recherche médicale et modèle animal* (pp. 53-60). Elsevier Masson.
- Giancinti, C., & Giordano, A. (2006). RB and cell cycle progression. *Oncogene*, *25*, 5220-5227.
- Golias, C. H., Charalabopoulos, A., & Charalabopoulos, K. (2004). Cell proliferation and cell cycle control: a mini review. *International Journal of Clinical Practice*, *58* (12), 1134-1141.
- González-Vallinas, M., González-Castejon, M., Rodriguez-Casado, A., & Ramirez de Molina, A. (2013). Dietary phytochemicals in cancer prevention and therapy: a complementary approach with promising perspectives. *Nutrition Reviews*, *71* (9), 585-599.

- Goszcz, K., Deakin, S. J., Duthie, G. G., Stewart, D., Leslie, S. J., & Megson, I. L. (2015, July 06). Antioxidants in cardiovascular therapy: panacea or false hope? *Frontiers in Cardiovascular Medicine*.
- Guo, H., & Ling, W. (2015). The update of anthocyanins on obesity and type 2 diabetes: Experimental evidence and clinical perspectives. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, 16 (1), 1-13.
- Guohua, C., & Prior, R. L. (1999). Anthocyanins Are Detected in Human Plasma after Oral Administration of an Elderberry Extract. *Clinical Chemistry*, 45 (4), 574-576.
- Halsted, C. H. (2003). Dietary supplements and functional foods: 2 sides of a coin? *The American Journal of Clinical Nutrition*, 77, 1001S-1007S.
- Hamdy, F. C., & Rouprêt, M. (2008). The PCPT trial. *Progrès en Urologie*, 18, 40-43.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144.
- Hao, G., Dong, Y., Huo, R., Wen, K., Zhang, Y., & Liang, G. (2016). Rutin Inhibits Neuroinflammation and Provides Neuroprotection in an Experimental Rat Model of Subarachnoid Hemorrhage, Possibly Through Suppressing the RAGE-NF- $\kappa$ B Inflammatory Signaling Pathway. *Neurochemical Research*, 41 (6), 1496-1504.
- Harris, A. L. (2002). Hypoxia - A Key Regulatory Factor in Tumor Growth. *Cancer*, 2.
- Hartwell, L. H., & Kastan, M. B. (1994). Cell Cycle Control and Cancer. *Science*, 266 (5192), 1821-1828.
- Hogan, S., Chung, H., Zhang, L., Li, J., Lee, Y., Dai, Y., et al. (2010). Antiproliferative and antioxidant properties of anthocyanin-rich extract from açai. *Food Chemistry*, 1 (18), 208-214.
- Huschtscha, L. I., Bartier, W. A., Andersson Ross, C. E., & Tattersall, M. H. (1996). Characteristics of cancer cell death after exposure to cytotoxic drugs in vitro. *British Journal of Cancer*, 73, 54-60.
- Iciek, M., Kwiecien, I., & Wlodek, L. (2009). Biological properties of garlic and garlic-derived organosulfur compounds. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 50 (3), 247-264.
- Islami, F., Goding Sauer, A., Miller, K. D., Siegel, R. L., Fedewa, S. A., Jacobs, E. J., et al. (2017, November 21). Proportion and number of cancer cases and deaths attributable to potentially modifiable risk factors in the United States. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*.

- Jacob, M. P., & Cook, J. G. (2016). Cell cycle proliferation decisions: the impact of single cell analyses. *The Federation of European Biochemical Societies Journal*, 284 (3), 362-375.
- Jeong, J. C., Jang, S. W., Kim, T. H., Kwon, C. H., & Kim, Y. K. (2010). Mulberry fruit (*Morus fructus*) extracts induce human glioma cell death in vitro through ROS-dependent mitochondrial pathway and inhibits glioma tumor growth in vivo. *Nutrition and Cancer*, 62 (3), 402-410.
- Jordheim, M., Giske, N. H., & Andersen, O. M. (2007). Anthocyanins in Caprifoliaceae. *Biochemical Systematics and Ecology*, 35, 153-159.
- Joseph, J. V., Conroy, S., Pavlov, K., Sontakke, P., Tomar, T., Eggens-Meijer, E., et al. (2015). Hypoxia enhances migration and invasion in glioblastoma by promoting a mesenchymal shift mediated by the HIF1 $\alpha$ -ZEB1 axis. *Cancer Letters*, 359 (1).
