

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

IMPACT DE L'ÉPIGALLOCATÉCHINE-3-GALLATE SUR LA RÉPONSE À LA
NEUROTENSINE DANS UN MODÈLE DE CELLULES
PROMYÉLOMONOCYTAIRES LEUCÉMIQUES

MÉMOIRE
PRÉSENTÉ
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN BIOCHIMIE

PAR
WENDENMI TIZIANA MANUELLA DAO

NOVEMBRE 2019

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.04-2020). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier tout d'abord Dr. Borhane Annabi, mon directeur de recherche qui m'a ouvert les portes de son laboratoire. Merci pour son encadrement tout au long de mon cursus, sa disponibilité, ses constants encouragements et merci pour la confiance qu'il a porté à mon travail au cours de ses deux années.

Un grand merci à mes collègues Alain Zhgeib, Dr Cyndia Charfi et Marbelis Francisco Fernandez pour l'apprentissage des différentes techniques ainsi que leur disponibilité pour répondre à mes questions.

À Makamissa, ma grande sœur, merci pour ton aide et ton support. Puisse le tout puissant te le rendre au centuple. A Sow Ibrahima, merci pour les conseils, ta gentillesse, ta patience et ton support que Dieu dans sa grande miséricorde puisse te bénir au-delà de tes attentes.

Merci à mes parents Dao Mory Gaston et Berewidougou Zenabou pour leur soutien, leur encouragement et leurs prières à mon égard. Je ne sais pas à quel point vous remercier car vous m'avez donné la possibilité de poursuivre mes rêves. Que le Seigneur n'oublie pas vos sacrifices sur cette terre et vous permet de profiter du fruit de vos efforts.

Un grand merci à la Fondation et à la Faculté des Sciences de l'UQAM ainsi qu'au centre Pharmaqam pour leur soutien financier au travers des bourses qu'ils m'ont octroyé durant ma maîtrise.

DÉDICACE

*A ma mère, ma meilleure amie
Femme battante et inspirante,
Femme au grand cœur et pleine de vie,
Femme pleine de foi et de bonté,
A toi je dédie ma réussite.*

TABLE DES MATIERES

LISTE DES FIGURES.....	vi
LISTE DES TABLEAUX.....	viii
LISTE DES ABBRÉVIATIONS	ix
RÉSUMÉ	xi
RÉSUMÉ GRAPHIQUE	xii
CHAPITRE I INTRODUCTION.....	1
1.1 Le cancer	1
1.1.1 Généralités.....	1
1.1.2 Statistiques	2
1.1.3 Cancérogénèse.....	3
1.1.4 Mécanismes moléculaires et cellulaires de la cancérogénèse	6
1.1.5 Thérapies	13
1.2 La leucémie	17
1.2.1 Description	17
1.2.2 Classification des principaux types de leucémies	18
1.2.3 Modèle cellulaire : HL-60.....	23
1.2.4 Différenciation des cellules HL-60	23
1.2.5 Cascade de signalisation induite par le PMA.....	25
1.3 Le système neurotensinergique	27
1.3.1 La neurotensine (NTS).....	27
1.3.2 Les récepteurs de la NTS	29
1.3.3 Les fonctions biologiques de la NTS	38
1.3.4 Implication de l'axe NTS/NTSR dans le cancer	41
1.4 Diète et chimioprévention	44
1.4.1 Les molécules phytochimiques dans la prévention du cancer	44
1.4.2 Les polyphénols du thé vert : les catéchines	46
1.4.3 L'épigallocatechine-3-gallate (EGCG)	48
CHAPITRE II PROJET DE RECHERCHE	52
2.1 Problématique	52
2.2 Hypothèse.....	53
2.3 Objectifs de recherche.....	53

CHAPITRE III IMPACT OF DIET-DERIVED POLYPHENOL EGCG ON NEUROTENSIN RESPONSE UPON HL-60 PROMYELOCYTIC LEUKEMIA CELLS ACQUISITION OF A MACROPHAGE-LIKE PHENOTYPE	54
3.1 Abstract	56
3.2 Introduction	57
3.3 Materials and Methods	59
3.4 Results	63
3.5 Discussion	67
3.6 Conclusions	71
3.7 Declarations	72
3.8 Acknowledgments	72
3.9 References	73
3.10 Figure Legends	81
CHAPITRE IV DISCUSSION	88
CONCLUSION	96
PERSPECTIVES	98
ANNEXES	100
BIBLIOGRAPHIE	102

LISTE DES FIGURES

Figure	Page
1.1 Les causes de décès au Canada en 2017.....	3
1.2 Les trois étapes de la carcinogénèse.....	5
1.3 Le processus de la réponse inflammatoire.....	7
1.4 Implication des macrophages dans le processus de prolifération cellulaire dans le cancer.....	8
1.5 Implication des MMPs lors de la progression du cancer.....	11
1.6 Les différentes catégories de leucémie	23
1.7 Effet de la différenciation des cellules HL-60 par le PMA sur leur morphologie.....	25
1.8 Cascade de signalisation du PMA.....	27
1.9 Représentation schématique de pro-NT/NN et des différents peptides exprimés chez le rat lors de la maturation du précurseur.....	29
1.10 Illustration schématique des voies de signalisation de NTSR1.....	32
1.11 Différence structurelle entre le NTSR1 et le NTSR2.....	34
1.12 Représentation schématique des domaines structuraux des membres de la familles VPS 10p.....	35
1.13 Représentation schématique des différents cheminements par lesquels la Sortiline va médier ses fonctions.....	38

1.14	L'axe NTS/NTSR dans le cancer et les cascades de signalisation.....	44
1.15	Structure chimique et classification des polyphénols contenus dans le thé vert.....	48
1.16	Les différentes cibles biochimiques de l'EGCG.....	51
3.1	High neurotensin and NTSR3 gene expression correlate with poor prognosis in AML patients.....	81
3.2	Increased NTS3 and MMP-9 expression upon PMA-induced differentiation of promyelomonocytic HL-60 suspension cells into macrophage-like adherent cells.....	82
3.3	Neurotensin internalization is increased in PMA-differentiated HL-60 macrophages and requires NTSR3.....	83
3.4	Differential chemotactic response to neurotensin between undifferentiated and differentiated macrophage-like HL-60 cells.....	84
3.5	EGCG prevents PMA-induced NTSR3 gene expression in differentiated macrophages.....	85
3.6	EGCG potentiates the reduction in chemotactic response of HL-60 differentiated macrophages.....	86
3.7	Schematic representation of the molecular signature associated to the PMA-induced macrophage-like phenotype, and implications in brain immune evasion strategies.....	87
A.1	The galloyl moiety of green tea catechins trigger the inhibition of MMP-9 activity.....	100
A.2	Tea polyphenols inhibit migration of differentiated HL-60 cells.....	101

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Page
1.1 Classification des MMPs en fonctions de leur famille et de leurs fonctions biologiques	12

LISTE DES ABBRÉVIATIONS

ADH	<i>Adherent cells</i>
APC	<i>Adenomatous polyposis coli</i>
BAD	<i>Bcl-2-associated death promoter</i>
BAX	<i>Bcl-2-associated X protein</i>
BCL-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BCL-xS	<i>B-cell lymphoma-extra small</i>
BDNF	<i>Brain-derived neurotrophic factor</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CHO	<i>Chinese hamster ovary cells</i>
Cdk	<i>Cyclin dependent kinase</i>
DMSO	<i>Dimethyl sulfoxide</i>
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
FAK	<i>Focal adhesion kinase</i>
IL	<i>Interleukine</i>
I κ B	<i>Inhibitor of kappa B</i>
JAK	<i>Janus Kinase</i>
Kd	<i>Dissociation constant</i>
LAL	Leucémie aiguë lymphoblastique
LAM	Leucémie aiguë myéloblastique
LLC	Leucémie myéloïde chronique
LMC	Leucémie myéloïde chronique
67LR	<i>67 kDa Laminin receptor</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MEC	Matrice extracellulaire
MEK	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase</i>
NF- κ B	<i>Nuclear factor-kappa B</i>

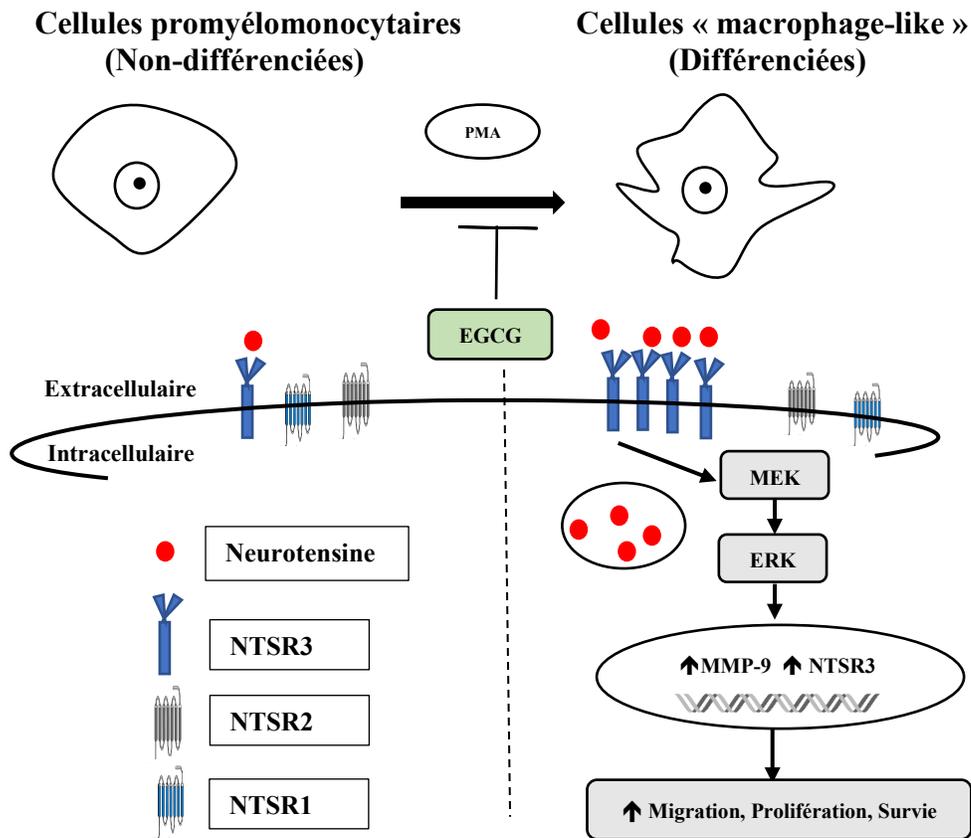
NGF	<i>Nerve growth factor</i>
NTS	Neurotensine
NTSR	Récepteur à la neurotensine
PKC	Proteine kinase C
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acétate
pro-NGF	<i>Pro-Nerve Growth Factor</i>
p21	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 1</i>
p27	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B</i>
p53	<i>Tumor protein 53</i>
Raf-1	<i>Proto-oncogene serine/threonine-protein kinase</i>
Rap	<i>Ras proximate protein</i>
Rb	<i>Retinoblastoma protein</i>
SIDA	Syndrome d'immunodéficience acquise
SORL	<i>Sortilin-related receptor</i>
STAT3	<i>Signal transducer and activator of transcription 3</i>
Tcf	<i>Transcriptional factor</i>
TIMPs	<i>Tissue inhibitors of metalloproteinases</i>
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
TLR	<i>Toll-like receptors</i>
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine

