

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

**LES PROPRIÉTÉS ANTIANGIOGÉNIQUES  
DES FLAVONOÏDES**

MÉMOIRE PRÉSENTÉ  
COMME EXIGENCE PARTIELLE  
DE LA MAÎTRISE EN CHIMIE

PAR  
VALÉRIE BÉDARD

AVRIL 2008

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.01-2006). 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 voudrais remercier sincèrement toutes les personnes qui m'ont aidée, de près ou de loin, à réaliser ce projet de maîtrise, soit, tout d'abord, mon directeur de recherche, le Dr Richard Béliveau. Premièrement, je tiens à le remercier de m'avoir accueillie dans son laboratoire de médecine moléculaire et de m'avoir donné l'opportunité d'effectuer mes travaux dans l'axe de recherche de la prévention du cancer par l'alimentation. Ensuite, j'aimerais le remercier pour la confiance qu'il m'a témoignée et qui m'a permis de m'épanouir scientifiquement.

J'aimerais aussi exprimer ma sincère reconnaissance à l'égard du Dre Sylvie Lamy, ma superviseure, pour son dévouement pour notre projet, mais également pour la patience dont elle a su faire preuve surtout envers toutes mes « petites questions » et, finalement, pour son soutien, ses précieux conseils, sa rigueur scientifique et ses encouragements tout au long de l'aventure et ce, même avec la petite Jade dans son ventre et dans ses bras.

J'en profite pour remercier également tous mes collègues de travail et amis avec qui j'ai eu la chance de partager de merveilleux moments et de nombreux fous rires: Jessica Jackson, Mathieu Provençal, David Labbé, Carine Nyalendo, Xavier Vanier-Verville, Marguerite Buchanan, Geneviève Di Tomasso, Mélanie Blanchette, Édith Beaulieu, Dominique Boivin, Naomi Defort, Karina Thai, Élodie Boulier, Claire Gaillard, Nicolas Fontaine et Ryan Veitch. Des remerciements plus spéciaux vont à ma complice, amie et collègue Marisol Michaud avec qui j'ai eu le bonheur de partager mon quotidien durant ces cinq dernières années. Merci Marie pour toutes nos longues discussions tant scientifiques que personnelles et pour tous les beaux moments qu'on a vécus ensemble.

Je remercie les gens que j'ai eu le plaisir de côtoyer au centre de recherche de l'hôpital Sainte-Justine ou à l'Université du Québec à Montréal: Jonathan Michaud-Lévesque, Normand Lapierre, Marie-Paule Lachambre, Yannève Rolland ainsi que tout le personnel de l'animalerie et, plus particulièrement, Denise Carrier, Véronique Pellerin et Yvhans Chery.

De plus, je souhaite remercier le Dr Hervé Sartelet, médecin au département de pathologie du CHU Sainte-Justine, pour sa précieuse collaboration.

Je désire également remercier Marc-André Deschênes, mon conjoint, pour son support moral et informatique, mais également pour sa patience et ses encouragements. J'aimerais aussi soulever l'importance de ma famille et de mes amis tout au long de mes études, sans qui je n'y serais pas parvenue. Merci donc, plus particulièrement, à mes parents, Diane Lachapelle et Denis Bédard et à ma sœur, Maryse Bédard, pour leur compréhension, leur appui, leur assistance et leurs encouragements.

Pour terminer, je désire remercier le Fonds de recherche en santé du Québec (FRSQ), la Fondation Charles Bruneau et la Société de recherche sur le cancer pour leur soutien financier durant l'accomplissement de ce travail.

## TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES.....	vii
LISTE DES TABLEAUX.....	ix
LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES .....	x
LISTE DES SYMBOLES ET UNITÉS.....	xiii
RÉSUMÉ.....	xiv
CHAPITRE I	
INTRODUCTION.....	1
1.1 Le cancer.....	1
1.1.1 Statistiques.....	1
1.1.2 La cancérogenèse.....	3
1.2 L'angiogenèse.....	6
1.2.1 Vue d'ensemble.....	6
1.2.2 L'angiogenèse tumorale.....	7
1.2.3 Le « <i>switch</i> » angiogénique.....	8
1.2.4 Les étapes de l'angiogenèse tumorale.....	10
1.3 Les différents acteurs du processus d'angiogenèse tumorale .....	13
1.3.1 L'angiopoïétine.....	13
1.3.2 Le FGF.....	14
1.3.3 Le VEGF.....	15
1.3.4 Les MMPs.....	16
1.4 Le facteur de croissance dérivé des plaquettes .....	18
1.4.1 Historique de sa découverte.....	18
1.4.2 Structure et fonction.....	18
1.4.3 Les récepteurs du PDGF.....	20
1.4.4 Son rôle.....	21
1.4.5 Signalisation du PDGF/PDGFR.....	23
1.5 Les cellules périvasculaires .....	29
1.5.1 Identité et identification des cellules périvasculaires .....	29
1.5.2 Fonctions des cellules périvasculaires dans le développement vasculaire .....	30
1.5.3 Interactions des cellules périvasculaires avec les cellules endothéliales.....	31
1.5.4 Recrutement des cellules périvasculaires par le PDGF-BB .....	32

1.5.5	Importance de la stabilisation par les cellules périvasculaires .....	33
1.6	La prévention du cancer par l'alimentation .....	34
1.6.1	L'angiogenèse tumorale comme cible.....	34
1.7	Les flavonoïdes.....	37
1.7.1	Un aperçu.....	37
1.7.2	Structure et sous-classe.....	37
1.7.3	Sources alimentaires .....	40
1.7.4	Consommation.....	42
1.7.5	Absorption, métabolisme et biodisponibilité.....	43
1.7.6	Les propriétés connues des Flavonoïdes.....	44
1.8	Objectifs du projet .....	46
CHAPITRE II		
MATÉRIEL ET MÉTHODES.....		
2.1	Matériel.....	48
2.1.1	Culture cellulaire.....	48
2.1.2	Anticorps.....	48
2.1.3	Facteur de croissance.....	49
2.1.4	Réactifs et matériel .....	49
2.1.5	Animaux .....	50
2.2	Méthodes .....	51
2.2.1	Préparation des flavonoïdes .....	51
2.2.2	Culture cellulaire.....	51
2.2.3	Essai de migration cellulaire <i>in vitro</i> en chambre de type Boyden .....	52
2.2.4	Test de viabilité au bleu de trypan .....	53
2.2.5	Test d'invasion <i>in vitro</i> .....	53
2.2.6	Étude des marqueurs moléculaires.....	54
2.2.7	Zymographie gélatinolytique.....	59
2.2.8	Test d'implant de Matrigel <sup>TM</sup> .....	60
2.2.9	Visualisation de la néovascularisation des implants .....	60
2.2.10	Dosage de l'hémoglobine.....	61
2.2.11	Coupes et colorations histologiques.....	61
2.2.12	ELISA.....	61

## CHAPITRE III

RÉSULTATS .....	64
3.1 La migration cellulaire.....	64
3.1.1 Efficacité des flavonoïdes pour inhiber la migration des PSMCs .....	64
3.1.2 Inhibition par les flavonoïdes de la migration des PSMCs induite par le PDGF-BB .....	65
3.2 L'invasion cellulaire .....	65
3.2.1 Inhibition par les flavonoïdes de l'invasion des PSMCs induite par le PDGF-BB.....	66
3.3 Étude des marqueurs moléculaires .....	66
3.3.1 Effets des flavonoïdes sur la phosphorylation du récepteur PDGFR- $\beta$ .....	67
3.3.2 Effets des flavonoïdes sur des protéines impliquées dans la signalisation cellulaire.....	68
3.4 Zymographie gélatinolytique .....	69
3.4.1 Effets des flavones sur la sécrétion de MMPs par les PSMCs .....	69
3.5 Sécrétion du VEGF.....	70
3.5.1 Inhibition par les flavones de la sécrétion de VEGF par les PSMCs.....	70
3.6 Essai de viabilité .....	71
3.6.1 Effets des flavonoïdes les plus actifs sur la viabilité des PSMCs.....	71
3.7 Études <i>in vivo</i> .....	72
3.7.1 Inhibition par les flavones de l'angiogenèse <i>in vivo</i> .....	72
3.7.2 Quantification de l'angiogenèse.....	75

## CHAPITRE IV

DISCUSSION.....	93
4.1 La motilité cellulaire.....	94
4.2 La signalisation cellulaire .....	96
4.3 Étude de l'effet protecteur et stabilisateur des PSMCs.....	100
4.4 Les études <i>in vivo</i> .....	101

## CHAPITRE V

CONCLUSION .....	104
5.1 Les propriétés antiangiogéniques des flavonoïdes.....	104
5.2 Les perspectives.....	105
APPENDICE A.....	107
BIBLIOGRAPHIE.....	108

## LISTE DES FIGURES

Figure		Page
1.1	Facteurs de risques du cancer .....	3
1.2	Étapes de l'évolution du cancer.....	4
1.3	Revue simplifiée des étapes clés de l'angiogenèse tumorale .....	12
1.4	Représentation des récepteurs au PDGF et de leurs ligands.....	20
1.5	Représentations de certains RTK et des tyrosines phosphorylables de la portion cytoplasmique du PDGFR .....	24
1.6	Vue d'ensemble sur la signalisation cellulaire induite suite à l'activation du PDGFR par son ligand.....	26
1.7	Représentation schématique et par microscopie électronique à balayage (MEB) des cellules périvasculaires .....	30
1.8	Interactions entre les cellules endothéliales et les cellules périvasculaires .....	32
1.9	Structure de base des flavonoïdes.....	38
1.10	Recrutement des cellules périvasculaires par les cellules endothéliales vasculaires dans l'angiogenèse tumorale.....	46
3.1	Efficacité des flavonoïdes en comparaison à un inhibiteur synthétique de l'angiogenèse, le Gleevec, sur la migration des PSMCs induite par le PDGF-BB .....	76
3.2	Effets des flavonoïdes sur le niveau basal de migration des cellules PSMCs. ...	77
3.3	Inhibition par les flavonols, kaempférol et myricétine, de la migration des PSMCs induite par le PDGF-BB.....	78
3.4	Inhibition par les flavones, apigénine et lutéoline, de la migration des PSMCs induite par le PDGF-BB.....	79
3.5	Inhibition par les flavonols, kaempférol et myricétine, de l'invasion des PSMCs induite par le PDGF-BB.....	80



3.6	Inhibition par les flavones, apigénine et lutéoline, de l'invasion des PSMCs induite par le PDGF-BB.....	81
3.7	Inhibition par les flavonoïdes de l'induction de la phosphorylation du récepteur PDGFR- $\beta$ par le PDGF-BB chez les PSMCs. ....	82
3.8	Inhibition par les flavonoïdes de l'induction de la phosphorylation de deux protéines intracellulaires, ERK et Akt, par le PDGF-BB chez les PSMCs.....	83
3.9	Inhibition par l'apigénine de l'induction de la phosphorylation de la protéine ERK par le PDGF-BB chez les PSMCs. ....	84
3.10	Inhibition par la lutéoline de l'induction de la phosphorylation de la protéine ERK par le PDGF-BB chez les PSMCs. ....	85
3.11	Inhibition par l'apigénine de l'induction de la phosphorylation de la protéine Akt par le PDGF-BB chez les PSMCs. ....	86
3.12	Inhibition par la lutéoline de l'induction de la phosphorylation de la protéine Akt par le PDGF-BB chez les PSMCs. ....	87
3.13	Inhibition par les flavones, apigénine et lutéoline, de l'excrétion par les PSMCs de la proMMP-2 dans le milieu de culture.....	88
3.14	Inhibition par les flavones, lutéoline et apigénine, de la sécrétion de VEGF par les PSMCs stimulées au PDGF-BB.....	89
3.15	Effets des flavonoïdes les plus actifs sur la viabilité des PSMCs.....	90
3.16	Inhibition de l'angiogenèse <i>in vivo</i> par les flavonoïdes les plus actifs.....	91
3.17	Quantification de l'angiogenèse réalisée à l'aide du dosage du niveau d'hémoglobine présent dans chacun des implants.....	92

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau		Page
1.1	Facteurs pro et antiangiogéniques endogènes .....	9
1.2	Structure des flavonoïdes .....	39
1.3	Quantité des flavonoïdes contenus dans certains fruits, légumes et herbes aromatiques .....	41

## LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

AB	<i>Acidic box</i>
ACS	<i>American chemical society</i>
ADN	Acide désoxyribonucléique
Akt	Protéine kinase Akt ou Protéine kinase B
Ang	Angiopoïétine
Api	Apigénine
APS	Persulfate d'ammonium
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ATP	Adénosine triphosphate
BAEC	Cellules endothéliales d'aorte bovine
BCA	Acide bicinchoninique
BCS	Sérum de veau foetal
BSA	Albumine sérique bovine
bFGF	Facteur de croissance des fibroblastes basique
CE	Cellules endothéliales
CHAPS	3-[(3-Chloamidopropyl) diméthylammonio]-1-propane-sulfonate
CUB	<i>Domain found in complement subcomponents C1r/C1s, urchin epidermal growth factor-like protein and bone morphogenetic protein 1</i>
G-CSF	Facteur stimulant la formation de colonies de granulocytes
DMSO	Diméthyl sulfoxyde
DTT	Dithiothreitol
ECL	Réactif de chemiluminescence
EDTA	Acide éthylènediamine tétraacétique
EGF	Facteur de croissance épidermal
EGFD	Domaine similaire à l'EGF
EGTA	Acide éthylène glycol tétraacétique
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ERK	Kinase régulatrice des signaux extracellulaires
FAK	Kinase d'adhésion focale
FBS	Sérum foetal de veau
FGF	Facteur de croissance des fibroblastes
FGFR	Récepteur du FGF
FITC	Isothiocyanate-5 de fluorescéine
Flk-1	<i>Foetal liver kinase-1</i>
Flt	<i>Fms-like tyrosine kinase</i>
FNIII	Fibronectine III
GAP	Protéine activatrice de la GTPase
<i>Gap junction</i>	Jonction lacunaire
Gle	Gleevec
Grb-2	Protéine associée aux récepteurs de facteurs de croissance
Hb	Hémoglobine

HCl	Chlorure d'hydrogène
HepG2	Lignée cellulaire provenant d'hépatome humain
HGF	Facteur de croissance des hépatocytes
HIF	Facteur induit par l'hypoxie
HPLC	Chromatographie liquide haute performance
IC <sub>50</sub>	Concentration de l'inhibiteur nécessaire à l'obtention de 50 % d'inhibition
ID	Immunodétection
IgD	Domaine similaire aux immunoglobulines
IL	Interleukine
IP	Immunoprécipitation
JNK	<i>C jun aminoterminal kinase</i>
Kae	Kaempférol
KCl	Chlorure de potassium
KDR	<i>Kinase insert domain-containing receptor</i>
LDL	Lipoprotéines de faible densité
Lut	Lutéoline
MAPKs	Protéine kinase activatrice des voies mitogéniques
MDA-MB-231	Cellules cancéreuses humaines provenant d'un cancer du sein
MEB	Microscopie électronique à balayage
MEC	Matrice extracellulaire
MLCK	Kinase de la chaîne légère de la myosine
MMP	Métalloprotéase de la matrice extracellulaire
Myr	Myricétine
NaCl	Chlorure de sodium
NaF	Fluorure de sodium
NaN <sub>3</sub>	Azoture de sodium
NaOH	Hydroxyde de sodium
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	Sodium orthovanadate
PAGE	<i>Polyacrylamide gel electrophoresis</i>
pAkt	Protéine kinase Akt phosphorylée
PASMCs	Cellules musculaires lisses humaines d'artère pulmonaire
PBS	Tampon sodium phosphate
PC-3	Cellules cancéreuses humaines provenant d'un cancer de la prostate
pERK	Protéine kinase régulatrice des signaux extracellulaires qui est phosphorylée
PD-ECGF	Facteur de croissance des cellules endothéliales dérivé des plaquettes
PDGF	Facteur de croissance dérivé des plaquettes
PDGFR	Récepteur du PDGF
PDK1	Protéine kinase 1 dépendante du 3-phosphoinositide
PEDF	Facteur dérivé de l'épithélium pigmentaire
PI3K	<i>Phosphatidylinositol 3-kinase</i>
PKB	Protéine kinase B
PLC-γ	Phospholipase Cγ
PIGF	Facteur de croissance placentaire
PSJ	Jonction de type « <i>peg and socket</i> »

PTB	Domaine de liaison aux phosphotyrosines
PTK	Protéine tyrosine kinase
PVDF	Difluorure de polyvinylidène
RASMCs	Cellules musculaires lisses d'aorte de rat
RGS5	Régulateur de la signalisation par la protéine-G 5
ROS	Espèces réactives de l'oxygène
RTK	Récepteur à activité tyrosine kinase
SDS	Sodium dodécyl sulphate
SDS-PAGE	Sodium dodécyl sulphate- <i>polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SFK	Kinases de la famille de Src
SH2	Domaine d'homologie avec la protéine Src 2
SMA	Actine musculaire lisse
SMC	Cellules musculaires lisses
Sos	<i>Son of sevenless</i>
SPARC	<i>Secreted protein acidic and rich in cystein</i>
Stat	Transducteurs de signal et activateur de la transcription
TBS	Tampon tris salin
TEMED	N,N,N',N'-tétraméthyléthylènediamine
TGF	Facteur de croissance tumoral
Tie	<i>Tyrosine kinase with immunoglobulin and epidermal growth factor homology domains</i>
TIMPs	Inhibiteurs tissulaires des métalloprotéases matricielles
TNF	Facteur nécrosant des tumeurs
Tris	Tris(hydroxyméthyl)aminoéthane
Tyr	Tyrosine
USDA	Département de l'agriculture des États-Unis
VEGF	Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
VEGFR	Récepteur du VEGF
VEGI	Inhibiteur de croissance de l'endothélium vasculaire
VPF	Facteur de perméabilité vasculaire
vSMC	Cellules musculaires lisses vasculaires
Y	Résidu tyrosine

## LISTE DES SYMBOLES ET UNITÉS

%	Pourcentage
°C	Degré Celcius
$\alpha$	Alpha
$\beta$	Bêta
$\gamma$	Gamma
Da	Dalton
g	Gramme
g	Unité de la force gravitationnelle (unité de la force centrifuge)
g/l	Gramme par litre
h	Heure
kDa	KiloDalton
l	Litre
M	Molaire
min	Minute
mg	Milligramme
ml	Millilitre
mm	Millimètre
mM	Millimolaire
$\mu$ g	Microgramme
$\mu$ g/ml	Microgramme par millilitre
$\mu$ l	Microlitre
$\mu$ M	Micromolaire
$\mu$ m	Micromètre
ng	Nanogramme
nm	Nanomètre
p/v	Poids/volume
rpm	Rotation par minute
T	Température (°C)
U	Unités
v/v	Volume/volume
V	Volt

## RÉSUMÉ

Malgré les progrès considérables qui ont été réalisés depuis une trentaine d'années, le cancer demeure un ennemi redoutable. Néanmoins, de nombreuses études épidémiologiques ont montré qu'une alimentation riche en fruits et légumes réduit les risques de développer le cancer. Nous savons également que l'angiogenèse, ou la formation de nouveaux vaisseaux à partir de capillaires préexistants, joue un rôle crucial dans la croissance des tumeurs et dans leur dissémination sous forme de métastases. En conséquence, l'objectif de ce projet est de caractériser les effets antiangiogéniques d'une famille de composés omniprésents dans notre alimentation, les flavonoïdes, en particulier, les flavonols, kaempférol et myricétine, et les flavones, lutéoline et apigénine. Pour y parvenir, nous avons d'abord procédé à des tests de migration cellulaire et d'invasion de Matrigel™ en chambre de Boyden à l'aide de cellules musculaires lisses d'artère pulmonaire (PASCs). Les données obtenues montrent qu'apigénine, lutéoline et myricétine inhibent grandement la migration et l'invasion cellulaire, et que les niveaux d'inhibition sont comparables à ceux observés avec des médicaments synthétiques. Ensuite, nous avons réalisé des études de marqueurs moléculaires tels que la phosphorylation du récepteur du facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGFR-β), de la protéine kinase régulatrice des signaux extracellulaires (ERK) et de la protéine Akt, et ce, toujours avec des PASCs. L'inhibition de la phosphorylation du récepteur PDGFR-β, de la protéine ERK et Akt par l'apigénine et la lutéoline a également été observée. Nous nous sommes également assurés que les effets observés n'étaient pas dus à la toxicité des molécules étudiées en effectuant des tests de viabilité cellulaire au bleu de trypan. Nous avons poursuivi en analysant la sécrétion de la proMMP-2 et du VEGF par les PASCs lorsqu'elles sont stimulées au PDGF-BB. Les résultats obtenus montrent que la sécrétion de VEGF est inhibée par les flavones alors que seule la lutéoline affecte la sécrétion de la proMMP-2. Finalement, nous avons réalisé des études *in vivo* sur un modèle animal de souris immunosupprimées, soit des souris Crl:CD1<sup>®</sup> Foxn1<sup>nu</sup>. Ce modèle a permis de mettre en lumière le potentiel antiangiogénique *in vivo* des flavones. En somme, tous les résultats obtenus *in vivo* et *in vitro* indiquent que les flavones, lutéoline et apigénine, ont un fort potentiel antiangiogénique.

**Mots clés :** Cancer, angiogenèse, flavonoïdes, cellules musculaires lisses, PDGFR.

## CHAPITRE I

### INTRODUCTION

#### 1.1 LE CANCER

Le cancer nous frappe tous autant que nous sommes, directement ou indirectement, et ce, sans discrimination. Le cancer est une maladie au cours de laquelle il y a un dérèglement des fonctions de la cellule. Ce dérèglement se manifeste par l'acquisition progressive de caractéristiques qui engendrent une croissance cellulaire anormale et plus rapide que chez les cellules normales. Ceci permet aux cellules anormales d'envahir les tissus de l'organisme et c'est pourquoi cette pathologie est caractérisée par la présence d'une ou de plusieurs tumeurs malignes chez le patient (Béliveau et Gingras, 2005).

##### *1.1.1 Statistiques*

Malgré plusieurs décennies de recherche, le cancer demeure un ennemi redoutable. Un fléau qui n'épargne personne, que l'on soit jeune ou vieux, riche ou pauvre, homme ou femme. Le nombre de cas de cancer est en progression constante partout dans le monde. En effet, le cancer est devenu l'une des maladies les plus dévastatrices pour l'humanité puisque, selon la Société de recherche sur le cancer, chaque année, plus de 10 millions de personnes en meurent à travers le monde. L'Organisation mondiale de la santé indique qu'il y a, actuellement, plus de 24.6 millions de personnes qui vivent avec le cancer et, si la tendance se maintient, qu'elles seront plus de 30 millions d'ici 2020. De plus, tous les cancers réunis représentent désormais la deuxième cause de mortalité, dans les pays industrialisés, après les maladies cardiovasculaires.



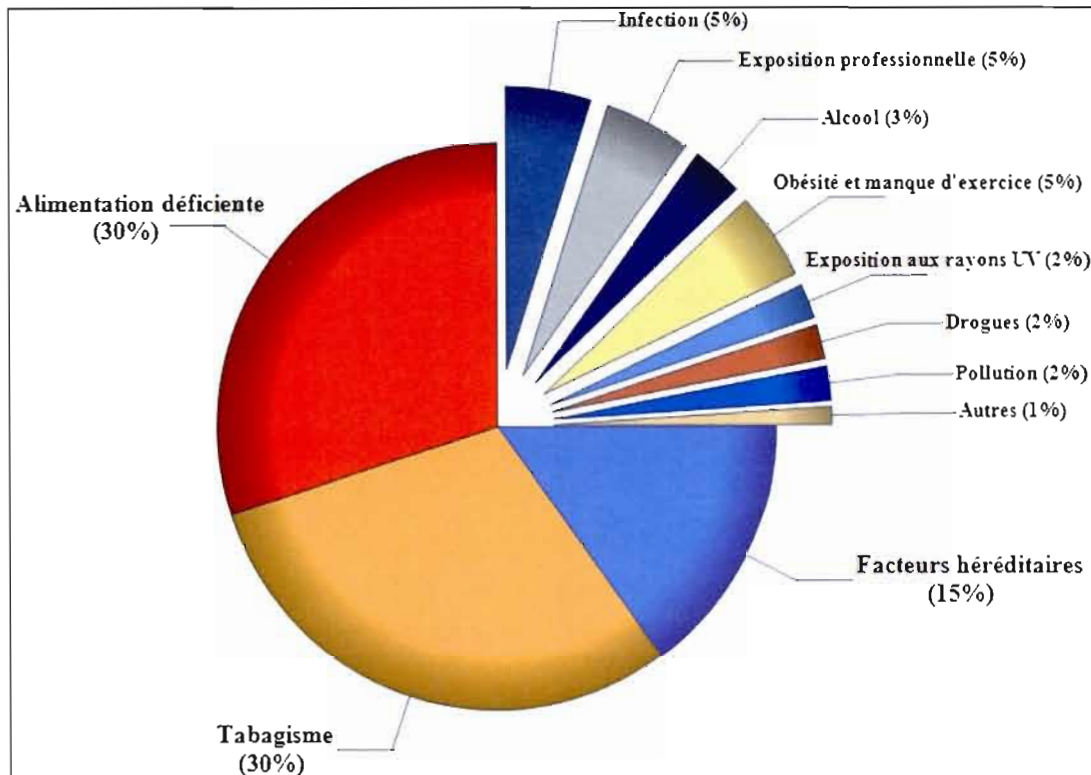
Plus près de nous cette fois, on rapporte, dans un rapport publié en 2007 par la Société canadienne du cancer et l'Institut national du cancer du Canada, que le nombre de nouveaux cas de cancer cette année au Canada est estimé à 159 000. Ceci signifie qu'en moyenne, chaque semaine 3 050 Canadiens et Canadiennes recevront un diagnostic de cancer. On indique également dans ce rapport que la prévision concernant le nombre de décès attribuable au cancer en 2007 au Canada s'élève à 72 700 personnes.

Le cancer représente un fardeau tant pour les malades eux-mêmes que pour leurs famille et amis, mais également pour les systèmes de soins de santé. Un fardeau qui se chiffre à plusieurs centaines de milliards de dollars et qui n'a pas fini d'augmenter puisqu'avec le vieillissement de la population, on estime que, dans un avenir rapproché, une personne sur trois devra combattre le cancer et qu'au minimum une sur quatre ne pourra le vaincre.

Il existe plus de cent différents types de cancers et sous-types de tumeurs qui peuvent être détectés dans des organes spécifiques. Certains sont plus communs alors que d'autres sont extrêmement rares. Au Canada, les cancers les plus répandus sont les cancers du poumon, du sein, de la prostate ainsi que le cancer colorectal. Ils comptent pour plus de la moitié des nouveaux cas de cancer déclarés chaque année et, parmi eux, le cancer des poumons est celui qui fait le plus de victimes (Société canadienne du cancer et Institut national du cancer du Canada, 2007).

Les causes et les types de cancer varient selon les régions, mais un élément demeure : nous pouvons prévenir la plupart d'entre eux, car la vaste majorité des cancers sont causés par des facteurs autres que l'hérédité (voir fig. 1.1). Il est actuellement estimé que plus de la moitié des cancers pourraient être évités puisqu'ils sont associés à des facteurs reliés à un mode de vie malsain qu'il nous est possible de contrôler. Le style de vie (sédentarité, obésité, consommation d'alcool ou de drogues), nos habitudes alimentaires et le tabagisme sont responsables de plus de 65 % des cas de cancer (Béliveau et Gingras, 2005). Ce sont donc autant de facteurs qui contribuent à la prévention ou au développement de la maladie.

En résumé, les plus récentes statistiques canadiennes sur le cancer démontrent sans équivoque que le cancer continue de progresser au pays et confirment l'importance de poursuivre nos recherches pour lutter contre cette maladie et développer des stratégies de prévention.



**Figure 1.1 Facteurs de risques du cancer.**

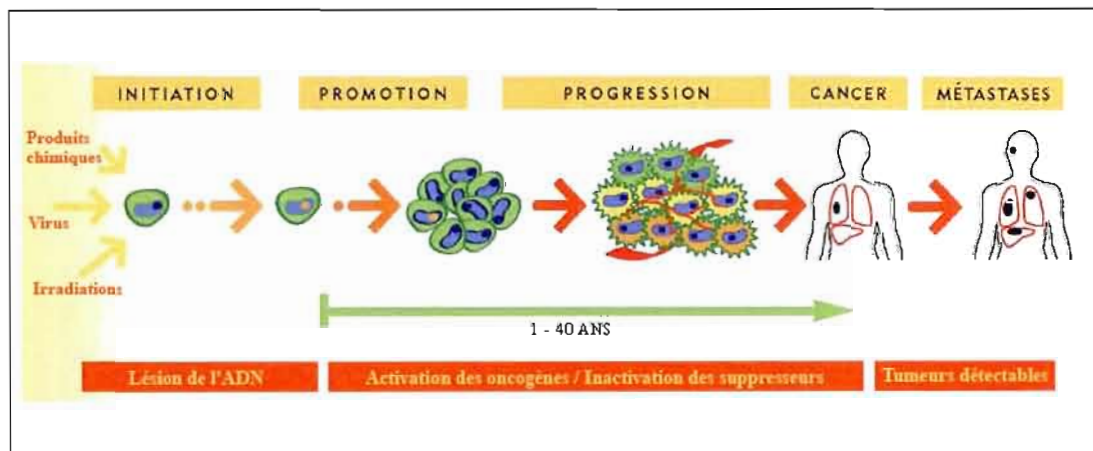
Les facteurs étiologiques associés au développement du cancer sont nombreux, mais il n'en demeure pas moins que l'alimentation et la cigarette représentent les plus importants. Illustration modifiée tirée de : Béliveau et Gingras, 2005.

### **1.1.2 La cancérogenèse**

Le cancer est caractérisé par la présence d'une ou de plusieurs tumeurs qui sont l'aboutissement d'une série de transformations pouvant se dérouler sur une période de plusieurs années (Weinberg, 2007). La cancérogenèse est, en effet, un processus complexe à étapes multiples menant une cellule d'un état sain à un état cancéreux (Bode et Dong, 2006;

Jakobisiak, Lasek et Golab, 2003). Les différentes phases de la cancérogenèse sont : l'initiation, la promotion et la progression (voir fig. 1.2).

L'initiation est l'étape durant laquelle les cellules sont exposées à des agents cancérogènes, qu'ils soient de natures chimique (substances chimiques mutagènes contenues dans la fumée de cigarette), physique (radiations de type ultraviolet) ou virale, qui vont ultimement provoquer des dommages irréversibles sur une région importante de l'ADN de la cellule et entraîner l'apparition de mutations. Lors de cette phase, les cellules ne sont pas encore transformées, mais leur génotype modifié leur procure désormais le potentiel de former des tumeurs (Warshawsky et Landolph, 2006).



**Figure 1.2 : Étapes de l'évolution du cancer.**

Illustration modifiée tirée de : Béliveau et Gingras, 2005.

La phase de promotion, quant à elle, correspond à la phase d'expansion clonale des cellules dites « initiées », c'est-à-dire qui ont subi une altération de leur matériel génétique. Normalement, les cellules de notre corps répondent à certaines règles qui permettent de maintenir l'équilibre entre la prolifération et la mort cellulaire (Alison, 2005). Les cellules initiées sont caractérisées par le fait qu'elles ne répondent plus à ces règles d'homéostasie. Il se produit alors un dérèglement des gènes cellulaires favorisant la prolifération et inhibant le déclenchement de l'apoptose chez ces cellules. Du coup, l'accroissement du taux de division

cellulaire augmente les probabilités d'obtenir un clone possédant des mutations supplémentaires qui lui permettraient, cette fois, de se développer de manière autonome. La phase de promotion est généralement induite par un agent promoteur comme des lipides alimentaires, des hormones ou des facteurs de croissance qui poussent les cellules à se diviser. À l'instar de la première phase, la phase de promotion est réversible, et consiste en un long processus pouvant se prolonger durant plusieurs années, voir décennies. Elle offre donc une grande fenêtre d'intervention pour la prévention du développement du cancer (Trosko, 2001).

Finalement, la phase de progression est celle durant laquelle les cellules évoluent de cellules transformées en cellules cancéreuses. On attribue alors à la tumeur ses caractères malin et invasif (Bergers et Benjamin, 2003). Ainsi, cette phase inclut toutes les étapes subséquentes de la croissance tumorale jusqu'à sa dissémination dans l'organisme sous forme de métastases. À ce moment, la tumeur est contrôlée à la fois par des mécanismes intratumoraux, nécessitant une collaboration étroite entre les cellules cancéreuses, et par ses interactions avec son environnement immédiat (Jakobisiak, Lasek et Golab, 2003). Les cellules, modifiées autant dans leur phénotype que dans leur génotype, forment une société de cellules tumorales ayant acquis de nouvelles propriétés caractéristiques, souvent désignées comme les six signatures du cancer, qui contribuent à augmenter leur caractère envahissant : l'indépendance vis-à-vis des signaux stimulant la prolifération, l'insensibilité aux signaux inhibiteurs, la résistance à l'apoptose, une capacité de prolifération illimitée, un pouvoir invasif et la capacité d'induire l'angiogenèse (Hanahan et Weinberg, 2000). Chacune de ces six caractéristiques représente une cible thérapeutique potentielle pour contrer le cancer. D'ailleurs, la cancérologie du XXI<sup>e</sup> siècle est caractérisée par l'émergence de thérapies moléculaires ciblées, c'est-à-dire d'approches thérapeutiques ciblant une anomalie moléculaire ou un processus global considéré comme impliqué dans la progression tumorale (L'Allemain et Soria, 2007).

## 1.2 L'ANGIOGENÈSE

C'est dans cet ordre d'idée qu'il y a une trentaine d'années, suite au concept d'angiogenèse tumorale formulé par Judah Folkman, la théorie selon laquelle s'opposer à la vascularisation d'une tumeur pourrait constituer une nouvelle stratégie thérapeutique anticancéreuse, a vu le jour (Bisacchi *et al.*, 2003; Folkman, 2006). L'angiogenèse est maintenant un champ d'investigation de pointe et un sujet majeur de la recherche biomédicale.

### 1.2.1 Vue d'ensemble

L'angiogenèse est définie comme l'ensemble des processus menant à la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de capillaires préexistants (Folkman, 1971). Elle se distingue de la vasculogenèse durant laquelle il se produit une différenciation *in situ* de cellules précurseurs indifférenciées, les hémangioblastes, en angioblastes qui, à leur tour, vont se différencier en cellules endothéliales qui s'assemblent pour donner un premier réseau nommé plexus vasculaire primitif (Carmeliet, 2000; Flamme, Frolich et Risau, 1997; Risau, 1997).

Normalement, l'angiogenèse physiologique a pour but d'assurer qu'un tissu en développement ou en réparation reçoive une quantité adéquate et suffisante de nutriments (Papetti et Herman, 2002). Dans un organisme adulte, l'angiogenèse physiologique est un événement peu fréquent, finement régulé, qui survient surtout lors de réparation tissulaire dans le processus de cicatrisation ou encore, plus spécifiquement, dans les fonctions reproductrices chez les femmes soit lors de la formation de l'endomètre durant les cycles menstruels ou du placenta lorsqu'elle est enceinte (Carmeliet, 2000; Otrrock *et al.*, 2007). Ce type d'angiogenèse se déroule en relation avec le tissu environnant d'une manière strictement contrôlée dans l'espace et dans le temps (Dor, Djonov et Keshet, 2003).

En revanche, on retrouve chez l'adulte de l'angiogenèse pathologique dans plusieurs situations. Notamment, dans des cas d'ischémies cardiaque et cérébrale où l'angiogenèse est

insuffisante ou encore lorsqu'elle est excessive comme dans des cas de psoriasis, de rétinopathie diabétique, d'arthrites rhumatoïdes, d'inflammation ou de cancer (Pandya, Dhalla et Santani, 2006).

### 1.2.2 *L'angiogenèse tumorale*

L'angiogenèse pathologique que l'on retrouve dans les cas de cancer est appelée angiogenèse tumorale et il a été démontré maintes fois qu'il s'agit d'un processus indispensable à la croissance des tumeurs et au phénomène métastatique qui constitue la plupart du temps la principale cause de mortalité associée au cancer.

L'hypothèse selon laquelle la croissance tumorale dépend de la formation de nouveaux vaisseaux sanguins a été mise en évidence pour la première fois, il y a de ça tout près de 40 ans, par le Dr Judah Folkman (1971). Le Dr Folkman, qui avait remarqué que les cancers très invasifs présentaient une hypervascularisation, postula alors, qu'à l'aube de son développement, une tumeur est sans connexion avec le système vasculaire préexistant. Il nomma, par conséquent, cette étape comme la phase pré-vasculaire ou avasculaire. Il affirma alors que, durant cette phase, la tumeur est confinée dans un état dit de « dormance » à moins qu'elle soit capable d'induire l'angiogenèse de manière à obtenir son propre lit vasculaire (Naumov *et al.*, 2006). En effet, les tumeurs, tout comme les tissus normaux, ont besoin d'un apport adéquat en oxygène et nutriments ainsi que de moyens efficaces pour se débarrasser de leurs déchets métaboliques (Cristofanilli, Charnsangavej et Hortobagyi, 2002). La diffusion passive de l'oxygène et des nutriments étant limitée à une distance maximale de 150  $\mu\text{m}$  du capillaire le plus près, cela restreint la croissance tumorale à quelques  $\text{mm}^3$  (Alison, 2005). Il inféra alors que la connexion vasculaire s'avère rapidement indispensable pour que la tumeur puisse continuer de croître (Bergers et Benjamin, 2003; Folkman et Shing, 1992).

Cette connexion implique une néoangiogenèse qui résulte d'un processus qui, bien loin d'être simple, implique une multitude de facteurs proangiogéniques et antiangiogéniques et dont le résultat final est déterminé par l'équilibre local qui s'établit entre ces facteurs. C'est

ce que l'on appelle le « *switch* » angiogénique. Celui-ci peut se produire à différents moments de la croissance tumorale selon le type de tumeur et de ses interactions avec son environnement (Bisacchi *et al.*, 2003).

### 1.2.3 Le « *switch* » angiogénique

Dès 1971, le Dr Folkman formulait le paradigme de l'angiogenèse tumorale et indiquait également que celle-ci était due à des substances diffusibles provenant de la tumeur (Folkman *et al.*, 1971). Il est désormais connu que de nombreux facteurs comme des facteurs de croissance, des récepteurs et des molécules de la matrice extracellulaire interviennent pour favoriser ou inhiber l'angiogenèse (Kurz, 2000). Plus d'une vingtaine de composés endogènes capables d'activer ou d'inhiber l'angiogenèse ont été identifiés; une liste non exhaustive est présentée au tableau 1.1 (Scappaticci, 2002). La croissance vasculaire se produit lorsque la balance dynamique est en faveur des stimuli positifs (Carmeliet, 2005). Il se produit alors un « *switch* » angiogénique, à proprement dit, qui est défini comme étant le passage de la phase de latence à la phase plus agressive par le déclenchement de la néovascularisation.