- Kalt, W., Blumberg, J. B., McDonald, J. E., Vinqvist-Tymchuk, M. R., Fillmore, S. A., Graf, B. A., et al. (2008). Identification of Anthocyanins in the Liver, Eye, and Brain of Blueberry-Fed Pigs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56 (3), 705-712.
- Karp, G. (2009). *Cell and Molecular Biology: Concepts and Experiments* (éd. 6th Edition). Hoboken: John Wiley & Sons.
- Kaur, B., Tan, C., Brat, D. J., Post, D. E., & Van Meir, E. G. (2004). Genetic and hypoxic regulation of angiogenesis in gliomas. *Journal of Neuro-Oncology* (70), 229-243.
- Kaye, A. H., Morstyn, G., Gardner, I., & Pyke, K. (1986). Development of a Xenograft Glioma Model in Mouse Brain. *Cancer Research*, 46 (3), 1367-1373.
- Khoo, H.-E., Prasad, N., Kong, K.-W., Jiang, Y., & Ismail, A. (2011). Carotenoids and Their Isomers: Color Pigments in Fruits and Vegetables. *Molecules*, 16, 1710-1738.
- Kops, G. J., Weaver, B. A., & Cleveland, D. W. (2005). On the Road to Cancer: Aneuploidy and the Mitotic Checkpoint. *Cancer*, 5, 773-785.
- Kramer, R., & Brown, P. (2004). Should Tamoxifen Be Used in Breast Cancer Prevention? *Drug Safety*, 27 (13), 979-989.
- Kristo, A. S., Klimis-Zacas, D., & Sikalidis, A. K. (2016). Protective Role of Dietary Berries in Cancer. *Antioxidants*, 5 (37).
- Kyritsis, A. P., Bondy, M. L., & Levin, V. A. (2011). Modulation of glioma risk and progression by dietary nutrients and anti-inflammatory agents. *Nutrition and Cancer*, 63 (2), 174-184.

- Labak, C. M., Wang, P. Y., Arora, R., Guda, M. R., Asuthkar, S., Tsung, A. J., et al. (2016). Glucose transport: meeting the metabolic demands of cancer, and applications in glioblastoma treatment. *American Journal of Cancer Research*, 6 (8), 1599-1608.
- Lamy, S., Akla, N., Ouanouki, A., Lord-Dufour, S., & Béliveau, R. (2012). Diet-derived polyphenols inhibit angiogenesis by modulating the interleukin-6/STAT3 pathway. *Experimental Cell Research*, 1586-1596.
- Lamy, S., Beaulieu, É., Labbé, D., Bédard, V., Moghrabi, A., Barette, S., et al. (2008). Delphinidin, a dietary anthocyanidin, inhibits platelet-derived growth factor ligand/receptor (PDGF/PDGFR) signaling. *Cardiogenesis*, 29 (5), 1033-1041.
- Lamy, S., Blanchette, M., Michaud-Levesque, J., Lafleur, R., Durocher, Y., Moghrabi, A., et al. (2006). Delphinidin, a dietary anthocyanidin, inhibits vascular endothelial growth factor receptor-2 phosphorylation. *Journal of Cellular Biochemistry*, 27 (5), 989-996.
- Lee, J., & Finn, C. E. (2007). Anthocyanins and other polyphenolics in American elderberry (*Sambucus canadensis*) and European elderberry (*S. nigra*) cultivars. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87, 2665-2675.
- Li, Y. (2014). Association between fruit and vegetable intake and risk for glioma: A meta-analysis. *Nutrition*, 30 (11-12), 1272-1278.
- Lin, B.-W., Gong, C.-C., Song, H.-F., & Cui, Y.-Y. (2016). Effects of anthocyanins on the prevention and treatment of cancer. *British Journal of Pharmacology*, 1-18.
- Lin, J.-O., Yang, J.-S., Lin, J.-J., Lai, K.-C., Lu, H.-F., Ma, C.-Y., et al. (2012). Rutin Inhibits Human Leukemia Tumor Growth in a Murine Xenograft Model In Vivo. *Environmental Toxicology*, 27 (8), 480-484.
- Liu, E., Wu, J., Cao, W., Zhang, J., Liu, W., Jiang, X., et al. (2007). Curcumin induces G2/M cell cycle arrest in a p53-dependent manner and upregulates ING4 expression in human glioma. *Journal of Neurooncology*, 85, 263-270.