RÉSUMÉ

La neurotensine (NTS) est un neuropeptide qui possède de multiples fonctions physiologiques et pathologiques médiées par trois récepteurs distincts (NTSR). La suractivation de l'axe de signalisation NTS/NTSR a été étroitement liée à la progression tumorale et au processus de métastases dans divers types de cancer. En outre, la NTS a été impliquée dans la régulation de l'immunité et de l'inflammation. Des études ont démontré que la NTS et les NTSR étaient exprimés différemment dans les lymphocytes B sains et malins. Certaines évidences ont aussi montré l'implication de l'axe NTS/NTSR dans la signalisation pro-survie des lymphocytes B représentant donc une potentielle cible thérapeutique. Dans notre étude, nous avons investigué le potentiel *in vitro* de la molécule d'épigallocatechine-3-gallate (EGCG) dérivée de l'alimentation sur l'altération d'un phénotype invasif induit par l'axe de signalisation NTS/NTSR3 lors de la différenciation des cellules leucémiques promyélomonocytaires HL-60 en cellules de type « macrophage-like ». L'analyse *in silico* de l'expression de NTS, NTSR1, NTSR2 et NTSR3 dans la leucémie aiguë myéloblastique (LAM) avec la méthode de Kaplan-Meier indique que la NTS et la NTSR3 corrélaient avec un faible pronostic de survie chez les patients atteints de LAM. Nos résultats montrent que la différenciation des HL-60 mène à leur adhésion au pectine et à l'expression d'un phénotype CD14-/CD11b+ spécifique aux macrophages. La différenciation induit l'expression génique et protéique de NTSR3, une internalisation accrue de NTS, une surexpression de la métalloprotéinase matricielle MMP-9 et une augmentation de la migration cellulaire associée à l'activation des voies de signalisation ERK, MEK et Src. En outre, les données montrent que l'EGCG, un polyphénol dérivé du thé vert, est en mesure d'altérer certaines fonctions du NTSR3 dans les cellules différenciées en réduisant les propriétés telles la migration cellulaire, l'expression de certaines protéines comme MMP-9 et de marqueurs CD11b. La mise en évidence du potentiel de l'EGCG à altérer l'acquisition d'un phénotype invasif ouvre ainsi des perspectives de ciblage moléculaire dans la chimioprévention en élucidant les voies de signalisation et son mode d'action.

Mots clés : Neurotensine, récepteurs à la neurotensine, EGCG, sortiline, macrophages, cellules HL-60, leucémie.

RÉSUMÉ GRAPHIQUE



CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1 Le cancer

1.1.1 Généralités

Le cancer désigne un ensemble de maladies ayant la capacité de s'attaquer à n'importe quelle partie de l'organisme (Organisation mondiale de la santé, 2018). Deux différentes catégories de cancer peuvent être distinguées en fonction de la gravité de la maladie ainsi que son profil de propagation: les tumeurs bénignes et les tumeurs malignes ou néoplasmes. L'une des principales caractéristiques du cancer est la prolifération rapide de cellules anormales qui peuvent se propager de leur site d'origine et envahir des tissus distants de l'organisme et cibler d'autres organes. On parle alors de métastases, responsables de la plupart des décès par suite de cancer (Organisation mondiale de la santé, 2018). La capacité des cellules cancéreuses à maintenir une prolifération incontrôlée se fera en déviant ainsi le réseau de signalisation homéostatique contrôlant la division cellulaire dans les tissus normaux (Hanahan et Weinberg, 2011).

Le développement du cancer peut être lié à des facteurs génétiques ou résulter de l'exposition à certains agents externes cancérigènes parmi lesquels se retrouvent des

agents physiques comme les radiations, des agents chimiques et biologiques. L'action de ces facteurs induira le changement de cellules normales en cellules tumorales au cours du processus de cancérogénèse qui contribuera en la transformation d'une lésion précancéreuse à une tumeur maligne (Blackadar, 2016).

1.1.2 Statistiques

Les causes de mortalités dans le monde varient d'une décennie à une autre et seront différentes aussi dans les régions du monde différant selon le mode de vie, le revenu et les facteurs environnementaux (Foreman *et al.*, 2018). À l'échelle mondiale, le cancer apparaît comme l'une des causes majeures de décès avec une incidence croissante. L'extension du fardeau associé au cancer est liée à plusieurs facteurs notamment le vieillissement de la population, ainsi que la prédominance de certains facteurs de risque établis tels que le tabagisme, le surpoids, l'inactivité physique et les facteurs hormonaux, et dépendant aussi du développement économique et social (Torre *et al.*, 2015). Au Canada, selon les différents rapports statistiques sur le cancer, 1 canadien sur 2 sera diagnostiqué d'un cancer et 1 canadien sur 4 mourra de cette maladie (Marrett *et al.*, 2008). Le cancer apparaît ainsi comme étant l'une des principales causes de décès au Canada, responsable de 30% de tous les décès, suivi des maladies cardiovasculaires, maladies cérébrovasculaires, des accidents et des maladies chroniques des voies respiratoires inférieures d'après les données de Statistique Canada en 2017 (Statistique Canada) (Figure 1.1). En 2017, la Société Canadienne du Cancer avait fait une estimation prédisant que près de 206 000 nouveaux cas de cancers seraient diagnostiqués. Les cancers les plus diagnostiqués en 2017 au Canada étaient le cancer du poumon, le cancer colorectal, le cancer du sein et de la prostate représentant la moitié des cancers diagnostiqués et de décès par cancer. Ces différentes statistiques sont alarmantes et décrivent le poids que représente le cancer dans une société en

constante évolution. À la vue de cela, le besoin urgent de l'augmentation des recherches portant sur l'identification de thérapies et de préventions sur le cancer se fait ressentir.

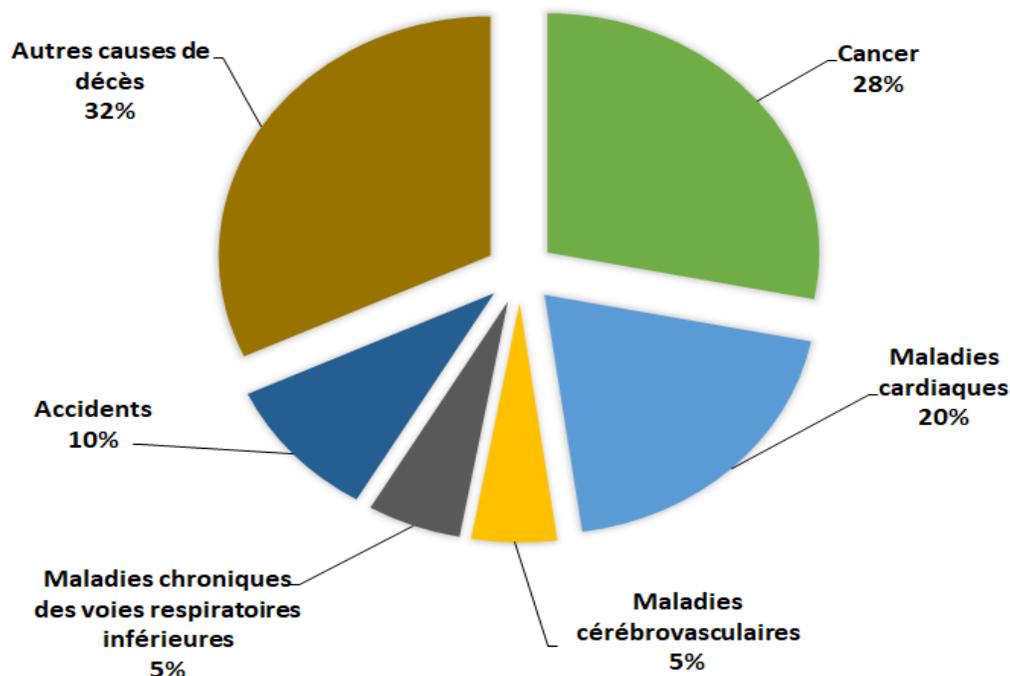


Figure 1.1 Les causes de décès au Canada en 2017. En 2017; le cancer représentait près de 30% de taux de mortalité au Canada et se classait donc comme la première cause de mortalité. [Adapté d'après Statistique Canada, 2017].