Lors de l'angiogenèse physiologique, les nouveaux vaisseaux sont formés, puis ils deviennent matures et stables rapidement puisque tout le processus est soigneusement régulé (Bergers et Benjamin, 2003). En revanche, en condition pathologique, comme lors de l'angiogenèse tumorale, on assiste à un déploiement aberrant des mécanismes d'angiogenèse physiologique (Papetti et Herman, 2002).

**Tableau 1.1 : Facteurs pro et antiangiogéniques endogènes**

Stimulateurs	Inhibiteurs
VEGF	Interférons $\alpha$
bFGF	Interférons $\beta$
aFGF	Angiostatine
PIGF	Endostatine
TGF- $\alpha$	Vasostatine
TGF- $\beta$	Canstatine
TNF- $\alpha$	Tumstatine
PDGF	VEGI
HGF	Facteur plaquettaire-4
PD-ECGF	Thrombospondine-1
Angiogénine	IL-12
IL-3	Fragment de 16 kDa de la prolactine
IL-8	PEDF
Proliférine	2-méthoxyestradiol
Pléiotrophine	Fragment de 53 kDa antithrombine III
Follistatine	Fragments 1 et 2 de prothrombine
Midkine	Vasculostatine
Leptine	Restine
G-CSF	Maspine
Angiopoïétine-1	SPARC
	IL-18
	IP-10
	TIMPs

**Abréviations :** aFGF, facteur de croissance acide des fibroblastes; bFGF, facteur de croissance basique des fibroblastes; G-CSF, facteur stimulant la formation de colonies de granulocytes; HGF, facteur de croissance des hépatocytes; IL; Interleukine; IP-10, protéine inductible par l'interféron; PD-ECGF, facteur de croissance des cellules endothéliales dérivé des plaquettes; PDGF, facteur de croissance dérivé des plaquettes; PEDF, facteur dérivé de l'épithélium pigmentaire; PIGF, facteur de croissance placentaire; SPARC, *secreted protein acidic and rich in cysteine*; TGF- $\alpha$ , facteur de croissance tumoral alpha; TGF- $\beta$ , facteur de croissance tumoral bêta; TIMPs, Inhibiteurs tissulaires des métalloprotéases matricielles; TNF- $\alpha$ , facteur nécrosant des tumeurs alpha; VEGF, facteur de croissance de l'endothélium vasculaire; VEGI, inhibiteur de croissance de l'endothélium vasculaire.

D'après Scappaticci, 2002.



## ***1.2.4 Les étapes de l'angiogenèse tumorale***

### ***1.2.4.1 Survol***

Il a été démontré précédemment qu'en l'absence d'un réseau sanguin fonctionnel, la croissance des tissus, qu'ils soient normaux ou tumoraux, est limitée par la capacité de l'oxygène à diffuser des vaisseaux sanguins vers les cellules (Brahimi-Horn et Pouyssegur, 2006).

Lors de la carcinogenèse, la prolifération anarchique et rapide des cellules tumorales entraîne l'apparition de régions hypoxiques et nécrotiques au centre de la tumeur. L'hypoxie est alors détectée au niveau cellulaire par un mécanisme complexe de réactions sensibles à la baisse d'oxygène. Dans le but d'augmenter le débit sanguin vers les tissus privés d'oxygène, ce mécanisme déclenche l'activation de voies moléculaires, sous la dépendance des protéines de la famille HIF (facteur induit par l'hypoxie), qui stimulent l'expression d'une multitude de gènes, dont ceux qui induisent la sécrétion du facteur de croissance vasculaire endothélial (VEGF) (Lauzier *et al.*, 2006). Le VEGF présent dans l'environnement permettra, par la suite, une hyperperméabilité qui engendrera l'extravasation de protéases et de certaines composantes matricielles de la circulation sanguine. Les cellules endothéliales vont ensuite pouvoir proliférer et migrer sur la nouvelle matrice remodelée pour former un nouveau réseau vasculaire (Papetti et Herman, 2002).

### ***1.2.4.2 Revue simplifiée des différentes étapes***

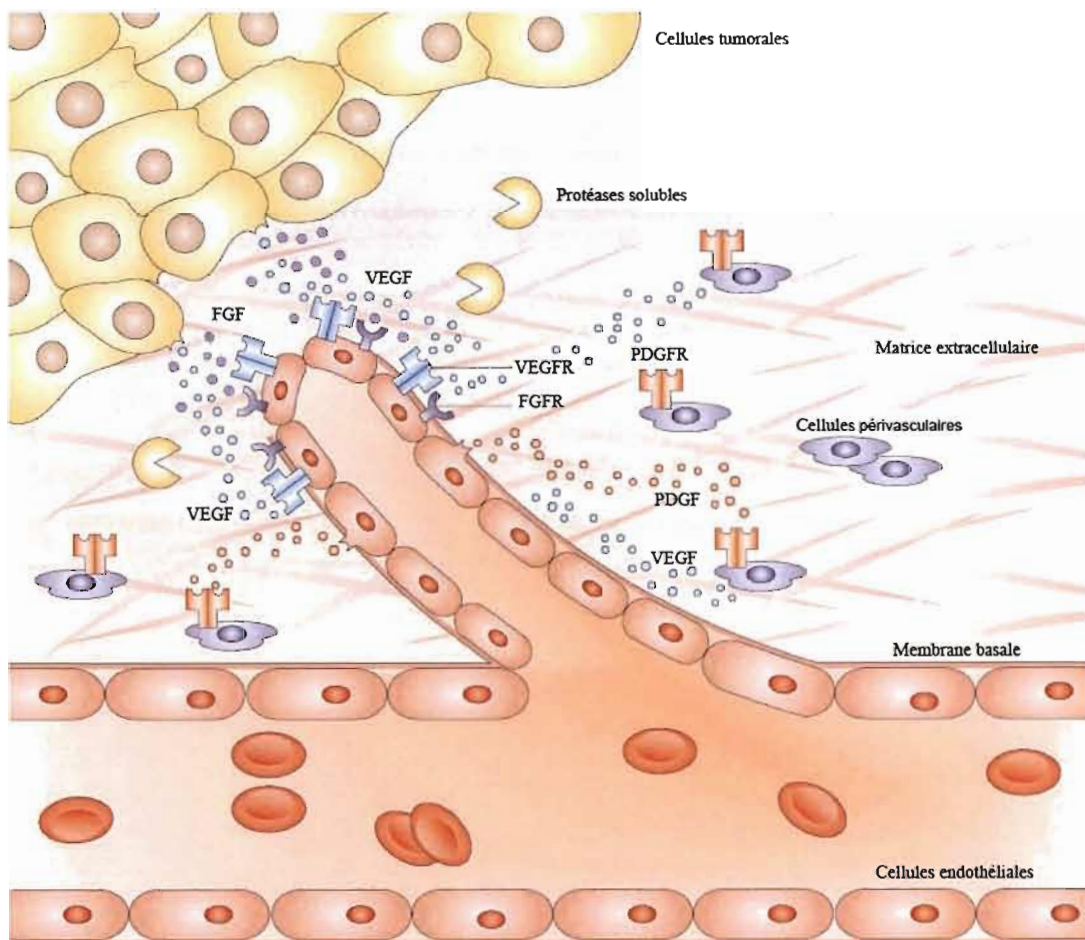
Bien que l'hypoxie au sein de la tumeur soit un des facteurs essentiels responsables de l'activation de l'angiogenèse tumorale, il ne faut pas oublier que celle-ci résulte de la coordination de nombreux processus.

D'abord, les cellules tumorales sécrètent de l'angiopoïétine-2 (Ang2) (voir sect. 1.3) qui permet aux cellules endothéliales de passer d'un état de quiescence à un état de prolifération.

En effet, chez l'adulte, les cellules endothéliales qui forment les vaisseaux sanguins sont remarquablement quiescentes avec un taux de renouvellement d'environ 1000 jours. Or, durant l'angiogenèse tumorale, celui-ci peut diminuer jusqu'à aussi peu que 5 jours (Alison, 2005). De plus, l'angiopoïétine-2 déstabilise la structure des capillaires pour permettre aux cellules endothéliales de migrer plus facilement et de répondre aux facteurs angiogéniques relargués par les cellules tumorales (Vandenbunder, 2000). Ces dernières relâchent des facteurs proangiogéniques, tels que le VEGF ou le FGF (facteur de croissance des fibroblastes, qui vont diffuser dans les tissus environnants pour aller se lier à leurs récepteurs respectifs situés sur les cellules endothéliales d'un capillaire à proximité. Ceci aura pour effet « d'activer » les cellules endothéliales (voir fig. 1.3) (Cristofanilli, Charnsangavej et Hortobagyi, 2002).

Ces interactions entre les cellules tumorales et les cellules endothéliales du vaisseau mènent à la sécrétion et à l'activation de plusieurs enzymes protéolytiques appelées protéases solubles. Parmi celles-ci, on retrouve les MMPs, c'est-à-dire les métalloprotéases de la matrice extracellulaire. Ces enzymes vont dégrader la matrice extracellulaire (MEC) et la membrane basale pour permettre aux cellules endothéliales vasculaires, qui ont récemment été activées, de proliférer et de migrer en direction de la tumeur. Ce processus se nomme « bourgeonnement ». Durant ce dernier, la forme des cellules endothéliales change pour faire place à un phénotype beaucoup plus allongé. Les cellules commencent alors à exprimer des molécules de surface qui leur permettent de migrer le long de la MEC (Alison, 2005).

Les cellules endothéliales vont ensuite, à leur tour, sécréter des facteurs de croissance, tels que le PDGF (facteur de croissance dérivé des plaquettes) dans le but d'attirer des cellules périavasculaires. Ces cellules sont dites « murales » ou « de support » parce qu'elles stabilisent les vaisseaux en inhibant la prolifération et la migration endothéliale et en stimulant la production de matrice extracellulaire. Par ailleurs, ce sont elles qui protègent la structure endothéliale de la rupture ou encore de la régression (Jain, 2003).



**Figure 1.3 : Revue simplifiée des étapes clés de l'angiogenèse tumorale.**

Illustration modifiée tirée de : Cristofanilli, Charnsangavej et Hortobagyi, 2002.

En effet, bien que les cellules endothéliales forment le nouveau vaisseau, celui-ci va demeurer fragile tant qu'il ne sera pas stabilisé par des cellules dites de support, soit les cellules périsvasculaires. Le recrutement de ces cellules complète la maturation des vaisseaux et du coup le processus d'angiogenèse. Les cellules endothéliales qui forment le nouveau vaisseau retrouvent alors leur état de quiescence (Li, Zhang et Zhao, 2007).

### 1.3 LES DIFFÉRENTS ACTEURS DU PROCESSUS D'ANGIOGENÈSE TUMORALE

Les récents progrès dans la compréhension des bases de la progression tumorale ont conduit à l'identification et la caractérisation de nombreux acteurs moléculaires du processus angiogénique. Les cellules tumorales sécrètent divers médiateurs dont des facteurs de croissance qui activent les cellules endothéliales et périvasculaires et favorisent la formation de néovaisseaux sanguins, parmi lesquels on retrouve l'angiopoïétine, le FGF, le VEGF, qui demeure l'élément clé et indispensable et le PDGF qui est essentiel à la maturation vasculaire. L'angiogenèse est régulée par un équilibre fin et complexe entre ces divers facteurs pro et antiangiogéniques.

#### 1.3.1 L'angiopoïétine

Récemment, deux membres de la famille des angiopoïétines ont été découverts et ont démontré une activité régulatrice importante de l'angiogenèse (Davis *et al.*, 1996; Maisonpierre *et al.*, 1997). Il s'agit de l'angiopoïétine 1 (Ang1) et 2 (Ang2) qui présentent un degré d'homologie de 60 % et ont le même récepteur, soit le Tie-2 (*tyrosine kinase with immunoglobulin and epidermal growth factor homology domains 2*) (Bach, Uddin et Burke, 2007).

En bref, l'angiopoïétine-1 augmente la vascularisation et diminue la perméabilité vasculaire. Elle exerce également des effets spécifiques sur les cellules endothéliales, c'est-à-dire qu'elle favorise leur différenciation, qu'elle est capable d'induire une réponse chimiotactique et qu'elle constitue un facteur de survie antiapoptotique. L'Ang1 maintient l'intégrité et la quiescence de l'endothélium (Vandembunder, 2000).

L'angiopoïétine-2, quant à elle, est un antagoniste naturel de l'angiopoïétine-1 qui empêche l'activation de Tie-2 induite par Ang1. Or, l'angiopoïétine-2 peut potentialiser le VEGF pour induire l'angiogenèse, mais il n'est pas capable à lui seul d'induire une angiogenèse. Par contre, en l'absence de VEGF, l'inhibition de l'activité de l'Ang1 par l'Ang2 conduit à un détachement des cellules endothéliales de la matrice et des cellules

périvasculaires, à leur mort et à la régression des vaisseaux. Il a été démontré récemment que l'Ang2 était exprimée au niveau du front d'invasion des néovaisseaux dans certaines tumeurs (Ergun *et al.*, 2006; Plank, Sleeman et Jones, 2004).

### 1.3.2 Le FGF

Cette famille de facteurs de croissance comprend au moins neuf polypeptides, dont les facteurs de croissance acide (aFGF) et basique (bFGF) des fibroblastes qui sont les membres les mieux caractérisés. L'aFGF et bFGF sont reconnus pour leur capacité à induire l'angiogenèse et ce, dans tous les types d'essai *in vivo* et c'est d'ailleurs pourquoi ils sont fréquemment utilisés à titre de témoin positif dans ces essais. Ces deux polypeptides ne possèdent pas la séquence signal nécessaire à la sécrétion extracellulaire. Cependant, *in vivo*, le relargage de l'aFGF ou du bFGF peut avoir lieu à partir de cellules nécrotiques ou lors de la dégradation de la matrice extracellulaire, comme c'est le cas durant le processus d'angiogenèse tumorale (Ornitz et Itoh, 2001). En effet, puisque le FGF possède la capacité de se lier à l'héparine, grâce à un domaine spécifique, il est « entreposé » dans la matrice extracellulaire, puis relâché durant le processus d'angiogenèse par les protéases solubles qui dégradent la matrice.

À ce jour, cinq récepteurs de haute affinité ont été identifiés et chacun d'entre eux peut fixer différents FGF. De plus, les membres de la famille des FGFs peuvent se fixer, eux aussi, à plusieurs récepteurs. Cette fixation du FGF à son récepteur stimule une activité tyrosine kinase qui mène à la phosphorylation des phospholipases C et à l'expression des gènes qui modulent le cycle cellulaire (Groth et Lardelli, 2002).

Le bFGF est un polypeptide qui existe sous quatre isoformes différentes produites à partir d'un seul gène. L'isoforme de 18 kDa possède une activité biologique pouvant induire l'angiogenèse *in vivo* et elle est produite par de nombreuses cellules normales, notamment les cellules endothéliales et périvasculaires, et tumorales. En effet, le bFGF est reconnu pour sa capacité à induire la prolifération des cellules endothéliales et leur migration. De plus, il a été démontré qu'il possède un effet synergique avec le VEGF dans l'induction de la

différenciation endothéliale et dans l'induction de l'angiogenèse *in vivo* (Cross et Claesson-Welsh, 2001).

### 1.3.3 *Le VEGF*

Parmi les régulateurs les plus importants de l'angiogenèse figure le VEGF. À l'origine, il a été défini comme un facteur de perméabilité vasculaire (VPF) exerçant une action 50 000 fois plus puissante que celle de l'histamine (Byrne, Bouchier-Hayes et Harmey, 2005).

Le VEGF appartient à une famille composée de 6 membres : VEGF-A, -B, -C, -D, -E et le PlGF (facteur de croissance placentaire). Les VEGFs lient trois types de récepteurs à domaine tyrosine kinase : les VEGFR1 (Flt1), VEGFR2 (Flk1) aussi appelé KDR (*kinase insert domain-containing receptor*) et VEGFR3 (Flt3) (Shibuya et Claesson-Welsh, 2006). Parmi ceux-ci le VEGF-A lie spécifiquement le VEGFR-1 et le VEGFR-2. Le VEGF-A est la forme principale qui régule l'angiogenèse tandis que VEGF-C et son récepteur, le VEGFR-3, induisent la lymphangiogenèse. La structure du VEGF comporte un peptide signal qui lui permet d'être sécrété. Ainsi, toutes les protéines de la famille du VEGF sont sécrétées sous la forme de glycoprotéines dimériques d'approximativement 40 kDa (Hoeben *et al.*, 2004).

L'appellation VEGF est couramment utilisée pour désigner précisément le VEGF-A et on référerà, pour la suite du texte, au VEGF-A en employant cette appellation. Le VEGF est un peptide homodimérique de 46 kDa liant l'héparine, qui peut se présenter sous six isoformes (121, 145, 165, 183, 189, 206) générées par un épissage alternatif à partir d'un gène unique organisé en 8 exons et 7 introns (Carmeliet, 2005). Les propriétés décrites pour le VEGF correspondent habituellement à celles du VEGF<sub>165</sub>. Tout comme le FGF, celui-ci peut se lier à l'héparine, ce qui implique que malgré qu'il soit sécrété, une certaine quantité demeurera attachée à la matrice extracellulaire et sera relâchée par les protéases solubles.

L'expression du VEGF peut être induite par de nombreux facteurs, mais le stimulus le plus puissant demeure l'hypoxie, qui induit également l'expression de ses récepteurs. Par exemple, les cellules endothéliales de vaisseaux tumoraux peuvent exprimer les récepteurs du

VEGF, alors que les cellules endothéliales des tissus normaux ne l'expriment pas. Le VEGF est angiogénique *in vitro* et *in vivo*. Il peut induire la prolifération et la migration des cellules endothéliales et périvasculaires ainsi que la formation de tubes capillaires (Byrne, Bouchier-Hayes et Harmey, 2005). De plus, le VEGF endogène intervient dans la stabilisation et le maintien de l'homéostasie des vaisseaux à l'âge adulte (Couffinhal *et al.*, 2001; Drogat *et al.*, 2007).

Les deux récepteurs spécifiques au VEGF sont le VEGFR-1 (Flt-1) et le VEGFR-2 (Flk-1/KDR), qui sont des récepteurs à activité tyrosines kinases qui s'autophosphorylent lorsqu'ils lient leurs ligands (Olsson *et al.*, 2006). Ils sont exprimés essentiellement sur les cellules endothéliales. Le VEGFR-2 est le récepteur indispensable pour l'angiogenèse et la perméabilité vasculaire (Ferrara, 2005). De plus, tel que mentionné précédemment, l'association entre le VEGF et le bFGF résulte en une synergie qui a pour effet de potentialiser l'effet de chacun des facteurs de croissance à induire l'angiogenèse (Alison, 2005).

Bien que le VEGF soit un acteur clé dans l'initiation du processus de l'angiogenèse, celui-ci joue également d'autres rôles tous aussi cruciaux. Par exemple, il a été démontré que le VEGF est un facteur de survie cellulaire pour les cellules endothéliales (Li, Zhang et Zhao, 2007). Ce dernier est sécrété par les cellules périvasculaires pour stabiliser les vaisseaux et protéger les cellules endothéliales de l'apoptose. Une diminution de la sécrétion de VEGF peut entraîner la régression vasculaire (Reinmuth *et al.*, 2001).

#### 1.3.4 Les MMPs

L'angiogenèse tumorale est un processus qui nécessite la migration et l'invasion des cellules endothéliales et périvasculaires. De prime abord, cela nécessite une dégradation de la membrane basale et de la matrice extracellulaire pour permettre aux cellules de se déplacer. Pour parvenir à dégrader et remodeler l'environnement tumoral, de nombreuses enzymes sont nécessaires dont les activateurs du plasminogène et les MMPs (Garbisa *et al.*, 2001).

Il existe plusieurs sous-familles de MMPs formées en fonction de leur structure primaire et de leur spécificité, mais l'ensemble des MMPs constitue une famille d'enzymes ayant les caractéristiques suivantes : une structure homologue, la présence d'un ion zinc impliqué dans leur mécanisme catalytique, une synthèse et une sécrétion sous forme inactive (proMMP ou zymogène), une activation dans le milieu extracellulaire et la capacité à dégrader les composants de la matrice extracellulaire *in vivo* (Snoek-van Beurden et Von den Hoff, 2005). Actuellement, plus de 25 MMPs ont été identifiées chez les vertébrés, dont 23 chez l'humain (Visse et Nagase, 2003). Collectivement, les MMPs sont capables de dégrader toutes les composantes de la matrice extracellulaire (Vayalil et Katiyar, 2004). Les MMPs sont soumises à de nombreux processus de régulation, et leur activité est régulée par des inhibiteurs spécifiques : les inhibiteurs tissulaires des métalloprotéases (TIMPs). L'activité des MMPs dans l'espace extracellulaire dépend donc de l'équilibre entre leur inhibition et leur activation (Noel, Jost et Maquoi, 2007).

Toutes les MMPs sont constituées de plusieurs domaines homologues : un pré-domaine, nécessaire à leur acheminement intracellulaire jusqu'à la surface cellulaire, un prodomaine (propeptide), qui confère une latence à l'enzyme en occupant son site actif, ce qui rend le site catalytique inaccessible au substrat, un domaine hémapexine, un domaine catalytique, une petite région charnière qui permet de relier le domaine catalytique au domaine hémapexine. Finalement, les MMPs possèdent aussi des domaines particuliers, partagés parmi certaines d'entre elles seulement. Ces domaines structuraux additionnels, ou encore la spécificité envers les substrats, ont mené à la séparation des MMPs en diverses sous-classes.

Les gélatinases A (MMP-2) et B (MMP-9) forment la quatrième sous-classe de MMPs. Leur activité protéolytique est dirigée contre le collagène interstitiel dénaturé (gélatine) et les collagènes de type I à V ainsi que de type VII et X que l'on retrouve dans la membrane basale (Snoek-van Beurden et Von den Hoff, 2005). Les deux membres de la famille des gélatinases jouent un rôle prépondérant dans la migration des cellules endothéliales et périvasculaires lors de la cascade angiogénique. Elles peuvent aussi réguler la biodisponibilité de certains facteurs angiogéniques attachés à la matrice extracellulaire, tels le bFGF, le VEGF et le PDGF. En effet, il est reconnu que ces protéines liées à la matrice



constituent un réservoir potentiel de facteurs de croissance qui permettent d'accroître rapidement la biodisponibilité de facteurs proangiogéniques sans avoir à en augmenter l'expression génique. Les gélatinases peuvent ainsi avoir des conséquences très importantes sur le développement du cancer (Vayalil et Katiyar, 2004).

## **1.4 LE FACTEUR DE CROISSANCE DÉRIVÉ DES PLAQUETTES**

### ***1.4.1 Historique de sa découverte***

La découverte du PDGF n'a pas été fortuite. En effet, au début des années 70, Samuel Balk (1971) avait constaté que bien qu'il soit possible de faire croître des cellules en culture en présence de milieu contenant du sérum, il ne l'était pas si l'on n'employait que du plasma. Il en déduit donc que les facteurs de croissance nécessaires à la culture cellulaire étaient produits par les plaquettes. Plusieurs autres études ont, par la suite, montré que le facteur nécessaire à la croissance de plusieurs types cellulaires, notamment les fibroblastes et les cellules musculaires, était dérivé des plaquettes. Conséquemment, ce facteur de croissance fut nommé facteur de croissance dérivé des plaquettes (Betsholtz, 2003). Le PDGF était alors l'un des premiers facteurs de croissance à être caractérisé, et il a donc ensuite servi de modèle d'étude pour plusieurs autres facteurs.

### ***1.4.2 Structure et fonction***

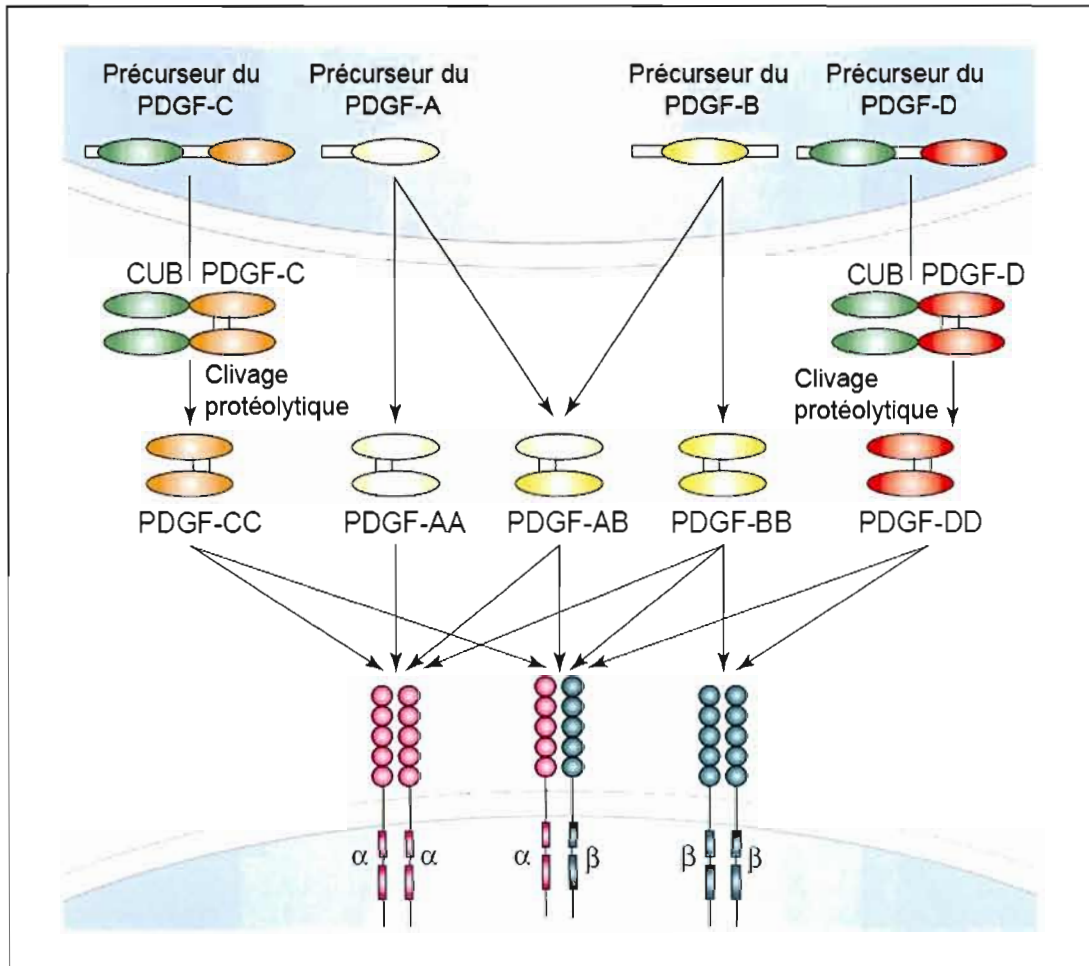
Le PDGF et son récepteur ont été découverts et isolés il y a 30 ans et, bien que de nouveaux membres continuent d'être identifiés, la famille des PDGFs compte à ce jour cinq membres connus. Les PDGFs appartiennent à une famille structurale beaucoup plus grande, soit la famille des facteurs de croissance vasculaires endothéliaux, dont fait également partie le VEGF (Mariani *et al.*, 2002).

Les PDGFs sont formés à partir de quatre chaînes polypeptidiques qui contiennent des ponts disulfure intrachânes : les chaînes PDGF -A, -B, -C et -D. Ces chaînes sont codées par

quatre gènes différents situés sur quatre chromosomes distincts. Les gènes codant pour les chaînes PDGF-A et -B sont situés sur les chromosomes 7 et 22, alors que ceux codant pour les chaînes PDGF-C et -D sont situés sur les chromosomes 4 et 11, respectivement (Fredriksson, Li et Eriksson, 2004). On réfère aux chaînes PDGF-A et -B en tant que chaînes « classiques » puisqu'elles ont été découvertes les premières, alors que les chaînes PDGF-C et -D ne l'ont été que récemment et sont, par conséquent, moins caractérisées.

Bien que la plupart des types cellulaires exprimant le PDGF présentent à la fois des chaînes PDGF-A et PDGF-B, leur expression est indépendamment régulée tant au niveau traductionnel que post-traductionnel (Fredriksson, Li et Eriksson, 2004). Les chaînes PDGF-A et -B sont synthétisées sous forme de précurseurs polypeptidiques de 196 ou 211 acides aminés, pour la chaîne PDGF-A, et de 241 acides aminés pour la chaîne PDGF-B, générées par un épissage alternatif. Elles subissent ensuite une transformation protéolytique, à leur extrémité N-terminale pour la chaîne PDGF-A, et aux extrémités C- et N- terminales pour la chaîne PDGF-B. Les chaînes PDGF-C et -D ont une longueur respective de 345 et 370 acides aminés et elles présentent un domaine supplémentaire à leur extrémité N-terminale. La protéolyse de ce domaine n'est pas nécessaire à leur sécrétion, mais elle demeure essentielle à leur association aux récepteurs (Mariani et al, 2002). Les quatre chaînes possèdent toutes un domaine commun hautement conservé à travers l'évolution, appelé domaine « facteur de croissance », de 100 acides aminés, que l'on retrouve même chez les drosophiles et les serpents (Fredriksson, Li et Eriksson, 2004). Ce domaine est également présent chez le VEGF. Finalement, les séquences d'acides aminés situées dans les portions N- et C-terminales des différentes chaînes sont impliquées dans la régulation de leurs propriétés biologiques et dans leur capacité à se lier à la MEC. Comme c'était le cas pour le FGF et le VEGF, la biodisponibilité *in vivo* du PDGF peut donc également être régulée par la présence des protéases solubles qui libèrent le PDGF attaché à la MEC (Armulik, Abramsson et Betsholtz, 2005).

Ces chaînes sont assemblées entre elles, à l'aide de ponts disulfures, de manière à former cinq isoformes homo ou hétérodimériques : PDGF-AA, -BB, -CC, -DD, -AB (voir fig. 1.4). Toutes les isoformes sont produites de manière endogène dans les cellules.



**Figure 1.4 : Représentation des récepteurs au PDGF et de leurs ligands.**

Le PDGF existe sous forme de dimère formé par différentes combinaisons, c'est-à-dire, AA, BB, AB, CC et DD, qui peuvent se lier aux récepteurs à activité tyrosine kinase, PDGFR- $\alpha\alpha$ , - $\alpha\beta$ , - $\beta\beta$ , avec une affinité et une spécificité différentes. Abréviations : CUB, *domain found in complement subcomponents C1r/C1s, urchin epidermal growth factor-like protein and bone morphogenetic protein 1*.

Illustration modifiée tirée de : Mariani *et al.*, 2002.

### 1.4.3 Les récepteurs du PDGF

Il existe 3 récepteurs spécifiques au PDGF, soit : le PDGFR- $\alpha\alpha$ , le PDGFR- $\beta\beta$  et le PDGFR- $\alpha\beta$ . Tous les isoformes du PDGF, à l'exception de PDGF-DD, sont capables de lier de manière spécifique le PDGFR- $\alpha\alpha$ , alors que seuls les isoformes PDGF-BB et PDGF-DD

peuvent se lier au PDGFR- $\beta\beta$ . Finalement, tous les isoformes du PDGF, à l'exception du PDGF-AA, sont capables de se lier au PDGFR- $\alpha\beta$  (voir fig. 1.4).

Les trois récepteurs au PDGF sont des récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK). On réfère normalement au PDGFR- $\alpha\alpha$  en tant que PDGFR- $\alpha$ , celui-ci joue un rôle de premier plan dans le développement neuronal, alors que le PDGFR- $\beta\beta$ , appelé PDGFR- $\beta$ , joue un rôle primordial dans le recrutement des cellules périvasculaires (Tallquist, French et Soriano, 2003).

L'activité des récepteurs au PDGF est très soigneusement régulée. Leur expression l'est également, et ce, tant au niveau transcriptionnel qu'au niveau protéique. Considérant la complexité des cascades de signalisation ainsi que les nombreuses connexions entre les différentes voies, il est évident que la dérégulation de l'activité ou de l'expression du système PDGF/PDGFR peut avoir de graves conséquences sur une multitude de processus biologiques. À cet égard, une corrélation a été démontrée entre la suractivité du système PDGF/PDGFR et de nombreuses maladies, incluant l'athérosclérose, l'inflammation chronique et le cancer (Heldin, 2004). De plus, des études ont tenté d'exploiter cet équilibre fragile et ont montré qu'une surexpression du PDGF dans une tumeur peut résulter en la dissociation des vSMC, soit des cellules musculaires lisses vasculaires, des vaisseaux sanguins et en une diminution de leur recrutement à venir stabiliser les vaisseaux (Nissen *et al.*, 2007).

#### **1.4.4 Son rôle**

Le système PDGF/PDGFR est impliqué dans de nombreux processus physiologiques. En effet, il est nécessaire à la formation des alvéoles dans les poumons, au développement des follicules pileux des cheveux et à la formation des villosités dans les intestins (Pietras *et al.*, 2003). Il n'en demeure pas moins que la régulation et le contrôle de la formation des vaisseaux sanguins ainsi que la stabilisation de ces derniers constituent, sans contredit, les fonctions les plus importantes du PDGF.

En effet, le PDGF est un facteur angiogénique essentiel à la formation de vaisseaux sanguins normaux puisqu'il recrute les cellules périvasculaires, soit des cellules musculaires lisses vasculaires, nécessaires à la stabilisation (Li et al., 2003). À cet égard, des études réalisées à l'aide de souris génétiquement modifiées ont montré que l'inactivation des gènes codant pour le PDGF ou pour son récepteur était létale pour l'animal, puisque le réseau vasculaire ne pouvait être stabilisé par les cellules périvasculaires, ce qui donnait lieu à de nombreuses hémorragies (Lindahl *et al.*, 1997). Le PDGF-BB et le récepteur PDGFR- $\beta$  sont impliqués dans le recrutement des cellules périvasculaires aux capillaires. D'ailleurs, ils sont exprimés principalement durant le développement vasculaire. Le PDGF-BB est produit par les cellules endothéliales, alors que le PDGFR est exprimé par les cellules périvasculaires. (Hellstrom *et al.*, 1999). Le PDGF-BB est considéré comme un agent mitogène et chimioattractant pour ces cellules.

Le PDGF joue également un rôle essentiel dans la croissance et la survie cellulaire. Il peut aussi induire la prolifération de cellules tumorales par une stimulation autocrine (Pietras *et al.*, 2003). De plus, il peut stimuler la synthèse du collagène et la production de matrice extracellulaire. En plus d'être produit par les plaquettes, le PDGF peut être produit par plusieurs types cellulaires, notamment les cellules endothéliales, les fibroblastes et les macrophages.

Les vaisseaux tumoraux sont constamment exposés à une multitude de facteurs de croissance. Les interactions complexes entre ces derniers influencent la croissance vasculaire. Tout comme pour le VEGF, il a été démontré que le PDGF-BB et le FGF-2 interagissaient de manière synergique pour promouvoir l'angiogenèse. Le FGF-2 augmente significativement la réponse au PDGF-BB à induire l'angiogenèse tumorale alors que le PDGF-BB augmente les effets du FGF-2 sur les vSMC. Le PDGF-BB et le FGF-2 sont fréquemment fortement exprimés dans les tissus tumoraux (Nissen *et al.*, 2007).

Ces nombreuses fonctions font du PDGF une cible intéressante dans le traitement du cancer (Ostman, 2004; Pietras *et al.*, 2003). D'ailleurs, des inhibiteurs spécifiques de

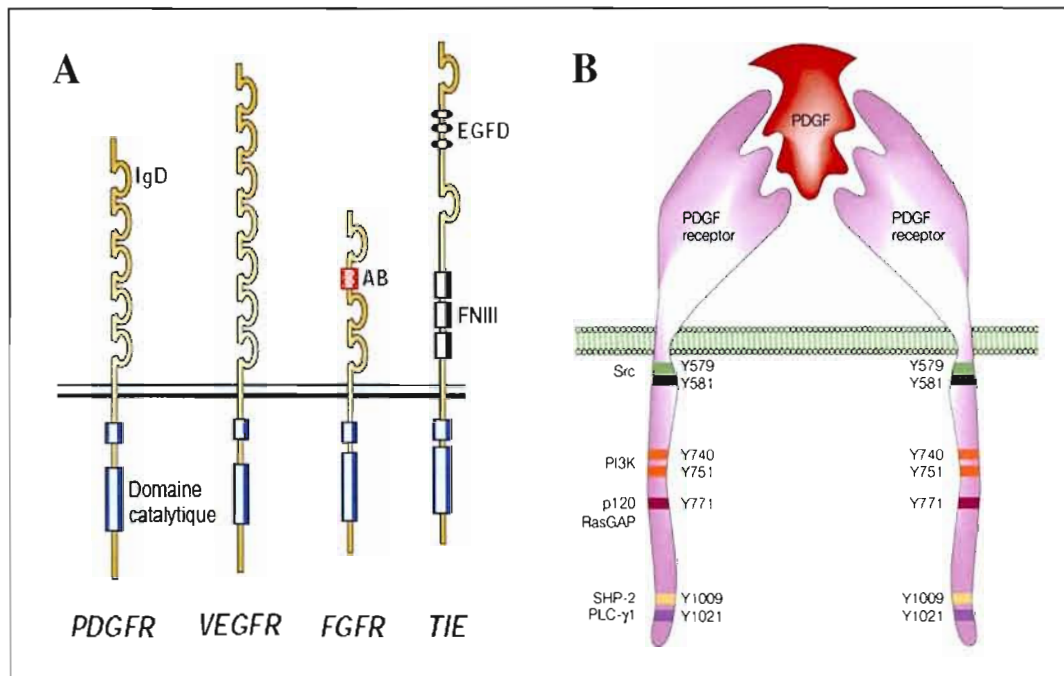
l'activité tyrosine kinase du PDGFR, tel le SU6668, ont montré des propriétés antiangiogéniques et antitumorales sur un modèle animal. En effet, il a été démontré que l'inhibition de l'activation du PDGFR induit le détachement des cellules périvasculaires situées sur les vaisseaux sanguins tumoraux, menant ainsi à la destruction de ce réseau vasculaire et, par conséquent, à l'arrêt de la progression et de la croissance de tumeurs de stade avancé (Bergers *et al.*, 2003). D'autres études abondent dans le même sens, par exemple, une étude réalisée par Roberts et ses collaborateurs (2005) a mis en évidence que l'inhibition du PDGFR, par un inhibiteur hautement spécifique, le CP-673/451, provoque l'inhibition de l'angiogenèse et, de ce fait, bloque la croissance tumorale. Cette étude a ainsi confirmé que l'action antitumorale de cet inhibiteur spécifique du PDGFR est due à ses propriétés antiangiogéniques.