- Malik, M., Zhao, C., Schoene, N., Guisti, M., Moyer, M. P., & Magnuson, B. A. (2003). Anthocyanin-Rich Extract From *Aronia meloncarpa* E. Induces a Cell Cycle Block in Colon Cancer but Not Normal Colonic Cells. *Nutrition and Cancer*, 46 (2), 186-196.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., & Jiménez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 79, 727-747.

- Manach, C., Williamson, G., Morand, C., Augustin, S., & Rémésy, C. (2005). Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *The American Journal of Clinical Nutrition* , 81, 230S-242S.
- Mayne, S. T., Playdon, M. C., & Rock, C. L. (2016). Diet, nutrition, and cancer: past, present and future. *Nature* , 13, 504-515.
- Metges, J.-P., Volant, A., Pera, M., & Robaszkiewicz, M. (2005). Combattre la néo- angiogenèse tumorale, attaquer les voies d'activation du cancer : Les nouvelles voies dans la prise en charge des cancers digestifs. *Médecine Thérapeutique* , 11 (05), 325-336.
- Mikulic-Petkovsek, M., Samoticha, J., Eler, K., Stampar, F., & Veberic, R. (2015). Traditional Elderflower Beverages: A Rich Source of Phenolic Compounds with High Antioxidant Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* , 63, 1477-1487.
- Milbury, P. E., Cao, G., Prior, R. L., & Blumberg, J. (2002). Bioavailability of elderberry anthocyanins. *Mechanisms of Ageing and Development* , 123, 997-1006.
- Miller, J. A., Thompson, P. A., Hakim, I. A., Sherry Chow, H.-H., & Thomson, C. A. (2011). d-Limonene: a bioactive food component from citrus and evidence for a potential role in breast cancer prevention and treatment. *Oncology Reviews* , 5 (1), 31-42.
- Moeller, B. J., Richardson, R. A., & Dewhirst, M. W. (2007). Hypoxia and radiotherapy: opportunities for improved outcomes in cancer treatment. *Cancer and Metastasis Reviews* , 26 (2), 241-248.
- Mokhtari, R. B., Baluch, N., Homayouni, T. S., Morgatskaya, E., Kumar, S., Kazemi, P., et al. (2017, July 23). The role of Sulforaphane in cancer chemoprevention and health benefits: a mini-review. *Journal of Cell Communication and Signaling* , 1-11.
- Morgan, D. O. (2007). *The Cell Cycle: Principles of Control*. London: New Science Press.
- Morgan, D. O. (2007). *The Cell Cycle: Principles of Control*. London: New Science Press.
- Mrugala, M. M. (2013, April 25). Advances and Challenges in the Treatment of Glioblastoma: A Clinician's Perspective. *Discovery medicine* .
- Nagy, R., Sweet, K., & Eng, C. (2004). Highly penetrant hereditary cancer syndromes. *Oncogene* , 23, 6445-6470.
- Nguyen, V., Tang, J., Oroudjev, E., Jae Lee, C., Marasigan, C., Wilson, L., et al. (2010). Cytotoxic Effects of Bilberry Extract on MCF7-GFP-Tubulin Breast Cancer Cells. *Journal of Medicinal Food* , 13 (2), 278-285.

- Noback, C. R., Strominger, N. L., Desmarest, R. J., & Ruggiero, D. A. (2005). *The Human Nervous System: Structure and Function* (éd. 6th Edition). Totowa, New Jersey: Humana Press.
- Oak, M.-H., El Bedoui, J., & Schini-Kerth, V. B. (2005). Antiangiogenic properties of natural polyphenols from red wine and green tea. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, *16* (1), 1-8.
- Organisation mondiale de la santé. (2017, February). *Cancer*. Consulté le March 8, 2017, sur Organisation mondiale de la santé Web site: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/fr/>
- Otto, T., & Sicinski, P. (2007). Cell cycle proteins as promising targets in cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, *17*.
- Ozgen, M., Scheerens, J. C., Reese, R. N., & Miller, R. A. (2010). Total phenolic, anthocyanin contents and antioxidant capacity of selected elderberry (*Sambucus canadensis* L.) accessions. *Pharmacognosy Magazine*, *6* (23), 198-203.
- Pandey, K. B., & Rizvi, S. I. (2009). Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2* (5), 270-278.
- Passamonti, S., Vrhovsek, U., Vanzo, A., & Mattivi, F. (2005). Fast access of some grape pigments to the brain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53* (18), 7029-7034.