1.1.3 Cancérogénèse

La cancérogénèse se définit comme étant le processus par lequel des cellules saines se transforment en cellules tumorales (Figure 1.2). Le développement du cancer se fait en plusieurs étapes, dont trois principales : l'initiation, la promotion et la progression (Carella *et al.*, 2015). La première étape est l'initiation. Au cours de celle-ci, des changements se produisent au niveau du matériel génétique des cellules donnant lieu à des mutations et donc à des dommages à l'ADN conduisant la cellule à devenir possiblement cancéreuse (Scott *et al.*, 1984). Les dommages occasionnés peuvent

apparaître de manière spontanée ou peuvent être causés par certains agents nommés carcinogènes pouvant être chimiques ou physiques. Ceux-ci entraînent des changements génétiques permanents, indiquant que les cellules porteront toujours les mutations même après une division cellulaire. La deuxième étape est la promotion qui cause la prolifération des cellules qui ont été transformées. En effet, les cellules ayant passé l'étape de l'initiation peuvent demeurer inoffensives jusqu'à ce qu'elles soient stimulées par des agents dits promoteurs qui contribueront à augmenter la prolifération cellulaire et, par conséquent, bouleverser l'homéostasie cellulaire (Devi, 2004; Malarkey *et al.*, 2013). La transformation d'une cellule initiée en une cellule néoplasique peut demander du temps et des expositions répétées aux promoteurs tumoraux. Divers facteurs environnementaux sont impliqués lors de cette transformation. Les promoteurs se distinguent par leur mode d'action et leurs propriétés. Ils peuvent être spécifiques, c'est-à-dire qu'ils vont interagir de manière directe en ayant recours à un récepteur ou en agissant directement sur une cellule cible. Les promoteurs non spécifiques, quant à eux, altèrent l'expression de certains gènes sans aucune interaction. Cette phase de promotion va entraîner la diminution de l'apoptose et une augmentation de la croissance cellulaire des cellules qui sera en partie responsable du développement tumoral et qui mènera possiblement à la malignité (Devi, 2004; Klaunig *et al.*, 2000). La dernière phase consiste à la progression durant laquelle les cellules tumorales bénignes pourront se transformer en cellules malignes qui rendent la tumeur plus agressive. Cette étape est irréversible et se caractérise par des changements au niveau du caryotype et des instabilités génétiques. De multiples aberrations chromosomiques sont observées, avec plusieurs cellules aneuploïdes au lieu de cellules diploïdes ainsi qu'un nombre inexact de chromosomes. Cette phase fait intervenir des substances carcinogéniques dont les stimuli favorisent divers changements (Devi, 2004; Oliveira *et al.*, 2007). Au cours de la progression tumorale qui est dans un premier temps localisée, certains mécanismes peuvent favoriser une expansion de la prolifération des cellules cancéreuses pour former des métastases. En effet, une fois la phase de progression enclenchée, les cellules peuvent perdre leur

capacité d'adhérence donnant à la masse tumorale une propriété mobile et celle-ci peut aller au-delà du site d'origine et envahir d'autres sites. Ceci va propager la maladie et sera responsable de plusieurs effets mortels liés au cancer (Devi, 2004).

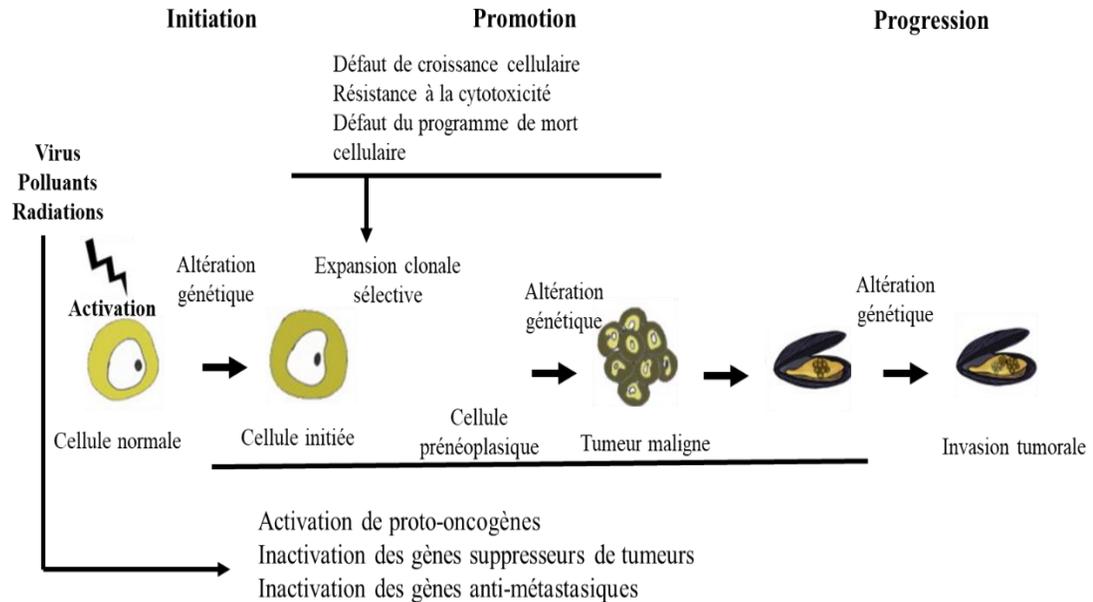


Figure 1.2 Les trois étapes de la carcinogénèse. Une exposition avec un agent viral, polluant, ou radioactif va induire des dommages au niveau du matériel génétique, c'est-à-dire des mutations qui résulteront en une dérégulation des voies de signalisation associées aux processus de prolifération cellulaire, de survie et de différenciation lors de la phase d'initiation. En présence d'un promoteur, les cellules initiées vont proliférer anormalement en augmentant les mutations. Cela entrainera la formation de cellules prénéoplasiques et de tumeurs bénignes. Dans la phase de promotion, certains oncogènes sont activés, aboutissant à la transformation néoplasique, impliquant une croissance rapide de la tumeur avec un caractère invasif pouvant aboutir aux métastases. [Adapté d'après Carella, et al., 2015].

1.1.4 Mécanismes moléculaires et cellulaires de la cancérogénèse

1.1.4.1 L'inflammation

L'inflammation se définit comme une réponse locale à une lésion cellulaire qui sert de mécanisme initiant l'élimination des agents nocifs et des tissus endommagés (Medzhitov, 2010b). Ce processus comprend une dilatation vasculaire, une perméabilité des capillaires, une augmentation du débit sanguin et un recrutement des leucocytes (Savill *et al.*, 2002). Les neutrophiles polymorphonucléaires sont recrutés en premier et s'accumulent au niveau du site enflammé. Ces neutrophiles agissent en première ligne de défense du système immunitaire inné en raison de leurs fonctions phagocytaires et antimicrobiennes. Ensuite, les monocytes et les macrophages vont pénétrer dans le site inflammatoire pour se débarrasser des débris cellulaires et des cellules apoptotiques par phagocytose (Savill *et al.*, 2002). La réponse inflammatoire met en jeu quatre composantes clés: les inducteurs inflammatoires, qui seront détectés par des senseurs. Ces derniers vont induire les médiateurs inflammatoires qui engendreront le recrutement de cellules effectrices qui vont diriger la réponse inflammatoire (Medzhitov, 2010a) (Figure 1.3). Chaque composant se présente sous plusieurs formes et leurs combinaisons fonctionnent dans une voie inflammatoire distincte. Deux types d'inflammation peuvent être distingués (Dolgachev et Lukacs, 2010). L'inflammation aiguë est une réponse normale qui fait suite à une blessure et représente un processus contrôlé (Kumar *et al.*, 2004). La réponse générée lors d'une inflammation aiguë fait intervenir le système immunitaire et va inclure le recrutement de globules blancs au niveau du site de l'inflammation par chimiotactisme et à travers d'autres mécanismes. Cette réponse génère le relâchement de cytokines et chimiokines parmi lesquelles se retrouvent les interférons et les interleukines (Varela *et al.*, 2018). Celles-ci sont responsables d'initier les réponses qui vont mener à la résolution de l'inflammation et à un retour aux conditions homéostatiques de base (Gabay et

Kushner, 1999). Un échec de la résolution lors de l'inflammation aiguë mène à l'installation d'une inflammation chronique (Haworth et Buckley, 2007). C'est une inflammation qu'on qualifie d'inflammation à longue durée car elle peut persister des mois ou même des années. Cependant, l'inflammation chronique peut résulter de l'induction par certaines particules environnementales tels que le tabac, la poussière de silice, les désordres métaboliques comme l'hypoxie ou les maladies auto-immunes (Comen *et al.*, 2018). Lors de cette inflammation, les premières cellules à intervenir sont les lymphocytes T et les macrophages. Leur activation permettra le relâchement de cytokines qui vont induire l'amplification de la réponse immunitaire (Gabay et Kushner, 1999; Medzhitov, 2010a).

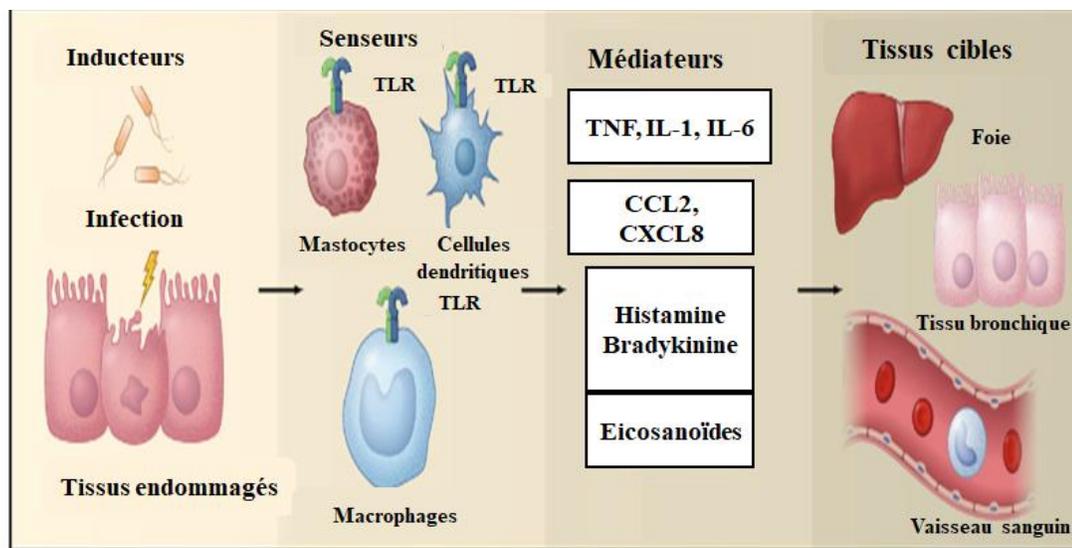


Figure 1.3 Le processus de la réponse inflammatoire. À la suite d'un dommage tissulaire, le système immunitaire va d'abord détecter les agents infectieux grâce à la présence de senseurs qui résident au niveau de tissus comme les cellules dendritiques, les macrophages et les cellules mastocytes qui vont participer à la reconnaissance de motifs portés par les pathogènes. Il se produit ensuite une sécrétion de médiateurs de l'inflammation (cytokines pro-inflammatoires, chimiokines). La réponse se poursuivra en modifiant le flux sanguin, ce qui permettra l'activation de cellules effectrices au niveau du tissu infecté. Cet ensemble va contribuer à la résolution de l'inflammation par l'élimination de tout agent étranger. [Adapté d'après Medzhitov, 2010].