#### ***1.4.5 Signalisation du PDGF/PDGFR***

Les récepteurs au PDGF appartiennent tous à la famille des récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK). La famille des RTK est très diversifiée et comprend plus de 58 glycoprotéines transmembranaires qui ont toutes un domaine C-terminal cytoplasmique ayant une activité de protéine tyrosine kinase (PTK) (voir fig. 1.5 A). Bien que la grande majorité des résidus d'acide aminé phosphorylés par les protéines kinases soient des résidus sérine ou thréonine, il n'en demeure pas moins que la phosphorylation sur les résidus tyrosine par les PTK soit d'une importance capitale dans la régulation d'un grand nombre de processus cellulaires essentiels, y compris le processus de recrutement des cellules périvasculaires par le PDGF. Les PTK catalysent la phosphorylation de leurs protéines cibles sur des résidus tyrosines spécifiques en utilisant l'ATP comme donneur de phosphate (Blume-Jensen et Hunter, 2001).

Tous les RTK comprennent un domaine extracellulaire contenant un site de fixation au ligand et une région transmembranaire hydrophobe qui a pour fonction d'ancrer les récepteurs à la membrane. La plupart des RTK sont monomériques, et la réaction du domaine extracellulaire avec le ligand induit la dimérisation du récepteur. Les ligands de certains RTK étant dimériques, comme le PDGF, ils peuvent dimériser directement les récepteurs monomériques, alors que d'autres RTK, comme le récepteur à l'insuline, sont, en absence

d'hormone, des dimères unis par des ponts disulfure; ce type de RTK est activé par un changement de conformation induit par l'interaction avec le ligand. Quelles que soient les modalités de la fixation du ligand ou de la dimérisation du récepteur l'étape suivante est commune à tous les RTK et consiste en l'activation du récepteur (Blume-Jensen et Hunter, 2001).



**Figure 1.5 : Représentations de certains RTK et des tyrosines phosphorylables de la portion cytoplasmique du PDGFR.** (A) Représentations de certains récepteurs à tyrosine kinase impliqués dans l'angiogenèse. Chacun de ces récepteurs contient un domaine catalytique à activité tyrosine kinase. Abréviations : AB, région acide (*acidic box*); EGFD, domaine similaire à l'EGF (Facteur de croissance épidermal); FGFR, récepteur au facteur de croissance des fibroblastes; FNIII, Fibronectine III; IgD, domaine similaire aux immunoglobulines; PDGFR, récepteur au facteur de croissance dérivé des plaquettes, Tie, *Tyrosine kinase with immunoglobulin and epidermal growth factor homology domains*; VEGF, récepteur au facteur de croissance de l'endothélium vasculaire.

(B) Schéma des tyrosines phosphorylables dans la queue cytoplasmique du PDGFR. Abréviations : PI3K, *phosphatidylinositol 3-kinase*; Y, résidu tyrosine.

Illustration modifiée tirée de : (A) Blume-Jensen et Hunter, 2001; (B) Yaffe, 2002.

Comme pour la plupart des récepteurs à activité tyrosine kinase, la dimérisation des PDGFR induit leur autophosphorylation et l'activation subséquente de nombreuses molécules intracellulaires impliquées dans différentes cascades de signalisation. Le PDGFR s'autophosphoryle sur 14 résidus tyrosines lorsqu'il lie son ligand (voir fig. 1.5 B). Les résidus phosphotyrosines interagissent alors avec des protéines adaptatrices, possédant un domaine SH2 comme la PI3K, la PLC- $\gamma$  (Phospholipase C $\gamma$ ), les SFK (kinases de la famille de Src), les molécules adaptatrices Grb2 (Protéines associées aux récepteurs du facteur de croissance-2) et Sos (*son of sevenless*), la phosphatase SHP-2 et les molécules de la famille de Stat (transducteurs de signal et activateur de la transcription) (voir fig. 1.6). Ces molécules sont des petites protéines qui contiennent des domaines SH2, PTB (domaine de liaison aux phosphotyrosines) ou SH3, mais qui sont dépourvues d'activité enzymatique intrinsèque ou de signalisation (Yaffe, 2002). Ces protéines connectent les RTK activés à d'autres composantes des voies de transduction qui, ultimement, vont activer, directement ou indirectement, des kinases situées en aval dans la cascade moléculaire. Ces kinases vont à leur tour induire l'activation de certains facteurs de transcription qui vont initier la transcription de gènes impliqués dans l'apoptose, la motilité, la prolifération ou encore la survie cellulaire (Mariani *et al.*, 2002). À cet effet, les voies des protéines kinases activatrices des voies mitogéniques (MAPK) et de la protéine Akt constituent des voies principales de transmission des signaux induits par les facteurs de croissance.



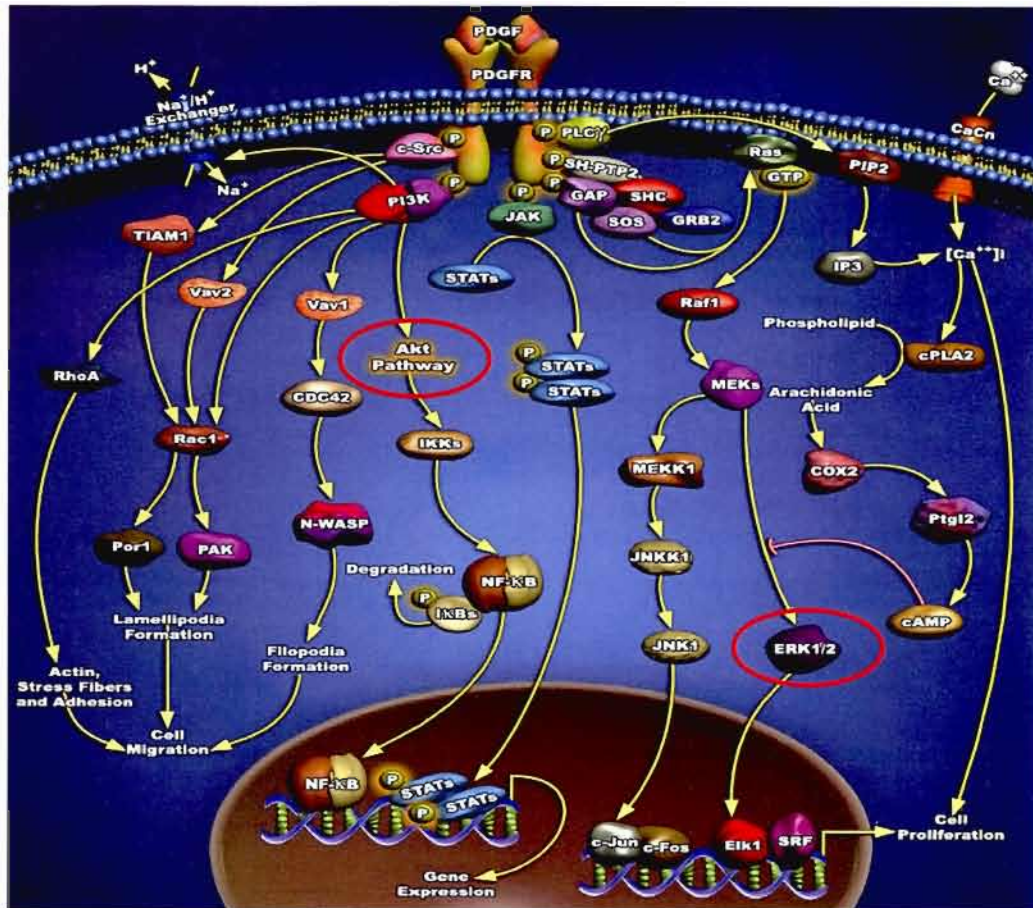


Figure 1.6 : Vue d'ensemble sur la signalisation cellulaire induite suite à l'activation du PDGFR par son ligand.

Source : GeneAssist™ Pathway Atlas provenant de Applied Biosystems.

#### 1.4.5.1 La voie des protéines kinases activatrices des voies mitogéniques (MAPK)

La voie des MAP kinases a pour fonction de coordonner la régulation de diverses activités cellulaires, telles que la division, la survie, la motilité, le métabolisme et la différenciation cellulaire, l'apoptose et l'expression génique. Ces processus biologiques, s'ils ne sont pas contrôlés de façon appropriée, peuvent contribuer au développement de nombreux types de cancer. Les groupes de MAPK les plus étudiés sont ERK (protéine kinase régulatrice des signaux extracellulaire), JNK (*c jun aminoterminal kinase*) et p38 kinase. Les

MAPK sont activées par une grande variété de stimuli différents, mais, de manière générale, ERK1 et ERK2 sont celles qui sont préférentiellement activées en réponse aux facteurs de croissance, comme dans le système PDGF/PDGFR.

Brièvement, après l'activation des récepteurs, il y a recrutement par la phosphatase SHP-2 des protéines adaptatrices Grb2, Sos et GAP (protéine activatrice de la GTPase) qui vont mener à l'activation de la protéine Ras, qui, ultimement, par l'action du module « Ras-Raf-MEK 1/2 » qui consiste en une cascade des activités de phosphorylation, va conduire à l'activation de la protéine ERK. Cette dernière, migre dans le noyau cellulaire, phosphoryle alors les facteurs de transcription qui activent la transcription de l'ensemble des gènes responsables de la réplication de l'ADN et de la mise en route du cycle cellulaire, d'où son action mitogénique (voir fig. 1.6).

Or, la protéine ERK est également connue pour son rôle dans la migration cellulaire. En effet, de nombreux substrats de la protéine ERK sont impliqués dans ce processus cellulaire. Parmi ceux-ci, on retrouve les protéines FAK (kinase d'adhésion focale) et Paxillin, la MLCK (kinase de la chaîne légère de la myosine), qui est impliquée dans les complexes d'adhésion focale et dans l'organisation des protrusions membranaires au front de migration, et, finalement, les calpaïnes qui sont des enzymes protéolytiques impliquées dans la migration. De plus, ERK peut également inhiber la capacité des intégrines à se lier à leurs ligands situés dans la matrice extracellulaire. En somme, la coordination de tous ces processus par la protéine ERK fait de cette dernière une protéine « pivot » dans la régulation de la migration cellulaire (Huang, Jacobson et Schaller, 2004).

#### *1.4.5.2 La voie de la protéine kinase B (PKB/Akt)*

Les voies de signalisation permettent à la cellule de réagir aux modifications de son environnement et, en particulier, aux différents signaux extracellulaires. Ces signaux participent notamment à l'équilibre entre la survie et la mort cellulaire (Alison, 2005). La perte de cet équilibre peut être liée à une anomalie d'une ou de plusieurs voies de

signalisation. Parmi celles-ci, on retrouve la voie de signalisation de la protéine kinase B (PKB), aussi connue sous le nom d'Akt. Cette voie joue un rôle prépondérant dans la progression tumorale puisqu'elle possède un large éventail d'effecteurs impliqués dans la régulation de plusieurs processus essentiels à la croissance tumorale (Cheng *et al.*, 2005b).

En effet, suite à l'activation du PDGFR, il y a recrutement de la PI3K qui interagit directement ou indirectement avec le récepteur via des protéines adaptatrices, comme la protéine Ras. L'activation de la PI3K entraîne une activation de la PDK1 (protéine kinase I dépendante du 3-phosphoinositide) qui, elle-même, provoque la phosphorylation de la protéine Akt. Il existe plus de 100 substrats connus pour cette protéine ce qui implique qu'elle est responsable de l'activation de différents modulateurs ayant des rôles dans la régulation du cycle cellulaire, de la prolifération, de l'apoptose ou de la survie cellulaire, du métabolisme et de l'angiogenèse (Kim *et al.*, 2005a; Manning et Cantley, 2007). Il a d'ailleurs déjà été démontré que certaines tumeurs dépendent de la signalisation induite par Akt pour leur survie et leur croissance, et que l'inhibition de cette signalisation peut induire l'apoptose et la régression tumorale. Par conséquent, l'inhibition de la signalisation d'Akt constitue une cible de choix dans la recherche de médicaments visant à contrer le cancer (Bellacosa *et al.*, 2005).

De plus, il est important de noter que la protéine Akt se situe au carrefour de nombreux réseaux de signalisation induits par différentes cytokines, différents facteurs de croissance ou facteurs angiogéniques, ce qui a pour effet de lui conférer divers autres rôles. Parmi ceux-ci, on retrouve un rôle dans la migration cellulaire (Kim *et al.*, 2005a; Manning et Cantley, 2007), dans la stimulation de la vasodilatation des vaisseaux sanguins (Morbidelli, Donnini et Ziche, 2003), dans le remodelage vasculaire et finalement, un rôle dans l'induction de la sécrétion de plusieurs facteurs de croissance par son action sur la transcription des gènes codant pour le HIF (Semenza, 2003).

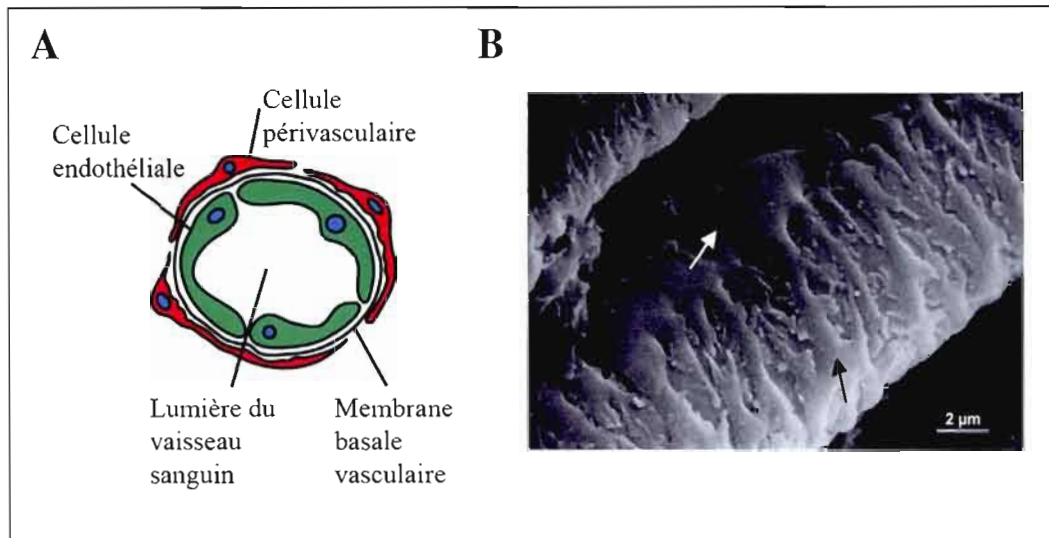
## 1.5 LES CELLULES PÉRIVASCULAIRES

Charles Rouget, en 1873, fut le premier à décrire la présence de cellules périvasculaires adjacentes aux capillaires; il les nomma alors cellules de Rougets (Hall, 2006). Par la suite, en 1923, le terme péricyte (*peri*, autour de; *cyte*, cellule) a été introduit dans la littérature par Zimmerman (Allt et Lawrenson, 2001). Plus récemment, les termes cellules « murales », cellules de « support », cellules musculaires lisses vasculaires (vSMC), cellules périvasculaires et péricytes ont tous été employés pour décrire ou définir les cellules qui forment un contact intime avec les cellules endothéliales vasculaires afin de supporter les microvaisseaux (Bergers et Song, 2005).

### 1.5.1 Identité et identification des cellules périvasculaires

Les cellules périvasculaires sont dérivées de cellules précurseurs mésenchymateuses possédant les marqueurs cellulaires Flk-1<sup>+</sup> et VEGFR-2<sup>+</sup> et ayant la capacité de se différencier en vSMC s'il y a présence dans l'environnement cellulaire de PDGF (Hall, 2006; Yamashita *et al.*, 2000).

Jusqu'à présent, plusieurs marqueurs moléculaires permettant d'identifier les cellules périvasculaires ont été décrits, mais aucun d'entre eux ne permet une identification positive sans aucune ambiguïté (Gerhardt et Betsholtz, 2003). On retrouve parmi ceux-ci l' $\alpha$ -SMA ( $\alpha$ -actine musculaire lisse), qui constitue l'une des six isoformes des protéines d'actines normalement exprimées dans les cellules de lignée musculaire lisse, la desmine, un filament intermédiaire de classe III spécifique aux cellules musculaires, le PDGFR- $\beta$ , l'aminopeptidase A et N et le régulateur de la signalisation par la protéine-G 5 (RGS5). Il est à noter que l'expression de ces différents marqueurs est dynamique. Par conséquent, elle peut varier dans le temps selon le stade de développement ainsi qu'entre les différents organes et tissus, rendant l'utilisation de ces marqueurs d'autant plus difficile. La méthode la plus fiable d'identification demeure donc la microscopie électronique (voir fig. 1.7), qui ne peut cependant pas être employée lors du processus d'angiogenèse puisque la membrane basale n'est pas totalement développée (Gerhardt et Betsholtz, 2003; Shepro et Morel, 1993).



**Figure 1.7 : Représentation schématique et par microscopie électronique à balayage (MEB) des cellules périvasculaires.** (A) Les vaisseaux sanguins sont composés de cellules endothéliales qui constituent la paroi interne appelée intima; cette paroi est recouverte d'une membrane basale et de cellules périvasculaires qui émettent de longs prolongements cytoplasmiques pour entourer la structure vasculaire. (B) Sur cette image, la flèche blanche met en évidence la région nucléaire des cellules périvasculaires, alors que la flèche noire pointe leurs prolongements cytoplasmiques.

Illustration modifiée tirée de : (A) Bergers et Song, 2005; (B) Shepro et Morel, 1993.

### 1.5.2 Fonctions des cellules périvasculaires dans le développement vasculaire

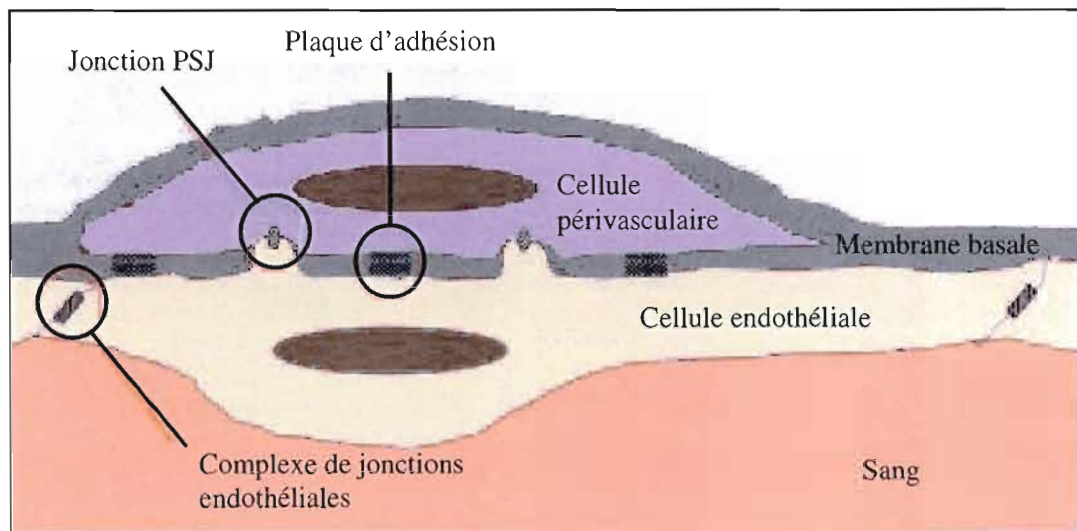
Contrairement à ce que l'on croyait, les cellules périvasculaires n'ont pas pour seule fonction de maintenir la stabilité structurelle des vaisseaux. Elles inhibent également la prolifération des cellules endothéliales et maintiennent le diamètre des capillaires. De plus, grâce à leur activité contractile, elles sont capables de moduler le tonus microvasculaire et elles régulent ainsi le débit de la circulation sanguine (Hall, 2006). Les cellules périvasculaires ont également la capacité de communiquer directement, par la voie paracrine, avec les cellules endothéliales qui forment le vaisseau. Comme ces dernières, elles synthétisent des constituants de la membrane basale et elles participent à la régulation du tonus vasculaire en produisant des prostacyclines qui ont une fonction vasodilatatrice. Dans un même ordre d'idée, elles interviennent dans le contrôle de l'hémostase en sécrétant la

trombospondine, soit une molécule d'adhésion des plaquettes à l'endothélium, particulièrement utile lors du processus de cicatrisation. Il a été démontré également, *in vitro*, que les cellules périvasculaires réduisent la croissance des cellules endothéliales, contrôlent leur prolifération et les protègent contre le stress oxydatif. Finalement, des études ont démontré que la densité de cellules périvasculaires présentes était négativement corrélée avec le temps de réplication des cellules endothéliales, ce qui appuie le fait qu'elles ont une action de stabilisation sur les cellules endothéliales (Alison, 2005).

### ***1.5.3 Interactions des cellules périvasculaires avec les cellules endothéliales***

Les cellules périvasculaires sont localisées à l'intérieur de la membrane basale. Elles contribuent d'ailleurs, tout comme les cellules endothéliales, à la formation de cette dernière. Elles y sont donc littéralement enfouies, mais elles émettent toutefois des prolongements cytoplasmiques permettant des contacts directs avec plusieurs cellules endothéliales par des jonctions lacunaires (*gap junction*), des plaques d'adhésion ou par la sécrétion de facteurs solubles (voir fig. 1.8). Les jonctions lacunaires permettent une connexion directe entre le cytoplasme des cellules périvasculaires et endothéliales ce qui leur procure la possibilité d'échanger des ions ainsi que des molécules de faible poids moléculaire. Les cellules périvasculaires occupent ainsi un rôle prépondérant dans la régulation du métabolisme des cellules endothéliales (Armulik, Abramsson et Betsholtz, 2005).

Cette relation entre ces deux types cellulaires en est une d'interdépendance au sens où chaque type procure à l'autre des facteurs de croissance et un contact qui promeut la prolifération, la stabilité et la survie cellulaire. Il s'agit donc d'une association durable dont les avantages sont réciproques (von Tell, Armulik et Betsholtz, 2006). Sans ces interactions cellulaires, le néovaisseau demeurerait un vaisseau immature et fragile.



**Figure 1.8 : Interactions entre les cellules endothéliales et les cellules périvasculaires.**

Les cellules périvasculaires communiquent avec les cellules endothéliales directement à l'aide de jonction de type PSJ (« *peg-and-socket* » junction). Ce type de jonction consiste en une invagination de la membrane riche en jonctions lacunaires et jonctions serrées. L'adhésion, la reconnaissance et la signalisation entre les cellules endothéliales et périvasculaires sont maintenues grâce à des plaques d'adhésion et des complexes de jonctions endothéliales.

Illustration modifiée tirée de : Armulik, Abramsson et Betsholtz, 2005.

#### **1.5.4 Recrutement des cellules périvasculaires par le PDGF-BB**

Normalement, durant le processus angiogénique, les cellules endothéliales du néovaisseau vont sécréter du PDGF dans le but d'attirer des cellules périvasculaires (voir fig. 1.3). Le PDGF va diffuser dans le milieu environnant, mais des séquences d'acides aminés situées dans les portions N- et C-terminales du PDGF lui confèrent la capacité de se lier à la MEC. Cette rétention à la MEC va permettre de limiter l'influence du PDGF, tout en générant un gradient de PDGF qui va guider la migration des cellules périvasculaires vers le vaisseau et assurer une bonne adhésion. Ce phénomène a également été observé pour l'orientation des cellules endothéliales par le VEGF (Ruhrberg *et al.*, 2002).

### 1.5.5 Importance de la stabilisation par les cellules périvasculaires

Les cellules périvasculaires sont essentielles à la maturation vasculaire. Elles participent d'ailleurs au contrôle hémostatique et protègent la structure endothéliale de la rupture ou de la régression. Durant la phase de stabilisation des vaisseaux naissants, à laquelle certains auteurs réfèrent en tant que « myogenèse vasculaire », les cellules périvasculaires inhibent la prolifération et la migration endothéliales tout en stimulant la production de matrice extracellulaire (Couffinhal *et al.*, 2001). Bien que le PDGF-BB soit le facteur responsable de leur recrutement, les MMPs leur permettent de se déplacer vers le néovaisseau et d'autres acteurs jouent également des rôles majeurs dans la maturation des néovaisseaux. Parmi ces derniers on retrouve l'angiopoïétine et le TGF (Kurz, 2000).

Plusieurs études affirment que, dû à une surexpression des signaux angiogéniques, les vaisseaux sanguins tumoraux ne sont pas normaux. Ils présenteraient une forte pression interstitielle qui contribuerait à les rendre hyperperméables, dilatés et tortueux (Jain, 2003). Ces études prétendent que, manifestement, dans un contexte d'angiogenèse tumorale, les cellules périvasculaires sont incapables de stabiliser les néovaisseaux. Or, plusieurs études ont démontré que les inhibiteurs spécifiques du VEGF/VEGFR-2 ne parvenaient pas à affecter complètement les vaisseaux tumoraux (Bergers *et al.*, 2003). À cet effet, Erber et ses collaborateurs (2004), ont démontré que l'inhibition spécifique du VEGFR-2 n'était pas suffisante pour induire la régression vasculaire, et ce, parce que les vaisseaux étaient stabilisés par les cellules périvasculaires (voir fig. 1.10). Ils ont alors mis en évidence que dans certaines tumeurs le recouvrement par ces cellules peut atteindre jusqu'à 80 % de la surface vasculaire. Ainsi, l'action des inhibiteurs du VEGF/VEGFR-2 serait limitée à une petite fraction de vaisseaux encore immatures et susceptibles à ce type de thérapie. Ces résultats ont pour effet d'attirer l'intérêt de la communauté scientifique vers l'importance des cellules périvasculaires, alors que les cellules endothéliales avaient été, jusqu'alors, le centre d'intérêt. Enfin, Erber et son équipe (2004) ont ensuite prouvé que l'utilisation d'une combinaison d'inhibiteurs spécifiques était plus efficace, puisque de cette façon même les vaisseaux matures et stabilisés par les cellules périvasculaires étaient déstabilisés.



En somme, cela a permis de mettre l'emphase sur la stabilisation des vaisseaux sanguins par les cellules périvasculaires, dont l'importance avait été, jusqu'à récemment, considérée comme négligeable dans les thérapies antiangiogéniques.

## 1.6 LA PRÉVENTION DU CANCER PAR L'ALIMENTATION

On estime que la nature du régime alimentaire des individus est responsable de plus du tiers des nouveaux cas de cancer. Ces statistiques suggèrent que la modification d'habitudes alimentaires pourrait réduire l'incidence de cette maladie. En effet, de nombreuses études épidémiologiques ont montré qu'une alimentation riche en produits végétaux (fruits et légumes) réduit considérablement les risques de développer le cancer (Block, Patterson et Subar, 1992; Glade, 1999; Gonzalez et Riboli, 2006; Graf, Milbury et Blumberg, 2005; Key *et al.*, 2002). Ainsi, en plus d'être une excellente source de vitamines et de minéraux, les fruits et légumes constituent également une arme efficace dans l'optique de la prévention du cancer par l'alimentation.

Un changement dans les habitudes alimentaires favorisant un apport quotidien d'aliments d'origine végétale riches en composés anticancéreux et antiangiogéniques représente donc une stratégie prometteuse (Béliveau et Gingras, 2007). La prévention par l'alimentation permet à tous d'agir au quotidien, de façon très peu coûteuse, en employant des molécules anticancéreuses présentes dans les aliments et qui possèdent une action à la source contre le cancer, soit avant que celui-ci ne parvienne à maturité et menace tout l'organisme (Béliveau et Gingras, 2005).

### 1.6.1 *L'angiogenèse tumorale comme cible*

Il est désormais bien établi que le développement d'une vascularisation intra et péri-tumorale par le processus d'angiogenèse est un événement important et indispensable à la croissance d'une tumeur et à sa dissémination métastatique par la voie sanguine. Ceci a pour conséquence que l'angiogenèse est maintenant devenue une cible de choix pour lutter contre

le cancer. En effet, en entravant la formation de nouveaux vaisseaux, on « affame » la tumeur et on empêche les cellules tumorales d'emprunter le réseau sanguin pour aller fonder des foyers métastatiques dans d'autres organes. Qui plus est, cette stratégie peut également viser la destruction des vaisseaux tumoraux déjà en place.

Une telle stratégie signifie la restriction de la croissance tumorale à des microtumeurs d'au plus 2 mm<sup>3</sup>. Ainsi, cette stratégie permet d'empêcher la dispersion tumorale dans l'organisme, car une tumeur qui réussit à se vasculariser peut ensuite facilement continuer de croître au-delà de 2 mm<sup>3</sup> et envahir les tissus de son hôte par un processus métastatique.

Les stratégies antiangiogéniques ne visent pas à détruire les tumeurs, mais bien à inhiber la vascularisation de ces dernières (Medina, Munoz-Chapuli et Quesada, 2007). Parmi les stratégies antiangiogéniques conventionnelles, on distingue trois types d'approches. Premièrement, l'inhibition des facteurs angiogéniques et de leurs récepteurs ainsi que des voies de signalisation qui en dépendent. Deuxièmement, l'inhibition des cellules endothéliales activées et troisièmement, l'inhibition des molécules d'adhérence cellulaire et du remodelage de la matrice extracellulaire (Gastl *et al.*, 1997). En bref, les agents antiangiogéniques cherchent à déstabiliser une des étapes du processus au lieu de s'attaquer directement aux cellules tumorales, ce qui confère plusieurs avantages à cette stratégie (Folkman et Shing, 1992).

D'abord, contrairement à l'instabilité génétique des cellules tumorales propice à l'acquisition d'une résistance aux traitements cytotoxiques, les cellules endothéliales sont génétiquement beaucoup plus stables et, pour leur immense majorité, dans un état quiescent (Alison, 2005). L'acquisition d'une résistance est donc un phénomène qui, statistiquement, a moins de chance de se produire (Scappaticci, 2003).

Deuxièmement, les traitements antiangiogéniques offrent également l'avantage d'une moindre toxicité que celle observée avec la chimiothérapie (Schenone, Bondavalli et Botta, 2007). Il ne faut pas oublier que l'angiogenèse physiologique est un phénomène peu fréquent chez l'adulte, ce qui minimise les risques d'effets secondaires habituellement rencontrés lors

des traitements conventionnels. Ainsi, il devient donc possible d'administrer des traitements sur de plus longues périodes.

Ensuite, les cellules endothéliales ou périvasculaires qui forment les vaisseaux sanguins sont beaucoup plus accessibles que les cellules tumorales lorsqu'il est question d'administrer un traitement, et ce, à cause de leur contact beaucoup plus intime avec la circulation sanguine (Alison, 2005). De plus, les cellules endothéliales qui répondent aux stimuli angiogéniques pour former la néovascularisation sont des cellules saines diploïdes qui sont similaires d'un individu à un autre (Tosetti *et al.*, 2002). Finalement, un autre argument qui plaide en faveur des stratégies antiangiogéniques est que la destruction d'un seul vaisseau sanguin peut mener à une amplification de la destruction tumorale, car il est estimé que dix couches de cellules tumorales dépendent de l'approvisionnement d'un seul vaisseau (Alison, 2005).

Les recherches épidémiologiques sont parvenues à mettre en évidence qu'un grand nombre d'aliments faisant partie du quotidien alimentaire de plusieurs cultures constituaient des sources exceptionnelles de molécules possédant la capacité d'interférer avec certains processus à l'œuvre dans le développement des cancers, comme l'angiogenèse, et ce, d'une façon analogue au mode d'action de plusieurs médicaments utilisés aujourd'hui (Béliveau et Gingras, 2006). En ce sens, des études récentes publiées dans la littérature, dont certaines ont été effectuées à notre laboratoire, ont démontré que les catéchines (flavan-3-ol) du thé vert possédaient une activité anticancéreuse directement liée à l'inhibition des mécanismes moléculaires impliqués dans l'angiogenèse (Demeule *et al.*, 2002). En effet, elles peuvent affecter la dégradation de la matrice extracellulaire par les MMPs en inhibant la sécrétion de la proMMP-2 (Annabi *et al.*, 2002). De plus, les catéchines peuvent également avoir des effets d'inhibition de la phosphorylation du VEGFR (Lamy, Gingras et Béliveau, 2002). Il a également été démontré que l'acide ellagique présent dans les fruits et les noix ou encore les anthocyanidines, comme la delphinidine, possèdent des effets antiangiogéniques (Labrecque *et al.*, 2005; Lamy *et al.*, 2006).

Plusieurs études rapportent que les flavones et les flavonols peuvent influencer plusieurs fonctions biologiques comme la synthèse de protéines, la prolifération et la différenciation

cellulaire ce qui leur confère un avantage pour lutter contre l'angiogenèse tumorale. Cependant, aucune de ces études n'a encore tenté d'évaluer la capacité de ces composés à inhiber la stabilisation des néovaisseaux lors du processus angiogénique. D'où notre grand intérêt à étudier plus en profondeur ces types de composés.

## 1.7 LES FLAVONOÏDES

### 1.7.1 *Un aperçu*

Les flavonoïdes ont longtemps été perçus comme un pigment qui donnait de la couleur aux plantes. La première observation en ce qui concerne leur activité biologique a été publiée par Rusznyák et Szent-Györgyi (1936) qui avaient d'abord cru qu'il s'agissait d'une vitamine, qu'ils nommèrent la vitamine P. Le terme a ensuite été abandonné puisque les flavonoïdes ne rencontraient aucune des caractéristiques associées à la définition d'une vitamine.

Par contre, à partir de ce moment, les flavonoïdes ont continué de captiver les scientifiques de plusieurs disciplines, et ce, à cause, entre autres, de leur diversité structurelle, biologique et écologique, mais surtout à cause de leurs bienfaits sur la santé (Williams et Grayer, 2004).

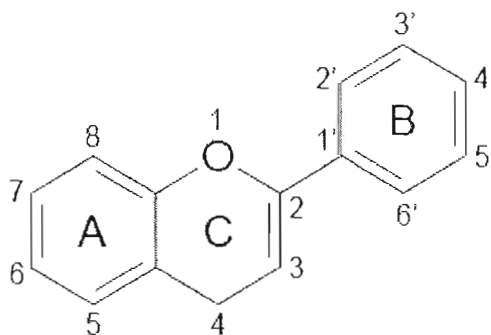
### 1.7.2 *Structure et sous-classes*

Les flavonoïdes font partie de la vaste classe des composés polyphénoliques que l'on retrouve de manière ubiquitaire chez les plantes (Hollman et Katan, 1999). Les composés polyphénoliques ont, eux aussi, suscité l'intérêt scientifique depuis plusieurs décennies. D'abord à cause de leur importance dans la physiologie des plantes et de leurs rôles dans la pigmentation, mais aussi parce qu'ils sont impliqués dans la croissance et la reproduction des plantes (Manach *et al.*, 2004). Ils ont également pour fonction de protéger ces dernières contre les pathogènes d'origine virale ou bactérienne, les prédateurs comme les insectes, et

les maladies (Bravo, 1998). Plus particulièrement, les flavonoïdes sont impliqués, chez les plantes, dans le transport d'électrons lors de la photosynthèse et ils jouent un rôle de protection contre les effets néfastes des rayons ultraviolets en agissant comme antioxydant (Havsteen, 2002).

Les polyphénols sont divisés en 10 grandes classes si on se base sur leur structure chimique. Parmi celles-ci, la classe des flavonoïdes est la plus abondante et elle représente 60 % des composés polyphénoliques (Ramos, 2007).

On estime aujourd'hui à plus de 9000 le nombre de flavonoïdes répertoriés et il en reste, sans aucun doute, des milliers d'autres à découvrir puisque le squelette des flavonoïdes (voir fig. 1.9) comporte 10 atomes de carbone qui peuvent être substitués par différents groupements comme des groupements hydroxy, méthoxy, méthyl, benzyl et isoprényl (Beecher, 2003; Williams et Grayer, 2004).



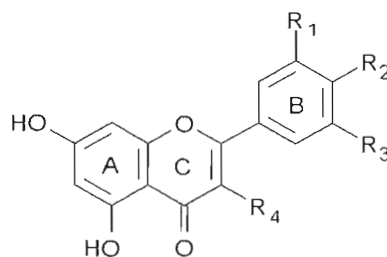
**Figure 1.9 : Structure de base des flavonoïdes**

Tous les flavonoïdes répertoriés partagent la même structure de base soit : un squelette de carbone organisé en diphenylpropanes (C6-C3-C6), c'est-à-dire deux benzènes reliés par une chaîne linéaire de carbone et un atome d'oxygène qui forme un hétérocycle. Le cycle A provient habituellement d'une molécule de réSORCINOL ou phloroglucinoLE synthétisée par la voie métabolique de l'acétate et possède une hydroxylation caractéristique en position 5 ou 7. L'anneau B quant à lui provient de la voie des shikimates et il est normalement hydroxylé en position 4', 3'4' ou encore 3'4'5' (Croft, 1998).

De plus, selon les variations que l'on retrouve dans l'hétérocycle C (soit le degré d'oxydation, de saturation et d'hydroxylation) ainsi que selon la position de la connexion entre le cycle B et C, la classe des flavonoïdes peut être subdivisée, à son tour, en 6 sous-classes soit : les flavonols, les flavones, les flavanones, les flavan-3-ols (ou catéchines), les isoflavones et les anthocyanidines (Birt, Hendrich et Wang, 2001; Graf, Milbury et Blumberg, 2005; Havsteen, 2002).

Les sous-classes retenues pour ce projet se trouvent dans deux sous-classes différentes : soient les flavones et les flavonols. Parmi les flavonols, on peut retrouver le kaempférol, la myricétine, la quercétine, la rutine et la fisétine alors que l'apigénine, la lutéoline et la chrysin appartiennent à la sous-classe des flavones. Pour notre projet, nous avons caractérisé les 4 molécules suivantes : kaempférol, myricétine, apigénine et lutéoline (voir tabl. 1.2). On remarque que ce qui distingue les deux classes, c'est la présence d'un groupement hydroxy en R<sub>4</sub> sur le cycle C (Graf, Milbury et Blumberg, 2005).

Tableau 1.2 : Structure des flavonoïdes



Flavonols	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>
Kaempférol (Kae)	H	OH	H	OH
Myricétine (Myr)	OH	OH	OH	OH
Flavones	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>
Lutéoline (Lut)	OH	OH	OH	H
Apigénine (Api)	H	OH	H	H

D'après Williams et Grayer, 2004.

### 1.7.3 Sources alimentaires

Les polyphénols sont des produits largement distribués dans le règne végétal et sont consommés quotidiennement. La plupart des flavonoïdes proviennent d'extraits de plantes, comme c'est le cas pour le thé, le vin et le cacao (Dwyer et Peterson, 2002). Par contre, ils sont plus particulièrement consommés sous forme de fruits et de légumes dans notre société occidentale (Hollman et Katan, 1999; Williams et Grayer, 2004). Les sous-classes des flavonols et des flavones sont omniprésentes dans notre alimentation. Le tableau 1.3 présente une vue d'ensemble de la distribution des flavonols, kaempférol et myricétine, et des flavones, apigénine et lutéoline, chez les fruits et légumes. Dans un même ordre d'idée, notons que les fruits et légumes qui contiennent le plus de kaempférol sont, respectivement, les bleuets et le chou vert alors qu'il s'agit des mûres et du rutabaga pour la myricétine, des raisins et du céleri pour l'apigénine et, enfin, du citron et des piments forts pour la lutéoline.