- Perry, M.-C., Demeule, M., Régina, A., Moumdjian, R., & Béliveau, R. (2010). Curcumin inhibits tumor growth and angiogenesis in glioblastoma xenografts. *Molecular Nutrition and Food Research*, *54*, 1-10.
- Platz, E. A., Willet, W. C., Colditz, G. A., Rimm, E. B., Spiegelman, D., & Giovannucci, E. (2000). Proportion of colon cancer risk that might be preventable in a cohort of middle-aged US men. *Cancer Causes & Control*, *11* (7), 579-588.
- Pouliquen, D., Olivier, C., Hervouet, E., Pedelaborde, F., Debien, E., Le Cabellec, M.-T., et al. (2008). Dietary prevention of malignant glioma aggressiveness, implications in oxidant stress and apoptosis. *International Journal of Cancer*, *123* (2), 288-295.
- Prior, R. L., & Wu, X. (2006). Anthocyanins: Structural characteristics that result in unique metabolic patterns and biological activities. *Free Radical Research*, *40* (10), 1014-1028.
- Reni, M., Mazza, E., Zanon, S., Gatta, G., & Vecht, C. J. (2017). Central nervous system gliomas. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, *113*, 213-234.

- Richard, D., & Richard Peto. (1981). The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. *Journal of the National Cancer Institute*, 66 (6), 1191-1308.
- Richards, R., Jenkinson, M. D., Haylock, B. J., & See, V. (2016, March). Cell cycle progression in glioblastoma cells is unaffected by pathophysiological levels of hypoxia. *PeerJ Journal*.
- Rocca, J. (2003). Galenic Dietetics. [Review of: Grant M. Galen on food and diet. London, Routledge, 2000]. *Early Science and Medicine*, 8 (1), 44-51.
- Roomi, M. W., Shanker, N., Niedwiecki, A., & Rath, M. (2016, December). Vitamin C in Health: Scientific focus on its anti-cancer efficacy. *Research In Cellular and Natural Health Journal*.
- Ruddon, R. W. (2007). *Cancer biology* (éd. 4th Edition). New York, United States of America: Oxford University Press.
- Schmelzer, G. H., & Gurib-Fakim, A. (2008). *Medicinal plants 1*.
- Seeram, N. P., Adams, L. S., Hardy, M. L., & Heber, D. (2004). Total Cranberry Extract versus Its Phytochemical Constituents: Antiproliferative and Synergistic Effects against Human Tumor Cell Lines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52 (9), 2512-2517.
- Semenza, G. L. (2003). Targeting HIF-1 for Cancer Therapy. *Cancer*, 3, 721-732.
- Seville, L. L., Shah, N., Westwell, A. D., & Chan, W. C. (2005). Modulation of pRb/E2F Functions in the Regulation of Cell Cycle and in Cancer. *Current Cancer Drug Targets*, 5 (3), 159-170.
- Shweiki, D., Itin, A., Soffer, D., & Keshet, E. (1992). Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature*, 359, 843-845.
- Société canadienne du cancer. (2017). *Développement de la cellule cancéreuse*. Consulté le February 25, 2017, sur Société canadienne du cancer : <http://www.cancer.ca>
- Société canadienne du cancer. (2017). *Grades du cancer du cerveau et de la moelle épinière*. Consulté le March 5, 2017, sur Société canadienne du cancer Web site: <http://www.cancer.ca/fr-ca/cancer-information/cancer-type/brain-spinal/grading/?region=qc>
- Société canadienne du cancer. (2017, March 5). *Oligodendrogliome*. Consulté le 2017, sur Société canadienne du cancer Web site: <http://www.cancer.ca/fr-ca/cancer-information/cancer-type/brain-spinal/brain-and-spinal-tumours/oligodendroglioma/?region=qc>

- Société canadienne du cancer. (2017). *Statistiques de survie pour le cancer du cerveau et de la moelle épinière*. Consulté le March 23, 2017, sur Société canadienne du cancer Web site: <http://www.cancer.ca/fr-ca/cancer-information/cancer-type/brain-spinal/prognosis-and-survival/survival-statistics/?region=on>
- Sun, J., & Hai Liu, R. (2006). Cranberry phytochemical extracts induce cell cycle arrest and apoptosis in human MCF-7 breast cancer cells. *Cancer Letters*, 124-134.
- Taylor, R. W., & Stark, R. G. (2001). Regulation of the G2/M transition by p53. *Oncogene*, 20, 1803-1815.