La réponse inflammatoire prolongée s'accompagne souvent d'une destruction des tissus ou de dommages cellulaires (Coussens et Werb, 2002). L'inflammation chronique joue un rôle majeur dans certaines maladies telles que les maladies cardiaques, le diabète, et le cancer. Plusieurs recherches ont établi un lien étroit entre l'inflammation et le cancer. L'inflammation chronique associée à une infection et une irritation peut créer un environnement favorisant les lésions génomiques et l'initiation de la tumeur (Reuter *et al.*, 2010; Varela *et al.*, 2018). Plusieurs évidences ont montré que les cellules recrutées lors de la réponse à une inflammation telles les cytokines, les chimiokines et les macrophages agissent en favorisant la prolifération des cellules cancéreuses, en stimulant l'angiogenèse tumorale et la dégradation de la matrice extracellulaire (MEC); en supprimant les réponses immunitaires antitumorales, contribuant ainsi à l'invasion tumorale, et à la suppression du processus d'apoptose (Coussens et Werb, 2002; Qian et Pollard, 2010) (Figure 1.4).

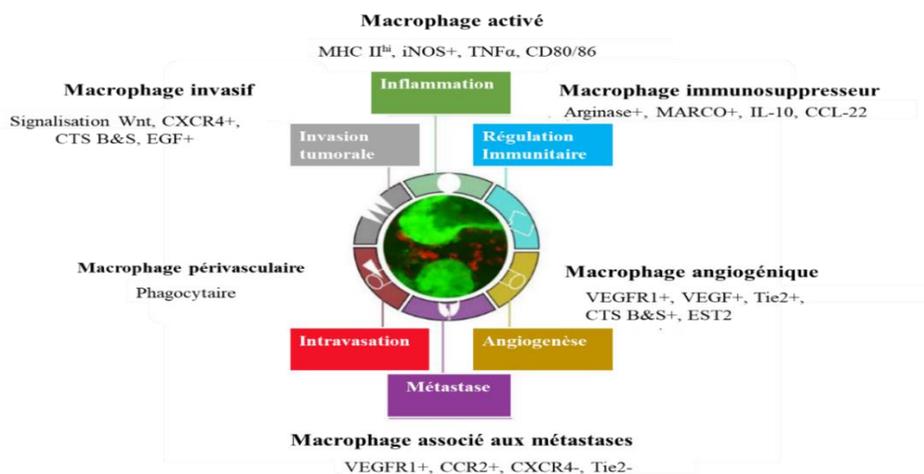


Figure 1.4 Implication des macrophages dans le processus de prolifération cellulaire dans le cancer. Le phénotype exprimé par les macrophages montre que ceux-ci peuvent être impliqués dans la progression tumorale. Les macrophages et les cellules tumorales vont être étroitement liés incitant ainsi les macrophages à adopter certains comportements facilitant des modifications génétiques intrinsèques des cellules tumorales. Certaines voies de signalisation permettront aux macrophages de contribuer à la progression tumorale en apportant d'importants changements au niveau du microenvironnement de la tumeur supportant l'invasion, l'angiogenèse, l'intravasation, l'immunosuppression et les métastases. [Adapté d'après Qian et al., 2010].

1.1.4.2 La migration cellulaire

La migration cellulaire se définit comme la capacité qu'a une cellule à se mouvoir et qui est essentielle à l'accomplissement des processus physiologiques de celle-ci. Le processus de migration cellulaire est observé au cours du développement lors du stade embryonnaire durant la formation des tissus lors de la gastrulation et lors de la différenciation de plusieurs tissus et organes (Keller, 2005; Rorth, 2009). Le cytosquelette d'actine agit comme le principal moteur de la migration cellulaire (Franz *et al.*, 2002). Cette migration est impliquée dans les processus inflammatoires menant à la cicatrisation (Franz *et al.*, 2002). La transition de la phase statique à la phase mobile est très importante au-delà du processus de morphogénèse lors du développement embryonnaire, car la motilité cellulaire joue un rôle clé lors du renouvellement de certains organes comme celui de la peau, dont les précurseurs vont migrer pour donner des cellules différenciées constituées d'un ou plusieurs tissus. La réponse immunitaire n'est pas exclue par la migration de cellules comme les leucocytes recrutés lors de l'inflammation (Horwitz et Webb, 2003). Une dérégulation de la migration peut être associée à diverses pathologies. L'invasion lors du cancer a été très souvent associée à une migration cellulaire incontrôlée. La migration cellulaire est orchestrée par une séquence de processus biophysiques en lien avec des événements biochimiques impliquant une transformation au niveau du cytosquelette, et des changements de la MEC par divers stimuli (Ridley *et al.*, 2003). Des changements dans les voies de signalisation régulant la motilité peuvent donc conduire aux processus pathologiques d'invasion de cellules tumorales et de métastases principalement au travers de la dégradation de la MEC par les métalloprotéinases qui induira la migration cellulaire (Chang et Werb, 2001).

1.1.4.3 Les métalloprotéinases

Les métalloprotéinases (MMPs) sont des enzymes qui font partie de la famille des protéinases extracellulaires et responsables de la dégradation de la MEC (Sternlicht *et al.*, 2001). Elles sont synthétisées sous la forme de proenzymes ou zymogènes sécrétés ou transmembranaires avec la présence d'une séquence intracellulaire de 80 résidus en N-terminal. Le passage de la forme inactive à la forme active se fait suite au clivage du propeptide en N-terminal par des MMPs ou des protéases, ou par l'action de certains agents chaotropiques qui vont perturber l'ion zinc du site catalytique au niveau du thiol du résidu de cystéine (Sternlicht *et al.*, 2001). Elles peuvent être inhibées par les membres d'une famille inhibitrice des MMPs, les TIMPs. Plus d'une vingtaine de MMPs ont été identifiées et diffèrent en fonction de leur structure primaire et de leur affinité avec un substrat spécifique. Différentes familles de MMPs sont connues (Visse et Nagase, 2003) (Tableau 1.1). Les collagénases interviennent dans la dégradation du collagène fibrillaire, les stromélysines dégradent les composants non collagènes de la MEC. Les MMPs de type membranaire (MT-MMP), sont des molécules transmembranaires capables de dégrader des composants de la MEC. Une dernière catégorie constitue le groupe hétérogène regroupant les autres éléments moins caractérisés (Sternlicht *et al.*, 2001). La structure tridimensionnelle des MMPs montre une organisation en différents domaines qui sont : le prodomaine, responsable de la protection du domaine catalytique et qui restreint ainsi l'accès du substrat au niveau du site actif, le domaine fibronectine, et le domaine hémopexine (Sternlicht *et al.*, 2001). Des recherches précédentes ont pu mettre en lien les MMPs et divers stades d'évolution du cancer. La MEC, qui est le fondement de l'architecture interne du corps humain, est un composant non cellulaire formé de plusieurs macromolécules présentes entre les tissus et les organes, et fournit un échafaudage physique requis pour les constituants cellulaires, mais aussi permet le déclenchement de différents signaux biochimiques nécessaires pour la formation, la différenciation et l'homéostasie des tissus (Yue,

2014). Toute aberration compromettant la MEC entrainera une modification de son organisation et de ses fonctions en promouvant des maladies comme le cancer (Sprenger *et al.*, 2008).

L'implication des MMPs dans le cancer, se fait à la fois de façon directe et indirecte. De façon directe, les MMPs dégradent la MEC, ce qui va créer un environnement plus favorable au processus de migration et d'invasion cellulaire via la dérégulation des protéines de la MEC. Cela va par la suite augmenter l'angiogenèse par un relargage du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (Deryugina et Quigley, 2015). Quant aux effets indirects, les MMPs peuvent induire les chimiokines impliquées dans la réponse inflammatoire, activer certaines pro-MMPs et cliver des molécules intervenant dans la régulation de protéines de surface participant activement à la progression du cancer (Gialeli *et al.*, 2011; Reed *et al.*, 2007) (Figure 1.5).

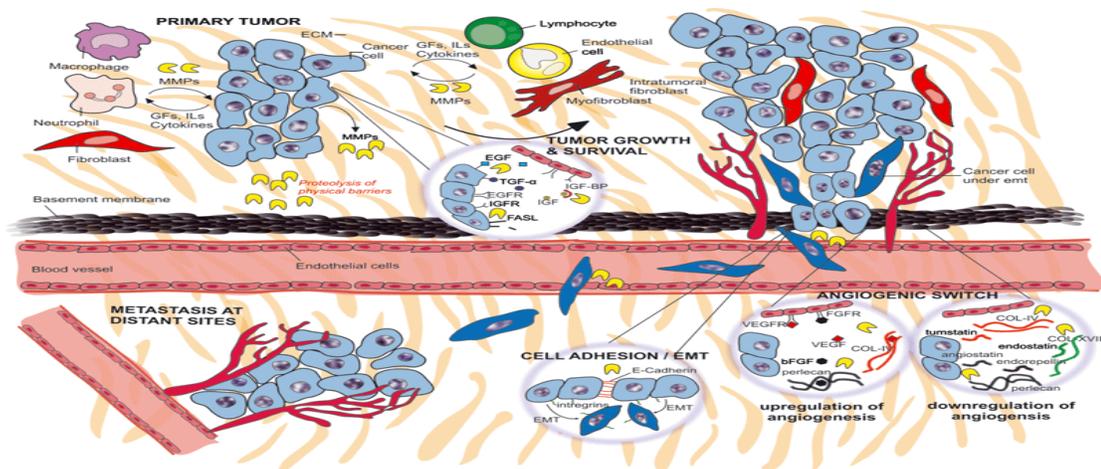


Figure 1.5 Implication des MMPs lors de la progression du cancer. L'activité protéolytique des MMPs au niveau de la MEC va favoriser l'invasion tumorale. Les MMPs vont intervenir à plusieurs stades du développement du cancer allant de l'initiation à la métastase et sont aussi impliqués dans la perte d'adhérence des cellules tumorales. Ils vont modifier l'architecture de la MEC, participer au processus inflammatoire en supprimant le recrutement de cellules responsables de la réponse inflammatoire. Ils vont réduire l'apoptose et favoriser la croissance cellulaire. En présence de certains stimuli internes, les MMPs auront un rôle dans l'angiogenèse par la libération de certains facteurs de croissance. [Adapté d'après Gialeli *et al.*, 2011].