Les flavonoïdes constituent un élément important de la diète chez l'humain et, tel que démontré, on les retrouve dans un grand nombre de fruits et légumes. Ils sont également présents dans plusieurs herbes et épices, comme le persil et le thym et on les retrouve également dans le miel (Merken et Beecher, 2000). L'apigénine est particulièrement abondante dans le persil alors que la lutéoline est surtout présente chez le thym. L'aneth est l'herbe aromatique qui contient le plus de myricétine et l'on retrouve le kaempférol en grande quantité dans les câpres. De plus, parmi les différents thés, le thé vert est celui qui contient en plus grande quantité les quatre flavonoïdes retenus pour cette étude.

Chez certains fruits, comme le citron, les flavonoïdes, toutes sous-classes confondues, peuvent représenter jusqu'à 1 % du fruit frais (Di Carlo *et al.*, 1999). Les flavonoïdes de faible poids moléculaire sont responsables de l'amertume et du goût acide et aigre de certains fruits alors que les flavonoïdes de haut poids moléculaire, plus particulièrement les tannins, sont responsables de l'astringence de certains fruits (Di Carlo *et al.*, 1999).

**Tableau 1.3 : Quantité des flavonoïdes contenus dans certains fruits, légumes et herbes aromatiques**

<b>Fruits</b>	<b>Quantité (mg / 100g)</b>
Cassis	7,81
Bleuets sauvages	7,30
Canneberges	4,42
Citrons	1,50
Bleuets	0,82
Fraises	0,79
Jus de raisin	0,58
Raisins	0,45
Pamplemousse	0,40
Mûres	0,08
Jus d'orange, de pomme	0.05
<b>Légumes</b>	<b>Quantité (mg / 100g)</b>
Choux vert	26,74
Cœurs de céleri	22,69
Feuilles d'oseille	16,00
Échalottes	10,15
Piments forts	6,93
Rutabaga	6,55
Brocoli	6,16
Céleri	5,92
Navets	4,80
Endives	4,04
Chou-raves	3,73
Poireaux	2,95
Racines de raifort	2,48
Choux de Bruxelles	1,29
Épinards	1,13
Radis	0,86
<b>Herbes aromatiques</b>	<b>Quantité (mg / 100g)</b>
Persil	311,76
Fenouil	26,40
Cresson alénois	13,00
Estragon	12,00

**Source :** USDA Database for the Flavonoid Content of Selected Foods, 2003.



#### 1.7.4 Consommation

On estime que la consommation quotidienne en flavonoïdes se situe aux environs de quelques centaines de milligrammes par jour (Hollman et Katan, 1997) et, plus particulièrement, la consommation de flavonols et de flavones est évaluée à environ 20 à 28 mg par jour (Hertog *et al.*, 1993; Justesen, Knuthsen et Leth, 1998; Sampson *et al.*, 2002). Néanmoins, il est extrêmement difficile d'évaluer cette consommation, car plusieurs facteurs peuvent influencer les données (Hammerstone, Lazarus et Schmitz, 2000). D'abord, la formation même des flavonoïdes chez les plantes est influencée par plusieurs facteurs comme la lumière (qui stimule la synthèse des flavonoïdes), la génétique de la plante, les conditions environnementales et les différentes variétés de plantes (Manach *et al.*, 2004). Ainsi, le contenu en flavonoïdes d'une variété de pomme à une autre peut varier grandement (ex. : McIntosh versus Granny Smith). Qui plus est, il est également possible de distinguer des différences de concentration en flavonoïdes chez des fruits provenant d'un même arbre et parfois même sur les différents côtés d'un seul fruit selon son exposition au soleil.

De plus, la façon d'apprêter les aliments peut influencer de manière capitale leur contenu en flavonoïdes. Par exemple, le simple fait de peler un fruit ou un légume peut éliminer une grande portion des flavonoïdes présents puisque ceux-ci se retrouvent généralement en quantité plus importante dans les parties externes plutôt qu'internes (Manach *et al.*, 2004). La cuisson peut également avoir un effet dévastateur. En effet, des études montrent que certains légumes peuvent perdre jusqu'à 80 % de leur contenu original en flavonoïdes après avoir été bouillis plus de 15 minutes et jusqu'à 65 % après une cuisson au micro-ondes (Crozier *et al.*, 1997). Les procédés de fabrication industrielle affectent également le contenu en flavonoïdes des aliments. Les fruits sont généralement pelés et décortiqués ce qui résulte en l'oxydation des molécules d'intérêt qui se transforment alors en pigment brun. En revanche, la macération lors du processus de vinification semble favoriser leur diffusion dans le vin rouge, celui-ci en contenant 10 fois plus qu'un vin blanc (Manach *et al.*, 2004).

### 1.7.5 Absorption, métabolisme et biodisponibilité

Bien que plusieurs études épidémiologiques aient démontré le potentiel d'une alimentation riche en fruits et légumes, la prémisse pour établir une relation causale entre les flavonoïdes contenus dans l'alimentation et les bienfaits associés à une alimentation riche en fruits et légumes, c'est que ces flavonoïdes doivent être absorbés. De plus, la métabolisation des flavonoïdes, suite à leur absorption, ne doit pas inhiber leurs effets bénéfiques observés *in vitro*.

Cette dernière décennie, le métabolisme et la pharmacocinétique des polyphénols ont fait l'objet d'intenses recherches et, parmi ces derniers, les flavonoïdes, et plus particulièrement les flavonols, ont été les plus étudiés parce qu'ils sont présents dans la plupart des fruits et légumes. Ces recherches ont montré que les flavonoïdes sont rapidement absorbés dans le tractus intestinal et détectés dans le plasma, ce qui suggère qu'ils sont disponibles pour exercer leurs effets biologiques (Spencer, Abd-el-Mohsen et Rice-Evans, 2004). En effet, il a été démontré que les flavonoïdes peuvent traverser la barrière intestinale et atteindre la circulation plasmatique à des concentrations de l'ordre du micromolaire, concentrations auxquelles ils possèdent des effets *in vitro* (Manach *et al.*, 2005; Williamson et Manach, 2005).

Des études ont montré que l'absorption de la lutéoline dans le petit intestin peut atteindre jusqu'à 60 % de la quantité consommée et que la demie-vie varie de 2 à 28 heures (Scalbert *et al.*, 2002; Shimoi *et al.*, 1998). Les flavonoïdes sont excrétés dans la bile et dans le duodénum, puis ils sont réabsorbés dans le cycle entérohépatique ce qui explique la longueur de leur demie-vie.

Une autre étude a prouvé que la lutéoline pouvait être détectée sous sa forme monoglucuronique ainsi que sous forme d'aglycone dans le plasma humain (Manach et Donovan, 2004; Shimoi *et al.*, 2000). On sait également qu'en moyenne 54 % de la consommation quotidienne d'apigénine est excrétée dans l'urine à l'intérieur de 24 heures (Chen *et al.*, 2007).

Bien qu'il y ait une grande variabilité entre individus en ce qui concerne les voies de métabolisation des composés, principalement due aux différences de la flore intestinale de chacun, si l'on se base sur la consommation quotidienne en flavonoïdes, les concentrations utilisées dans ces recherches sont physiologiquement significatives et ne causent pas d'effets secondaires toxiques (Hollman *et al.*, 1999; Ramos, 2007).

### 1.7.6 Les propriétés connues des flavonoïdes

Les flavonoïdes ont d'abord fait la manchette pour leurs propriétés antioxydantes et leur capacité à piéger les radicaux libres (Williams et Grayer, 2004). Au cours du stress oxydatif, les espèces radicalaires libres vont attaquer des cibles bioactives telles les protéines et les acides nucléiques favorisant l'apparition de mutations délétères à l'origine de divers cancers. Les radicaux libres peuvent également s'attaquer aux lipides, principalement les lipoprotéines de faible densité (LDL) qui sont la principale forme de transport du cholestérol plasmatique, et leur conférer un caractère athérogène. Les flavonoïdes parviennent à capturer les principales espèces réactives de l'oxygène associées au stress oxydatif comme les radicaux anion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ), les radicaux hydroxyle ( $OH^{\cdot}$ ) et les radicaux peroxydes ( $RO_2^{\cdot}$ ), les empêchant ainsi de créer des dommages cellulaires. En effet, les flavonoïdes sont capables d'inactiver et de stabiliser les radicaux libres grâce à leur groupement hydroxyle fortement réactif. Les flavonoïdes inhibent aussi l'oxydation des LDL et, de ce fait, ils peuvent prévenir l'athérosclérose et diminuer les risques de maladies cardiovasculaires (Tu *et al.*, 2007).

Bien qu'il s'agisse là de la propriété la mieux décrite des flavonoïdes, on rapporte qu'ils sont capables d'exercer une multitude d'autres activités biologiques. À un point tel qu'ils ont été surnommés les « modificateurs naturels des réponses biologiques » (Middleton, Kandaswami et Theoharides, 2000). On leur attribue notamment, en plus des propriétés antioxydantes, des propriétés anti-inflammatoires, antiallergiques et antiulcérogènes (Di Carlo *et al.*, 1999). On rapporte même qu'ils peuvent avoir plusieurs effets protecteurs cardiovasculaires (Stoclet *et al.*, 2004). Certains flavonoïdes ont également démontré un potentiel d'agent vasodilatateur (Woodman et Chan, 2004).

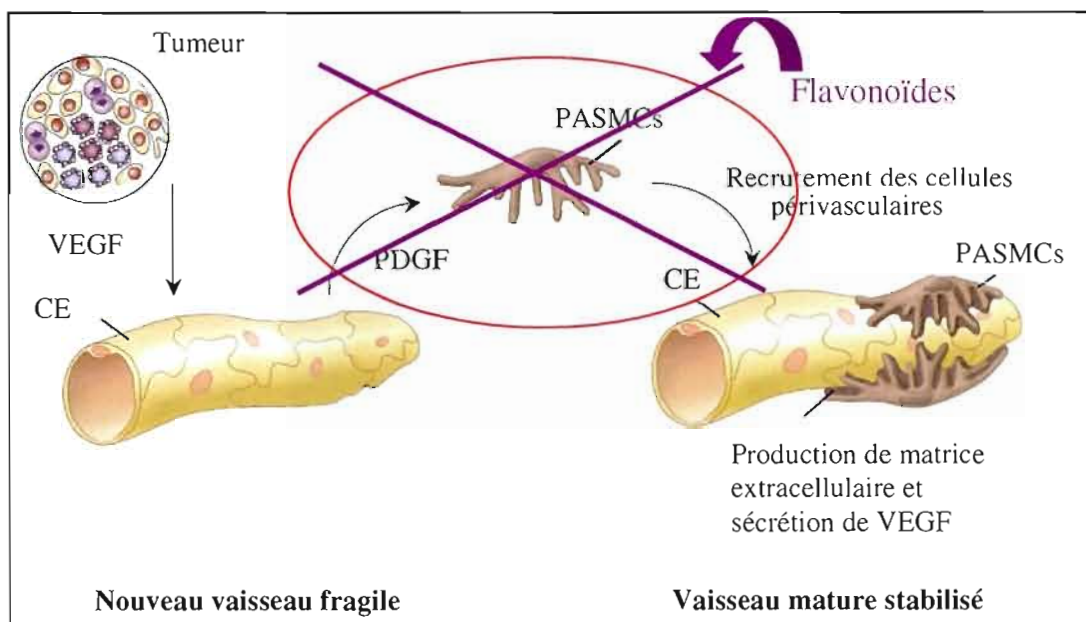
Une panoplie d'études *in vitro* ont ensuite montré que les flavonoïdes peuvent moduler l'activité d'une grande variété d'enzymes impliquées dans des voies importantes qui régulent la division et la prolifération cellulaire, l'agrégation des plaquettes, la détoxification, l'inflammation et la réponse immunitaire (Hollman et Katan, 1999; Middleton, Kandaswami et Theoharides, 2000). Ils sont donc capables de modifier le comportement de plusieurs systèmes cellulaires.

Qui plus est, il y a déjà plus de 20 ans, des études suggéraient que les flavonoïdes pouvaient « inhiber » le cancer et qu'ils avaient des propriétés antitumorales (Wattenberg, 1992; Wattenberg *et al.*, 1985). Récemment, plusieurs études épidémiologiques ainsi que des études réalisées dans différentes lignées cellulaires ou encore dans différents modèles animaux ont démontré le potentiel antitumoral et anticancéreux des flavonoïdes (Birt, Hendrich et Wang, 2001; Di Carlo *et al.*, 1999; Ramos, 2007; Tosetti *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2001). Par exemple, l'activité antitumorale des flavonoïdes du thé, particulièrement des catéchines, a été démontrée dans plusieurs modèles animaux et ce, pour divers types de cancer, comme des médulloblastomes ou des cancers de la peau, des poumons, de l'œsophage, de l'estomac, du foie, du côlon, de la rate et du pancréas (Conney *et al.*, 1999; Di Carlo *et al.*, 1999; Pilorget *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 1996; Yang *et al.*, 1999). Dans un même ordre d'idée, des anthocyanidines, soit des molécules appartenant à une sous-classe de la grande famille des flavonoïdes, ont montré des effets d'inhibition de la migration de cellules provenant de tumeurs hautement invasives et prolifératives, les glioblastomes (Lamy *et al.*, 2007).

De plus, une étude réalisée par Wenzel et ses collaborateurs (2000) a mis en évidence que des molécules appartenant à la sous-classe des flavones pouvaient induire l'apoptose et inhiber la prolifération de cellules provenant d'une lignée cellulaire de cancer du côlon. Il a également été démontré que l'apigénine, qui appartient aussi à la sous-classe des flavones, parvient à inhiber l'angiogenèse dans un modèle d'adénocarcinome pulmonaire humain (Liu *et al.*, 2005).

## 1.8 OBJECTIFS DU PROJET

L'objectif principal de notre étude est de caractériser les propriétés antiangiogéniques *in vitro* et *in vivo* de quatre molécules appartenant à la grande famille des flavonoïdes, soit : les flavonols, kaempférol et myricétine, et les flavones, apigénine et lutéoline (voir tabl. 1.2). Pour y parvenir, les cellules PSMCs ont été sélectionnées comme modèle d'étude *in vitro*. Ce sont des cellules musculaires lisses qui proviennent d'artères pulmonaires et qui constituent un excellent modèle de cellules périvasculaires. De plus, elles ont l'avantage de proliférer rapidement et en grand nombre. Notre stratégie vise plus spécifiquement à inhiber la stabilisation des néovaisseaux induite par les cellules périvasculaires (voir fig. 1.10) à l'aide de ces molécules d'origine nutritionnelle (voir tabl. 1.3). De surcroît, cette recherche vise également à identifier de nouvelles molécules d'origine nutritionnelle qui pourraient contribuer à la prévention du cancer par l'alimentation.



**Figure 1.10 : Recrutement des cellules périvasculaires par les cellules endothéliales vasculaires dans l'angiogenèse tumorale.** Abréviations : CE, cellules endothéliales; PSMCs, cellules musculaires lisses d'artère pulmonaire; PDGF, facteur de croissance dérivé des plaquettes; VEGF, facteur de croissance de l'endothélium vasculaire.

Illustration modifiée tirée de : Carmeliet, 2003.

Nous avons donc évalué les effets des quatre flavonoïdes sélectionnés sur le potentiel invasif et migratoire des cellules PASMCs. Ensuite, nous avons procédé à la caractérisation de leurs actions inhibitrices sur la phosphorylation du récepteur PDGFR- $\beta$  et de certains effecteurs des voies de signalisation intracellulaire dépendants de l'activation de ce récepteur. Dans l'optique de caractériser davantage les molécules identifiées comme étant les plus actives dans nos modèles *in vitro*, nous nous sommes ensuite attardés à leur potentiel d'inhibition de la dégradation matricielle en évaluant leurs effets sur la sécrétion des MMPs qui sont impliquées dans ce processus, puis nous avons vérifié s'il était possible d'inhiber la sécrétion de VEGF par les cellules PASMCs, puisque le VEGF contribue à la stabilisation des néovaisseaux. Afin de s'assurer que les effets observés *in vitro* n'étaient pas dus à la toxicité des molécules étudiées, nous avons effectué des tests de viabilité cellulaire au bleu de trypan. Finalement, dans le but de caractériser les propriétés antiangiogéniques *in vivo*, des tests d'implants de Matrigel™ chez des souris Crl:CD1<sup>®</sup> Foxn1nu ont été réalisés.

## CHAPITRE II

### MATÉRIEL ET MÉTHODES

#### 2.1 MATÉRIEL

##### 2.1.1 *Culture cellulaire*

Les PASMCM ont été achetées chez Clonetics (San Diego, CA, USA). Le milieu de culture basal SmBM<sup>®</sup> ainsi que le milieu de culture complet SmGM<sup>®</sup>-2 contenant les facteurs de croissance hEGF et hFGF-B, des suppléments d'insuline, du FBS (*serum fetal bovin*) ainsi que de la gentamycine (GA-1000) proviennent de Clonetics (San Diego, CA, USA). La trypsine-EDTA et les antibiotiques (streptomycine et pénicilline) ont été achetés chez Gibco<sup>®</sup> Invitrogen cell culture (Grand Island, NY, USA). Les sérums FBS et BCS (*bovine calf serum*) ont été obtenus de HyClone Laboratories (Logan, UT, USA). Les chambres de migration de type Boyden viennent de Costar (Corning, NY, USA). Les plaques, les flacons et les pétris utilisés en culture cellulaire ont été achetés chez Sarstedt (Newton, NC, USA).

##### 2.1.2 *Anticorps*

L'anticorps monoclonal anti-phosphotyrosine PY99 et l'anticorps polyclonal anti-PDGFR- $\beta$  (958) ont été obtenus de Santa Cruz Biotechnologies (Santa Cruz, CA, USA). Les anticorps polyclonaux anti-p44/42 MAPK et anti-phospho-p44/42 MAPK (Thr 202/Tyr 204) ainsi que les anticorps monoclonaux anti-Akt (pan) et anti-phospho-Akt (Ser 473) proviennent de chez Cell Signaling technology (New England Biolabs, Pickering, ON, Canada). Les anticorps secondaires anti-souris et anti-lapin conjugués à la peroxydase de

Raifort ont été obtenus auprès de Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA, USA).

### 2.1.3 Facteur de croissance

Le facteur de croissance humain recombinant PDGF-BB et le VEGF ont été achetés chez R&D Systems Inc. (Minneapolis, MN, USA). Le bFGF a été obtenu de Upstate Biotechnology Inc. (Lake Placid, NY, USA).

### 2.1.4 Réactifs et matériel

Les flavonoïdes apigénine (4',5,7-Trihydroxyflavone), lutéoline (3',4',5,7-Tétrahydroxyflavone), myricétine (3,3',4',5,5',7-Hexahydroxyflavone) et kaempférol (3,4',5,7-Tétrahydroxyflavone) purifiés par HPLC proviennent d'Extrasynthèse (Genay, France). Le Gleevec, STI571 ou Imatinib, a été obtenu de Novartis Pharma Canada inc. (Dorval, QC, Canada). Les microtubes (*ependorf*) ambrées proviennent de Sarstedt (Newton, NC, USA). Le bleu de trypan a été commandé chez Gibco<sup>®</sup> Invitrogen cell culture (Grand Island, NY, USA).

Les réactifs de microBCA pour le dosage de protéines ont été achetés chez Pierce (Rockford, IL, USA). Les billes Protein A Sepharose™ et Protein G Sepharose™ proviennent de Amersham Biosciences (Baie d'Urfé, QC, Canada). L'acrylamide provient de Roche Diagnostics (Laval, QC, Canada). Le bis-acrylamide provient de Rose Scientific (Mississauga, ON, Canada). Les systèmes d'électrophorèse SDS-PAGE (*Sodium dodecyl sulfate/polyacrylamide gel electrophoresis*) ainsi que les appareils utilisés pour le transfert de protéines proviennent de BioRad (Mississauga, ON, Canada) tout comme le 2-mercaptoéthanol, le dodécylsulfate de sodium (SDS), le bleu de bromophénol, le bleu brillant de Coomassie R-250, le N,N,N',N'-tétraméthyléthylènediamine (TEMED), l'ammonium persulfate (APS) et les standards SDS-PAGE High Range et Low Range. La glycine est un produit de Fisher Scientific (Ville St-Laurent, QC, Canada). Les membranes de PVDF



(Difluorure de polyvinylidène) Immobilon-P PVDF de 0,45  $\mu\text{m}$  de porosité ainsi que les filtres et les steriflip-GP de 0,22  $\mu\text{m}$  ont été commandés chez Millipore Corporation (Bedford, MA, USA). Les réactifs de chimiluminescence ECL (*Enhanced chemiluminescence*) proviennent de Perkin Elmer Life Sciences (Boston, MA, USA). Les films radiologiques utilisés sont des films Fuji Medical X-Ray film 8X10 distribués par Groupe Christie Itée (St-Eustache, QC, Canada).

Le BD Matrigel™ Matrix phenol red-free a été acheté chez BD Biosciences (Bedford, MA, USA). La plaque ELISA, Quantikine® Human VEGF Immunoassay provient de chez R&D Systems Inc (Minneapolis, MN, USA).

Le Tris-HCl, le méthanol (grade ACS), l'éthanol, l'acide acétique et le formaldéhyde proviennent de VWR International (Ville Mont-Royal, QC, Canada). La formaline phosphate 10% provient de Fisher Scientific Company (Ottawa, ON, Canada). L'acide chlorhydrique (HCl) a été commandé chez Fisher Scientifique (Nepean, ON, Canada). Le chlorure de sodium, le glycérol, le dithiothréitol (DTT), le 3-[(3-cholamidopropyl)-diméthylammonio]-1-propano-sulfonate (CHAPS), le Triton X-100, le chlorure de sodium (NaCl), l'héparine, l'hémoglobine, la gélatine, le crystal violet, le DMSO (Diméthyl sulfoxyde), le NaF (Fluorure de sodium) et le  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  (Sodium d'ortho-vanadate) ont tous été achetés de Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

### 2.1.5 Animaux

Les souris Crl:CD1® Foxn1nu, immunosupprimées, proviennent de chez Charles River Laboratories (St-Constant, QC, Canada). Lors de leur arrivée à l'animalerie, les souris ont été placées en quarantaine pour un minimum d'une semaine afin de s'assurer que leur état de santé répondait aux critères d'acceptation dans la colonie exempte de maladies. De cette façon, elles peuvent s'acclimater à leur nouvel environnement. Les souris utilisées étaient toutes âgées de 6 semaines et pesaient entre 20 et 25 g.

## 2.2 MÉTHODES

### 2.2.1 Préparation des flavonoïdes

Les flavonoïdes ont été préparés selon les recommandations du fabricant, c'est-à-dire qu'ils ont été solubilisés dans du DMSO de manière à obtenir une concentration finale de 25 mM, concentration suffisamment élevée pour assurer une bonne conservation. Ils ont ensuite été aliquotés (25 µl) dans des microtubes ambrés, puis congelés à -80 °C. Lors de leur utilisation, les molécules étaient décongelées sur glace, puis, très brièvement, à la température de la pièce, tout juste avant leur usage, le DMSO étant solide à 4 °C. C'est à ce moment-là qu'ils ont été dilués, toujours dans le DMSO, pour l'obtention de concentrations de l'ordre du micromolaire. La concentration de DMSO dans l'essai était de 0.1 %, une concentration non toxique pour nos cellules. Les molécules ont toutes été utilisées à l'intérieur de 2 mois suivant le moment de leur solubilisation. Pour les expériences *in vivo*, les flavonoïdes ont été mis en solution le jour même de l'expérience.

### 2.2.2 Culture cellulaire

Une seule lignée cellulaire a été utilisée durant ces recherches et il s'agit des cellules PSMC. Elles ont été cultivées dans des flacons en plastique de 75 cm<sup>2</sup> et conservées dans un incubateur à une température de 37 °C et dans une atmosphère humide contenant 5 % de CO<sub>2</sub> et 95 % d'air. Le milieu de culture employé fut le milieu complet SmGM<sup>®</sup>-2. Pour récolter les cellules, lorsque la confluence voulue était atteinte, 2 ml de trypsine-EDTA 0.5 X ont été employés pendant 2 minutes dans l'incubateur, puis celle-ci a été inhibée par l'ajout de 5 ml de milieu complet. Dans le but de minimiser les risques de changement phénotypique, les cellules ont toutes été utilisées entre les passages 6 à 8.

### 2.2.3 Essai de migration cellulaire *in vitro* en chambre de type Boyden

L'influence des flavonoïdes sur le chimiotactisme induit par le PDGF-BB a été étudiée à l'aide d'un test de migration. Pour y parvenir, des chambres à migration Costar (*Transwell polycarbonate membrane*; 6,5 mm de diamètre; pore 8  $\mu\text{m}$ ) ont été recouvertes, stérilement, d'une solution de gélatine 0,15 % p/v dans du PBS (150 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,3 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  et 8,1 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , à pH 7,4), sans  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ , stérile. Les chambres ont ensuite été incubées toute la nuit à 4 °C pour être ensuite rincées au PBS sans  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  stérile. Des PSMCs ont été déposées dans les chambres supérieures de migration à raison de 50 000 cellules par chambre dans un volume de 50  $\mu\text{l}$  de milieu SmBM<sup>®</sup> ne contenant ni sérum ni supplément de croissance. Afin de permettre aux cellules d'adhérer sur la membrane de la chambre supérieure, les chambres de migration ont été incubées 30 minutes à 37 °C dans une atmosphère humide contenant 5 % de  $\text{CO}_2$  et 95 % d'air. Pendant ce temps, des dilutions en série, permettant des concentrations finales variant de 1  $\mu\text{M}$  à 15  $\mu\text{M}$  dans les chambres du haut et du bas, ont été réalisées dans du milieu SmBM<sup>®</sup> pour chacun des flavonoïdes puis 600  $\mu\text{l}$  ont été ajoutés à la chambre du bas (solution 1X) et 50  $\mu\text{l}$  dans celle du haut (solution 2X). Après 2 heures d'incubation à 37 °C dans une atmosphère humide contenant 5 % de  $\text{CO}_2$ , le chimioattractant, soit le PDGF-BB, a été ajouté dans la chambre du bas à une concentration finale de 10 ng/ml, puis l'incubation s'est poursuivie durant 3 heures supplémentaires. Après cette étape, les cellules ont été fixées à la formaline phosphate 10 % toute la nuit à 4 °C. Le lendemain, elles ont été colorées durant 30 minutes à température ambiante à l'aide d'une solution de méthanol 20 % contenant 0,1 % de crystal violet. L'intérieur des chambres de migration a finalement été rincé à l'eau nanopure, puis nettoyé dans le but de retirer les cellules qui n'avaient pas migré. Les cellules qui ont migré, se retrouvant désormais sous la chambre de migration, ne sont pas affectées par cette étape et ont, par la suite, été prises en photo et quantifiées à l'aide du programme d'analyse d'image Northern Eclipse 5,0 (Albini *et al.*, 1987). Toutes les analyses statistiques, particulièrement les tests de *t*, ont été réalisées à l'aide du logiciel *GraphPad Prism 4*. Dans la légende de chacune des différentes figures présentées le nombre d'expérience indépendante réalisée est indiqué.

#### 2.2.4 *Test de viabilité au bleu de trypan*

La viabilité cellulaire a été déterminée à l'aide d'un test d'exclusion au bleu de trypan. Pour y parvenir, des cellules PSMCs ont étéensemencées dans des pétris de 60 mm dans du milieu SmGM<sup>®</sup>-2 complet jusqu'à ce qu'elles atteignent une confluence d'environ 75 %. À ce moment, les cellules ont été incubées en présence, ou en absence, d'apigénine et de lutéoline à une concentration finale de 15 µM dans du milieu SmBM<sup>®</sup> contenant du FBS 0,5 % et ce, pour une période de 24 heures. Les cellules adhérentes au pétri ont été récoltées par trypsination puis combinées aux cellules flottantes récupérées dans le milieu de culture. Leur viabilité a, par la suite, été déterminée à l'aide d'un test d'exclusion au bleu de trypan. Brièvement, ce produit non toxique pour la cellule permet la différenciation entre les cellules viables (incolores) et non viables (colorées en bleu) lors de la numération cellulaire. Le principe est simple, les cellules en bon état ont des mécanismes pour rejeter le colorant dans le milieu extracellulaire par l'action de leur barrière cytoplasmique active, contrairement aux cellules mortes. Ainsi, les cellules en mauvais état (ou mortes) ne peuvent pas éliminer ce produit et il se produit une accumulation à l'intérieur du cytoplasme. Il est donc facile, par observation au microscope, de distinguer les cellules mortes des cellules vivantes n'ayant pas accumulé le produit (Prescott, Harley et Klein, 2003; Tortora, Funke et Case, 2003). Le pourcentage des cellules vivantes et mortes est exprimé en fonction du nombre total de cellules comptées dans chaque échantillon, soit en moyenne une centaine de cellules.

#### 2.2.5 *Test d'invasion in vitro*

Afin de déterminer si les différents flavonoïdes affectaient le potentiel invasif des PSMCs, des chambres de migration ont été recouvertes d'une couche de Matrigel<sup>™</sup>. Pour y parvenir, 100 µl d'une solution stérile de PBS, sans Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>, contenant 0,5 mg/ml de Matrigel<sup>™</sup> ont été déposés délicatement, afin d'éviter la formation de bulles, dans la chambre du haut. Les chambres ont ensuite été incubées toute une nuit à la température de la pièce sous une hotte à flux laminaire. La suite des procédures du test d'invasion est identique à celle de l'essai de migration (voir sect. 2.2.3), à la seule différence que l'invasion se poursuit pour une durée de 24 heures à 37 °C dans une atmosphère humide contenant 5 % de CO<sub>2</sub>.

après l'ajout du PDGF-BB. La quantification de l'invasion s'effectue de la même manière que pour la migration décrite à la section 2.2.3.

## 2.2.6 *Étude des marqueurs moléculaires*

### 2.2.6.1 *Traitements et stimulation des PSMCs*

Les cellules PSMCs ont été mises en pétris de 100 mm dans du milieu complet SmGM<sup>®</sup>-2, puis elles ont été incubées à 37 °C dans une atmosphère humide contenant 5 % de CO<sub>2</sub> jusqu'à ce qu'elles atteignent une confluence de 85-90 %. Le milieu a été retiré et remplacé par du milieu basal SmBM additionné de FBS 0,5 % et contenant les différents flavonoïdes à des concentrations finales variant de 1 µM à 15 µM, sauf pour les contrôles, pour une période de 18 à 20 heures. À la suite de ce traitement, les cellules ont été stimulées 5 minutes, à 37°C, avec du PDGF-BB à 50 ng/ml de concentration finale. Pour arrêter la stimulation, le milieu contenant le PDGF-BB a été aspiré et remplacé par une solution de PBS sans Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup> stérile et froid contenant 1 mM final de NaF et 1 mM final de Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>. Ensuite, les cellules ont été incubées une heure à 4 °C avec une agitation réduite dans ce milieu.

### 2.2.6.2 *Préparation des lysats cellulaires*

Après cette incubation, les cellules ont été lysées à l'aide de 300 µl de tampon de lyse 1X (150 mM NaCl, 10 mM Tris/HCl pH 7,4, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 % Triton X-100, 0,5 % NP40, 1 mM NaF, 1 mM de Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>). Les cellules ont ensuite été recueillies à l'aide d'un grattoir puis transférées dans des microtubes et conservées sur glace pour une période de 30 minutes avec agitation au vortex toutes les 10 minutes. Finalement, les lysats cellulaires ont été centrifugés à 11 500 rpm, 10 minutes, à 4°C, et le surnageant a été récupéré. puis les protéines ont été dosées tel que décrit ci-dessous.

### 2.2.6.3 Dosage des protéines

La quantité de protéines contenues dans les lysats cellulaires a été déterminée par la méthode de  $\mu$ BCA (acide bicinchoninique) à l'aide du Micro BCA™ *Protein Assay Kit* provenant de chez Pierce Biotechnologies et de l'albumine sérique bovine comme standard (BSA). Brièvement, 4  $\mu$ l d'échantillon ont été dilués dans un volume final de 1 ml d'eau nanopure, puis 1 ml du réactif, préparé selon les recommandations du fabricant, a été ajouté à cette dilution. Le mélange a ensuite été agité 5 secondes et finalement chauffé à 60 °C durant une heure. Le réactif est utilisé pour détecter les ions  $\text{Cu}^{+1}$ , qui sont formés lorsque  $\text{Cu}^{+2}$  est réduit par les protéines en milieu alcalin. Il se produit alors un complexe  $\text{BCA-Cu}^{+1}$ , formé par la chélation de 2 molécules de BCA avec un ion  $\text{Cu}^{+1}$ , qui devient de couleur pourpre, plus ou moins intense, selon le contenu en acides aminés des protéines analysées et le nombre de liaisons peptidiques. L'intensité de cette coloration est ensuite analysée par spectrophotométrie d'absorbance à 562 nm. Ainsi, suite à la période d'incubation d'une heure à 60 °C, les échantillons ont été agités légèrement, puis 200  $\mu$ l de chacun d'entre eux ainsi que de la courbe de référence ont été déposés sur une plaque de 96 puits et l'absorbance à 562 nm a été déterminée en utilisant un lecteur de microplaque *Molecular Devices* (SpectraMax Plus). L'équation de la courbe standard a ensuite permis de déterminer la concentration de protéines contenues dans les lysats.

### 2.2.6.4 Immunoprécipitation

Pour l'étude de phosphorylation du récepteur PDGFR- $\beta$  induite par le PDGF, un volume de lysat cellulaire contenant entre 150 et 200  $\mu$ g de protéines a été dilué dans un volume final de 1 ml dans du tampon de lyse 1X (tel que définit ci-haut). Dans le but d'éliminer un maximum de contamination non spécifique, 20  $\mu$ l d'un mélange contenant 50 % de billes Protein A Sepharose™ et 50 % de billes Protein G Sepharose™ a été ajouté aux lysats puis ces derniers ont été incubés une heure à 4 °C sur une plaque sérologique à agitation réduite. Il est à noter, cependant, que ces billes se trouvaient elles-mêmes dans une solution contenant 50 % de billes et 50 % de PBS. Les lysats ont, par la suite, été centrifugés 2 minutes à 4500 rpm à 4°C, puis les surnageants ont été récupérés et transférés dans des nouveaux microtubes. Un à trois microgrammes d'anticorps spécifique anti-PDGFR ont été ajoutés aux lysats et,

finalement, ce mélange a été incubé toute la nuit à 4 °C sur une plaque sérologique à agitation réduite. Afin de récupérer les complexes immuns, 25 µl de billes Protein A Sepharose™ ont été ajoutés à chacun des échantillons et le tout a été mis de nouveau sous agitation douce à 4 °C pour une durée de 2 heures. Les complexes ont ensuite été récoltés par centrifugation de 2 minutes à 4500 rpm à 4 °C. Les protéines non-liées spécifiquement ont été éliminées à l'aide de 3 lavages successifs au tampon de lyse 1X. Finalement, un dernier lavage à l'aide d'une solution de PBS, sans Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>, contenant 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> a été effectué, puis 25 µl de tampon d'échantillon d'électrophorèse 2X de Laemmli (Laemmli, 1970) ont été ajoutés aux échantillons. Le tampon d'échantillon de Laemmli est composé de 62,5 mM Tris-HCL pH 6,8, 10 % glycérol, 2 % SDS, 5 % 2-mercaptoéthanol et 0,00625 % de bleu de bromophénol. Ces derniers ont ensuite été chauffés à 100°C, puis refroidis sur glace dans le but de décrocher les protéines immunoprécipitées des billes, avant de les charger sur un gel de type SDS-PAGE 7,5 % (voir sect. 2.2.6.6) à l'aide d'une seringue Hamilton.

#### 2.2.6.5 Préparation des lysats

Pour l'étude de la phosphorylation des protéines ERK et Akt, les échantillons ont été préparés de façon à obtenir une quantité constante de protéines (entre 10 et 15 µg) dans du tampon d'échantillon de Laemmli 5X, tel que décrit à la section 2.2.6.4, dans un volume final de 25 µl. Ces derniers ont ensuite été chauffés à 100°C, puis refroidis sur glace avant d'être déposés sur des gels d'électrophorèse SDS-PAGE.

#### 2.2.6.6 Électrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE)

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide SDS-PAGE (*Sodium dodecyl sulfate/polyacrylamide gel electrophoresis*) débute par la préparation de différents gels, tous de 1,5 mm d'épaisseur, mais de différents pourcentages d'acrylamide. D'abord, des gels de séparation contenant 10 % (p/v) d'acrylamide, 0,24 % (p/v) de N,N-méthylène-bis-acrylamide, 375 mM de Tris/HCl pH 8,8, 0,1 % de SDS, 1 µl/ml TEMED et de 0,5 mg/mL d'APS ont été utilisés pour la séparation des protéines ERK et Akt alors que des gels contenant 7,5 % (p/v) d'acrylamide, 0,18 % (p/v) de N,N-méthylène-bis-acrylamide, 375 mM

de Tris/HCl pH 8,8, 0,1 % de SDS, 1 µl/ml de TEMED et de 0,5 mg/ml d'APS ont été utilisés pour la séparation du récepteur PDGFR-β.

Les gels d'entassement ont tous été préparés de la même façon, soit 3,8 % (p/v) d'acrylamide, 0,1 % (p/v) N, N-méthylène-bis-acrylamide, 125 mM de Tris/HCl pH 6,8, 0,1 % de SDS, 1 µl/ml TEMED et de 0,5 mg/ml d'APS.

Pour les gels de séparation des protéines ERK et Akt, la migration a été effectuée à 100 V (voltage constant), dans un tampon d'électrophorèse contenant 19,2 mM de glycine, 2 mM de Tris et 0,01 % de SDS jusqu'à ce que le bleu de bromophénol atteigne la limite inférieure du gel; alors que pour les gels de séparation de la protéine PDGFR-β, la migration s'est poursuivie 10 minutes supplémentaires à 120 V, dans le but de bien la visualiser, car il s'agit d'une protéine de haut poids moléculaire (190 kDa). La séparation des protéines a été effectuée à l'aide des systèmes d'électrophorèse Mini-PROTEAN® III de chez Bio-Rad et les protéines ont été séparées selon leur poids moléculaire.

#### **2.2.6.7 Immunobuvardage de type Western**

Suite à la séparation des protéines par l'électrophorèse SDS-PAGE, ces dernières ont été transférées sur des membranes de PVDF de 0,45 µm de porosité à l'aide d'un transfert humide de type Western. Brièvement, les membranes ont été hydratées 1 minute dans le méthanol, puis 5 minutes dans l'eau avant d'être transférées, tout comme les gels, dans du tampon de transfert composé de 96 mM de glycine, 10 mM Tris, 20 % méthanol et 0,01 % de SDS. Le transfert des protéines a été effectué à 100 V (voltage constant) pendant 90 minutes à 4 °C à l'aide de l'appareil Mini Trans-Blot Cell de Bio-Rad Laboratories. Les membranes de PVDF ont ensuite été déposées dans une solution de TBS-Tween (un tampon Tris salin (TBS) contenant 150 mM NaCl, 20 mM Tris pH 7,5, 0,1 % (v/v) de Tween 20) additionné de 3 % de BSA pour les récepteurs PDGFR et la protéine ERK, ou de 5 % de lait pour la protéine Akt, pour la nuit, à 4 °C, avec une légère agitation afin de bloquer les sites non spécifiques.