- The Angiosperm Phylogeny Group. (2009). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 161 (2), 105-202.
- Thi Ho, G. T., Wangenstein, H., & Barsett, H. (2017). Elderberry and Elderflower Extracts, Phenolic Compounds, and Metabolites and Their Effect on Complement, RAW 264.7 Macrophages and Dendritic Cells. *International Journal of Molecular*, 18 (3), 584-601.
- Thi Ho, G., Wangenstein, H., & Barsett, H. (2017). Elderberry and Elderflower Extracts, Phenolic Compounds, and Metabolites and Their Effect on Complement, RAW 264.7 Macrophages and Dendritic Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 18, 1-17.
- Thole, J. M., Burns Kraft, T. F., Sueiro, L., Kang, Y.-H., Gills, J. J., Cuendet, M., et al. (2006). A Comparative Evaluation of the Anticancer Properties of European and American Elderberry Fruits. *Journal of Medicinal Food*, 4 (9), 498-504.
- Tsao, R. (2010). Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. *Nutrients*, 2, 1231-1246.
- Tuso, P. J., Ismail, M. H., Ha, B. P., & Bartolotto, C. (2013). Nutritional Update for Physicians: Plant-Based Diets. *The Permanente Journal*, 17 (2), 61-66.
- Ueda, Y., Nakagawa, T., Kubota, T., Ido, K., & Sato, K. (2005). Glioma cells under hypoxic conditions block the brain microvascular endothelial cell death induced by serum starvation. *Journal of Neurochemistry*, 95, 99-110.
- Veliz, I., Loo, Y., Castillo, O., Karachaliou, N., Olga, N., & Rosell, R. (2015). Advances and challenges in the molecular biology and treatment of glioblastoma—is there any hope for the future? *Annals of Translational Medicine*, 1 (7), 1-14.
- Vlachostergios, P. J., Voutsadakis, I. A., & Papandreou, C. N. (2012). The ubiquitin-proteasome system in glioma cell cycle control. *Cell Division*, 7 (18), 1-6.



- Walczak, C. E., & Heald, R. (2008). Mechanisms of mitotic spindle assembly and function. *International Review of Cytology*, 265, 111-158.
- WCRF International. (2017). *Dietary supplements*. Consulté le March 15, 2017, sur WCRF International Web site: <http://www.wcrf.org/int/research-we-fund/cancer-prevention-recommendations/dietary-supplements>
- Weston, A., & Harris, C. C. (2003). Multistage Carcinogenesis. Dans D. W. Kufe, R. E. Pollock, R. R. Weichselbaum, R. C. Bast, T. S. Gansler, J. F. Holland, et al. (Éds.), *Cancer Medicine* (éd. 6th Edition). Hamilton, ON: BC Decker.
- Wong, A. D., Ye, M., Levy, A. F., Rothstein, J. D., Bergles, D. E., & Searson, P. C. (2013). The blood-brain barrier: an engineering perspective. *Frontiers in Neuroengineering*, 6 (7), 1-22.
- Wong, S. Y., & Hynes, R. O. (2006). Lymphatic or Hematogenous Dissemination: How Does a Metastatic Tumor Cell Decide? *Cell Cycle*, 5 (8), 812-817.
- Wu, X., Gu, L., Prior, R. L., & McKay, S. (2004). Characterization of Anthocyanins and Proanthocyanidins in Some Cultivars of Ribes, Aronia, and Sambucus and Their Antioxidant Capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 7846-7856.
- Xie, Q., Mittal, S., & Berens, M. E. (2014). Targeting adaptive glioblastoma: an overview of proliferation and invasion. *Neuro-Oncology*, 16 (12), 1575-1584.
- Yang, K., Hitomi, M., & Stacey, D. W. (2006). Variations in cyclin D1 levels through the cell cycle determine the proliferative fate of a cell. *Cell Division*, 1 (32).
- Yao, L., Jiang, Y., Shi, J., Tomas-Barberan, F., Datta, N., Singanusong, R., et al. (2013). Flavonoids in food and their health benefits. *Plant Foods for Human Nutrition*, 59 (3), 113-122.
- Zhao, Z., Nelson, A. R., Betsholtz, C., & Zlokovic, B. V. (2015). Establishment and Dysfunction of the Blood-Brain Barrier. *Cell*, 163.
- Zlokovic, B. V. (2005). Neurovascular mechanisms of Alzheimer's neurodegeneration. *Trends in Neurosciences*, 28 (4), 202-208.