Tableau 1.1 Classification des MMPs en fonctions de leur famille et de leurs fonctions biologiques. [Adapté d'après Visse et Nagase, 2003].

Classe	Numérotation (MMPs)	Fonctions Biologiques
Matrilysines	MMP-7= matrilysine MMP-26= matrilysine 2	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Différenciation adipocytaire, modulation de la réponse inflammatoire ▪ Dégradation de la MEC, remodelage tissulaire
Collagénases	MMP-1= collagénase interstitielle MMP-8= collagénase neutrophile MMP-13= collagénase 3	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Migration des kéranocytes et réépithélialisation, migration cellulaire ▪ Régulation de l'apoptose, réponse anti-inflammatoire ▪ Activation des ostéoclastes, migration endothéliale
Gélatinases	MMP-2 MMP-9	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Croissance neuritique, migration cellulaire ▪ Modulation de la réponse à l'Interleukine 2, réponse anti-inflammatoire et pro-inflammatoire, résistance tumorale, migration des neutrophiles
Stromélysines	MMP-3 MMP-10 MMP-11	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Apoptose et différenciation des cellules épithéliales mammaires, migration cellulaire ▪ Migration cellulaire et réépithélialisation ▪ Implantation de l'embryon, ontogénèse des organes
MT-MMPs	MMP-14=MT1-MMP MMP-15=MT2-MMP MMP-16=MT3-MMP MMP-17=MT4-MMP MMP-24=MT5-MMP MMP-25=MT6-MMP	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Migration cellulaire, Modulation de l'adhésion cellulaire, tubulogénèse des reins ▪ Modulation de l'adhésion cellulaire ▪ Modulation de l'adhésion cellulaire ▪ Inflammation et angiogénèse ▪ Croissance neuritique, modulation de l'adhésion cellulaire ▪ Remodelage tissulaire, développement embryonnaire
Autres MMPs	MMP-12= métalloélastase MMP-18, MMP-19, MMP-20= énamélysine	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Dégradation de l'élastine, migration des macrophages ▪ Régulation de la formation de l'émail cementum

1.1.5 Thérapies

Il existe une multitude de traitements administrés en fonction du type de cancer ainsi que de son état d'avancement. Certaines personnes atteintes de cancer n'auront qu'un seul traitement, mais la plupart des patients ont recours à la combinaison de plusieurs traitements. Les traitements les plus utilisés comprennent la chirurgie, la chimiothérapie, la radiothérapie, l'immunothérapie et la thérapie ciblée (Falzone *et al.*, 2018; Palumbo *et al.*, 2013).

La chirurgie est utilisée de diverses manières chez les patients atteints de cancer. Celle-ci apparaît comme étant le traitement offrant de meilleures chances de lutter contre de nombreux types de cancer. Plusieurs raisons peuvent expliquer le recours à la chirurgie. La chirurgie peut être utilisée comme un outil diagnostique afin de confirmer un cancer avant un traitement. Lorsque utilisé dans un but préventif, on parle de chirurgie prophylactique qui consiste à retirer un organe sain mais à haut risque de cancérisation. Elle est le plus souvent utilisée chez les personnes avec des prédispositions génétiques (You *et al.*, 2007). La chirurgie curative a essentiellement pour but de retirer une tumeur en procédant à l'ablation partielle de l'organe ou en retirant la tumeur dans son entièreté. Pour certains types de cancers, la chirurgie de réduction tumorale est utilisée pour réduire le volume de la masse tumorale pour optimiser l'effet d'autres traitements. On distingue aussi la chirurgie palliative permettant d'améliorer la qualité de vie et de soulager plusieurs effets secondaires du cancer et des traitements (Grove et Marchant, 2016).

La chimiothérapie fait référence à un traitement utilisant des médicaments de synthèse, fabriqués chimiquement contre le cancer. Ceux-ci interfèrent avec le programme biochimique impliqué ou engagé dans la réplication cellulaire et provoquer ainsi la

mort cellulaire sélective (Osiecki *et al.*, 2002). Plusieurs agents chimiothérapeutiques détruisent les cellules cancéreuses par oxydation en produisant des espèces réactives de l'oxygène et en induisant l'apoptose ou la nécrose des cellules tumorales (Wang et Yi, 2008). Cependant, d'autres agissent sur divers composants du métabolisme cellulaire en influençant les activités de différentes enzymes nécessaires à la division cellulaire (Ma *et al.*, 2009). Les agents de chimiothérapie peuvent être divisés en plusieurs catégories en fonction de facteurs tels que leur mode de fonctionnement, leur structure chimique et leur relation avec un autre médicament. Les catégories les plus importantes d'agents chimiothérapeutiques comprennent les agents alkyls, les antimétabolites, les antitumoraux et des inhibiteurs mitotiques (Lamson et Brignall, 1999; Wu, 2006). Bien que la chimiothérapie soit en mesure de favoriser la survie et améliorer la qualité de vie des patients de cancer, la résistance au cours de ce traitement représente un obstacle majeur à l'amélioration de la réponse globale et de la survie des patients cancéreux. Celle-ci peut résulter d'une activité réduite de transporteurs d'absorption (Liu, 2009). En outre, bien que l'objectif recherché par la chimiothérapie soit d'éliminer les cellules tumorales, certaines cellules normales sont également affectées, ce qui entraîne de nombreux effets secondaires indésirables dans plusieurs organes (Zhou *et al.*, 2007b). Ces effets constituent un problème clinique majeur de même que la toxicité qui limite aussi souvent l'utilisation des agents anticancéreux (Johnstone *et al.*, 2002; Kovacic, 2007).

La radiothérapie a recours à l'utilisation de radiation au cours du traitement. Le principe consiste en l'utilisation de rayons d'énergie élevée, ou de substances radioactives qui auront pour but d'endommager les cellules tumorales et d'empêcher leur croissance ainsi que leur division. Le but est de délivrer une intensité de radiation optimale à la tumeur en épargnant le plus possible les tissus sains (Martin *et al.*, 2014). Ce traitement est le plus souvent utilisé chez les patients avec des tumeurs inopérables, chez les patients ayant des tumeurs qui n'ont pas été complètement réséquées ou encore chez

les patients confrontés à une récurrence (Durante et Loeffler, 2010). Au cours du traitement, la radiation en agissant de façon directe induit une ionisation causant des dommages à l'ADN en induisant une cassure double brin ou simple brin de l'ADN menant à la mort cellulaire. Un effet indirect peut induire la production de radicaux libres qui dérivent de l'ionisation ou de l'excitation principalement des molécules d'eau présentes dans les cellules, causant aussi des dommages d'ADN (Moding *et al.*, 2013). Bien que la radiothérapie soit utilisée pour traiter près de la moitié des personnes atteintes de cancer, certains chercheurs ont montré qu'en endommageant les cellules tumorales, le rayonnement pouvait détruire aussi des cellules normales adjacentes à la tumeur (Shao *et al.*, 2004). Aussi, du fait de l'hétérogénéité de certaines tumeurs car plusieurs mutations différentes peuvent y coexister, une résistance peut se développer lors du traitement conduisant donc à son échec. Néanmoins, on observe l'émergence de plusieurs stratégies pour renforcer l'efficacité de la radiothérapie par la compréhension des mécanismes par lesquels le microenvironnement et le système immunitaire affectent le traitement par les radiations, mais aussi en utilisant des méthodes plus sécuritaires et mieux appropriées pour dispenser des doses de radiations sans affecter les tissus normaux (Moding *et al.*, 2013).

L'immunothérapie est un traitement faisant recours aux défenses du système immunitaire pour induire une défense antitumorale et ainsi combattre le cancer. Le système immunitaire constitue le mécanisme de défense naturelle du corps contre les infections et les maladies par sa capacité à détecter les menaces externes et internes. La réponse immunitaire peut être innée. Elle possède des propriétés de reconnaissance peu spécifiques basées sur les motifs moléculaires présentés par les protéines membranaires (Weiner, 2015). En outre, la réponse immunitaire peut être adaptative et est basée sur la capacité de réorganiser les récepteurs d'antigènes sur les lymphocytes B et T du système immunitaire. Ceci permet la reconnaissance de structures spécifiques sur les antigènes, appelés épitopes, qui déclenchent des réponses immunitaires (Weiner,

2015). Au cours d'un cancer, des réponses immunitaires et inflammatoires sont déclenchées au fur à mesure qu'il envahit les tissus sains et que des métastases apparaissent. Le système immunitaire en réponse à une tumeur peut s'en débarrasser à un stade précoce grâce à la reconnaissance de certains antigènes (Pardoll, 2015). L'immunothérapie anticancéreuse a pour objectif principal de réactiver le système immunitaire supprimé du patient, afin qu'il soit à nouveau capable de déclencher des attaques prolongées contre les cellules tumorales, aboutissant idéalement à l'éradication du cancer. Ce traitement fait intervenir des anticorps monoclonaux qui sont des versions artificielles de grosses protéines produites par un clone de lymphocytes B particulier, qui possèdent une spécificité antigénique unique qui leur permet de se lier à des épitopes sur la cellule cancéreuse ou dans le plasma (Karlitepe *et al.*, 2015). Le traitement fait intervenir aussi des vaccins. Les vaccins anticancéreux contiennent des cellules cancéreuses entières, des fragments de cellules cancéreuses ou des antigènes purifiés qui renforcent la réponse immunitaire contre les cellules cancéreuses. Ils peuvent être à base de peptides, de cellules immunitaires, de cellules dendritiques ou de cellules tumorales (Alatrash *et al.*, 2013; Karlitepe *et al.*, 2015). Bien que ce traitement s'avère efficace et prometteur, les facteurs limitants dont la complexité et les coûts d'ingénierie et d'administration de certaines formes d'immunothérapie ralentissent son utilisation (Alatrash *et al.*, 2013).