#### 2.2.6.8 Immunodétection

Les membranes de PVDF, dont les sites non spécifiques ont été bloqués, ont ensuite été lavées trois fois pendant 15 minutes, à température ambiante avec une légère agitation, dans une solution de TBS-Tween (tel que décrit à la section précédente). Elles ont, par la suite, été incubées 1 heure à température ambiante avec agitation dans une solution de TBS-Tween contenant cette fois 3 % de BSA, 0,05 % (p/v) de  $\text{NaN}_3$  et un anticorps primaire spécifique dilué 1000 fois (anti-PDGFR- $\beta$  (958), anti-phospho-p44/42 MAPK (Thr 202/Tyr 204), anti-Akt (pan) et anti-phospho-Akt (Ser 473)). L'anticorps monoclonal anti-phosphotyrosine PY99 a été dilué 4 000 fois alors que l'anticorps anti-p44/42 MAPK, lui, a dû être dilué 10 000 fois. Les membranes ont ensuite été lavées à 4 reprises avec une solution de TBS-Tween, toujours pour des périodes de 15 minutes à la température de la pièce avec légère agitation, dans le but d'éliminer l'excédent d'anticorps qui ne s'était pas lié. Elles ont ensuite été mises en présence de l'anticorps secondaire de l'espèce appropriée (lapin ou souris) couplé à la peroxydase de raifort et dilué 1 dans 40 000 ou 1 dans 20 000, respectivement, dans une solution de TBS-Tween contenant 3 % de BSA pour une période de 1 heure à température ambiante avec agitation. Une autre série de lavages a ensuite été réalisée puis, finalement, les membranes ont été mises en présence du substrat ECL durant 1 minute. Afin de permettre la détection des protéines immunoréactives immobilisées sur les membranes, ces dernières ont été exposées sur un film radiologique Fuji Medical X-Ray 8X10. Les autoradiogrammes ainsi obtenus ont été numérisés à l'aide de l'appareil Epson Perfection 2450 Photo (Long Beach, CA, USA). La quantification des bandes a ensuite été réalisée à l'aide du logiciel *IPLab Gel Software Scientific Image Processing 2.0a* alors que les masses moléculaires ont été évaluées en utilisant les standards SDS-PAGE de Bio-Rad High Range ou Low Range, selon le cas, qui contiennent des protéines de poids moléculaire connues. Dans le but de procéder à une seconde détection sur ces mêmes membranes, ces dernières ont dû être incubées dans une solution de glycine 1X (0,2 M glycine-HCl à pH 2,2) durant toute une nuit à 4 °C avec une légère agitation. Le lendemain, elles ont été lavées à trois reprises, rapidement, avec de l'eau nanopure. Ensuite, une autre série de lavages au TBS-Tween a été effectuée, puis les membranes ont été incubées en présence d'un nouvel anticorps primaire. La suite de la procédure est identique à celle décrite ci-haut.

### 2.2.7 Zymographie gélatinolytique

Les cellules PASCs ont été mises en pétris de 100 mm dans du milieu complet SmGM®-2, puis elles ont été incubées à 37 °C dans une atmosphère humide contenant 5 % de CO<sub>2</sub> jusqu'à ce qu'elles atteignent une confluence de 85-90 %. Le milieu a été retiré et remplacé par du milieu basal SmBM contenant, sauf pour les contrôles, les différents flavones à des concentrations finales variant de 1 µM à 25 µM pour une période de 18 à 20 heures. À la suite de ce traitement, le milieu de culture a été récupéré puis centrifugé 3 minutes à 1000 rpm, dans le but d'enlever tous les débris cellulaires. Finalement, les surnageants ont été aliquotés (1 ml) puis conservés à -80 °C jusqu'à leur utilisation.

Les échantillons ont été préparés avec une quantité constante de milieu conditionné et du tampon d'échantillon de Laemmli sans β-mercaptoéthanol, soit en condition dénaturante et non réductrice, puis ils ont été agités pendant 15 minutes à 25 °C. Les échantillons ont ensuite été déposés sur des gels de polyacrylamide de 7,5 % (tel que décrit à la section 2.2.6.2), mais contenant 0,1 % (p/v) de gélatine. L'électrophorèse a été effectuée à un voltage constant de 100 V dans un tampon d'électrophorèse contenant 19,2 mM de glycine, 2 mM de tris et 0,01 % de SDS (p/v) jusqu'à ce que le bleu de bromophénol atteigne la limite inférieure du gel. Suite à cette étape, les gels ont été équilibrés 2 fois durant 30 minutes à température ambiante avec agitation réduite dans une solution contenant 2,5 % (p/v) de Triton X-100, puis rincés 5 fois avec de l'eau nanopure. Les MMPs ont ensuite été renaturées à l'aide d'une incubation de 20 heures à 37 °C dans un tampon de zymographie contenant 50 mM Tris-HCl pH 7,6, 0,2 M NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub> et 0,02 % (v/v) Brij-58. Les gels ont ensuite été fixés 1 heure dans un mélange 30% (v/v) méthanol et 7,5 % (v/v) acide acétique, puis ils ont été successivement colorés et décolorés avec une solution de 0,1 % (p/v) de bleu brillant de Coomassie R-250 dans 30 % de méthanol et 10 % d'acide acétique et une solution de 30 % (v/v) méthanol et 7,5 % (v/v) acide acétique, respectivement. L'activité gélatinolytique correspond aux bandes non colorées (zones où les MMPs ont digéré la gélatine) sur fond bleu. La bande de dégradation associée à la proMMP-2 humaine apparaît aux environs de 72 kDa. Les gels, une fois colorés, ont été numérisés à l'aide de l'appareil ImageScanner chez Amersham Biosciences (Baie-d'Urfé, QC, Canada). L'activité de la proMMP-2

humaine a pu, par la suite, être déterminée en mesurant la densité des bandes à l'aide du logiciel *IPLab Gel Software Scientific Image Processing 2.0a*. Finalement, dans le but de conserver les gels, ceux-ci ont été séchés entre deux membranes de cellophane.

### 2.2.8 *Test d'implant de Matrigel™*

L'utilisation des animaux d'expérimentation s'est déroulée en accord et selon les normes et directives établies par le CCPA (Conseil canadien de protection des animaux). De plus, dans le but d'obtenir des résultats statistiquement significatifs, quatre souris ont été nécessaires pour chacun des quatre groupes de conditions différentes (témoin, FGF-2+VEGF, FGF-2+VEGF + Api, FGF-2+VEGF+Lut), et chacune des souris avait deux implants.

Les tests d'implants de Matrigel™ sont basés sur la méthode de Passanti (1987) avec quelques modifications. D'abord, l'héparine (concentration finale 0,0025 U/ml) est incubée en présence, ou en absence selon les conditions désirées, de FGF-2 (250 ng/ml finale) et de VEGF<sub>165</sub> (200 ng/ml finale) pendant 5 minutes à température ambiante. Les molécules à tester, ou leur vecteur, dans ce cas-ci le DMSO, sont ensuite ajoutés (25 ou 50 µM), puis ce mélange est complété à 700 µl avec du phenol-red free Matrigel™ sur glace. Enfin, 500 µl de cette solution sont ensuite injectés sur les deux flancs, pour une même condition, d'une souris Crl:CD1<sup>®</sup> Foxn1nu femelle anesthésiée à l'isoflurane (2 %/1L O<sub>2</sub>). Après douze jours, les souris ont été sacrifiées par inhalation de gaz (mélange O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>) et les implants ont été prélevés, lavés à l'aide de PBS sans Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup> froid, photographiés avec une caméra digitale Nikon Coolpix™ 5000, puis congelés à -80 °C pour les tests d'Hb ou encore conservés dans une solution de formaline-phosphate 10 % à l'abri de la lumière pour permettre la visualisation des microvaisseaux ou les coupes et colorations histologiques.

### 2.2.9 *Visualisation de la néovascularisation des implants*

Dix minutes avant le sacrifice des souris, 200 µl d'une solution à 25 mg/ml de FITC-Dextran (High molecular weight (HMW, 250-kDa) *fluorescently labeled FITC-dextran*) de Sigma Chemical (St. Louis, MO, USA) ont été injectés dans la veine de queue d'une souris,

déterminée aléatoirement, pour chacun des groupes de conditions différentes. Les implants ont ensuite été conservés dans un tube ambré jusqu'à ce qu'ils soient transférés dans un pétri, puis photographiés sous un microscope à fluorescence (excitation : 490 nm et émission : 520 nm (fluorescence verte)) à l'aide du programme d'analyse d'image Northern Eclipse 5,0.

#### ***2.2.10 Dosage de l'hémoglobine***

Les implants de Matrigel™ ont été tout d'abord congelés 1 heure à -80 °C avant d'être lyophilisés toute une nuit. Le lendemain, ces derniers ont été pesés, puis réduits en poudre et resuspendus dans 400 µl d'une solution de 0,1 % Triton X-100. Ils ont ensuite été incubés 1 heure, à température ambiante avec agitation, puis centrifugés à 14 000 g durant 15 minutes. Le surnageant a, par la suite, été recueilli dans un nouveau microtube. Une courbe standard d'hémoglobine a été réalisée et, ainsi, la concentration en hémoglobine des implants a pu être déterminée en mesurant l'absorbance à 405 nm à l'aide d'un lecteur de microplaque Molecular Devices (SpectraMax Plus). Cette concentration est exprimée en µg d'Hb/mg d'implants lyophilisés.

#### ***2.2.11 Coupes et colorations histologiques***

Les coupes et colorations histologiques des différents implants ont été réalisées par l'équipe du Dr Hervé Sartelet de l'Hôpital Sainte-Justine. Il s'agit d'une coloration standard à l'hématoxyline/éosine/safran.

#### ***2.2.12 ELISA***

Les cellules PSMCs ont été mises en pétris de 100 mm dans du milieu complet SmGM<sup>®</sup>-2, puis elles ont été incubées à 37 °C dans une atmosphère humide contenant 5 % de CO<sub>2</sub> jusqu'à ce qu'elles atteignent une confluence de 85-90 %. Le milieu a été retiré et remplacé par du milieu basal SmBM additionné de FBS 1 % et contenant, sauf pour les contrôles, les différents flavonoïdes à une concentration finale de 15 µM pour une période de 2 heures. L'ajout du FBS est nécessaire à la stabilité et à la conservation du VEGF. À la suite

de ce traitement, les cellules ont été stimulées, ou non, pendant différents temps variant de 1 heure à 24 heures, à 37°C, avec du PDGF-BB à 20 ng/ml. Ensuite, le milieu de culture a été récupéré, puis centrifugé 3 minutes à 1000 rpm, dans le but d'enlever tous les débris cellulaires. Finalement, les surnageants ont été aliquotés (1 ml), puis conservés à - 80 °C jusqu'à leur utilisation.

La concentration de VEGF contenue dans le milieu conditionné a été déterminée à l'aide d'un test ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) dit de type « Sandwich » avec la trousse Quantikine<sup>®</sup> Human VEGF Immunoassay de chez R&D Systems Inc. (Minneapolis, MN, USA). En bref, 200 µl du milieu conditionné ont été déposés dans une microplaque de 96 puits, qui avait préalablement été sensibilisée par le manufacturier avec des anticorps spécifiques au VEGF humain, à laquelle on avait ajouté 50 µl par puits de réactif pour dilution, tel qu'indiqué dans les instructions du fabricant. Par la suite, la plaque a été incubée 2 heures à la température de la pièce. Ainsi, si l'échantillon contient des antigènes, soit du VEGF, ceux-ci réagissent avec les anticorps primaires fixés à la plaque pour former des complexes antigène-anticorps (Kindt *et al.*, 2007). Trois lavages ont ensuite été effectués, à l'aide de la solution de lavage fournie, dans le but d'éliminer toute substance qui ne s'était pas liée aux anticorps. Puis, 200 µl d'une solution contenant des anticorps secondaires liés à une enzyme (peroxydase de raifort) ont été ajoutés dans chacun des puits et la plaque a été incubée pour 2 heures à température ambiante. Les anticorps secondaires réagissent avec un épitope différent des antigènes fixés aux anticorps primaires. Ensuite, trois autres lavages ont été effectués, puis 200 µl d'une solution préparée selon les recommandations du fabricant et contenant un substrat chromogène ont été ajoutés dans chacun des puits, puis la plaque a été incubée 20 minutes à la température de la pièce et à l'abri de la lumière. Les enzymes liées aux anticorps secondaires vont cliver le substrat ce qui va générer un produit coloré et l'intensité de la couleur de ce produit, après l'ajout de 50 µl de la solution d'arrêt fournie dans la trousse, pourra être mesurée par spectrophotométrie. La quantité d'antigènes, VEGF, pourra donc être évaluée par mesure de la densité optique, puisque celle-ci est proportionnelle à la quantité d'enzymes présentes, qui est elle-même proportionnelle à la quantité d'antigènes fixés (Male, 2005). Cette technique est extrêmement sensible et permet la détection d'antigènes (VEGF) à des concentrations très faibles, soit de l'ordre du

picogramme. La concentration en VEGF des milieux conditionnés a donc pu être déterminée en mesurant d'abord l'absorbance à 450 nm, avec un facteur de correction à 540 nm, à l'aide d'un lecteur de microplaque Molecular Devices (SpectraMax Plus), puis l'équation de la courbe standard a ensuite permis de déterminer la concentration de VEGF contenue dans les échantillons.

## CHAPITRE III

### RÉSULTATS

#### 3.1 LA MIGRATION CELLULAIRE

Lors de l'angiogenèse tumorale, les cellules musculaires sont appelées, par les cellules endothéliales qui sécrètent du PDGF-BB, à aller stabiliser le néovaisseau, tel que décrit en introduction (voir fig. 1.10). Pour y parvenir, elles doivent migrer en direction de ce dernier. L'essai de migration cellulaire en chambre de type Boyden offre la possibilité de reproduire *in vitro* cette migration cellulaire et, par conséquent, de vérifier si les flavonoïdes sont capables de l'inhiber.

##### 3.1.1 Efficacité des flavonoïdes pour inhiber la migration des PSMCs

La première étape du projet consistait donc à évaluer l'efficacité des flavonoïdes pour inhiber la migration des PSMCs. Pour ce faire, des tests de migration cellulaire ont été réalisés, tel que décrit dans la section matériel et méthodes, en utilisant comme témoin le Gleevec, qui est un inhibiteur synthétique utilisé dans le traitement de certains cancers, comme la leucémie myéloïde chronique (Ault, 2007) et les tumeurs du stroma gastrointestinal (Rubin, Heinrich et Corless, 2007), et dont les mécanismes d'action incluent l'inhibition du récepteur au PDGF. Tout d'abord, l'effet du Gleevec et des flavonoïdes à 5  $\mu$ M sur la migration des PSMCs a été mesuré (fig. 3.1). Sur cette figure, on observe premièrement qu'il y a induction de la migration par le chimioattractant et que le Gleevec (Gle) peut néanmoins l'inhiber avec un pourcentage d'inhibition de 99 %. On constate également que les flavonoïdes, kaempférol (Kae), lutéoline (Lut), myricétine (Myr) et apigénine (Api), sont

capables d'inhiber cette migration avec un pourcentage d'inhibition respectif de 22 %, 75 %, 84 % et 95 %. On remarque ainsi qu'une molécule d'origine naturelle comme l'apigénine a un effet inhibiteur aussi efficace qu'un composé synthétique utilisé en clinique comme le Gleevec. Mentionnons que les flavonoïdes n'ont aucun effet inhibiteur sur la migration basale des PSMCs confirmant ainsi qu'ils agissent sur le PDGF (fig. 3.2). Pour connaître les détails de la formule utilisée pour calculer le pourcentage d'inhibition, il faut se référer à l'appendice A.

### ***3.1.2 Inhibition par les flavonoïdes de la migration des PSMCs induite par le PDGF-BB***

Dans le but de déterminer la concentration requise afin d'obtenir 50 % d'inhibition ( $IC_{50}$ ), d'autres tests de migration cellulaire ont été réalisés pour chacun des flavonoïdes, mais cette fois en utilisant des concentrations croissantes (fig. 3.3 et 3.4). On observe d'abord que les effets obtenus sont dépendants de la concentration de flavonoïdes qui est employée.

On remarque ensuite que chez les flavonols les  $IC_{50}$  sont très différentes. Sur la figure 3.3, on voit que kaempférol et myricétine inhibent la migration des PSMCs de 50 % à une concentration de 9  $\mu$ M et 1  $\mu$ M, respectivement, et que l'on retrouve un niveau basal de migration à 15  $\mu$ M pour kaempférol et 7,5  $\mu$ M pour myricétine. La situation pour les deux flavones semble être beaucoup plus similaire. On obtient une inhibition de 50 % de la migration à 2,0  $\mu$ M et 1,5  $\mu$ M pour apigénine et lutéoline, respectivement. Le retour au niveau basal est observé à 7,5  $\mu$ M pour apigénine et 10  $\mu$ M pour lutéoline.

## **3.2 L'INVASION CELLULAIRE**

Cette méthode consiste à évaluer le potentiel invasif des cellules musculaires lisses. L'adjonction d'une couche de Matrigel™ sur le filtre de séparation d'une chambre de Boyden permet d'observer le processus d'invasion puisque les cellules doivent alors digérer et traverser le gel.



Le Matrigel™ est un gel constitué par la membrane basale solubilisée d'une lignée carcinomateuse de souris (Kleinman *et al.*, 1982) et il contient donc diverses protéines provenant de la matrice extracellulaire (MEC), protéines qui doivent être dégradées durant l'angiogenèse. On y retrouve principalement de la laminine, du collagène de type IV, de l'héparan-sulfate, de l'entactine et des protéoglycannes (Grant *et al.*, 1991).

### **3.2.1 Inhibition par les flavonoïdes de l'invasion des PSMCs induite par le PDGF-BB**

Pour étudier ce phénomène, des PSMCs ont étéensemencées dans les chambres supérieures de migration, recouvertes de Matrigel™ 0,5 mg/ml, à raison de 50 000 cellules par chambre. Après une incubation de 2 heures en présence des différents flavonoïdes, le chimioattractant, soit le PDGF-BB, a été ajouté dans la chambre inférieure et l'incubation s'est poursuivie 24 heures.

Les figures 3.5 et 3.6 présentent l'effet des flavonoïdes sur l'invasion des PSMCs induite par le PDGF-BB. De prime abord, on remarque que les effets obtenus sont dépendants de la concentration de flavonoïdes qui est employée, comme c'était le cas pour la migration.

On observe que kaempférol et myricétine inhibent l'invasion de 50 % à des concentrations de 2,6  $\mu\text{M}$  et 0,93  $\mu\text{M}$ , respectivement, et que l'on retrouve un niveau basal d'invasion à 15  $\mu\text{M}$  pour kaempférol et à 5  $\mu\text{M}$  pour myricétine. Sur la figure 3.6, on note qu'il y a une inhibition de 50 % de l'invasion à une concentration d'apigénine de 3,2  $\mu\text{M}$  et à 1,8  $\mu\text{M}$  pour lutéoline. Le retour au niveau basal s'effectue lorsque l'on emploie des concentrations de 15  $\mu\text{M}$  dans les deux cas.

## **3.3 ÉTUDE DES MARQUEURS MOLÉCULAIRES**

L'angiogenèse consiste en l'orchestration d'une multitude de phénomènes de manière ordonnée et finement régulée, tel qu'expliqué précédemment. Durant tous ces processus, il y a sécrétion de nombreux facteurs de croissance qui vont déclencher plusieurs cascades

moléculaires. L'étude des marqueurs moléculaires consiste notamment en l'analyse de la phosphorylation des protéines impliquées dans ces différentes cascades.

Les flavonoïdes sont déjà très connus pour plusieurs de leurs actions biologiques, par exemple pour leur pouvoir antioxydant ou encore leur capacité à inhiber l'agrégation des plaquettes. Cette étape du projet visait à déterminer si les effets observés lors des tests de motilité cellulaire, migration et invasion, étaient dus à une action des flavonoïdes sur le système PDGF/PDGFR- $\beta$  et les différentes protéines de signalisation qu'il active.

### *3.3.1 Effets des flavonoïdes sur la phosphorylation du récepteur PDGFR- $\beta$*

La première étape de l'étude des marqueurs moléculaires consistait donc inévitablement en la vérification des effets des flavonoïdes sur la phosphorylation du récepteur PDGFR- $\beta$ .

La figure 3.7 (A) présente la mise en évidence de la phosphorylation du récepteur ainsi que le récepteur lui-même. On note d'abord qu'il y a induction de la phosphorylation lorsqu'on stimule les PSMCs avec du PDGF-BB (50 ng/ml) durant 5 minutes. On observe, par la suite, qu'il y a une diminution de cette phosphorylation du récepteur PDGFR- $\beta$  lorsque les cellules sont traitées avec les flavones, lutéoline et apigénine, et que ces traitements n'affectent pas l'expression de la protéine PDGFR- $\beta$ .

Afin de caractériser davantage l'action de ces flavones sur la phosphorylation du récepteur, d'autres tests ont été réalisés, mais cette fois avec des concentrations croissantes de lutéoline et d'apigénine pour permettre la détermination de la concentration nécessaire à l'obtention d'une inhibition de 50 % de la phosphorylation (l' $IC_{50}$ ). La figure 3.7, en B et en C, présente les résultats obtenus ainsi que leurs quantifications. On observe que les effets obtenus sont dépendants de la concentration de flavonoïdes qui est employée, comme c'était le cas pour la migration et l'invasion. La quantification des bandes permet de déterminer que l' $IC_{50}$  pour l'apigénine est de 9  $\mu$ M alors qu'elle est de 8.5  $\mu$ M pour la lutéoline.

### 3.3.2 Effets des flavonoïdes sur des protéines impliquées dans la signalisation cellulaire

La liaison du PDGF-BB au PDGFR- $\beta$  induit l'activation de molécules intracellulaires impliquées dans différentes cascades de signalisation. La protéine kinase ERK et la protéine kinase B (ou Akt) font partie des principales protéines activées par la stimulation des PSMCs à l'aide du PDGF. C'est d'ailleurs ce que l'on peut observer en A et en B sur la figure 3.8 qui présentent les résultats obtenus pour l'étude de la phosphorylation de ces différentes protéines. Sur chacune d'entre elles on peut constater qu'il y a induction de la phosphorylation, donc activation, des différentes protéines lors de la stimulation au PDGF-BB. Ensuite, on remarque qu'en présence de l'apigénine et de la lutéoline cette phosphorylation est inhibée alors qu'elle n'est pas influencée par la présence du kaempférol ou de la myricétine. Dans tous les cas, le niveau endogène d'expression des protéines n'est pas affecté confirmant ainsi que les flavonoïdes inhibent seulement la phosphorylation et n'ont pas l'expression de ces protéines.

Les flavones, apigénine et lutéoline, semblent donc une fois encore être les plus actives. Afin de mieux cerner l'action de ces flavones sur la phosphorylation des différentes protéines, d'autres tests ont été réalisés à l'aide de concentrations croissantes. De cette façon, il fut possible de déterminer la concentration nécessaire à l'obtention d'une inhibition de 50 % de la phosphorylation des protéines ERK et Akt (l' $IC_{50}$ ). Les figures 3.9 à 3.12 présentent les résultats obtenus lors de ces tests ainsi que leur quantification. Sur ces figures, il est possible de constater en tout premier lieu, qu'une fois de plus, les effets obtenus sont dépendants de la concentration de flavones qui a été employée, et ce, peu importe qu'il s'agisse de la phosphorylation de la protéine ERK ou de la protéine Akt. Pour l'inhibition de la phosphorylation de la protéine ERK, on obtient une  $IC_{50}$  de 7  $\mu$ M pour l'apigénine et de 7,75  $\mu$ M pour lutéoline, alors que pour la protéine Akt, on obtient respectivement une  $IC_{50}$  de 7 et 9  $\mu$ M.

### 3.4 ZYMOGRAPHIE GÉLATINOLYTIQUE

Les protéases solubles ont un rôle crucial durant le processus d'angiogenèse. Ce sont elles qui vont dégrader la matrice extracellulaire et la membrane basale pour permettre aux cellules endothéliales et périvasculaires de se déplacer, par migration ou invasion, en direction de la tumeur. Les MMPs, ou métalloprotéases de la matrice extracellulaire, font partie des ces protéases solubles. La zymographie est une technique qui permet de localiser une protéine par son activité enzymatique. Plus particulièrement, la zymographie gélatinolytique nous a permis de mesurer l'activité gélatinolytique présente dans les milieux de culture des cellules PSMCs, selon une méthode décrite précédemment (Frederiks et Mook, 2004; Snoek-van Beurden et Von den Hoff, 2005). Brièvement, les protéines contenues dans les différents milieux de culture ont été déposées sur un gel SDS/PAGE auquel de la gélatine avait été incorporée durant la polymérisation. De cette façon, la gélatine est encapsulée dans le gel et elle ne peut migrer. Après la migration des échantillons contenant probablement des MMPs, une période d'incubation permet la renaturation des protéines, puis l'expression de leur activité protéolytique. Bien que, normalement, les formes zymogènes des MMPs ne soient pas actives, le processus de zymographie, par des étapes de dénaturation et de renaturation, leur confère une conformation particulière, qui empêche le pro-peptide de revenir bloquer le site actif, ce qui les rend actives et qui offre, par conséquent, la possibilité de visualiser leur activité gélatinolytique en zymographie (Springman *et al.*, 1990). Ainsi, les MMPs peuvent dégrader la gélatine et il ne reste plus qu'à colorer le gel, car l'absence de coloration révélera les endroits où il y a eu dégradation de la gélatine et donc présence de MMPs.

#### 3.4.1 Effets des flavones sur la sécrétion de MMPs par les PSMCs

Afin de mesurer l'activité gélatinolytique des MMPs humaines sécrétées dans le milieu de culture de cellules PSMCs incubées en présence de concentrations croissantes de flavones, une zymographie en présence de gélatine a été réalisée. La figure 3.13 (A) présente les résultats obtenus lors de ce test. Une seule activité gélatinolytique a été observée à un poids moléculaire de 72 kDa, ce qui correspond à la forme inactive de la MMP-2, soit la proMMP-2. La forme activée, retrouvée normalement à 62 kDa, n'a pas été observée, pas

plus d'ailleurs que les formes active et inactive de la MMP-9. Il est possible de constater que la présence de concentrations croissantes d'apigénine dans le milieu de culture n'influence pas la sécrétion de la proMMP-2 par les PSMCs. En revanche, la lutéoline, elle, réussit à inhiber cette sécrétion et ce, en fonction des concentrations qui ont été utilisées. Dans le but d'identifier l'IC<sub>50</sub>, l'activité gélatinolytique de la proMMP-2 a, par la suite, été quantifiée par analyse densitométrique. Les résultats de la quantification, présentés sous forme de graphique à la figure 3.13 (B), permettent de déterminer que la concentration nécessaire à une inhibition de 50 % de la sécrétion de la proMMP-2, par la lutéoline, est de 17 µM.

### 3.5 SÉCRÉTION DU VEGF

Les cellules périvasculaires sont essentielles à la maturation vasculaire. Comme il l'a été présenté en introduction, le contact entre cellules qu'elles établissent avec les cellules endothéliales du néovaisseau contribue à la stabilisation de ces dernières. Or, outre la stabilisation par le contact, les cellules périvasculaires vont également sécréter du VEGF pour protéger la structure endothéliale de la rupture et de la régression. Il était donc intéressant d'aller vérifier si les flavonoïdes influençaient cette sécrétion.

#### 3.5.1 *Inhibition par les flavones de la sécrétion de VEGF par les PSMCs*

La figure 3.14 présente les résultats obtenus lors du dosage, à l'aide d'un test ELISA, de la concentration en VEGF des milieux conditionnés de cellules PSMCs incubées en présence des flavones et stimulées au PDGF-BB. De prime abord, ce graphique montre qu'il y a une induction hautement significative par rapport au témoin non stimulé, de la sécrétion du VEGF chez les PSMCs induite par le PDGF-BB. Deuxièmement, cet histogramme permet de mettre en évidence l'inhibition de cette induction par la lutéoline et l'apigénine à 15 µM. On estime que grâce à la lutéoline on obtient une inhibition de 55 % de la sécrétion de VEGF alors que l'apigénine permet de retourner à un niveau basal de sécrétion avec un pourcentage d'inhibition de 96 % (voir appendice A pour les détails concernant les calculs du pourcentage d'inhibition).

### 3.6 ESSAI DE VIABILITÉ

Toutes les cultures de cellules humaines normales, c'est-à-dire qui ne sont pas cancéreuses, connaissent une série de divisions cellulaires avant d'arriver à un point où la probabilité de compléter le cycle cellulaire devient très faible. Ainsi, après un certain nombre de divisions cellulaires, appelées aussi générations, elles cessent de se multiplier, acquièrent un phénotype sénescent et finissent par mourir. Il est donc tout à fait normal d'observer un niveau basal de mortalité cellulaire chez des cellules en culture. Toutefois, il était primordial de nous assurer que les effets observés *in vitro* lors des différents tests ne résultaient pas d'une toxicité cellulaire qui aurait été induite par la présence des flavonoïdes. Par conséquent, nous avons réalisé des tests de viabilité cellulaire au bleu de trypan afin de déterminer la viabilité cellulaire.

#### 3.6.1 Effets des flavonoïdes les plus actifs sur la viabilité des PSMCs

Pour y parvenir, des cellules PSMCs ont étéensemencées dans des pétris de 60 mm, puis incubées en présence, ou en absence, d'apigénine et de lutéoline à des concentrations finales de 15 et 25  $\mu\text{M}$  dans du milieu SmBM<sup>®</sup> contenant du FBS 0,5 %, et ce, pour une période de 24 heures. Les cellules adhérentes au pétri ont été récoltées par trypsinisation, puis combinées aux cellules flottantes récupérées dans le milieu de culture. Leur viabilité a, par la suite, été déterminée à l'aide d'un test d'exclusion au bleu de trypan.

Sur la figure 3.15, on remarque, en premier lieu, que peu importe les conditions, la viabilité cellulaire dépasse les 75 %. En effet, on obtient 12 % de mortalité cellulaire pour le témoin alors que pour les cellules traitées la mortalité est de 15 % en présence d'apigénine et de 17 % en présence de lutéoline. Ces faibles augmentations par rapport au témoin ne sont pas considérées comme étant significatives. Des observations similaires ont été observées à 25  $\mu\text{M}$  où 18 % et 24 % de mortalité cellulaire ont été obtenus chez les cellules des groupes traités à l'apigénine et la lutéoline, respectivement. À ces concentrations, la lutéoline semble être très faiblement toxique par rapport à l'apigénine.

### 3.7 ÉTUDES *IN VIVO*

La figure 3.16 présente les résultats obtenus lors des tests d'implantation de Matrigel™ réalisés chez des souris (Crl:CD1<sup>®</sup> Foxn1nu) selon la procédure décrite dans la section matériel et méthodes. Brièvement, des facteurs de croissance tels que le bFGF (ou FGF-2) et le VEGF sont introduits dans une solution liquide de Matrigel, qui, après avoir été implantée chez l'animal de manière sous-cutanée, se solidifie pour former un implant qui sera vascularisé par les cellules de l'hôte. Douze jours plus tard, l'implant a été excisé, puis photographié, et on a ensuite procédé à l'évaluation de la néoangiogenèse selon diverses techniques, comme la coloration des vaisseaux au FITC-dextran, des coupes et des colorations histologiques et la quantification du contenu en hémoglobine de l'implant.

#### 3.7.1 *Inhibition par les flavones de l'angiogenèse in vivo*

Sur la figure 3.16, en A, on retrouve les photographies des différents implants de Matrigel™ représentant chacune des conditions distinctes, alors qu'en B, on retrouve celles des vaisseaux sanguins marqués au FITC-dextran, réalisées à l'aide d'un microscope à fluorescence à un grossissement de 50X. Finalement, les coupes histologiques des implants colorés à l'aide d'une coloration de type hématoxyline/éosine/safran sont montrées en C à un grossissement de 200X. Dans chacun des cas, toutes les photos présentées étaient les plus représentatives de celles obtenues et réalisées sur un échantillon statistiquement significatif.

##### 3.7.1.1 *Analyse macroscopique des implants*

En premier lieu, l'observation de l'aspect extérieur des différents implants en A, permet de constater que celui ne contenant aucun facteur de croissance (témoin) ne présente pas de coloration rosée. Toutefois, on remarque que l'addition de FGF-2 et de VEGF induit une forte néovascularisation, tel que démontré par l'apparition de la couleur rouge, et que la présence des flavones, apigénine et lutéoline, semble néanmoins pouvoir l'inhiber.

### 3.7.1.2 *Marquage des vaisseaux sanguins au FITC-dextran*

Les résultats obtenus en B corroborent ces premières observations visuelles, c'est-à-dire que l'on peut distinguer la présence d'un capillaire sanguin mature comportant de nombreux embranchements et ramifications dans l'implant où l'angiogenèse a été induite à l'aide du FGF-2 et du VEGF. De plus, il est à noter que cette procédure permet d'identifier la présence de réseaux de capillaires fonctionnels, puisque pour qu'un capillaire soit marqué avec le colorant, celui-ci doit être connecté à la circulation sanguine active et perfusé par cette dernière (Ozerdem et Stallcup, 2003). Ceci abonde donc dans le sens de la présence d'un réseau fonctionnel dans cet implant. Normalement, le FITC-dextran est rapidement distribué partout dans la circulation sanguine et demeure à l'intérieur des vaisseaux pour plusieurs heures (D'Amato, Wesolowski et Smith, 1993). C'est ce que l'on peut constater sur cette photo, le FITC est demeuré contenu à l'intérieur du réseau de capillaires, ce qui nous permet de bien le discerner.

Il n'est cependant pas possible de distinguer le même type de réseau dans les implants qui contenaient des flavones, qu'il s'agisse d'apigénine ou de lutéoline. On voit sur les photographies que les vaisseaux sont beaucoup plus courts, sans ramifications et ne semblent pas être matures. De plus, le FITC-dextran semble avoir diffusé à l'intérieur de l'implant, au lieu de demeurer dans la circulation, ce qui peut laisser croire que les capillaires ne sont pas complètement fonctionnels et présentent des signes de perturbations tels des discontinuités, des interruptions et même des ruptures qui ont permis au colorant de fuir des capillaires. Dans l'implant témoin aucun capillaire n'a pu être observé.

### 3.7.1.3 *Colorations et coupes histologiques*

Finalement, les images présentées en C sont celles obtenues des coupes histologiques des implants, colorés à l'aide d'une coloration de type hématoxyline/éosine/safran, réalisées par le Dr Hervé Sartelet, médecin au département de pathologie du CHU Sainte-Justine, et son équipe. Sur ces images la présence de petits capillaires sanguins est indiquée par une flèche.



La coloration à l'hématoxyline/éosine/safran (HES) est une coloration de routine dite trichromique, c'est-à-dire que dans une première phase, la chromatine contenue dans les noyaux cellulaires est colorée avec une solution d'hématoxyline, et les noyaux apparaissent donc bleus, violet foncé ou noirs. Ensuite, il y a une phase de contre-coloration à l'aide d'un colorant au xanthène (éosine ou érythrosine B). Le cytoplasme, le collagène, la kératine et les érythrocytes sont alors colorés en rouge. Quant au safran, c'est un colorant naturel anionique capable de se fixer sur des structures acidophiles lâches telles que les fibres de collagène, leur donnant alors une coloration jaune. Ce type de coloration permet la mise en évidence des noyaux et du cytoplasme des cellules ainsi que des fibres de collagène (Grignon, 2003).

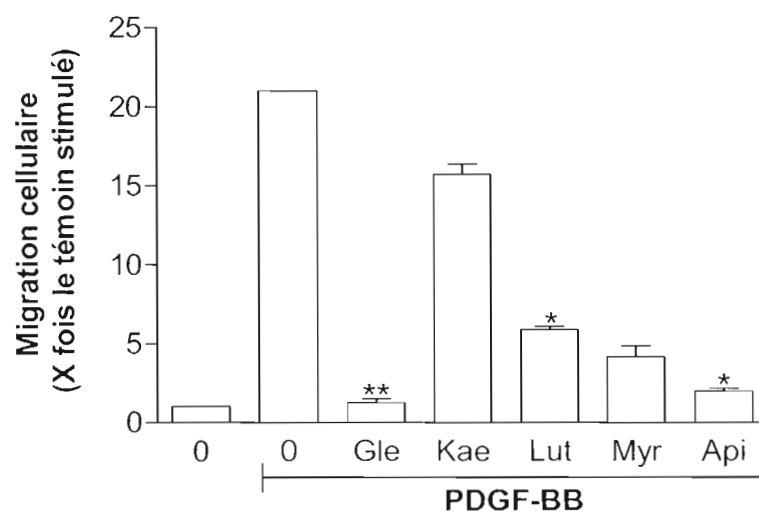
Sur les images, la combinaison de l'éosine et du safran donne une coloration rosée au Matrigel™ alors que l'hématoxyline colore les hématies en rouge ou fuchsia et les noyaux cellulaires en bleu foncé ou violet. Ainsi, un point bleu ou violet signale la présence d'une cellule et, bien qu'un marquage cellulaire spécifique n'ait pas été effectué, il est possible de déduire, d'après leur localisation et leur morphologie, de quel type cellulaire il s'agit.

On constate, de prime abord, que pour l'implant ne contenant aucun facteur de croissance (témoin), aucune structure capillaire n'a été détectée. Toutefois, on remarque la présence de points violets qui indique qu'il y a des cellules et, d'après la morphologie et la localisation de ces dernières, on peut penser qu'il s'agit de fibroblastes. On remarque, ensuite, comme c'était le cas lors de l'observation macroscopique des implants, que l'addition de FGF-2 et de VEGF induit une forte néovascularisation que la présence des flavones, apigénine et lutéoline, inhibe. On distingue en effet sur la coupe histologique de l'implant où l'angiogenèse a été induite à l'aide du FGF-2 et du VEGF, la présence de 4 capillaires sanguins, bordés par des cellules endothéliales et contenant des hématies. Dans l'implant contenant de l'apigénine on a relevé la présence de 2 petits capillaires alors qu'aucune structure capillaire n'a été détectée dans l'implant qui contenait de la lutéoline. Néanmoins, on peut noter la présence de cellules de morphologie un peu plus allongée et triangulaire, probablement des fibroblastes, à l'intérieur du Matrigel™, et ce, pour chacun des implants. Il faut mentionner cependant qu'on ne peut comparer directement le nombre de vaisseaux contenus dans les implants traités à

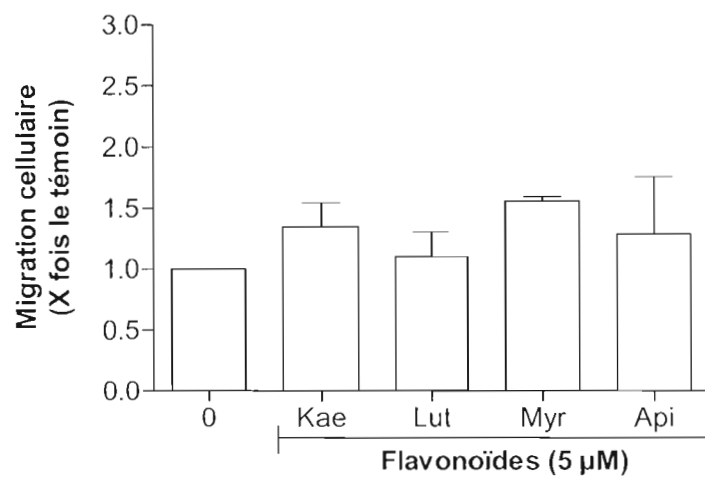
l'apigénine versus à la lutéoline, car la concentration de ces composés dans les implants est différente. En effet, à 25  $\mu\text{M}$  aucun effet de la lutéoline n'a été observé sur la néovascularisation comparativement à l'apigénine.

### **3.7.2 Quantification de l'angiogenèse**

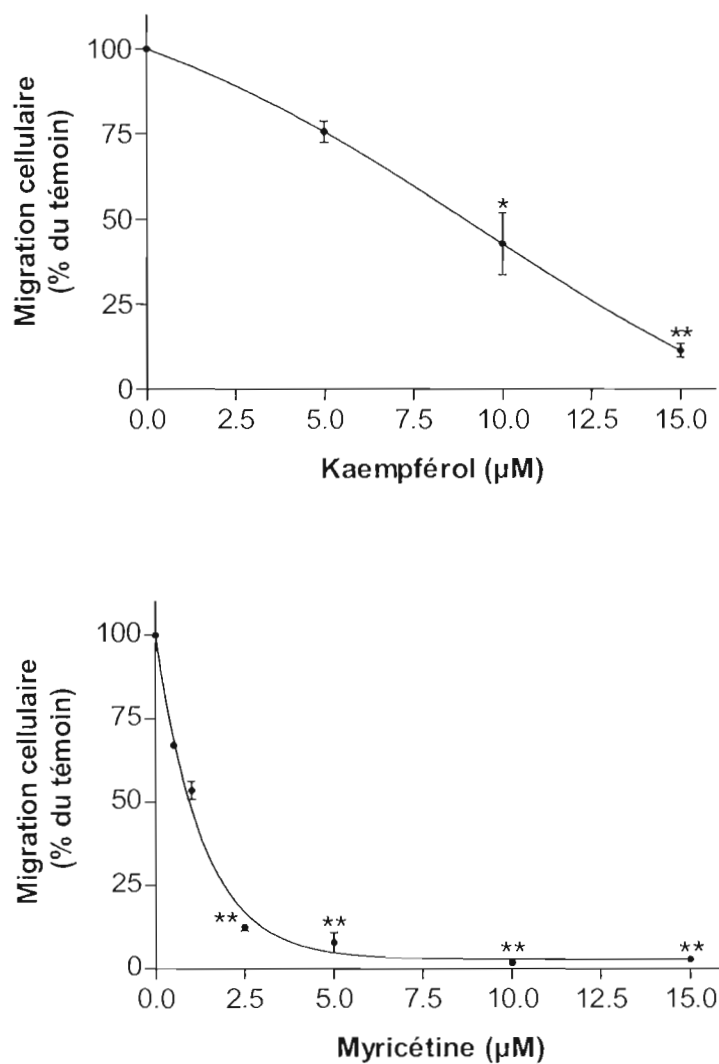
La quantification du niveau d'hémoglobine (Hb) dans chacun des implants permet d'évaluer de manière quantitative la néovascularisation induite par l'angiogenèse. La figure 3.17 montre que dans les implants contenant des flavones, l'angiogenèse a été inhibée à plus de 63 % par l'apigénine à 25  $\mu\text{M}$  et 84 % par la lutéoline à 50  $\mu\text{M}$ .



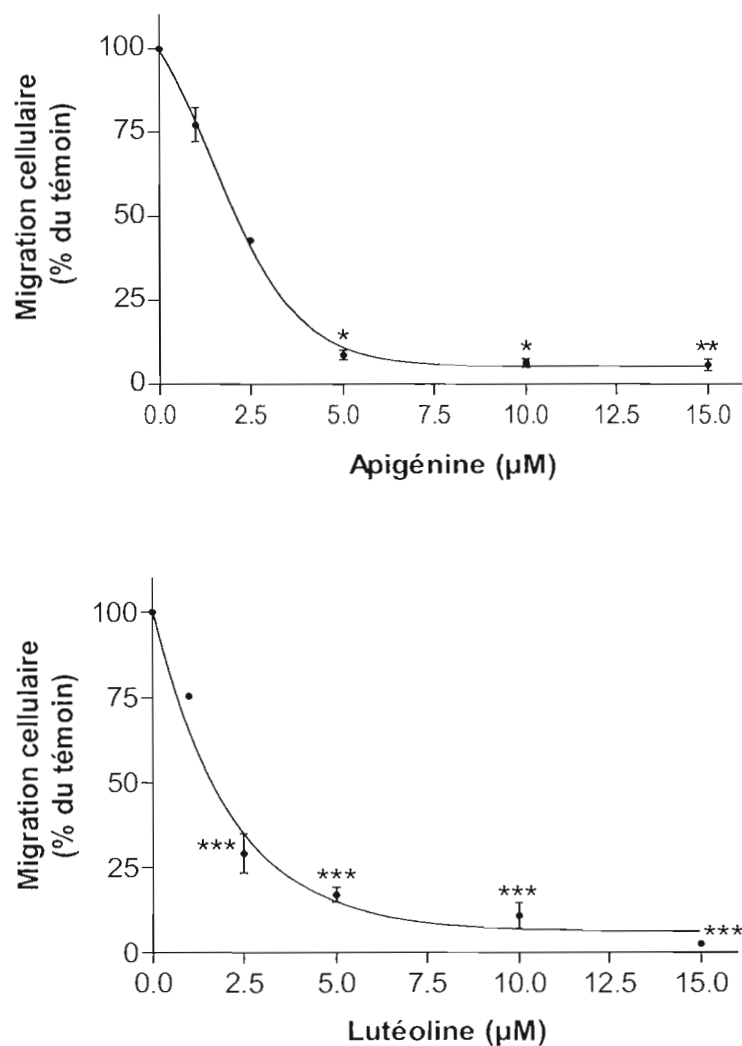
**Figure 3.1 : Efficacité des flavonoïdes en comparaison à un inhibiteur synthétique de l'angiogénèse, le Gleevec, sur la migration des PSMCs induite par le PDGF-BB.** Les cellules ont étéensemencées à raison de 50 000 cellules par chambre de Boyden puis elles ont été prétraitées, ou non, 2 h avec les différents flavonoïdes ou le Gleevec à une concentration finale de 5  $\mu$ M, étape suivie d'une stimulation de 3 h au PDGF-BB (10 ng/ml). Les cellules qui ont traversé le filtre recouvert de gélatine 0,15 % ont été colorées et comptées à l'aide du logiciel Northern Eclipse. Les valeurs obtenues représentent la moyenne des résultats de trois expériences indépendantes. Un test de *t* a été effectué, \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0,01$  étant considéré statistiquement significatif par rapport au témoin stimulé au PDGF-BB; écart-type  $\pm$  SEM.



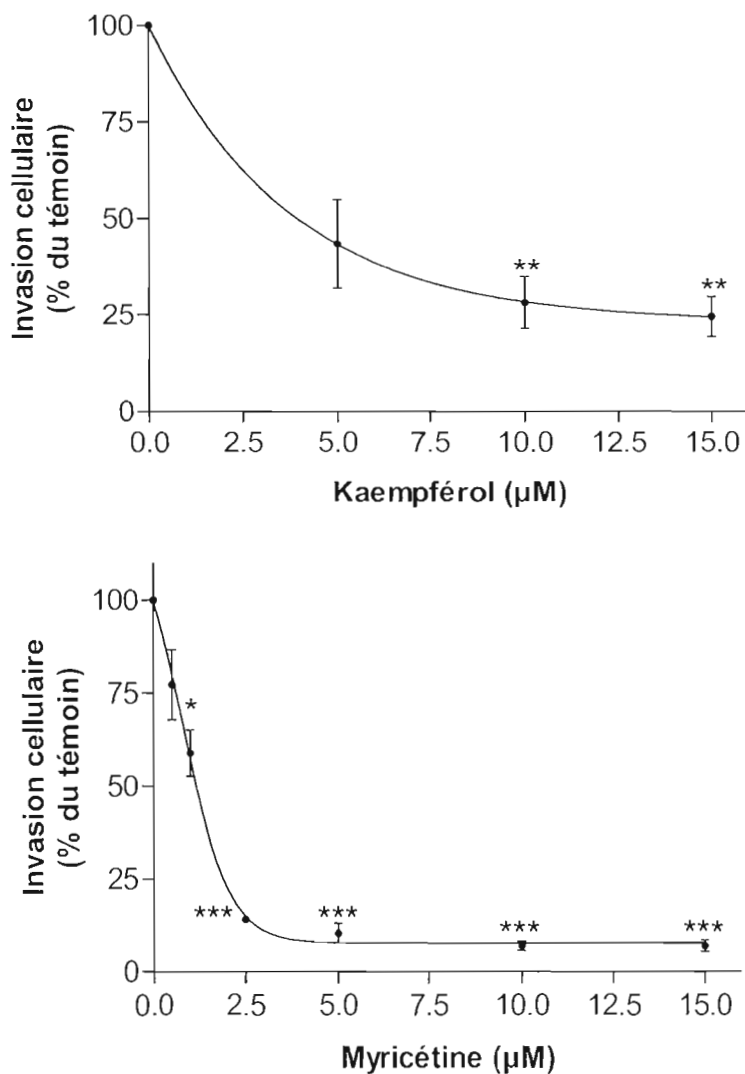
**Figure 3.2 : Effets des flavonoïdes sur le niveau basal de migration des cellules PSMCs.** Les cellules ont été ensemencées à raison de 50 000 cellules par chambre de Boyden puis elles ont été traitées, ou non, 5 h avec les différents flavonoïdes. Les cellules qui ont traversé le filtre recouvert de gélatine 0,15 % ont été colorées et comptées à l'aide du logiciel Northern Eclipse. Les valeurs obtenues représentent la moyenne des résultats de trois expériences indépendantes; écart-type  $\pm$  SEM.



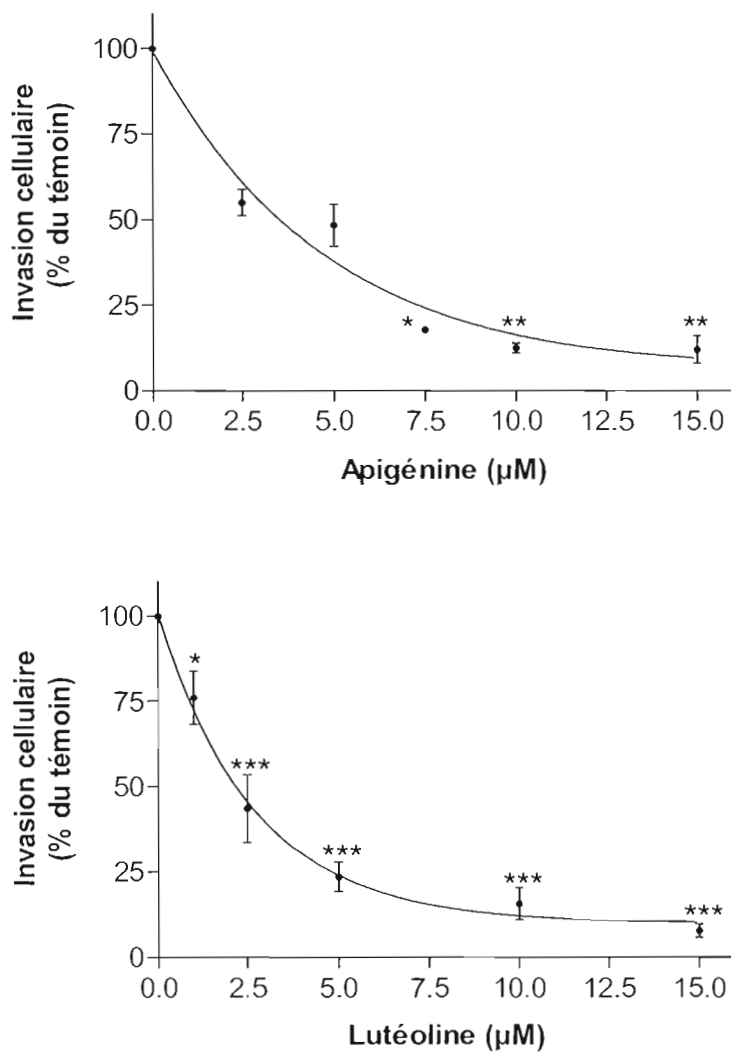
**Figure 3.3 : Inhibition par les flavonols, kaempférol et myricétine, de la migration des PSMCs induite par le PDGF-BB.** Les cellules ont été traitées selon la procédure décrite à la figure 3.1. avec comme seule différence que des concentrations croissantes de flavonols ont été utilisées. Les valeurs obtenues représentent la moyenne des résultats de quatre expériences indépendantes. Un test de *t* a été effectué, \**p* < 0,05; \*\**p* < 0,01 étant considérés statistiquement significatif par rapport au témoin stimulé au PDGF-BB; écart-type ± SEM.



**Figure 3.4 : Inhibition par les flavones, apigénine et lutéoline, de la migration des PSMCs induite par le PDGF-BB.** Les cellules ont été traitées selon la procédure décrite à la figure 3.1, avec comme seule différence que des concentrations croissantes de flavones ont été utilisées. Les valeurs obtenues représentent la moyenne des résultats de trois expériences indépendantes. Un test de *t* a été effectué, \**p* < 0,05; \*\**p* < 0,01; \*\*\**p* < 0,001 étant considérés statistiquement significatif par rapport au témoin stimulé au PDGF-BB); écart-type ± SEM.



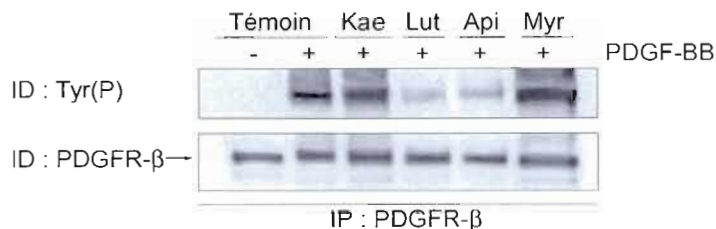
**Figure 3.5 : Inhibition par les flavonols, kaempférol et myricétine, de l'invasion des PSMCs induite par le PDGF-BB.** Les cellules ont étéensemencées à raison de 50 000 cellules par chambre de Boyden puis elles ont été prétraitées, ou non, 2 h avec des concentrations croissantes des différents flavonols, étape suivie d'une stimulation de 24 h au PDGF –BB (10 ng/ml). Les cellules qui ont traversé le filtre recouvert d'une solution de 0,5 mg/ml de Matrigel™ ont été colorées et comptées à l'aide du logiciel Northern Eclipse. Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport au témoin stimulé au PDGF-BB. Les valeurs obtenues représentent la moyenne des résultats de cinq expériences indépendantes. Un test de *t* a été effectué, \**p* < 0,05; \*\**p* < 0,01; \*\*\**p* < 0,001 étant considérés statistiquement significatif par rapport au témoin stimulé au PDGF-BB: écart-type ± SEM.



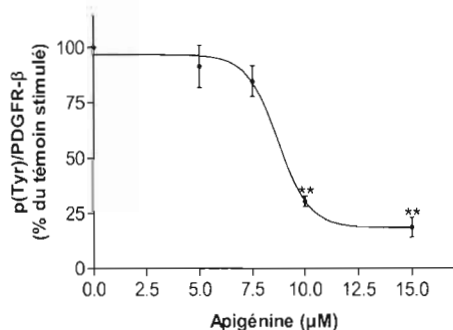
**Figure 3.6 : Inhibition par les flavones, apigénine et lutéoline, de l'invasion des PASMCS induite par le PDGF-BB.** Les cellules ont été traitées selon la procédure décrite à la figure 3.5. Les valeurs obtenues représentent la moyenne des résultats de quatre expériences indépendantes. Un test de *t* a été effectué, \**p* < 0,05; \*\**p* < 0,01; \*\*\**p* < 0,001 étant considérés statistiquement significatif par rapport au témoin stimulé au PDGF-BB); écart-type ± SEM.



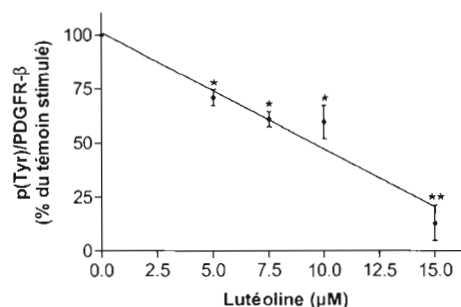
A



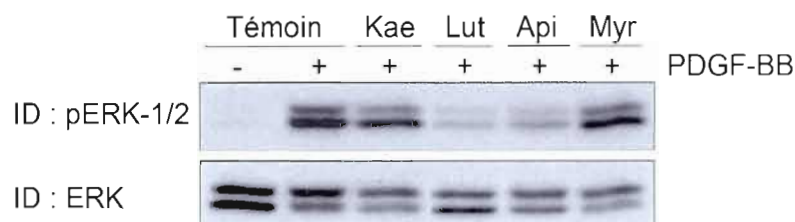
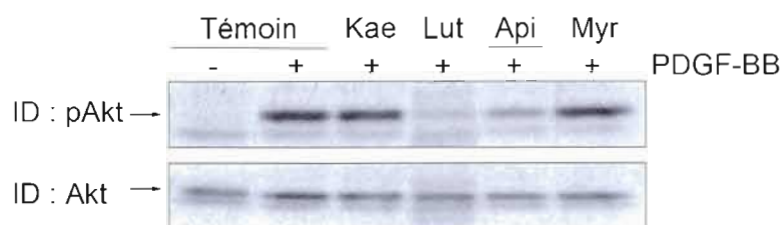
B



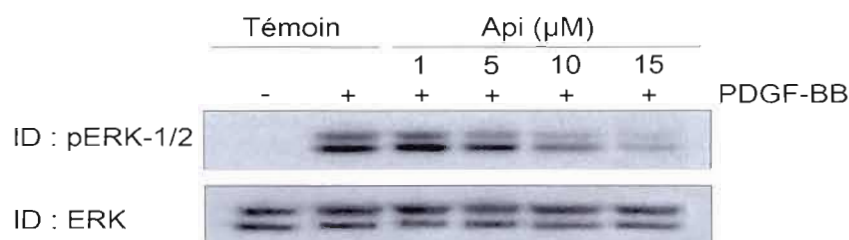
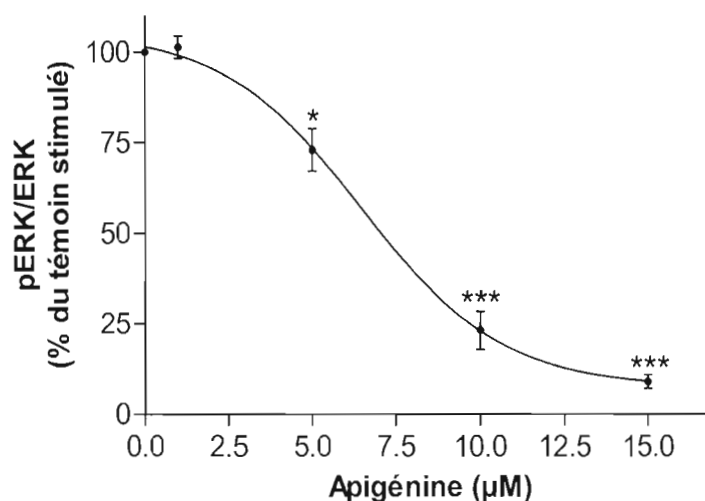
C



**Figure 3.7 : Inhibition par les flavonoïdes de l'induction de la phosphorylation du récepteur PDGFR-β par le PDGF-BB chez les PSMCs.** (A) Des cellules PSMCs ont été incubées dans du milieu 0,5 % sérum en présence, ou en absence, de flavonoïdes (15 μM) durant 24 heures. Les cellules ont, ensuite, été stimulées au PDGF-BB (50 ng/ml; 5min) et lysées tel que décrit dans la section matériel et méthodes. Les protéines ont été immunoprécipitées à l'aide d'un anticorps spécifique anti-PDGFR-β puis déposées sur un gel d'électrophorèse SDS-PAGE. Le niveau de phosphorylation du récepteur a pu être déterminé suite à un immunobuvardage de type Western et d'une immunodétection (ID) avec l'anti-Tyr(P) (PY99). Une re-détection a ensuite été effectuée à l'aide de l'anticorps anti-PDGFR-β pour visualiser le récepteur. Les PSMCs ont été traitées avec des concentrations croissantes d'apigénine (B) ou de lutéoline (C). Représentation graphique de la quantification des différentes bandes réalisée à l'aide du logiciel IPLab. Les résultats sont exprimés en pourcentage du témoin des ratios PY99/PDGFR. Un test de *t* a été effectué, \**p* < 0,05; \*\**p* < 0,01 étant considérés statistiquement significatif par rapport au témoin stimulé au PDGF-BB; écart-type ± SEM.

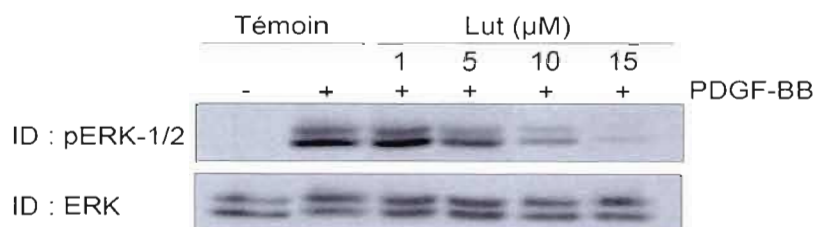
**A****B**

**Figure 3.8 : Inhibition par les flavonoïdes de l'induction de la phosphorylation de deux protéines intracellulaires, ERK et Akt, par le PDGF-BB chez les PSMCs.** Des cellules PSMCs ont été incubées dans du milieu 0,5 % sérum en présence, ou en absence, de flavonoïdes (15  $\mu$ M) durant 24 heures. Les cellules ont, ensuite, été stimulées au PDGF-BB (50 ng/ml; 5min), lysées, puis des lysats cellulaires ont été préparés, tel qu'indiqué dans la section matériel et méthodes. Les formes phosphorylées de la protéine ERK ont pu être visualisées par immunodétection (ID) avec l'anti-phospho-p44/42 MAPK (Thr 202/Tyr 204). Une re-détection a ensuite été effectuée à l'aide de l'anticorps anti-p44/42 MAPK pour visualiser la protéine. (C) La forme phosphorylée de la protéine Akt a pu être visualisée avec l'anti-phospho-Akt (Ser 473). Une re-détection a ensuite été effectuée à l'aide de l'anticorps anti-Akt (pan) pour visualiser la protéine. Les figures présentées ici étaient les plus représentatives de celles obtenues pour trois expériences distinctes.

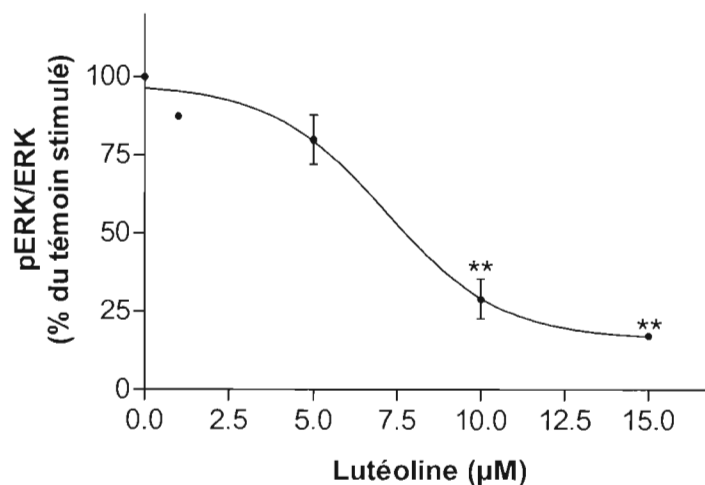
**A****B**

**Figure 3.9 : Inhibition par l'apigénine de l'induction de la phosphorylation de la protéine ERK par le PDGF-BB chez les PSMCs. (A)** Les cellules ont été traitées selon la procédure décrite à la figure 3.8. **(B)** Représentation graphique de la quantification des différentes bandes réalisée à l'aide du logiciel IPLab. Les résultats sont exprimés en pourcentage du témoin des ratios pERK/ERK. Un test de *t* a été effectué, \* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$  étant considérés statistiquement significatif par rapport au témoin stimulé au PDGF-BB; écart-type  $\pm$  SEM.

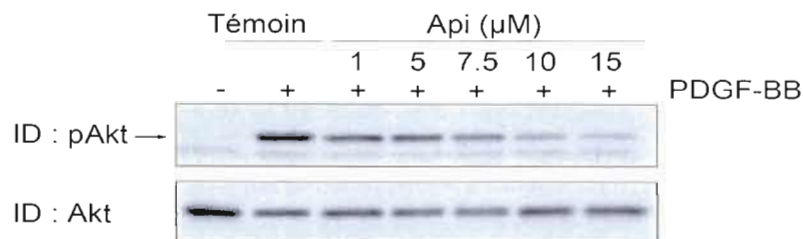
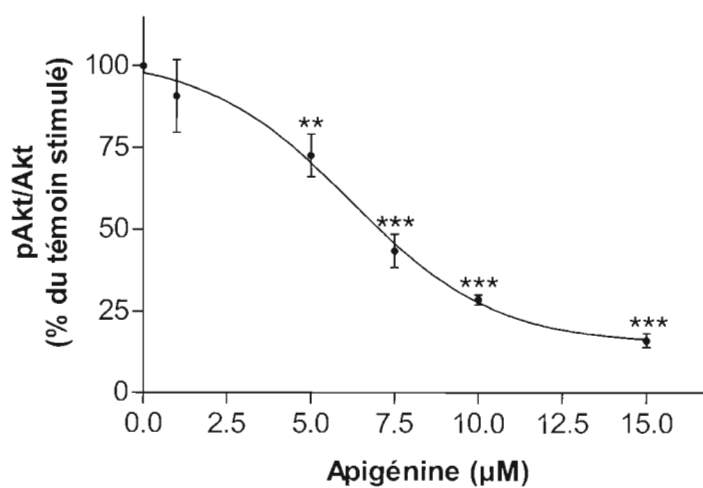
A



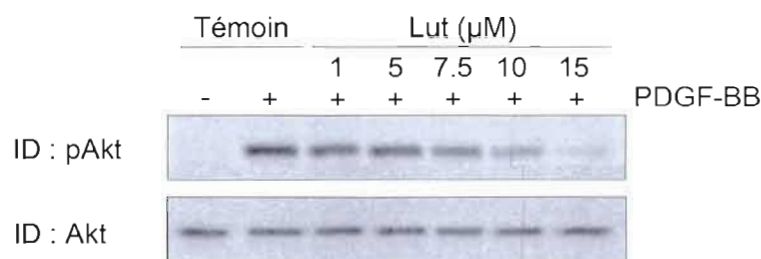
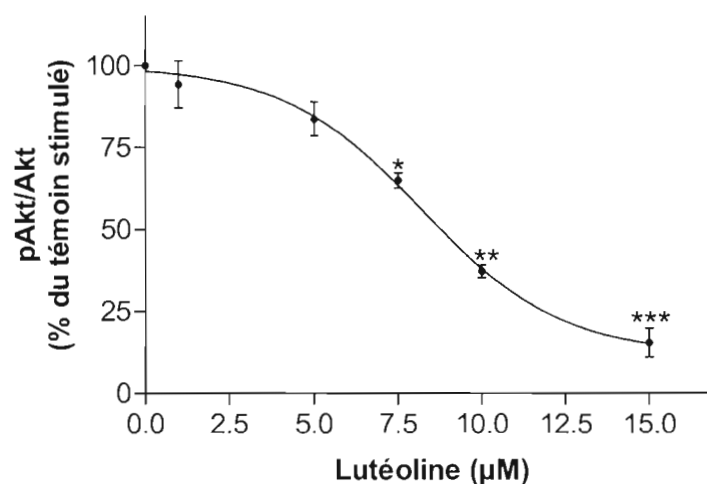
B



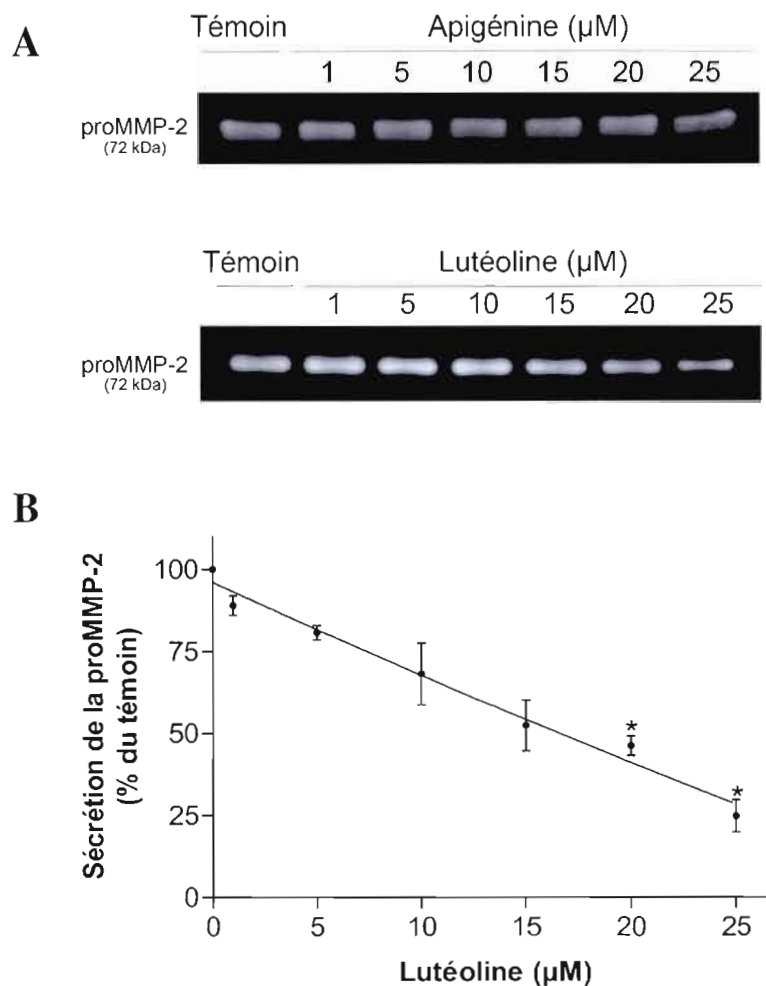
**Figure 3.10 : Inhibition par la lutéoline de l'induction de la phosphorylation de la protéine ERK par le PDGF-BB chez les PSMCs.** (A) Les cellules ont été traitées selon la procédure décrite à la figure 3.8. (B) Représentation graphique de la quantification des différentes bandes réalisée à l'aide du logiciel IPLab. Les résultats sont exprimés en pourcentage du témoin des ratios pERK/ERK. Un test de *t* a été effectué, \*\* $p < 0,01$  étant considéré comme étant statistiquement significatif par rapport au témoin stimulé au PDGF-BB; écart-type  $\pm$  SEM.

**A****B**

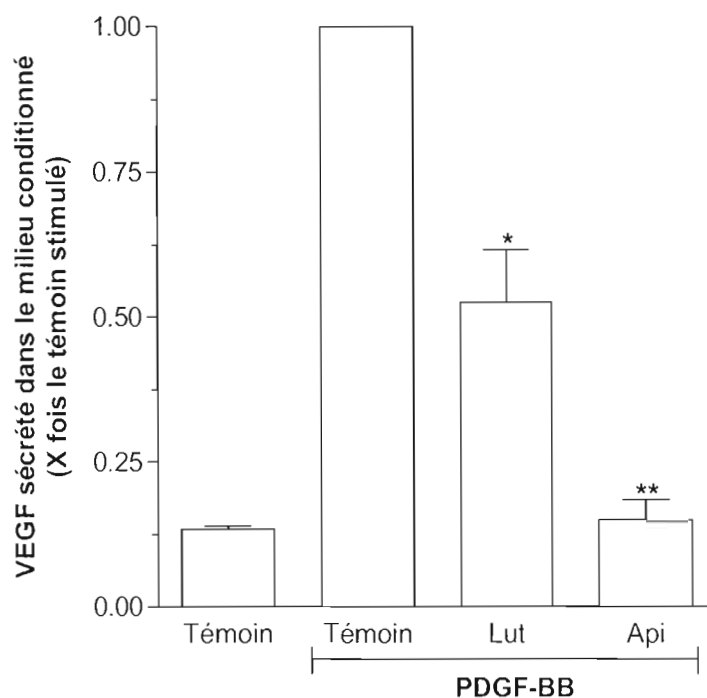
**Figure 3.11 : Inhibition par l'apigénine de l'induction de la phosphorylation de la protéine Akt par le PDGF-BB chez les PSMCs.** (A) Les cellules ont été traitées selon la procédure décrite à la figure 3.8. (B) Représentation graphique de la quantification des différentes bandes réalisée à l'aide du logiciel IPLab. Les résultats sont exprimés en pourcentage du témoin des ratios pAkt/Akt. Un test de *t* a été effectué, \*\**p* < 0,01; \*\*\**p* < 0,001 étant considérés statistiquement significatif par rapport au témoin stimulé au PDGF-BB; écart-type  $\pm$  SEM.

**A****B**

**Figure 3.12 : Inhibition par la lutéoline de l'induction de la phosphorylation de la protéine Akt par le PDGF-BB chez les PSMCs.** (A) Les cellules ont été traitées selon la procédure décrite à la figure 3.8. (B) Représentation graphique de la quantification des différentes bandes réalisée à l'aide du logiciel IPLab. Les résultats sont exprimés en pourcentage du témoin des ratios pAkt/Akt. Un test de *t* a été effectué, \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  étant considérés statistiquement significatif par rapport au témoin stimulé au PDGF-BB; écart-type  $\pm$  SEM.

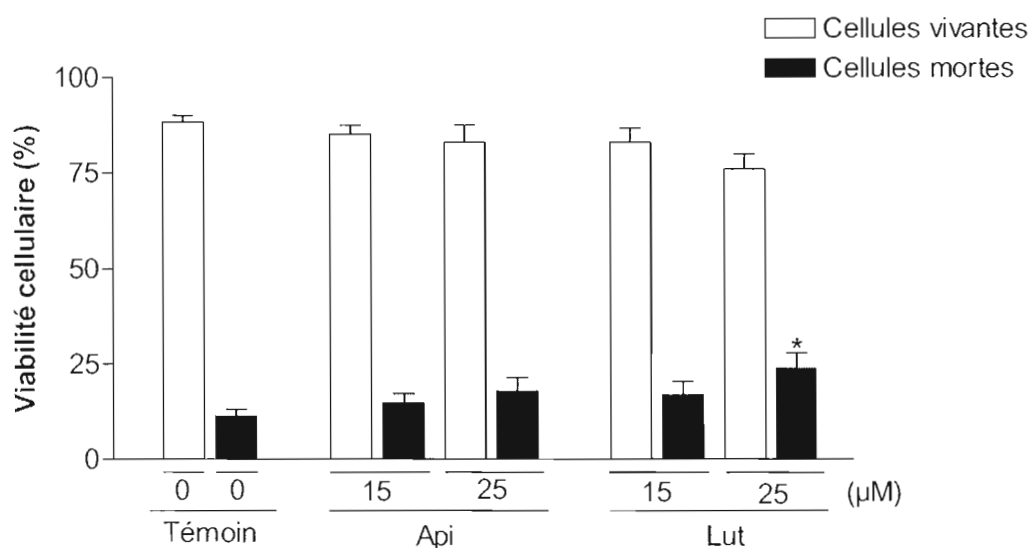


**Figure 3.13 : Inhibition par les flavones, apigénine et lutéoline, de l'excrétion par les PSMCs de la proMMP-2 dans le milieu de culture.** (A) Des cellules PSMCs quiescentes ont été incubées dans du milieu sans sérum en présence, sauf pour le témoin, de flavones, à des concentrations finales croissantes, pour une période de 18 à 20 h. Le milieu de culture a, par la suite, été récolté, puis la sécrétion de la proMMP-2 dans ce milieu par les cellules musculaires lisses a été mesurée par zymographie-gélatinolytique (voir matériel et méthodes). La figure présentée ici était la plus représentative de celles obtenues pour trois expériences distinctes. (B) Représentation graphique de la quantification des différentes bandes obtenues pour la lutéoline réalisée à l'aide du logiciel IPLab. Les résultats sont exprimés en % de sécrétion par rapport au témoin stimulé. Un test de *t* a été effectué, \**p* < 0,05 étant considéré statistiquement significatif par rapport au témoin stimulé au PDGF-BB; écart-type ± SEM.