La thérapie ciblée n'est pas des moindres dans le traitement du cancer due à sa spécificité. Elle vise à administrer des médicaments ciblant des gènes ou des protéines particulières, spécifiques aux cellules cancéreuses ou à l'environnement tissulaire favorisant la croissance du cancer. L'efficacité de la thérapie repose sur la libération ciblée de substances thérapeutiques sur le site de la maladie tout en minimisant les effets secondaires non ciblés au niveau des tissus normaux (Gerber, 2008). Ce type de traitement fait intervenir le développement de médicaments qui peuvent bloquer la prolifération cellulaire, induire l'autophagie ou l'apoptose en ciblant la délivrance de

substances toxiques pour détruire les cellules cancéreuses (Gerber, 2008). Ce traitement est le plus souvent utilisé en combinaison avec d'autres traitements. Bien que la thérapie ciblée soit considérée comme une avancée majeure dans le traitement du cancer, les dernières recherches montrent que l'hétérogénéité des tumeurs par rapport aux cibles moléculaires est un facteur d'échec dans de nombreux cas.

1.2 La leucémie

1.2.1 Description

La leucémie est une tumeur maligne qui apparaît lorsque des modifications des processus normaux de régulation cellulaire entraînent une prolifération incontrôlée de cellules souches hématopoïétiques dans la moelle osseuse (Udensi et Tchounwou, 2014). Elle se développe quand les cellules souches hématopoïétiques perdent leur capacité à se différencier en hématocytes matures durant leurs étapes de maturation et de différenciation. Au cours d'un développement normal, il se produit l'hématopoïèse qui fait référence au processus qui génère de nouvelles cellules sanguines matures. Toutes ces cellules proviennent d'un seul type de cellule progénitrice appelée cellule souche hématopoïétique, qui subit un processus de division et de différenciation hautement régulé en produisant toute la gamme de cellules sanguines matures (Kennedy et Barabe, 2008). Le processus de formation normal des cellules hématopoïétiques est constitué de plusieurs étapes très ordonnées et qui sont régulées par un réseau complexe de divers facteurs intrinsèques et des signaux cellulaires qui contrôlent les décisions relatives au destin des cellules dans la moelle osseuse. Cela implique donc un équilibre très minutieux pour ce qui concerne la différenciation, la prolifération et le renouvellement des hématocytes (Kennedy et Barabe, 2008). La perturbation de cet équilibre peut être observée, causant donc des troubles

hématologiques malins, y compris la leucémie. La différenciation incontrôlée des précurseurs de la série lymphoïde ou myéloïde favorise dans ce cas la croissance tumorale au dépend d'une production de cellules sanguines normales ainsi que la création de microenvironnements de moelle osseuse anormaux (Colmone *et al.*, 2008; Purizaca *et al.*, 2012). Au Canada, la leucémie se classe parmi la catégorie de cancer du sang où s'y trouvent aussi les lymphomes, les myélomes et la maladie de Hodgkin. En 2016, les cancers du sang représentaient environ 11% de tous les cancers avec près de 22 340 cas répertoriés (Leukemia & Lymphoma Society of Canada, 2016). Le taux de diagnostic est d'environ 15 cas pour 100 000 habitants et représente près de 3% de tous les cancers (Statistique Canada).

1.2.2 Classification des principaux types de leucémies

Il existe plusieurs types de leucémies qui varient en fonction de la progression de la maladie qui peut être aiguë ou chronique, et du type de cellules sanguines affectées. Quatre types de leucémie sont à distinguer avec quelques sous-types qui peuvent être observés. Les quatre principaux types de leucémies sont la leucémie aiguë lymphoblastique, la leucémie aiguë myéloblastique, la leucémie lymphoïde chronique et la leucémie myéloïde chronique (Davis *et al.*, 2014; Rousseau *et al.*, 2014) (Figure 1.6).

La leucémie aiguë lymphoblastique (LAL) est caractérisée par une prolifération incontrôlée et un arrêt de maturation des cellules souches lymphoïdes dans la moelle osseuse, entraînant un excès de cellules malignes. Les lymphoblastes prennent la place des constituants normaux de la moelle osseuse, entraînant une diminution marquée de la production de cellules sanguines normales qui fait suite à de l'anémie, à une

diminution de plaquettes et de neutrophiles (Purizaca *et al.*, 2012). La LAL apparait comme le cancer le plus observé chez les enfants et très rare chez les adultes et résulte d'altérations au niveau des chromosomes incluant des translocations, des réarrangements chromosomiques ainsi que des changements au niveau de leur nombre (Bloomfield *et al.*, 1981). Dans leur ensemble, qu'importe l'origine de l'altération, les changements ont lieu au niveau des lymphoblastes et causent l'augmentation de la division cellulaire (Campos-Sanchez *et al.*, 2011). Le diagnostic peut être effectué par une biopsie de la moelle osseuse, par une analyse sanguine en tenant compte d'indicateurs comme les cellules lymphoïdes qui seront en grand nombre dans la moelle osseuse, l'immunophénotypage ou encore par la recherche d'altération génétique unique du LAL. Les traitements courants sont la chimiothérapie, la radiothérapie et la transplantation (Inaba *et al.*, 2013).

La leucémie lymphoïde chronique (LLC) est la plus fréquente et la plus répandue chez les personnes âgées. C'est une tumeur maligne des cellules B matures qui est le plus souvent diagnostiquée accidentellement comme une lymphocytose périphérique. La LLC représente une expansion monoclonale de lymphocytes B matures CD5 +, CD23 + dans le sang, les ganglions lymphatiques et la moelle osseuse (Garcia-Munoz *et al.*, 2012). La maladie est sélectionnée par le biais d'expositions multiples à des antigènes dont le degré de mutation génique va différer dans des régions variables de la chaîne lourde de l'immunoglobuline (Chiorazzi *et al.*, 2005). Dans la dernière décennie, les recherches se sont basées sur les mécanismes moléculaires de cette maladie et ceux impliqués dans la résistance à certains traitements. Plusieurs facteurs ont pu être associés à la prolifération et la survie des lymphocytes B avec un phénotype malin. L'activation chronique du récepteur de lymphocytes B, l'acquisition de lésions génétiques ainsi que la stimulation chronique de certains antigènes sont quelques-uns des facteurs qui favorisent le développement de la LLC (Garcia-Munoz *et al.*, 2012). Les traitements utilisés prennent en compte des critères qui varient en fonction du patient comme le stade d'avancée de la maladie et les symptômes associés. Les

traitements utilisés le plus souvent sont la chimiothérapie, la greffe de cellules souches, la thérapie biologique qui sert à booster le système immunitaire (Zenz *et al.*, 2010).

La leucémie myéloïde chronique (LMC) représente entre 15 à 20 % des leucémies et résulte de la transformation néoplasique de cellules progénitrices hématopoïétiques et affecte les lignées myéloïdes, monocytaires, érythroïdes, mégacaryocytaires et lymphoïdes. L'incidence de celle-ci augmente avec l'âge. Au cours de son développement, les cellules souches hématopoïétiques sont entraînées dans la circulation, avec l'apparition d'une prolifération élevée de cellules granulocytaires qui ne perdent néanmoins pas leur capacité de différenciation (Faderl *et al.*, 1999). Du point de vue moléculaire, une anomalie est observée au niveau du caryotype causé par la translocation d'un gène conduisant à la création du chromosome Philadelphie (Ph1) (Melo, 1996). Le pronostic de La LMC est le plus souvent défavorable. La LMC peut être divisée en plusieurs phases compte tenu du stade d'évolution de la maladie (Furtado *et al.*, 2015). La première phase est la phase chronique au cours de laquelle la maladie évolue assez lentement. Cette phase est silencieuse à cause de l'absence ou la rareté des symptômes. La phase suivante est la phase accélérée caractérisée par une basophilie et une augmentation du nombre de blastes et de promyélocytes dans le sang périphérique (Furtado *et al.*, 2015). Cependant, lorsque cette leucémie est en phase accélérée elle passe assez vite à la phase blastique qui est la phase aiguë. Elle est généralement définie par la présence d'infiltrats extramédullaires de cellules leucémiques ou par un nombre de blastes supérieur à 30% dans le sang périphérique ou la moelle osseuse (Furtado *et al.*, 2015). Plusieurs traitements sont envisageables qui peuvent être conventionnels en faisant recours à la chimiothérapie avec l'utilisation d'agents comme le busulfan ou de l'hydroxyurée. L'émergence d'autres traitements avec l'utilisation d'interférons alpha semble être plus avantageux pour la survie des patients (Faderl *et al.*, 1999).