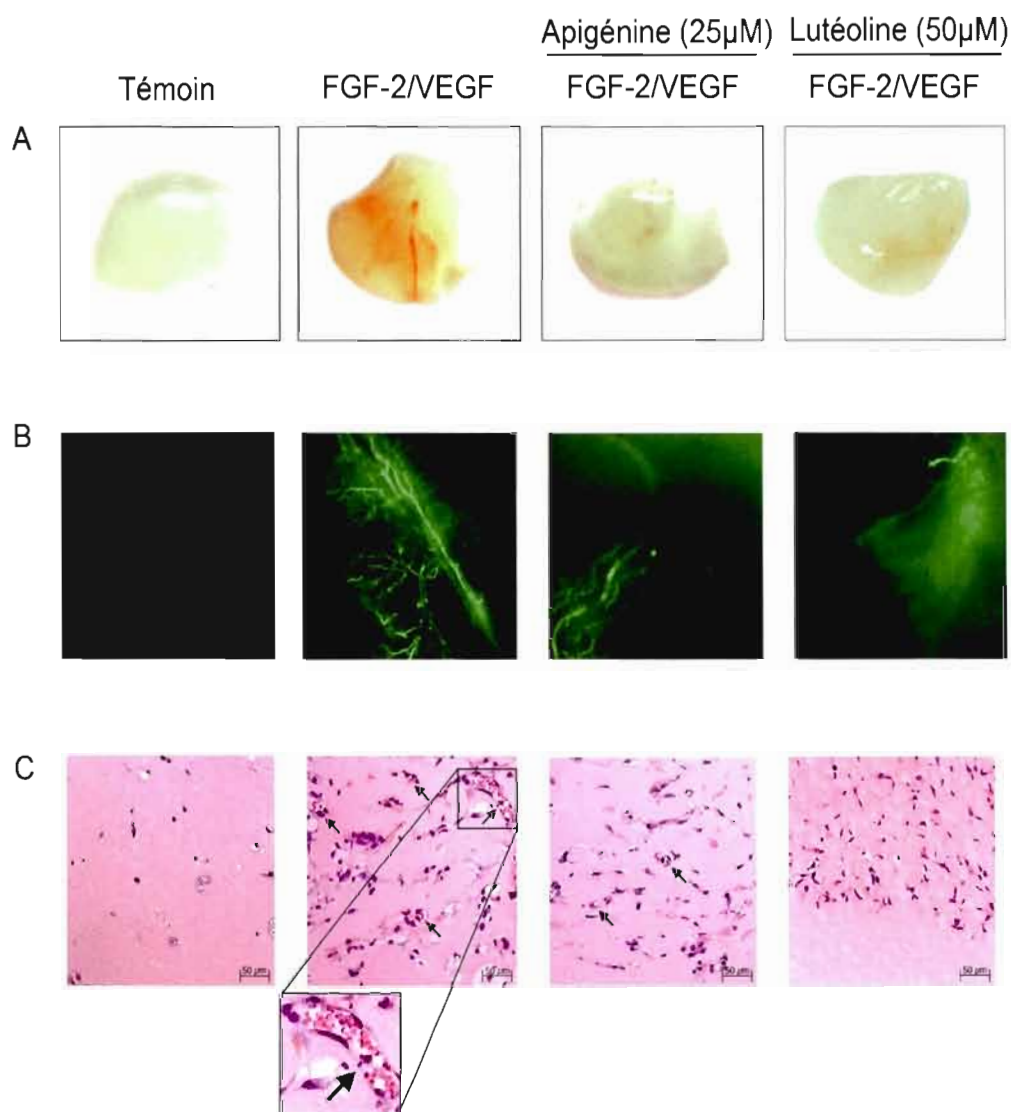


**Figure 3.14 : Inhibition par les flavones, lutéoline et apigénine, de la sécrétion de VEGF par les PSMCs stimulées au PDGF-BB.** Les cellules ont été incubées dans du milieu contenant 1 % de sérum FBS en présence, ou en absence, des flavones à 15  $\mu$ M durant 2 h, étape suivie d'une stimulation de 24 h au PDGF-BB (20 ng/ml). Le milieu a ensuite été récolté et le niveau de VEGF présent a été évalué par un test ELISA (voir matériel et méthodes). Un test de *t* a été effectué, \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  étant considérés statistiquement significatif par rapport au témoin stimulé au PDGF-BB; écart-type  $\pm$  SEM.

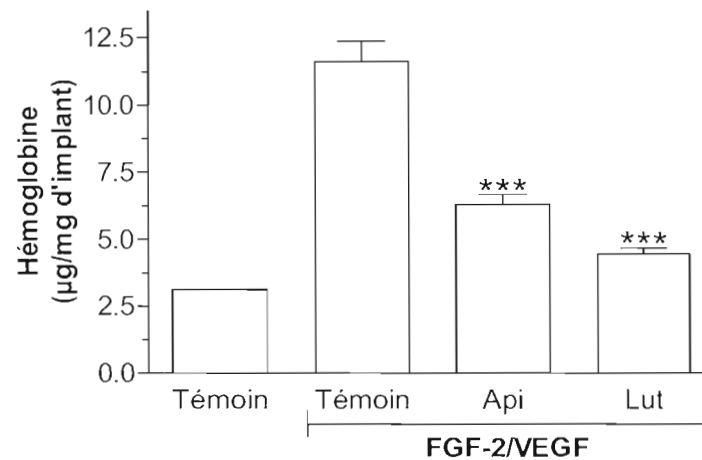




**Figure 3.15 : Effets des flavonoïdes les plus actifs sur la viabilité des PSMCs.** Des cellules PSMCs quiescentes ont été traitées, ou non, avec les flavones, apigénine et lutéoline, à des concentrations finales de 15  $\mu\text{M}$  et de 25  $\mu\text{M}$ . Les cellules adhérentes au pétri ont été récoltées par trypsinisation puis combinées aux cellules flottantes récupérées dans le milieu de culture. Leur viabilité a, par la suite, été déterminée à l'aide d'un test d'exclusion au bleu de trypan. Le pourcentage des cellules vivantes et mortes est exprimé en fonction du nombre total de cellules pour chaque condition. Un test de *t* a été effectué, \* $p < 0.05$  étant considéré statistiquement significatif par rapport au témoin; écart-type  $\pm$  SEM.



**Figure 3.16 : Inhibition de l'angiogenèse *in vivo* par les flavonoïdes les plus actifs.** Le Matrigel™ (500  $\mu$ l) contenant de l'apigénine ou de la lutéoline, du FGF-2 (250 ng/ml), du VEGF (200 ng/ml) et de l'héparine (0,0025 U/ml) a été injecté sur les 2 flancs de souris (Crl:CD1® Foxn1nu) afin de former un implant solide. Après 12 jours, pour chacun des 4 groupes, 200  $\mu$ l d'une solution à 25 mg/ml de FITC-Dextran ont été injectés dans la veine de queue d'une souris déterminée aléatoirement. Les souris ont ensuite été euthanasiées par inhalation de gaz (mélange O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>) et les implants de Matrigel™ excisés. (A) Implant de Matrigel™. (B) Vaisseaux sanguins marqués au FITC-Dextran (grossissement 50X) (C) Coupes histologiques d'implants colorés avec hématoxyline/éosine/safran (grossissement 200X). Les flèches indiquent les vaisseaux sanguins. L'agrandissement du vaisseau sanguin est de 1,5 X l'image initiale.



**Figure 3.17 : Quantification de l'angiogenèse réalisée à l'aide du dosage du niveau d'hémoglobine présent dans chacun des implants.** Les implants de Matrigel<sup>TM</sup> excisés ont, tout d'abord, été congelés 1 h à -80 °C avant d'être lyophilisés toute une nuit. Ils ont par la suite été réduits en poudre et la concentration d'hémoglobine a été déterminée tel que détaillé dans la section matériel et méthodes. Cette concentration est exprimée en µg d'Hb/mg d'implant lyophilisé qui contenait au départ de l'apigénine (25 µM) ou de la lutéoline (50 µM). Un test de *t* a été effectué, \*\*\* $p < 0,001$  étant considéré statistiquement significatif par rapport au témoin stimulé; écart-type  $\pm$  SEM.

## CHAPITRE IV

### DISCUSSION

Publié à l'occasion d'une conférence internationale le 2 novembre 2007, un rapport d'expert commandé par le Fonds Mondial de Recherche contre le Cancer et l'American Institute for Cancer Research parvenait au même constat que de nombreuses autres études épidémiologiques : les habitudes de vie, et tout particulièrement l'alimentation, sont responsables de plus du tiers des nouveaux cas de cancer chaque année. Autrement dit, notre mode de vie favorise davantage l'apparition du cancer que les facteurs héréditaires. Fort heureusement, il nous est possible de modifier notre alimentation et notre mode de vie contrairement à notre bagage génétique. La modification du régime alimentaire de manière à intégrer certains aliments constituant des sources de molécules anticancéreuses représente donc une des meilleures armes actuellement à notre disposition pour lutter contre le cancer.

À cet égard, des données épidémiologiques indiquent qu'une consommation accrue de fruits et légumes joue un rôle prépondérant dans la réduction des cas de cancer. Or, la contribution de la majorité de ces composés demeure totalement inconnue. L'identification et la caractérisation de leur mode d'action revêtent donc une importance capitale. C'est donc dans ce cadre que s'inscrit notre projet de recherche qui vise à caractériser les propriétés antiangiogéniques de quatre molécules (voir tabl. 1.2), appartenant à la grande famille des flavonoïdes, omniprésentes dans notre alimentation et ce, dans un contexte stratégique d'inhibition de la stabilisation des néovaisseaux par les cellules périvasculaires.

#### 4.1 LA MOTILITÉ CELLULAIRE

La migration et l'invasion cellulaire sont des processus primordiaux lors du phénomène d'angiogenèse tumorale. Nous avons donc, tout d'abord, voulu savoir si les molécules sélectionnées de la famille des flavonoïdes étaient capables d'inhiber la migration et l'invasion des cellules périvasculaires, les empêchant, par le fait même, d'aller stabiliser le néovaisseau.

Nous avons débuté la caractérisation des propriétés antiangiogéniques de ces molécules en effectuant des tests de migration en chambre de type Boyden. En tout premier lieu, nous désirions déterminer l'efficacité des flavonoïdes à inhiber la migration des PSMCs induite par le PDGF-BB. Les résultats obtenus ont permis de démontrer que parmi les flavonoïdes sélectionnés, la myricétine ainsi que les flavones, apigénine et lutéoline, parviennent à inhiber la migration cellulaire des PSMCs avec des pourcentages d'inhibition respectifs de 84 %, 95 % et 75 %. Le Gleevec, lui, atteint un pourcentage d'inhibition avoisinant 99 %, ce qui correspond à ce qui était attendu, considérant qu'il s'agit d'un inhibiteur spécifique du PDGFR (Capdeville *et al.*, 2002). Ces résultats nous permettent donc de conclure que parmi ces molécules d'origine nutritionnelle, abondantes dans notre alimentation, les flavones, apigénine et lutéoline, ainsi que myricétine possèdent une activité d'inhibition de la migration similaire à celle d'un médicament synthétique extrêmement efficace utilisé dans le traitement de certains cancers comme les leucémies myéloïdes chroniques. Dans le but de s'assurer que les effets observés n'étaient pas dus à la toxicité des molécules étudiées, des tests de viabilité cellulaire ont été réalisés et ils ont indiqué que les effets obtenus ne résultent pas d'une toxicité induisant la mortalité cellulaire.

En second lieu, des tests de migration ont été réalisés, mais cette fois, sans l'induction de la migration. De cette manière, nous voulions nous assurer que les flavonoïdes n'affectaient pas le niveau basal de migration des PSMCs, et c'est effectivement le cas. Ainsi, on peut inférer que les flavonoïdes inhibent spécifiquement l'induction de la migration par le PDGF-BB, ce qui est d'autant plus important puisque lors du processus d'angiogenèse, c'est le PDGF-BB qui recrute les cellules périvasculaires. De plus, ce résultat nous permet de déduire

que la capacité et le potentiel migratoire des cellules PASMCs ne sont pas affectés, puisque ces dernières possèdent toujours un niveau basal de migration. Par contre, l'induction de cette migration par le PDGF-BB, elle, est inhibée.

Les résultats obtenus à l'aide des tests réalisés avec des concentrations croissantes de flavonoïdes ont permis de mettre en évidence une différence marquée d'efficacité à inhiber l'induction de la migration par le PDGF-BB entre les molécules kaempférol et myricétine qui font toutes deux parties de la sous-classe des flavonols. On constate qu'il faut neuf fois la concentration en kaempférol pour réussir à obtenir la même inhibition que celle obtenue avec myricétine. Contrairement aux flavonols, les comportements de l'apigénine et de la lutéoline par rapport à l'inhibition de l'induction de la migration sont sensiblement les mêmes. Concrètement, on obtient une  $IC_{50}$  de 2  $\mu$ M pour l'apigénine et de 1.5  $\mu$ M pour lutéoline, ce qui est très intéressant puisque les concentrations plasmatiques de flavonoïdes retrouvées avec la consommation quotidienne de fruits et de légumes peuvent atteindre l'ordre du micromolaire (Manach et Donovan, 2004). Étrangement, l'efficacité de la myricétine s'apparente plus à celles obtenues pour les flavones. Par ailleurs, il est à noter que, peu importe la molécule, la réponse d'inhibition est dépendante de la concentration qui a été utilisée.

Ces résultats se confirment lors des tests d'invasion cellulaire, où, une fois encore, myricétine et kaempférol présentent un comportement distinct l'une de l'autre, alors que les flavones, quant à elle, ont un comportement similaire. Malgré tout, la tendance générale qui s'en dégage demeure la même, soit une inhibition de l'invasion cellulaire en fonction de la concentration utilisée. Les flavonoïdes semblent être plus efficaces que ce à quoi nous nous attendions. En effet, il avait été démontré précédemment, par Fotsis et ses collaborateurs (1997), que les flavonoïdes inhibaient l'invasion cellulaire de cellules endothéliales de diverses lignées avec une  $IC_{50}$  de l'ordre des dix micromolaires et nous obtenons des valeurs deux fois moins élevées.

Durant les tests d'invasions cellulaires, les cellules doivent digérer et traverser la couche de Matrigel™ qui recouvre le filtre de la chambre de Boyden. Les résultats obtenus

lors de ces tests indiquaient que les flavonoïdes empêchaient les cellules de digérer le gel. Ainsi, puisque l'interaction des cellules périvasculaires avec la matrice extracellulaire et le remodelage de cette dernière sont des processus importants impliqués dans la motilité cellulaire, nous nous y sommes donc intéressés davantage.

Pour permettre la motilité cellulaire lors du processus d'angiogenèse, il doit y avoir dégradation de la matrice extracellulaire par des protéases solubles. Les MMPs font partie de ces protéases solubles. Les deux membres de la famille des gélatinases (MMP-2 et MMP-9) jouent un rôle prépondérant dans la migration des cellules endothéliales et périvasculaires lors de la cascade angiogénique. Elles peuvent aussi réguler la biodisponibilité de certains facteurs angiogéniques attachés à la matrice extracellulaire et, du coup, influencer la motilité. Durant cette étude, nous avons évalué la capacité des flavones à inhiber la sécrétion des gélatinases chez les PSMCs. Seule l'activité gélatinolytique de la proMMP-2 a pu être observée ce qui correspond aux résultats préalablement obtenus par Cheng et ses collaborateurs (2005a) ainsi que par Kanda et son équipe (2000) dans différentes lignées de cellules musculaires lisses. De plus, parmi les flavones testées, seule la lutéoline a démontré une capacité à inhiber la sécrétion de la proMMP-2 avec une  $IC_{50}$  de  $17 \mu\text{M}$ . Ce résultat suggère que la lutéoline et l'apigénine utilisent des moyens différents pour inhiber l'invasion cellulaire. De plus, puisque les tests de cytotoxicité ne démontrent pas une hausse importante de mortalité cellulaire à  $25 \mu\text{M}$  et que l'effet d'inhibition de la sécrétion de la proMMP-2 observé suit une tendance dépendante de la concentration de lutéoline utilisée, nous pouvons donc affirmer que de 0 à  $25 \mu\text{M}$  l'effet inhibiteur ne semble pas relié directement à une toxicité cellulaire.

## 4.2 LA SIGNALISATION CELLULAIRE

Jusqu'à présent, les flavonoïdes semblent inhiber spécifiquement les actions induites par la stimulation des PSMCs au PDGF (migration, invasion) en n'affectant pas le niveau basal, ce qui suggère qu'ils agissent sur le récepteur PDGFR. De plus, on retrouve un niveau d'efficacité d'inhibition de la migration cellulaire similaire à celui obtenu avec le Gleevec. Le Gleevec est un dérivé 2-phényl-amino-pyrimidine qui empêche l'activation du PDGFR en

bloquant sa phosphorylation. Le PDGFR étant un RTK, il est activé en étant phosphorylé lorsqu'il se lie à son ligand. Le Gleevec compétitionne pour le site de liaison de l'ATP, qui constitue le donneur de groupements phosphates, groupements qui sont nécessaires à la phosphorylation du PDGFR (Rocha, Azevedo et Soares, 2007). Toutes ces informations nous ont donc permis d'émettre l'hypothèse que les flavonoïdes pouvaient avoir une action sur la phosphorylation de ce récepteur.

Pour confronter cette hypothèse à la réalité, il s'imposait donc inévitablement de réaliser l'étude de marqueurs moléculaires. Les résultats montrent que parmi les flavonoïdes testés, seules les flavones ont la capacité d'inhiber la phosphorylation du récepteur. Suggérant qu'il y aurait peut-être un lien entre la structure des flavones, par rapport à celle des flavonols, et leurs effets sur le récepteur. Mentionnons que la distinction majeure en ces deux sous-classes de flavonoïdes est la présence d'un groupement hydroxy en R<sub>4</sub> (voir tabl. 1.2).

Des études comparatives entre la structure et la fonction de plusieurs flavonoïdes ont d'ailleurs déjà rapporté des observations similaires quant à la relation entre la fonction biologique et la structure des flavonoïdes. En effet, des études réalisées dans un modèle cellulaire provenant d'un mélanome humain (A-431) ont mis en évidence que la présence d'un double lien en C2-C3 et de deux groupements hydroxyles en position 3' et 4' sur l'anneau B permettaient d'obtenir le maximum d'activité biologique (Fotsis *et al.*, 1997). Dans cette étude, ils expliquent leurs résultats en indiquant que la présence du double lien permet de s'assurer que les anneaux B et C seront dans le même plan, ce qui leur conférerait une accessibilité au site actif des différentes kinases. De plus, ils mentionnent que les groupements hydroxyles pourraient être responsables de l'inhibition de l'activité kinasique. Or, des études plus détaillées dans notre modèle cellulaire et sur plusieurs flavonoïdes de sous-classes différentes seraient requises pour permettre d'élucider la relation entre la structure et la fonction impliquée dans l'activité biologique d'inhibition de la phosphorylation du PDGFR. Cependant, il s'agit d'une avenue fort intéressante.

Afin de caractériser davantage l'action des flavones sur la phosphorylation du récepteur, d'autres tests ont été réalisés et ont montré que l'inhibition de la phosphorylation est



dépendante de la concentration utilisée. De plus, les résultats indiquent que pour inhiber à 50 % la phosphorylation du PDGFR, des concentrations similaires d'apigénine et de lutéoline, 9  $\mu\text{M}$  et 8,5  $\mu\text{M}$  respectivement, ont été requises. Ces effets sont d'autant plus intéressants qu'on rapporte dans la littérature que dans une lignée de cellules musculaires lisses d'aorte de rat (RASMCs), la forme glycosylée de la lutéoline, soit lutéoline 7-glucoside, ne parvient pas à inhiber la phosphorylation du PDGFR alors que la forme non glycosylée y parvient. Or, pour ce faire, cela nécessite l'emploi de concentrations supérieures à 25  $\mu\text{M}$  (Kim *et al.*, 2005b; Kim *et al.*, 2006).

Nos résultats et ces informations nous permettent donc de spéculer que la structure et la forme, glycosylée ou non, peuvent avoir de grandes répercussions sur le potentiel d'action de ces molécules. Ils nous permettent également de conclure que les flavones sélectionnées sont hautement efficaces sur les cellules musculaires lisses humaines (PASMCS) puisque leurs effets sont observés à des concentrations dix fois moins élevées que ceux rapportés dans la littérature. Toutefois, des effets similaires ont été observés dans des lignées de cellules musculaires lisses humaines, en présence de différents polyphénols et de catéchines, tel l'acide ellagique (Labrecque *et al.*, 2005; Sachinidis *et al.*, 2002).

De plus, mentionnons que la littérature foisonne de données en ce qui a trait à l'inhibition de divers récepteurs de type RTK par les flavonoïdes et ce, dans de nombreuses lignées cellulaires (Teillet *et al.*, 2007). En effet, dans notre laboratoire, il a été démontré que l'acide ellagique inhibe la phosphorylation du VEGFR dans une lignée cellulaire endothéliale provenant d'aorte bovine (BAEC). De plus, Huang et ses collaborateurs (1999) ont démontré que la lutéoline parvenait à inhiber l'EGFR avec une  $\text{IC}_{50}$  de 20  $\mu\text{M}$  dans une lignée cellulaire de cancer de la peau, les A431. Une autre étude réalisée par Fang et son équipe (2007) a également démontré que dans une lignée cellulaire de cancer de la prostate (PC-3), la lutéoline parvenait à inhiber la phosphorylation des récepteurs IGF-1R et EGFR.

L'hypothèse la plus plausible pour expliquer l'inhibition des RTK par les flavonoïdes est que la structure des flavonoïdes leur permettrait de mimer la portion adénine de l'ATP et ainsi compétitionner pour le site actif des récepteurs, un peu comme le fait le Gleevec pour

inhiber la phosphorylation du PDGFR. Nous pouvons donc supposer que l'apigénine et la lutéoline pourraient, elles aussi, agir de la sorte pour bloquer la phosphorylation du PDGFR.

Suite à l'activation du récepteur, de nombreuses voies de signalisation intracellulaire sont activées et, parmi celles-ci, les voies des protéines kinases activatrices des voies mitogéniques (MAPK) et de la protéine Akt constituent les principaux relais de transmission des signaux induits par les facteurs de croissance.

Parmi la famille des MAP kinases, les protéines ERK 1/2 sont particulièrement reconnues pour leurs rôles dans la migration cellulaire (Huang, Jacobson et Schaller, 2004). Nous avons donc décidé d'aller vérifier si les flavonoïdes pouvaient avoir une action sur ces dernières. Les résultats obtenus corroborent ceux obtenus précédemment pour le PDGFR, en ce sens où les flavones sont parvenues à inhiber de façon similaire la phosphorylation des protéines ERK 1/2 induite par le PDGF-BB, car les  $IC_{50}$  obtenus sont de 7 et de 7,5  $\mu M$  pour l'apigénine et la lutéoline, respectivement. Une fois de plus, les flavonols n'ont pas montré d'effet à cet égard.

Les effets obtenus pour les protéines ERK ont ouvert la porte à l'exploration d'autres voies de signalisation activées par le PDGFR, comme la voie PI3K-Akt. La protéine Akt, comme les protéines ERK, est reconnue pour son rôle dans l'activation de différents modulateurs ayant des fonctions de régulation de nombreux processus cellulaires, tel l'angiogenèse. Nous avons observé que seules les flavones inhibent de façon similaire la phosphorylation de la protéine Akt induite par la stimulation au PDGF-BB avec des  $IC_{50}$  de 7 et 9  $\mu M$  pour apigénine et lutéoline, respectivement.

Dans l'ensemble, les  $IC_{50}$  calculées pour apigénine et lutéoline concernant ERK et Akt sont également similaires à celles calculées pour le récepteur au PDGF et nous pouvons donc inférer que l'inhibition de l'activation du récepteur empêche l'activation subséquente des voies de signalisation qu'il activerait normalement, suggérant que le mécanisme par lequel les flavones affectent la motilité des cellules périvasculaires fait intervenir le récepteur au PDGF. Ces résultats abondent dans le même sens que la littérature. En effet, il a déjà été

démontré que certains flavonoïdes peuvent inhiber la migration, l'invasion et la sécrétion de MMPs dans différentes lignées cellulaires en bloquant l'activation de récepteurs de type RTK et, par le fait même, l'activation de leurs différents substrats, notamment les protéines ERK et Akt. Par exemple, Lee et ses collaborateurs (2006) rapportaient que la lutéoline inhibe la migration et l'invasion cellulaire induites par le HGF dans une lignée cellulaire d'hépatome humain (HepG2) en inhibant l'activation du récepteur c-Met et ses voies de signalisation, en l'occurrence les protéines ERK et Akt. De plus, il a été démontré (Lindenmeyer *et al.*, 2001) que l'apigénine pouvait inhiber la prolifération et la migration de cellules de cancer du sein, les MDA-MB-231, et qu'elle parvenait également à inhiber leur invasion en bloquant l'activation de la voie PI3K/Akt (Lee *et al.*, 2008). Évidemment, il serait intéressant d'étudier également l'effet de ces molécules sur d'autres voies de signalisation induites par le PDGF.

#### 4.3 ÉTUDE DE L'EFFET PROTECTEUR ET STABILISATEUR DES PASMCS

Bien que les flavones aient montré une très grande efficacité à inhiber le processus de motilité cellulaire, il serait utopique de croire qu'elles arrivent à empêcher la totalité des cellules périvasculaires de rejoindre le néovaisseau pour le stabiliser. Ainsi, on peut penser qu'il y a, malgré tout, des cellules musculaires lisses qui vont l'atteindre. Cependant, nous nous sommes questionnés à savoir si, une fois parvenues au vaisseau, ces cellules allaient être en mesure de sécréter le VEGF qui permet de stabiliser ce vaisseau et de protéger la structure endothéliale de la rupture et de la régression.

D'autres études ont démontré que des polyphénols présents dans le vin rouge, comme la delphinidine et la cyanidine, parviennent à inhiber, avec une concentration de 10  $\mu\text{M}$ , la sécrétion de VEGF induite par le PDGF-AB dans une lignée cellulaire humaine, soit les cellules musculaires lisses d'aorte humaine (Oak *et al.*, 2006). Nos données vont dans le même sens, c'est-à-dire que les flavones utilisées, lutéoline et apigénine, inhibent la sécrétion du VEGF induite par le PDGF-BB, chez les PASMCS. Une concentration de 15  $\mu\text{M}$  de lutéoline est nécessaire à l'obtention d'une inhibition de 55 % de cette sécrétion. alors que cette même concentration pour l'apigénine permet pratiquement un retour au niveau basal

avec une inhibition de 96 %. Cette inhibition a été expliquée par Oak et ses collaborateurs (2006) qui ont démontré que les polyphénols ont la capacité d'empêcher la réponse pro-oxydante, qui produit des ROS, déclenchée par l'activation des facteurs de croissance, tel que le PDGF, et qui, à son tour, induit l'expression du VEGF. Considérant le fait que les propriétés les plus connues des flavonoïdes sont leur action antioxydante et leur capacité à piéger les radicaux libres, on peut facilement supposer que l'effet des flavonoïdes sur la sécrétion pourrait être expliqué également par ce mode d'action.

Toutefois, outre cette explication, on peut également penser que l'inhibition de l'activation du PDGFR et de ses voies de signalisation reconnues pour induire l'expression du VEGF, telles que la voie des MAPK ERK 1/2 et de la protéine Akt, peut contribuer à expliquer l'inhibition de la sécrétion du VEGF. À cet effet, Oak rapporte que les voies de JNK et de p38 occupent un rôle majeur dans l'expression du VEGF. Il serait donc intéressant d'explorer le potentiel d'inhibition des flavones sur ces voies de signalisation.

#### 4.4 LES ÉTUDES *IN VIVO*

L'expérimentation *in vitro* réalisée à l'aide de cellules en culture constitue un excellent outil, à faible coût, pour étudier isolément des processus cellulaires ou moléculaires particuliers. Par contre, les modèles de culture cellulaire ne permettent pas d'étudier les processus tels qu'ils se dérouleraient dans un organisme entier vivant, car la culture cellulaire n'offre pas d'indication sur les interactions entre les différents types cellulaires ni sur l'influence des différents facteurs et signaux, qui sont le propre d'un organisme entier vivant et qui reflètent sa complexité. C'est d'ailleurs les raisons pour lesquelles Rakesh Jain et ses collaborateurs (1997) ont indiqué que les conclusions dérivées de l'expérimentation *in vitro* doivent toujours être renforcées par des expériences *in vivo*.

Or, puisque l'angiogenèse est devenue une cible de choix pour contrer le cancer, ceci a donné lieu au développement de nombreuses thérapies antiangiogéniques et, de ce fait, de nombreux moyens d'étude *in vivo* de l'angiogenèse ont été développés. Ces moyens

permettent l'étude de l'angiogenèse de manière fondamentale, mais offrent également la possibilité de tester l'efficacité des stratégies antiangiogéniques. Parmi ceux-ci, on retrouve le modèle d'implantation sous-cutanée de Matrigel™ qui est celui que nous avons choisi d'utiliser.

Ce type de test est facilement réalisable, mais il demande néanmoins des investissements monétaires. Ainsi, il a donc été nécessaire de faire un choix et bien qu'initialement la myricétine ait démontré une grande efficacité pour inhiber la migration et l'invasion cellulaire, les flavones, lutéoline et apigénine, ont présenté des effets moléculaires qui permettaient de croire qu'elles avaient le potentiel de démontrer des effets antiangiogéniques *in vivo*. Par conséquent, c'est avec ces deux dernières que nous avons poursuivi nos travaux de recherches et réalisé les études *in vivo*.

Les différentes données tirées de cette étude sont venues confirmer les résultats préalablement obtenus en laboratoire. En effet, tous les résultats recueillis, qu'ils proviennent de l'observation macroscopique des implants, de la mise en évidence des vaisseaux sanguins par marquage au FITC, des coupes et colorations histologiques ou du dosage du niveau d'hémoglobine contenu dans l'implant, ont montré que les flavones inhibent l'angiogenèse *in vivo* induite par le FGF-2 et le VEGF. Étant donné la complexité du processus angiogénique *in vivo*, les concentrations requises pour inhiber ce phénomène sont plus élevées que celles utilisées *in vitro*. Cependant, elles sont plus faibles que celles employées dans la plupart des études de même type effectuées avec des molécules naturelles (Min *et al.*, 2004; Singh *et al.*, 2002). De plus, il est important de préciser qu'il ne s'agit pas d'une étude où les molécules sont administrées oralement et quotidiennement par gavage de manière à reproduire l'apport obtenu par l'alimentation. Dans un tel type d'étude les molécules pures n'auraient pu être administrées.

La quantification du niveau d'hémoglobine contenu dans chacun des implants nous permet d'inférer que les flavones inhibent, bel et bien, l'angiogenèse *in vivo*. Ces résultats vont dans le même sens que d'autres études qui ont préalablement montré que des flavonoïdes, tel que la delphinidine (Lamy *et al.*, 2006) et l'épigallocatechine-3-gallate

(Fassina *et al.*, 2004), parvenaient à inhiber l'angiogenèse *in vivo*. De plus, ils corroborent ce qui avait déjà été obtenu *in vitro* par Kim (2003), c'est-à-dire que les flavonoïdes peuvent inhiber l'angiogenèse induite *in vitro* par le VEGF et le FGF-2.

À la lueur de l'analyse de l'ensemble des données recueillies durant ces travaux de recherche, l'apigénine semble être la molécule ayant le plus fort potentiel d'inhibition de l'angiogenèse. Le fait qu'elle semble plus efficace *in vivo* que la lutéoline peut être relié à sa capacité d'inhiber la sécrétion de VEGF par les cellules périvasculaires, VEGF qui normalement permettrait de stabiliser les néovaisseaux, combiné à sa capacité d'inhiber l'activation du PDGFR et possiblement du FGFR (Huang *et al.*, 1996). De plus, comme l'angiogenèse est un processus complexe, il serait possible que l'apigénine inhibe également l'activation du VEGFR-2? Toutefois, ceci demeure une avenue à explorer.

## CHAPITRE V

### CONCLUSION

#### 5.1 LES PROPRIÉTÉS ANTIANGIOGÉNIQUES DES FLAVONOÏDES

Des études précédentes ont démontré que les flavonoïdes peuvent influencer plusieurs fonctions biologiques comme la synthèse de protéines, la prolifération et la différenciation cellulaire, ce qui suggérait qu'elles pouvaient avoir des propriétés antiangiogéniques et antitumorales. Aucune de ces études n'avait cependant évalué la capacité de ces composés à inhiber la stabilisation des néovaisseaux par les cellules périvasculaires.

Dans cette étude, nous montrons que les flavonoïdes affectent la motilité cellulaire des PASMCs en inhibant leur potentiel migratoire et invasif et que les niveaux d'inhibition observés, en plus d'être dépendants de la concentration utilisée, sont comparables à ceux observés avec un médicament synthétique.

De plus, dans le but d'éclaircir le mécanisme d'action menant à cette inhibition, nous avons également démontré que les flavonoïdes, plus particulièrement les flavones, perturbent l'activation du récepteur au PDGFR et sa signalisation par les protéines kinase ERK et Akt. Effectivement, nous montrons que les flavones inhibent la phosphorylation du récepteur induite par une stimulation au PDGF-BB ainsi que celles des différentes protéines. Dans un même ordre d'idée, nous avons démontré que la sécrétion du VEGF par les PASMCs est inhibée par les flavones et que la lutéoline affecte la sécrétion de la proMMP-2.

L'angiogenèse constitue une étape capitale de l'évolution tumorale. L'inhibition de processus importants qui permettent la stabilisation des néovaisseaux durant l'angiogenèse, tels que la migration et l'invasion cellulaire, peut contribuer à bloquer l'angiogenèse. Tous les résultats obtenus *in vitro* nous permettaient de croire que les flavones pouvaient avoir un grand potentiel antiangiogénique *in vivo* et ce fut effectivement le cas. Durant ces travaux de recherches, nous avons montré, à l'aide de tests d'implantation de Matrigel™, que les flavones arrivaient à inhiber l'angiogenèse *in vivo* et que parmi les flavones, c'est l'apigénine qui semblait démontrer le plus fort potentiel.

En somme, nous avons mis en évidence dans cette étude les propriétés antiangiogéniques des flavonoïdes, plus particulièrement des flavones lutéoline et apigénine, en démontrant qu'elles inhibent l'induction de la phosphorylation du PDGFR ainsi que l'activation des différents substrats de ce dernier, telles que les protéines ERK et Akt qui sont impliquées dans les processus de migration et d'invasion cellulaire des cellules musculaires lisses, les empêchant ainsi d'aller stabiliser les néovaisseaux. De plus, nous avons également mis en évidence des différences entre les flavones, lutéoline et apigénine, quant à leur capacité d'inhibition de la sécrétion du VEGF et de la proMMP-2 chez les PSMCs et quant à leur capacité d'inhibition de l'angiogenèse *in vivo* stimulée par des facteurs de croissance autre que le PDGF.

Dans une ère où les thérapies antiangiogéniques constituent un champ d'investigation de pointe, l'identification et la caractérisation de nouvelles molécules d'origine nutritionnelle physiologiquement accessibles et à caractère antiangiogénique et non toxique offrent un outil complémentaire que tout individu peut employer pour prévenir le cancer.

## 5.2 LES PERSPECTIVES

En conclusion, comme dans plusieurs études, ces travaux ont soulevé des questions qu'il serait très intéressant d'explorer. Par exemple, est-ce que les flavonoïdes pourraient inhiber l'activation d'autres récepteurs à activité tyrosine kinase, tel que le VEGFR ou le FGFR? Ou



encore, y a-t-il un lien entre la structure des molécules et les effets observés? La myricétine affecte très fortement la migration et l'invasion cellulaire de PSMCs. Or, contrairement aux flavones, elle n'intervient pas dans la phosphorylation du récepteur PDGFR et ses voies de signalisation. Quels mécanismes met-elle en œuvre pour parvenir à ses fins? Est-ce que la lutéoline inhibe d'autres protéases matricielles comme celle du système plasminolytique? De plus, serait-il possible que l'encombrement stérique provoqué par la présence d'un groupement hydroxy en R<sub>4</sub>, chez les flavonols puisse affecter leurs propriétés? Si oui, est-ce l'absence de ce groupement chez les flavones qui leur procurent leurs effets? Est-ce que les autres voies de signalisation des MAP kinases telles que p38 et JNK sont affectées par les flavonoïdes?

De plus, outre les mécanismes d'action, il serait également très pertinent d'évaluer le potentiel synergétique de ces molécules en les utilisant selon différentes combinaisons. On pourrait également vérifier si elles peuvent exercer des effets sur d'autres lignées cellulaires, comme des cellules endothéliales ou mieux encore, des cellules cancéreuses. Il serait tout aussi passionnant d'étudier le potentiel antitumoral de ces composés par des tests d'induction de tumeurs *in vivo*.

Ce sont autant d'avenues d'exploration possible qui ouvre les portes à plusieurs autres recherches et au développement de futures molécules synthétiques mimant les propriétés des flavonoïdes.

La plupart des stratégies antiangiogéniques ciblent à l'heure actuelle une fonction spécifique d'un facteur de croissance ou d'un récepteur, et plus particulièrement le VEGF. Néanmoins, puisque les tumeurs ne dépendent pas uniquement du VEGF pour l'établissement de leur vascularisation et que d'autres acteurs sont aussi impliqués et peuvent constituer des cibles thérapeutiques additionnelles, une meilleure connaissance de l'angiogenèse tumorale agrandira donc les possibilités thérapeutiques. À cet égard, nous avons montré que des molécules d'origine nutritionnelle peuvent contribuer, par une alimentation riche en fruits et légumes, à la prévention du cancer par l'alimentation et pourraient être utilisées en combinaison avec des traitements conventionnels.

## APPENDICE A

### CALCUL DU POURCENTAGE D'INHIBITION

L'évaluation de l'inhibition exercée par les différents flavonoïdes est estimée par le calcul du pourcentage d'inhibition.

Ce calcul s'établit au moyen de la formule suivante :

$$I (\%) = 100 - \left[ \frac{(V_c - V_b) \times 100}{V_t - V_b} \right]$$

Où :  $I$  est le pourcentage d'inhibition;  $V_t$  est la valeur obtenue pour le témoin stimulé;  $V_b$  est la valeur obtenue pour le témoin du niveau basal et  $V_c$  est la valeur obtenue pour chaque condition dont on cherche à déterminer l'inhibition.

## BIBLIOGRAPHIE

- Albini, A., Y. Iwamoto, H. K. Kleinman, G. R. Martin, S. A. Aaronson, J. M. Kozlowski et R. N. McEwan. 1987. «A rapid in vitro assay for quantitating the invasive potential of tumor cells». *Cancer Res.* vol. 47, no 12, p. 3239-3245.
- Alison, Malcolm R. 2005. *The cancer handbook*. New York, N.Y.: Wiley InterScience, 1580 p.
- Allt, G., et J. G. Lawrenson. 2001. «Pericytes: cell biology and pathology». *Cells Tissues Organs.* vol. 169, no 1, p. 1-11.
- Annabi, B., M. P. Lachambre, N. Bousquet-Gagnon, M. Page, D. Gingras et R. Béliveau. 2002. «Green tea polyphenol (-)-epigallocatechin 3-gallate inhibits MMP-2 secretion and MT1-MMP-driven migration in glioblastoma cells». *Biochim Biophys Acta.* vol. 1542, no 1-3, p. 209-220.
- Armulik, A., A. Abramsson et C. Betsholtz. 2005. «Endothelial/pericyte interactions». *Circ Res.* vol. 97, no 6, p. 512-523.
- Ault, P. 2007. «Overview of second-generation tyrosine kinase inhibitors for patients with imatinib-resistant chronic myelogenous leukemia». *Clin J Oncol Nurs.* vol. 11, no 1, p. 125-129.
- Bach, F., F. J. Uddin et D. Burke. 2007. «Angiopoietins in malignancy». *Eur J Surg Oncol.* vol. 33, no 1, p. 7-15.
- Beecher, G. R. 2003. «Overview of dietary flavonoids: nomenclature, occurrence and intake». *J Nutr.* vol. 133, no 10, p. 3248S-3254S.
- Béliveau, R., et D. Gingras. 2007. «Role of nutrition in preventing cancer». *Can Fam Physician.* vol. 53, no 11, p. 1905-1911.
- Béliveau, Richard, et Denis Gingras. 2005. *Les aliments contre le cancer : la prévention et le traitement du cancer par l'alimentation*. Outremont, Québec: Trécarré, 213 p.
- Béliveau, Richard, et Denis Gingras. 2006. *Cuisiner avec les aliments contre le cancer*. Outremont, Québec: Trécarré, 267 p.
- Bellacosa, A., C. C. Kumar, A. Di Cristofano et J. R. Testa. 2005. «Activation of AKT kinases in cancer: implications for therapeutic targeting». *Adv Cancer Res.* vol. 94, p. 29-86.
- Bergers, G., et L. E. Benjamin. 2003. «Tumorigenesis and the angiogenic switch». *Nat Rev Cancer.* vol. 3, no 6, p. 401-410.

- Bergers, G., et S. Song. 2005. «The role of pericytes in blood-vessel formation and maintenance». *Neuro Oncol.* vol. 7, no 4, p. 452-464.
- Bergers, G., S. Song, N. Meyer-Morse, E. Bergsland et D. Hanahan. 2003. «Benefits of targeting both pericytes and endothelial cells in the tumor vasculature with kinase inhibitors». *J Clin Invest.* vol. 111, no 9, p. 1287-1295.
- Betsholtz, C. 2003. «Biology of platelet-derived growth factors in development». *Birth Defects Res C Embryo Today.* vol. 69, no 4, p. 272-285.
- Birt, D. F., S. Hendrich et W. Wang. 2001. «Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids». *Pharmacol Ther.* vol. 90, no 2-3, p. 157-177.
- Bisacchi, D., R. Benelli, C. Vanzetto, N. Ferrari, F. Tosetti et A. Albini. 2003. «Anti-angiogenesis and angioprevention: mechanisms, problems and perspectives». *Cancer Detect Prev.* vol. 27, no 3, p. 229-238.
- Block, G., B. Patterson et A. Subar. 1992. «Fruit, vegetables, and cancer prevention: a review of the epidemiological evidence». *Nutr Cancer.* vol. 18, no 1, p. 1-29.
- Blume-Jensen, P., et T. Hunter. 2001. «Oncogenic kinase signalling». *Nature.* vol. 411, no 6835, p. 355-365.
- Bode, A. M., et Z. Dong. 2006. «Molecular and cellular targets». *Mol Carcinog.* vol. 45, no 6, p. 422-430.
- Brahimi-Horn, C., et J. Pouyssegur. 2006. «The role of the hypoxia-inducible factor in tumor metabolism growth and invasion». *Bull Cancer.* vol. 93, no 8, p. E73-80.
- Bravo, L. 1998. «Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance». *Nutr Rev.* vol. 56, no 11, p. 317-333.
- Byrne, A. M., D. J. Bouchier-Hayes et J. H. Harmey. 2005. «Angiogenic and cell survival functions of vascular endothelial growth factor (VEGF)». *J Cell Mol Med.* vol. 9, no 4, p. 777-794.
- Capdeville, R., E. Buchdunger, J. Zimmermann et A. Matter. 2002. «Glivec (STI571, imatinib), a rationally developed, targeted anticancer drug». *Nat Rev Drug Discov.* vol. 1, no 7, p. 493-502.
- Carmeliet, P. 2000. «Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis». *Nat Med.* vol. 6, no 4, p. 389-395.
- Carmeliet, P. 2005. «VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer». *Oncology.* vol. 69 Suppl 3, p. 4-10.

- Chen, T., L. P. Li, X. Y. Lu, H. D. Jiang et S. Zeng. 2007. «Absorption and excretion of luteolin and apigenin in rats after oral administration of *Chrysanthemum morifolium* extract». *J Agric Food Chem.* vol. 55, no 2, p. 273-277.
- Cheng, J. Q., C. W. Lindsley, G. Z. Cheng, H. Yang et S. V. Nicosia. 2005b. «The Akt/PKB pathway: molecular target for cancer drug discovery». *Oncogene.* vol. 24, no 50, p. 7482-7492.
- Cheng, X. W., M. Kuzuya, K. Nakamura, Z. Liu, Q. Di, J. Hasegawa, M. Iwata, T. Murohara, M. Yokota et A. Iguchi. 2005a. «Mechanisms of the inhibitory effect of epigallocatechin-3-gallate on cultured human vascular smooth muscle cell invasion». *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* vol. 25, no 9, p. 1864-1870.
- Conney, A. H., Y. Lu, Y. Lou, J. Xie et M. Huang. 1999. «Inhibitory effect of green and black tea on tumor growth». *Proc Soc Exp Biol Med.* vol. 220, no 4, p. 229-233.
- Couffinhal, T., P. Dufourcq, D. Daret et C. Duplaa. 2001. «[The mechanisms of angiogenesis. Medical and therapeutic applications]». *Rev Med Interne.* vol. 22, no 11, p. 1064-1082.
- Cristofanilli, M., C. Charnsangavej et G. N. Hortobagyi. 2002. «Angiogenesis modulation in cancer research: novel clinical approaches». *Nat Rev Drug Discov.* vol. 1, no 6, p. 415-426.
- Croft, K. D. 1998. «The chemistry and biological effects of flavonoids and phenolic acids». *Ann N Y Acad Sci.* vol. 854, p. 435-442.
- Cross, M. J., et L. Claesson-Welsh. 2001. «FGF and VEGF function in angiogenesis: signalling pathways, biological responses and therapeutic inhibition». *Trends Pharmacol Sci.* vol. 22, no 4, p. 201-207.
- Crozier, A., MEJ Lean, MS McDonald et C Black. 1997. «Quantitative Analysis of the Flavonoid Content of Commercial Tomatoes, Onions, Lettuce, and Celery». *J. Agric. Food Chem.* vol. 45, p. 590-595.
- D'Amato, R., E. Wesolowski et L. E. Smith. 1993. «Microscopic visualization of the retina by angiography with high-molecular-weight fluorescein-labeled dextrans in the mouse». *Microvasc Res.* vol. 46, no 2, p. 135-142.
- Davis, S., T. H. Aldrich, P. F. Jones, A. Acheson, D. L. Compton, V. Jain, T. E. Ryan, J. Bruno, C. Radziejewski, P. C. Maisonpierre et G. D. Yancopoulos. 1996. «Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, by secretion-trap expression cloning». *Cell.* vol. 87, no 7, p. 1161-1169.

- Demeule, M., J. Michaud-Levesque, B. Annabi, D. Gingras, D. Boivin, J. Jodoin, S. Lamy, Y. Bertrand et R. Béliveau. 2002. «Green tea catechins as novel antitumor and antiangiogenic compounds». *Curr Med Chem Anticancer Agents*. vol. 2, no 4, p. 441-463.
- Di Carlo, G., N. Mascolo, A. A. Izzo et F. Capasso. 1999. «Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs». *Life Sci*. vol. 65, no 4, p. 337-353.
- Dor, Y., V. Djonov et E. Keshet. 2003. «Making vascular networks in the adult: branching morphogenesis without a roadmap». *Trends Cell Biol*. vol. 13, no 3, p. 131-136.
- Drogat, B., P. Auguste, D. T. Nguyen, M. Bouche-careilh, R. Pineau, J. Nalbantoglu, R. J. Kaufman, E. Chevet, A. Bikfalvi et M. Moenner. 2007. «IRE1 signaling is essential for ischemia-induced vascular endothelial growth factor-A expression and contributes to angiogenesis and tumor growth in vivo». *Cancer Res*. vol. 67, no 14, p. 6700-6707.
- Dwyer, J. T., et J. J. Peterson. 2002. «Measuring flavonoid intake: need for advanced tools». *Public Health Nutr*. vol. 5, no 6A, p. 925-930.
- Erber, R., A. Thurnher, A. D. Katsen, G. Groth, H. Kerger, H. P. Hammes, M. D. Menger, A. Ullrich et P. Vajkoczy. 2004. «Combined inhibition of VEGF and PDGF signaling enforces tumor vessel regression by interfering with pericyte-mediated endothelial cell survival mechanisms». *Faseb J*. vol. 18, no 2, p. 338-340.
- Ergun, S., D. Tilki, L. Oliveira-Ferrer, G. Schuch et N. Kilic. 2006. «Significance of vascular stabilization for tumor growth and metastasis». *Cancer Lett*. vol. 238, no 2, p. 180-187.
- Fang, J., Q. Zhou, X. L. Shi et B. H. Jiang. 2007. «Luteolin inhibits insulin-like growth factor I receptor signaling in prostate cancer cells». *Carcinogenesis*. vol. 28, no 3, p. 713-723.
- Fassina, G., R. Vene, M. Morini, S. Minghelli, R. Benelli, D. M. Noonan et A. Albini. 2004. «Mechanisms of inhibition of tumor angiogenesis and vascular tumor growth by epigallocatechin-3-gallate». *Clin Cancer Res*. vol. 10, no 14, p. 4865-4873.
- Ferrara, N. 2005. «The role of VEGF in the regulation of physiological and pathological angiogenesis». *Exs*, no 94, p. 209-231.
- Flamme, I., T. Frolich et W. Risau. 1997. «Molecular mechanisms of vasculogenesis and embryonic angiogenesis». *J Cell Physiol*. vol. 173, no 2, p. 206-210.
- Folkman, J. 1971. «Tumor angiogenesis: therapeutic implications». *N Engl J Med*. vol. 285, no 21, p. 1182-1186.

- Folkman, J. 2006. «Angiogenesis». *Annu Rev Med.* vol. 57, p. 1-18.
- Folkman, J., E. Merler, C. Abernathy et G. Williams. 1971. «Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis». *J Exp Med.* vol. 133, no 2, p. 275-288.
- Folkman, J., et Y. Shing. 1992. «Angiogenesis». *J Biol Chem.* vol. 267, no 16, p. 10931-10934.
- Fotsis, T., M. S. Pepper, E. Aktas, S. Breit, S. Rasku, H. Adlercreutz, K. Wahala, R. Montesano et L. Schweigerer. 1997. «Flavonoids, dietary-derived inhibitors of cell proliferation and in vitro angiogenesis». *Cancer Res.* vol. 57, no 14, p. 2916-2921.
- Frederiks, W. M., et O. R. Mook. 2004. «Metabolic mapping of proteinase activity with emphasis on in situ zymography of gelatinases: review and protocols». *J Histochem Cytochem.* vol. 52, no 6, p. 711-722.
- Fredriksson, L., H. Li et U. Eriksson. 2004. «The PDGF family: four gene products form five dimeric isoforms». *Cytokine Growth Factor Rev.* vol. 15, no 4, p. 197-204.
- Garbisa, S., L. Sartor, S. Biggin, B. Salvato, R. Benelli et A. Albini. 2001. «Tumor gelatinases and invasion inhibited by the green tea flavanol epigallocatechin-3-gallate». *Cancer.* vol. 91, no 4, p. 822-832.
- Gastl, G., T. Hermann, M. Steurer, J. Zmija, E. Gunsilius, C. Unger et A. Kraft. 1997. «Angiogenesis as a target for tumor treatment». *Oncology.* vol. 54, no 3, p. 177-184.
- Gerhardt, H., et C. Betsholtz. 2003. «Endothelial-pericyte interactions in angiogenesis». *Cell Tissue Res.* vol. 314, no 1, p. 15-23.
- Glade, M. J. 1999. «Food, nutrition, and the prevention of cancer: a global perspective. American Institute for Cancer Research/World Cancer Research Fund, American Institute for Cancer Research, 1997». *Nutrition.* vol. 15, no 6, p. 523-526.
- Gonzalez, C. A., et E. Riboli. 2006. «Diet and cancer prevention: where we are, where we are going». *Nutr Cancer.* vol. 56, no 2, p. 225-231.
- Graf, B. A., P. E. Milbury et J. B. Blumberg. 2005. «Flavonols, flavones, flavanones, and human health: epidemiological evidence». *J Med Food.* vol. 8, no 3, p. 281-290.
- Grant, D. S., P. I. Lelkes, K. Fukuda et H. K. Kleinman. 1991. «Intracellular mechanisms involved in basement membrane induced blood vessel differentiation in vitro». *In Vitro Cell Dev Biol.* vol. 27A, no 4, p. 327-336.
- Grignon, Georges. 2003. *Histologie*. Coll. «Le PCEM en QCM». Paris: Ellipses, 188 p.

- Groth, C., et M. Lardelli. 2002. «The structure and function of vertebrate fibroblast growth factor receptor 1». *Int J Dev Biol.* vol. 46, no 4, p. 393-400.
- Hall, A. P. 2006. «Review of the pericyte during angiogenesis and its role in cancer and diabetic retinopathy». *Toxicol Pathol.* vol. 34, no 6, p. 763-775.
- Hammerstone, J. F., S. A. Lazarus et H. H. Schmitz. 2000. «Procyanidin content and variation in some commonly consumed foods». *J Nutr.* vol. 130, no 8S Suppl, p. 2086S-2092S.
- Hanahan, D., et R. A. Weinberg. 2000. «The hallmarks of cancer». *Cell.* vol. 100, no 1, p. 57-70.
- Havsteen, B. H. 2002. «The biochemistry and medical significance of the flavonoids». *Pharmacol Ther.* vol. 96, no 2-3, p. 67-202.
- Heldin, C. H. 2004. «Platelet-derived growth factor--an introduction». *Cytokine Growth Factor Rev.* vol. 15, no 4, p. 195-196.
- Hellstrom, M., M. Kalen, P. Lindahl, A. Abramsson et C. Betsholtz. 1999. «Role of PDGF-B and PDGFR-beta in recruitment of vascular smooth muscle cells and pericytes during embryonic blood vessel formation in the mouse». *Development.* vol. 126, no 14, p. 3047-3055.
- Hertog, M. G., P. C. Hollman, M. B. Katan et D. Kromhout. 1993. «Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in The Netherlands». *Nutr Cancer.* vol. 20, no 1, p. 21-29.
- Hoeben, A., B. Landuyt, M. S. Highley, H. Wildiers, A. T. Van Oosterom et E. A. De Bruijn. 2004. «Vascular endothelial growth factor and angiogenesis». *Pharmacol Rev.* vol. 56, no 4, p. 549-580.
- Hollman, P. C., M. N. Bijlsman, Y. van Gameren, E. P. Cnossen, J. H. de Vries et M. B. Katan. 1999. «The sugar moiety is a major determinant of the absorption of dietary flavonoid glycosides in man». *Free Radic Res.* vol. 31, no 6, p. 569-573.
- Hollman, P. C., et M. B. Katan. 1997. «Absorption, metabolism and health effects of dietary flavonoids in man». *Biomed Pharmacother.* vol. 51, no 8, p. 305-310.
- Hollman, P. C., et M. B. Katan. 1999. «Dietary flavonoids: intake, health effects and bioavailability». *Food Chem Toxicol.* vol. 37, no 9-10, p. 937-942.
- Huang, C., K. Jacobson et M. D. Schaller. 2004. «MAP kinases and cell migration». *J Cell Sci.* vol. 117, no 20, p. 4619-4628.



- Huang, Y. T., J. J. Hwang, P. P. Lee, F. C. Ke, J. H. Huang, C. J. Huang, C. Kandaswami, E. Middleton, Jr. et M. T. Lee. 1999. «Effects of luteolin and quercetin, inhibitors of tyrosine kinase, on cell growth and metastasis-associated properties in A431 cells overexpressing epidermal growth factor receptor». *Br J Pharmacol.* vol. 128, no 5, p. 999-1010.
- Huang, Y. T., M. L. Kuo, J. Y. Liu, S. Y. Huang et J. K. Lin. 1996. «Inhibitions of protein kinase C and proto-oncogene expressions in NIH 3T3 cells by apigenin». *Eur J Cancer.* vol. 32A, no 1, p. 146-151.
- Jain, R. K. 2003. «Molecular regulation of vessel maturation». *Nat Med.* vol. 9, no 6, p. 685-693.
- Jain, R. K., K. Schlenger, M. Hockel et F. Yuan. 1997. «Quantitative angiogenesis assays: progress and problems». *Nat Med.* vol. 3, no 11, p. 1203-1208.
- Jakobisiak, M., W. Lasek et J. Golab. 2003. «Natural mechanisms protecting against cancer». *Immunol Lett.* vol. 90, no 2-3, p. 103-122.
- Justesen, U., P. Knuthsen et T. Leth. 1998. «Quantitative analysis of flavonols, flavones, and flavanones in fruits, vegetables and beverages by high-performance liquid chromatography with photo-diode array and mass spectrometric detection». *J Chromatogr A.* vol. 799, no 1-2, p. 101-110.
- Kanda, S., M. Kuzuya, M. A. Ramos, T. Koike, K. Yoshino, S. Ikeda et A. Iguchi. 2000. «Matrix metalloproteinase and alphavbeta3 integrin-dependent vascular smooth muscle cell invasion through a type I collagen lattice». *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* vol. 20, no 4, p. 998-1005.
- Key, T. J., N. E. Allen, E. A. Spencer et R. C. Travis. 2002. «The effect of diet on risk of cancer». *Lancet.* vol. 360, no 9336, p. 861-868.
- Kim, D., H. C. Dan, S. Park, L. Yang, Q. Liu, S. Kaneko, J. Ning, L. He, H. Yang, M. Sun, S. V. Nicosia et J. Q. Cheng. 2005a. «AKT/PKB signaling mechanisms in cancer and chemoresistance». *Front Biosci.* vol. 10, p. 975-987.
- Kim, J. H., Y. R. Jin, B. S. Park, T. J. Kim, S. Y. Kim, Y. Lim, J. T. Hong, H. S. Yoo et Y. P. Yun. 2005b. «Luteolin prevents PDGF-BB-induced proliferation of vascular smooth muscle cells by inhibition of PDGF beta-receptor phosphorylation». *Biochem Pharmacol.* vol. 69, no 12, p. 1715-1721.
- Kim, M. H. 2003. «Flavonoids inhibit VEGF/bFGF-induced angiogenesis in vitro by inhibiting the matrix-degrading proteases». *J Cell Biochem.* vol. 89, no 3, p. 529-538.

- Kim, T. J., J. H. Kim, Y. R. Jin et Y. P. Yun. 2006. «The inhibitory effect and mechanism of luteolin 7-glucoside on rat aortic vascular smooth muscle cell proliferation». *Arch Pharm Res.* vol. 29, no 1, p. 67-72.
- Kindt, Thomas J., Richard A. Goldsby, Barbara Anne Osborne et Janis Kuby. 2007. *Kuby immunology*, 6th. New York: W.H. Freeman and Company, 599 p.
- Kleinman, H. K., M. L. McGarvey, L. A. Liotta, P. G. Robey, K. Tryggvason et G. R. Martin. 1982. «Isolation and characterization of type IV procollagen, laminin, and heparan sulfate proteoglycan from the EHS sarcoma». *Biochemistry.* vol. 21, no 24, p. 6188-6193.
- Kurz, H. 2000. «Physiology of angiogenesis». *J Neurooncol.* vol. 50, no 1-2, p. 17-35.
- L'Allemain, G., et J. C. Soria. 2007. «Angiogenesis». *Bull Cancer.* vol. 94, p. S159.
- Labrecque, L., S. Lamy, A. Chapus, S. Mihoubi, Y. Durocher, B. Cass, M. W. Bojanowski, D. Gingras et R. Béliveau. 2005. «Combined inhibition of PDGF and VEGF receptors by ellagic acid, a dietary-derived phenolic compound». *Carcinogenesis.* vol. 26, no 4, p. 821-826.
- Laemmli, U. K. 1970. «Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4». *Nature.* vol. 227, no 5259, p. 680-685.
- Lamy, S., M. Blanchette, J. Michaud-Levesque, R. Lafleur, Y. Durocher, A. Moghrabi, S. Barrette, D. Gingras et R. Béliveau. 2006. «Delphinidin, a dietary anthocyanidin, inhibits vascular endothelial growth factor receptor-2 phosphorylation». *Carcinogenesis.* vol. 27, no 5, p. 989-996.
- Lamy, S., D. Gingras et R. Béliveau. 2002. «Green tea catechins inhibit vascular endothelial growth factor receptor phosphorylation». *Cancer Res.* vol. 62, no 2, p. 381-385.
- Lamy, S., R. Lafleur, V. Bédard, A. Moghrabi, S. Barrette, D. Gingras et R. Béliveau. 2007. «Anthocyanidins inhibit migration of glioblastoma cells: structure-activity relationship and involvement of the plasminolytic system». *J Cell Biochem.* vol. 100, no 1, p. 100-111.
- Lauzier, M. C., M. D. Michaud, M. A. Dery et D. E. Richard. 2006. «[HIF-1 activation during tumor progression: implications and consequences]». *Bull Cancer.* vol. 93, no 4, p. 349-356.
- Lee, W. J., W. K. Chen, C. J. Wang, W. L. Lin et T. H. Tseng. 2008. «Apigenin inhibits HGF-promoted invasive growth and metastasis involving blocking PI3K/Akt pathway and beta4 integrin function in MDA-MB-231 breast cancer cells». *Toxicol Appl Pharmacol.* vol. 226, no 2, p. 178-191.

- Lee, W. J., L. F. Wu, W. K. Chen, C. J. Wang et T. H. Tscng. 2006. «Inhibitory effect of luteolin on hepatocyte growth factor/scatter factor-induced HepG2 cell invasion involving both MAPK/ERKs and PI3K-Akt pathways». *Chem Biol Interact.* vol. 160, no 2, p. 123-133.
- Li, C., W. F. Zhang et Y. F. Zhao. 2007. «Pericytes may have an important role in the pathogenesis of vascular malformations». *Med Hypotheses.* vol. 68, no 4, p. 808-810.
- Lindahl, P., B. R. Johansson, P. Leveen et C. Betsholtz. 1997. «Pericyte loss and microaneurysm formation in PDGF-B-deficient mice». *Science.* vol. 277, no 5323, p. 242-245.
- Lindenmeyer, F., H. Li, S. Menashi, C. Soria et H. Lu. 2001. «Apigenin acts on the tumor cell invasion process and regulates protease production». *Nutr Cancer.* vol. 39, no 1, p. 139-147.
- Liu, L. Z., J. Fang, Q. Zhou, X. Hu, X. Shi et B. H. Jiang. 2005. «Apigenin inhibits expression of vascular endothelial growth factor and angiogenesis in human lung cancer cells: implication of chemoprevention of lung cancer». *Mol Pharmacol.* vol. 68, no 3, p. 635-643.
- Maisonpierre, P. C., C. Suri, P. F. Jones, S. Bartunkova, S. J. Wiegand, C. Radziejewski, D. Compton, J. McClain, T. H. Aldrich, N. Papadopoulos, T. J. Daly, S. Davis, T. N. Sato et G. D. Yancopoulos. 1997. «Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis». *Science.* vol. 277, no 5322, p. 55-60.
- Male, David K. 2005. *Immunologie : aide-mémoire illustré*, 3e éd. Bruxelles: De Boeck, xviii, 141 p.
- Manach, C., et J. L. Donovan. 2004. «Pharmacokinetics and metabolism of dietary flavonoids in humans». *Free Radic Res.* vol. 38, no 8, p. 771-785.
- Manach, C., A. Scalbert, C. Morand, C. Remesy et L. Jimenez. 2004. «Polyphenols: food sources and bioavailability». *Am J Clin Nutr.* vol. 79, no 5, p. 727-747.
- Manach, C., G. Williamson, C. Morand, A. Scalbert et C. Remesy. 2005. «Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies». *Am J Clin Nutr.* vol. 81, no 1 Suppl, p. 230S-242S.
- Manning, B. D., et L. C. Cantley. 2007. «AKT/PKB signaling: navigating downstream». *Cell.* vol. 129, no 7, p. 1261-1274.
- Mariani, S., S. Basciani, M. Arizzi, G. Spera et L. Gnassi. 2002. «PDGF and the testis». *Trends Endocrinol Metab.* vol. 13, no 1, p. 11-17.

- Medina, M. A., R. Munoz-Chapuli et A. R. Quesada. 2007. «Challenges of antiangiogenic cancer therapy: trials and errors, and renewed hope». *J Cell Mol Med.* vol. 11, no 3, p. 374-382.
- Merken, H. M., et G. R. Beecher. 2000. «Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: A review». *J Agric Food Chem.* vol. 48, no 3, p. 577-599.
- Middleton, E., Jr., C. Kandaswami et T. C. Theoharides. 2000. «The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer». *Pharmacol Rev.* vol. 52, no 4, p. 673-751.
- Min. J. K., K. Y. Han, E. C. Kim, Y. M. Kim, S. W. Lee, O. H. Kim, K. W. Kim, Y. S. Gho et Y. G. Kwon. 2004. «Capsaicin inhibits in vitro and in vivo angiogenesis». *Cancer Res.* vol. 64, no 2, p. 644-651.
- Morbidelli, L., S. Donnini et M. Ziche. 2003. «Role of nitric oxide in the modulation of angiogenesis». *Curr Pharm Des.* vol. 9, no 7, p. 521-530.
- Naumov, G. N., E. Bender, D. Zurakowski, S. Y. Kang, D. Sampson, E. Flynn, R. S. Watnick, O. Straume, L. A. Akslen, J. Folkman et N. Almog. 2006. «A model of human tumor dormancy: an angiogenic switch from the nonangiogenic phenotype». *J Natl Cancer Inst.* vol. 98, no 5, p. 316-325.
- Nissen, L. J., R. Cao, E. M. Hedlund, Z. Wang, X. Zhao, D. Wetterskog, K. Funa, E. Brakenhielm et Y. Cao. 2007. «Angiogenic factors FGF2 and PDGF-BB synergistically promote murine tumor neovascularization and metastasis». *J Clin Invest.* vol. 117, no 10, p. 2766-2777.
- Noel, A., M. Jost et E. Maquoi. 2007. «Matrix metalloproteinases at cancer tumor-host interface». *Semin Cell Dev Biol.* vol. 19, no 1, p. 52-60.
- Oak, M. H., J. E. Bedoui, S. V. Madeira, K. Chalupsky et V. B. Schini-Kerth. 2006. «Delphinidin and cyanidin inhibit PDGF(AB)-induced VEGF release in vascular smooth muscle cells by preventing activation of p38 MAPK and JNK». *Br J Pharmacol.* vol. 149, no 3, p. 283-290.
- Olsson, A. K., A. Dimberg, J. Kreuger et L. Claesson-Welsh. 2006. «VEGF receptor signalling - in control of vascular function». *Nat Rev Mol Cell Biol.* vol. 7, no 5, p. 359-371.
- Ornitz. D. M., et N. Itoh. 2001. «Fibroblast growth factors». *Genome Biol.* vol. 2, no 3, p. 3005-3017.

- Ostman, A. 2004. «PDGF receptors-mediators of autocrine tumor growth and regulators of tumor vasculature and stroma». *Cytokine Growth Factor Rev.* vol. 15, no 4, p. 275-286.
- Otrock, Z. K., R. A. Mahfouz, J. A. Makarem et A. I. Shamseddine. 2007. «Understanding the biology of angiogenesis: review of the most important molecular mechanisms». *Blood Cells Mol Dis.* vol. 39, no 2, p. 212-220.
- Ozerdem, U., et W. B. Stallcup. 2003. «Early contribution of pericytes to angiogenic sprouting and tube formation». *Angiogenesis.* vol. 6, no 3, p. 241-249.
- Pandya, N. M., N. S. Dhalla et D. D. Santani. 2006. «Angiogenesis--a new target for future therapy». *Vascul Pharmacol.* vol. 44, no 5, p. 265-274.
- Papetti, M., et I. M. Herman. 2002. «Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis». *Am J Physiol Cell Physiol.* vol. 282, no 5, p. C947-970.
- Pietras, K., T. Sjoblom, K. Rubin, C. H. Heldin et A. Ostman. 2003. «PDGF receptors as cancer drug targets». *Cancer Cell.* vol. 3, no 5, p. 439-443.
- Pilorget, A., V. Berthet, J. Luis, A. Moghrabi, B. Annabi et R. Beliveau. 2003. «Medulloblastoma cell invasion is inhibited by green tea (-)epigallocatechin-3-gallate». *J Cell Biochem.* vol. 90, no 4, p. 745-755.
- Plank, M. J., B. D. Sleeman et P. F. Jones. 2004. «The role of the angiopoietins in tumour angiogenesis». *Growth Factors.* vol. 22, no 1, p. 1-11.
- Prescott, Lansing M., John P. Harley et Donald A. Klein. 2003. *Microbiologie*, 2e éd. française. Bruxelles: De Boeck, xxvi, 1137 p.
- Ramos, S. 2007. «Effects of dietary flavonoids on apoptotic pathways related to cancer chemoprevention». *J Nutr Biochem.* vol. 18, no 7, p. 427-442.
- Reinmuth, N., W. Liu, Y. D. Jung, S. A. Ahmad, R. M. Shaheen, F. Fan, C. D. Bucana, G. McMahon, G. E. Gallick et L. M. Ellis. 2001. «Induction of VEGF in perivascular cells defines a potential paracrine mechanism for endothelial cell survival». *Faseb J.* vol. 15, no 7, p. 1239-1241.
- Risau, W. 1997. «Mechanisms of angiogenesis». *Nature.* vol. 386, no 6626, p. 671-674.
- Roberts, W. G., P. M. Whalen, E. Soderstrom, G. Moraski, J. P. Lyssikatos, H. F. Wang, B. Cooper, D. A. Baker, D. Savage, D. Dalvie, J. A. Atherton, S. Ralston, R. Szewc, J. C. Kath, J. Lin, C. Soderstrom, G. Tkalcevic, B. D. Cohen, V. Pollack, W. Barth, W. Hungerford et E. Ung. 2005. «Antiangiogenic and antitumor activity of a selective PDGFR tyrosine kinase inhibitor, CP-673,451». *Cancer Res.* vol. 65, no 3, p. 957-966.

- Rocha, A., I. Azevedo et R. Soares. 2007. «Anti-angiogenic effects of imatinib target smooth muscle cells but not endothelial cells». *Angiogenesis*. vol. 10, no 4, p. 279-286.
- Rubin, B. P., M. C. Heinrich et C. L. Corless. 2007. «Gastrointestinal stromal tumour». *Lancet*. vol. 369, no 9574, p. 1731-1741.
- Ruhrberg, C., H. Gerhardt, M. Golding, R. Watson, S. Ioannidou, H. Fujisawa, C. Betsholtz et D. T. Shima. 2002. «Spatially restricted patterning cues provided by heparin-binding VEGF-A control blood vessel branching morphogenesis». *Genes Dev*. vol. 16, no 20, p. 2684-2698.
- Rusznayk, S. , et A Szent-Györgyi. 1936. «Vitamin P: flavonols as vitamins». *Nature*. vol. 138, no 27, p. 798.
- Sachinidis, A., R. A. Skach, C. Seul, Y. Ko, J. Hescheler, H. Y. Ahn et J. Fingerle. 2002. «Inhibition of the PDGF beta-receptor tyrosine phosphorylation and its downstream intracellular signal transduction pathway in rat and human vascular smooth muscle cells by different catechins». *Faseb J*. vol. 16, no 8, p. 893-895.
- Sampson, L., E. Rimm, P. C. Hollman, J. H. de Vries et M. B. Katan. 2002. «Flavonol and flavone intakes in US health professionals». *J Am Diet Assoc*. vol. 102, no 10, p. 1414-1420.
- Scalbert, A., C. Morand, C. Manach et C. Remesy. 2002. «Absorption and metabolism of polyphenols in the gut and impact on health». *Biomed Pharmacother*. vol. 56, no 6, p. 276-282.
- Scappaticci, F. A. 2002. «Mechanisms and future directions for angiogenesis-based cancer therapies». *J Clin Oncol*. vol. 20, no 18, p. 3906-3927.
- Scappaticci, F. A. 2003. «The therapeutic potential of novel antiangiogenic therapies». *Expert Opin Investig Drugs*. vol. 12, no 6, p. 923-932.
- Schenone, S., F. Bondavalli et M. Botta. 2007. «Antiangiogenic agents: an update on small molecule VEGFR inhibitors». *Curr Med Chem*. vol. 14, no 23, p. 2495-2516.
- Semenza, G. L. 2003. «Targeting HIF-1 for cancer therapy». *Nat Rev Cancer*. vol. 3, no 10, p. 721-732.
- Shepro, D., et N. M. Morel. 1993. «Pericyte physiology». *Faseb J*. vol. 7, no 11, p. 1031-1038.
- Shibuya, M., et L. Claesson-Welsh. 2006. «Signal transduction by VEGF receptors in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis». *Exp Cell Res*. vol. 312, no 5, p. 549-560.

- Shimoi, K., H. Okada, M. Furugori, T. Goda, S. Takase, M. Suzuki, Y. Hara, H. Yamamoto et N. Kinae. 1998. «Intestinal absorption of luteolin and luteolin 7-O-beta-glucoside in rats and humans». *FEBS Lett.* vol. 438, no 3, p. 220-224.
- Shimoi, K., N. Saka, K. Kaji, R. Nozawa et N. Kinae. 2000. «Metabolic fate of luteolin and its functional activity at focal site». *Biofactors.* vol. 12, no 1-4, p. 181-186.
- Singh, A. K., P. Seth, P. Anthony, M. M. Husain, S. Madhavan, H. Mukhtar et R. K. Maheshwari. 2002. «Green tea constituent epigallocatechin-3-gallate inhibits angiogenic differentiation of human endothelial cells». *Arch Biochem Biophys.* vol. 401, no 1, p. 29-37.
- Snoek-van Beurden, P. A., et J. W. Von den Hoff. 2005. «Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors». *Biotechniques.* vol. 38, no 1, p. 73-83.
- Société canadienne du cancer et Institut national du cancer du Canada. 2007. «Statistiques canadiennes sur le cancer 2007». *Toronto, Canada.*
- Spencer, J. P., M. M. Abd-el-Mohsen et C. Rice-Evans. 2004. «Cellular uptake and metabolism of flavonoids and their metabolites: implications for their bioactivity». *Arch Biochem Biophys.* vol. 423, no 1, p. 148-161.
- Springman, E. B., E. L. Angleton, H. Birkedal-Hansen et H. E. Van Wart. 1990. «Multiple modes of activation of latent human fibroblast collagenase: evidence for the role of a Cys73 active-site zinc complex in latency and a "cysteine switch" mechanism for activation». *Proc Natl Acad Sci U S A.* vol. 87, no 1, p. 364-368.
- Stoclet, J. C., T. Chataigneau, M. Ndiaye, M. H. Oak, J. El Bedoui, M. Chataigneau et V. B. Schini-Kerth. 2004. «Vascular protection by dietary polyphenols». *Eur J Pharmacol.* vol. 500, no 1-3, p. 299-313.
- Tallquist, M. D., W. J. French et P. Soriano. 2003. «Additive effects of PDGF receptor beta signaling pathways in vascular smooth muscle cell development». *PLoS Biol.* vol. 1, no 2, p. E52.
- Teillet, F., A. Boumendjel, J. Boutonnat et X. Ronot. 2007. «Flavonoids as RTK inhibitors and potential anticancer agents». *Med Res Rev.*
- Tortora, Gerard J., Berdell R. Funke et Christine L. Case. 2003. *Introduction à la microbiologie.* Saint-Laurent, Québec: Éditions du Renouveau pédagogique, xxiii, 945 p.
- Tosetti, F., N. Ferrari, S. De Flora et A. Albini. 2002. «Angioprevention': angiogenesis is a common and key target for cancer chemopreventive agents». *Faseb J.* vol. 16, no 1, p. 2-14.

- Trosko, J. E. 2001. «Commentary: is the concept of "tumor promotion" a useful paradigm?». *Mol Carcinog.* vol. 30, no 3, p. 131-137.
- Tu, Y. C., T. W. Lian, J. H. Yen, Z. T. Chen et M. J. Wu. 2007. «Antiatherogenic effects of kaempferol and rhamnocitrin». *J Agric Food Chem.* vol. 55, no 24, p. 9969-9976.
- Vandenbunder, B. 2000. «Angiogenèse et remodelage vasculaire au début du développement tumoral». *médecine/sciences.* vol. 16, p. 281-283.
- Vayalil, P. K., et S. K. Katiyar. 2004. «Treatment of epigallocatechin-3-gallate inhibits matrix metalloproteinases-2 and -9 via inhibition of activation of mitogen-activated protein kinases, c-jun and NF-kappaB in human prostate carcinoma DU-145 cells». *Prostate.* vol. 59, no 1, p. 33-42.
- Visse, R., et H. Nagase. 2003. «Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry». *Circ Res.* vol. 92, no 8, p. 827-839.
- von Tell, D., A. Armulik et C. Betsholtz. 2006. «Pericytes and vascular stability». *Exp Cell Res.* vol. 312, no 5, p. 623-629.
- Warshawsky, David, et Joseph R. Landolph. 2006. *Molecular carcinogenesis and the molecular biology of human cancer.* Boca Raton: CRC Taylor & Francis. 578 p.
- Wattenberg, L. W. 1992. «Inhibition of carcinogenesis by minor dietary constituents». *Cancer Res.* vol. 52, no 7 Suppl, p. 2085s-2091s.
- Wattenberg, L. W., A. B. Hanley, G. Barany, V. L. Sparnins, L. K. Lam et G. R. Fenwick. 1985. «Inhibition of carcinogenesis by some minor dietary constituents». *Princess Takamatsu Symp.* vol. 16, p. 193-203.
- Weinberg, Robert A. 2007. *The biology of cancer.* New York: Garland Science, xix, 796 p.
- Wenzel, U., S. Kuntz, M. D. Brendel et H. Daniel. 2000. «Dietary flavone is a potent apoptosis inducer in human colon carcinoma cells». *Cancer Res.* vol. 60, no 14, p. 3823-3831.
- Williams, C. A., et R. J. Grayer. 2004. «Anthocyanins and other flavonoids». *Nat Prod Rep.* vol. 21, no 4, p. 539-573.
- Williamson, G., et C. Manach. 2005. «Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. II. Review of 93 intervention studies». *Am J Clin Nutr.* vol. 81, no 1 Suppl, p. 243S-255S.
- Woodman, O. L., et ECh Chan. 2004. «Vascular and anti-oxidant actions of flavonols and flavones». *Clin Exp Pharmacol Physiol.* vol. 31, no 11, p. 786-790.



- Yaffe, M. B. 2002. «Phosphotyrosine-binding domains in signal transduction». *Nat Rev Mol Cell Biol.* vol. 3, no 3, p. 177-186.
- Yamashita, J., H. Itoh, M. Hirashima, M. Ogawa, S. Nishikawa, T. Yurugi, M. Naito et K. Nakao. 2000. «Flk1-positive cells derived from embryonic stem cells serve as vascular progenitors». *Nature.* vol. 408, no 6808, p. 92-96.
- Yang, C. S., L. Chen, M. J. Lee et J. M. Landau. 1996. «Effects of tea on carcinogenesis in animal models and humans». *Adv Exp Med Biol.* vol. 401, p. 51-61.
- Yang, C. S., S. Kim, G. Y. Yang, M. J. Lee, J. Liao, J. Y. Chung et C. T. Ho. 1999. «Inhibition of carcinogenesis by tea: bioavailability of tea polyphenols and mechanisms of actions». *Proc Soc Exp Biol Med.* vol. 220, no 4, p. 213-217.
- Yang, C. S., J. M. Landau, M. T. Huang et H. L. Newmark. 2001. «Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds». *Annu Rev Nutr.* vol. 21, p. 381-406.