La leucémie aiguë myéloblastique (LAM) qui touche à la fois les adultes et les enfants peut apparaître des suites de troubles hématologiques ou à la suite d'un traitement antérieur. Elle est caractérisée par une expansion clonale de précurseurs myéloïdes non différenciés, entraînant une insuffisance de l'hématopoïèse et un dysfonctionnement de la moelle osseuse (Fey, 2007). Dans la majorité des cas, cette maladie est due à des mutations génétiques. Elle peut affecter diverses populations cellulaires: les myéloblastes, les myélocytes, les promyélocytes et les myélomonocytes qui sont toutes des cellules hématopoïétiques. Le terme aigu dans la leucémie aiguë myéloblastique est utilisé parce que la maladie progresse très vite si aucun traitement n'est utilisé. Durant cette leucémie, les cellules souches de la moelle osseuse, les cellules myéloïdes, ne se développent pas de manière normale et ne sont pas en mesure d'effectuer les fonctions des cellules sanguines. Cela résulte en un dysfonctionnement cellulaire et moléculaire occasionnant, par la même occasion, des dommages à l'ADN, la prolifération cellulaire, la survie cellulaire ainsi que du stress oxydatif (Austin, 2009; Zhou *et al.*, 2007a). La LAM a pu être classifiée en différentes catégories en fonction de certains critères. La première catégorie regroupe celles avec des anomalies génétiques, la deuxième catégorie regroupe celles avec une dysplasie multiligne, et la troisième catégorie prend en compte celles qui sont liées au traitement. En outre, la dernière catégorie qui est la quatrième regroupe l'ensemble des sous-types moins bien caractérisés (Vardiman *et al.*, 2002). Parmi ces catégories, l'une des plus agressives est la leucémie promyéloïde aiguë (LPA). Elle se caractérise par une croissance dérégulée de promyélocytes immatures. En effet, les cellules souches myéloïdes se différencient en myéloblastes malins qui ne seront pas en mesure de fonctionner normalement. Par conséquent, des blastes leucémiques s'accumulent dans la moelle osseuse et dans le sang, ce qui fait suite à une réduction significative de la production de globules blancs, de globules rouges, de plaquettes et de granulocytes sains et fonctionnels. Cette anomalie va être engendrée par suite d'une aberration au niveau du gène du récepteur de l'acide rétinoïque alpha (RARA) (Grignani *et al.*, 1994). Plusieurs symptômes peuvent y être associés : saignements, formation de caillots sanguins,

fatigue excessive, douleurs dans certaines zones touchées, problèmes de vue associés à des hémorragies rétinienne et ecchymoses. Les traitements comme la chimiothérapie, la thérapie ciblée et les transplantations sont très souvent utilisés. L'acide rétinoïque tout-trans (ATRA) est largement utilisé comme chimiothérapie conventionnelle avec un taux d'efficacité non négligeable (De Thé et Chen, 2010). D'autres médicaments sont utilisés aussi comme une chimiothérapie par l'anthracycline et le trioxyde d'arsenic. Bien que la résistance de la leucémie à certains traitements soit responsable des échecs de rémission, l'optimisation des traitements déjà présents et les recherches sur de nouveaux traitements ne font que s'accroître (Adams et Nassiri, 2015; Siveen *et al.*, 2017). De façon générale pour le LAM, les statistiques montrent que le pronostic de survie n'est pas satisfaisant car il s'avère fatal pour plus de 80% de la population atteinte que ce soit chez les plus jeunes ou les plus vieux avec une espérance de survie d'environ 5 ans. Les traitements les plus couramment utilisés sont la chimiothérapie, la radiothérapie, la transplantation de cellules souches de moelle osseuse (Juliussen *et al.*, 2009; Tallman *et al.*, 2005).

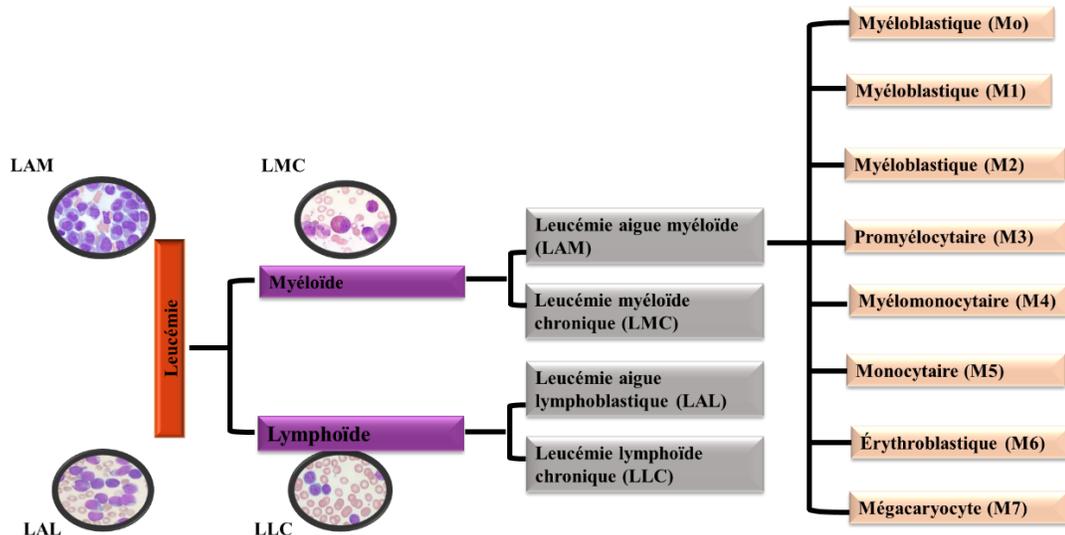


Figure 1.6 Les différentes catégories de leucémie. Il existe plusieurs types de leucémies en fonction du type cellulaire touché (myéloïde ou lymphoïde) et du degré d'évolution

de la maladie (aigüe ou chronique). Quatre principaux types sont très bien connus : la LAL, la LLC, la LAM, et la LMC qui est subdivisée en 8 différentes catégories qui diffèrent en fonction du type de cellule touché, des aberrations géniques ou chromosomiques et de leur état de différenciation. [Adapté d'après Udensi et al., 2014].

1.2.3 Modèle cellulaire : HL-60

La lignée cellulaire HL-60 est une lignée de la leucémie promyéloïde aiguë (LPA) qui est un sous type du LAM. C'est en 1977 que ces cellules furent isolées pour la première fois. Elles furent dérivées de lymphocytes du sang périphérique d'une femme de 36 ans souffrant de LPA (Collins *et al.*, 1977). Certaines propriétés des cellules HL-60 suscitent l'intérêt. Ces cellules peuvent être cultivées en suspension dans leur milieu de culture. Cependant, il est possible de les différencier avec une panoplie de composés chimiques ainsi que certains inducteurs de différenciation comme l'acide rétinoïque ou l'hypoxanthine (Fleck *et al.*, 2005). Elles peuvent adopter différentes conformations (Mollinedo *et al.*, 1993). Elles sont largement utilisées comme modèle pour étudier les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la prolifération et la différenciation des cellules leucémiques (Collins, 1987).

1.2.4 Différenciation des cellules HL-60

Les cellules HL-60 possèdent la capacité de se différencier en divers modèles cellulaires. La différenciation des cellules promyéloïdes peut être en granulocytes ou en monocytes/macrophages (Chatterjee *et al.*, 1997; Mollinedo *et al.*, 1993). Le Diméthylsulfoxyde (DMSO) ou l'acide tout-trans rétinoïque (ATTR), induisent la différenciation en granulocytes (Breitman *et al.*, 1980; Chatterjee *et al.*, 1997).

D'autres composés comme les esters de phorbols peuvent induire une différenciation en monocytes/ macrophages (Murao *et al.*, 1983). Le Phorbol 12-myristate 13-acétate (PMA), aussi connu sous le nom de 12-O-Tétradecanoylphorbol-13-acétate (TPA), est l'ester de phorbol le plus connu. C'est un composé organique naturel de plantes dérivé du Croton Tiglium (Goel *et al.*, 2007). C'est dans l'huile de Croton qu'est présent le phorbol sous la forme d'un mélange de diesters et triesters. L'isolation de phorbol implique une étape préalable de désacylation (Pagani *et al.*, 2017). Le PMA, un composé de type diterpène, est un agent irritant et inflammatoire et il est connu comme étant un puissant promoteur de tumeur principalement au niveau de la peau de souris. Il est couramment utilisé comme un outil au niveau des recherches biomédicales dans divers modèles de cancer (Han *et al.*, 1998). Le PMA est aussi impliqué dans l'activation de la protéine kinase C (PKC) aboutissant à sa maturation catalytique (Rebois et Patel, 1985). Le PMA va stimuler la PKC par imitation d'un de ses ligands qui est le diacylglycérol (DAG) ce qui aboutira au déclenchement de certaines voies de signalisation comme la voie NF- κ B et la voie de MAPK (Chang *et al.*, 2005; Rybin *et al.*, 2008; Taylor *et al.*, 2006). Certaines études ont pu mettre en lien l'activation de la PKC et l'implication du PMA dans la différenciation de certaines lignées cellulaires comme les cellules HL-60 leur donnant un phénotype de cellules « macrophage-like » (Collins, 1987; Rovera *et al.*, 1979). En effet, l'activation de la PKC par le PMA va provoquer l'induction de marqueurs et des caractéristiques de macrophages comme l'adhésion. Les cellules, sous l'effet d'un traitement au PMA à une certaine concentration, vont adhérer au plastique et adopter un phénotype différent de leur état initial conduisant à une réorganisation du cytosquelette (Brock *et al.*, 2003; Laouar *et al.*, 1999).

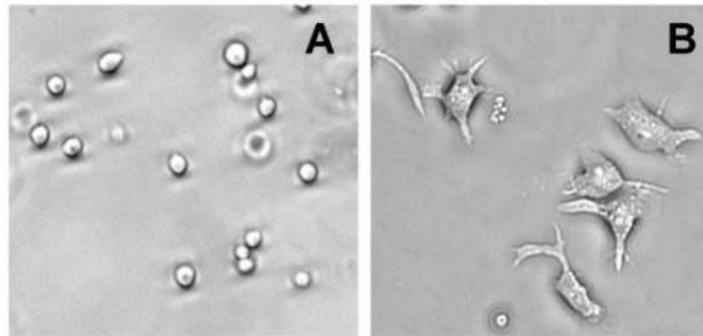


Figure 1.7 Effet de la différenciation des cellules HL-60 au PMA sur leur morphologie. Les cellules HL-60 sont connues pour croître en suspension dans leur milieu de croissance. Ainsi au niveau de la figure 1.7A, les cellules apparaissant sont en suspension avec une morphologie de cellules sphériques. Cependant au niveau de la figure 1.7B, un traitement au PMA induira un changement de morphologie et les cellules ne seront plus en suspension mais vont adhérer à leur surface de croissance à la suite d'une différenciation en macrophages et vont apparaître allongées. [Adapté d'après Brock et al., 2003].

1.2.5 Cascade de signalisation induite par le PMA

Le PMA est connu comme étant impliqué dans l'activation de la protéine kinase C (PKC). La PKC est un membre d'une famille composée de protéines kinases à sérine/thréonine impliquées dans diverses fonctions comme la régulation de la croissance cellulaire, la différenciation, l'apoptose et la tumorigenèse (Shchemelinin *et al.*, 2006). Plusieurs isoformes de la PKC sont à distinguer dépendamment de leur structure, de leur domaine de régulation et de leur domaine catalytique. La famille se subdivise donc en trois groupes majeurs: les PKC classiques (cPKC), y compris les isoformes α , β I, β II et γ ; les nouvelles PKC (nPKC), y compris les isoformes θ , η , ϵ , δ ; et les PKC atypiques (aPKC), incluant les isoformes ι et λ . Chacun des sous-groupes aura besoin soit du calcium, de phosphatidylsérine, de DAG ou d'esters de phorbol pour son activation. Le PMA peut activer soit les nPKC ou les cPKC (Steinberg, 2008).

En présence de PMA, il y a une activation de PKC qui induira l'activité de Ras et Raf-1, une protéine kinase sérine/thréonine qui va engendrer l'activation de la voie de signalisation MAPK/MEK. L'activation de MEK1 et MEK2 se fait par la phosphorylation de deux résidus de sérine en position 217 et 221 au niveau de la boucle d'activation de leur fente catalytique (Alessi *et al.*, 1994). Cela fait suite à l'activation de la voie MAPK/ERK. La cascade d'activation de ERK 1 et 2 se fait par la phosphorylation de résidus de thréonine et de tyrosine respectivement en position 202 et 204 (Gilmore, 2006). ERK1/2 poursuit son chemin dans le cytoplasme ou continue dans le noyau où elle pourra activer des facteurs de transcription et activer la cascade NF- κ B (Helfenberger *et al.*, 2018). Sans aucune stimulation, le NF- κ B se retrouve séquestré sous sa forme inactive due à sa liaison avec le I κ B β , le I κ B ϵ , le p105 et le p100 précurseurs des sous unités p50 et p52. À la suite de l'activation de NF- κ B, il se produit la dégradation de I κ B ou celle de p105 et p100 qui va engendrer la translocation de NF- κ B dans le noyau induisant sa transcription. Le NF- κ B est impliqué dans des processus de régulation de la transcription de certains gènes, le recrutement cellulaire et peut aussi intervenir dans le processus de cancérogénèse (Gilmore, 2006).

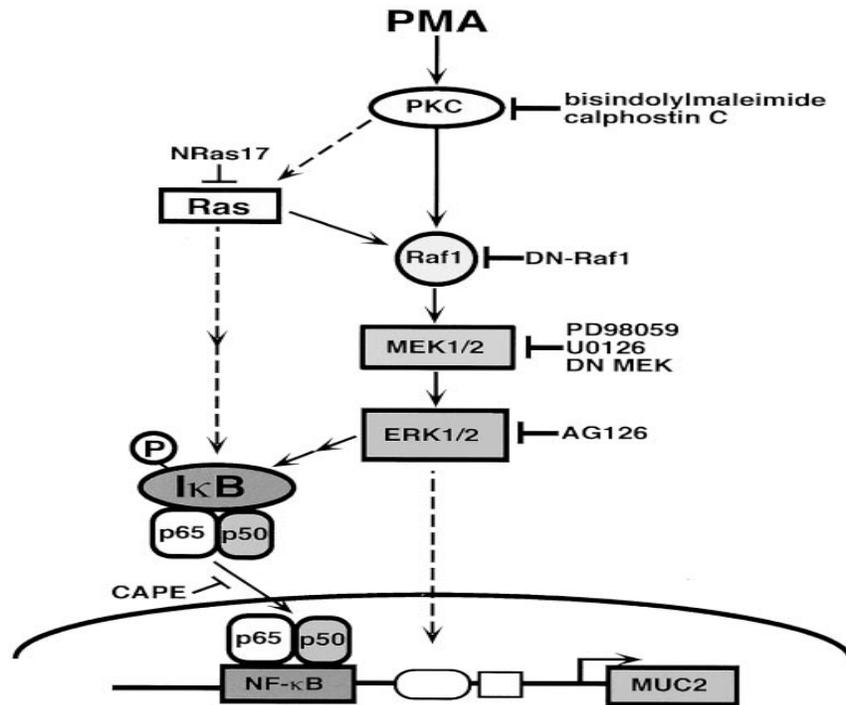


Figure 1.8 Cascade de signalisation du PMA. La cascade de signalisation du PMA va se faire via l'activation de la PKC et va agir sur les voies de signalisation MAPK. Cette cascade de signalisation va mener ultimement à l'activation du facteur de transcription NF- κ B qui sera responsable de la modulation de l'expression de certains gènes. [Adapté d'après Lee et al., 2002].

1.3 Le système neurotensinergique

1.3.1 La neurotensine (NTS)

C'est en 1973 que fut isolée pour la première fois la neurotensine (NTS ou NT) par Caraway et Leeman de l'hypothalamus d'un bovin (Caraway et Leeman, 1973). Son gène fut isolé en 1988 du rat et, après séquençage, s'est avéré être constitué d'un segment de 10,2 kilobases contenant 4 exons et 3 introns (Kislauskis *et al.*, 1988). Le

gène code pour une protéine précurseur, la proneurotensine / neuromédine N (proNT / NN) contenant à la fois le tridécapéptide NTS et un hexapeptide étroitement apparenté, la neuromédine N (NN). Les quatre acides aminés situés à l'extrémité carboxy-terminale de la NTS et de NN sont identiques, et les acides aminés 8 à 13 du NTS sont essentiels pour son activité biologique (Lambert *et al.*, 1995). La synthèse de la NTS se fait sous la forme d'un précurseur inactif (Bean *et al.*, 1992). Dans la partie N-terminale du précurseur se retrouve une séquence signal de 22 acides aminés qui sert à la translocation des peptides nouvellement synthétisés. La NTS et la NN sont libérées lors de la maturation du précurseur. Le processus de maturation est spécifique au site. Au niveau intestinal, la maturation se fait par la prohormone convertase 1 (PC1) tandis qu'au niveau cérébral la maturation est prise en charge par la PC2 (Rovere *et al.*, 1996). Un autre membre de la famille des PCs soit la PC5-A a été impliqué dans le processus de maturation par sa fonction au niveau des voies endocrines principalement dans les glandes surrénales (Barbero *et al.*, 1998). Le stockage de la NTS se fait dans des vésicules et sa libération peut se faire de manière calcium dépendante (Alvarez Gomez, 1977; Zupanc, 1996). La NTS possède plusieurs analogues donnant lieu à des structures différentes et diverses activités biologiques dépendamment de la séquence qui est générée à la suite d'un clivage. Il a été montré que l'activité biologique de la NTS dépend principalement de sa terminaison COOH qui va se lier à ses différents récepteurs (Carraway *et al.*, 1982; Schultz *et al.*, 1989). Il a été également démontré que certaines endopeptidases de la famille des métalloendopeptidases telles que l'endopeptidase 24.11, 24.16 et 24.15 étaient responsables de l'inactivation physiologique de la NTS suite à sa dégradation et par conséquent un arrêt de sa transmission (Vincent *et al.*, 1994)

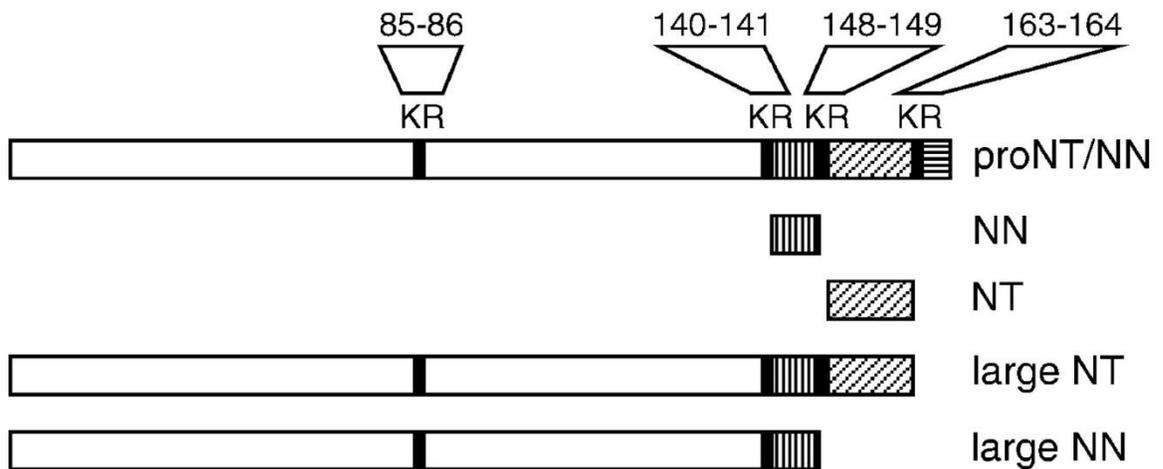


Figure 1.9 Représentation schématique de pro-NT/NN et des différents peptides exprimés chez le rat lors de la maturation du précurseur. La NTS est synthétisée à partir de son précurseur la proNT/NN qui en fonction de sa localisation va être clivée et donner des proportions différentes de NTS et de NN avec des séquences variables au niveau des portions N-terminale et C-terminale. [Adapté de Barbero *et al.*, 1998].

1.3.2 Les récepteurs de la NTS

La NTS exerce ses actions au travers de ses récepteurs. A ce jour, trois types de récepteurs ont été rapportés. Le récepteur à la neurotensine 1 (NTSR1) (Tanaka *et al.*, 1990) et le récepteur 2 (NTSR2) (Chalon *et al.*, 1996) sont deux récepteurs couplés à la protéine G partageant 43% d'identité de séquence d'acides aminés et 64% d'identité structurelle. Le récepteur de neurotensine 3 (NTSR3) (Mazella *et al.*, 1998) est un récepteur transmembranaire précédemment caractérisé en tant que Sortiline.

1.3.2.1 NTSR1

Le NTSR1 fait partie de la famille des récepteurs couplés aux protéines G et possède sept hélices transmembranaires (Betancur *et al.*, 1997). Ce récepteur désigné comme premier récepteur de la NTS fut cloné et caractérisé chez le rat et chez l'humain respectivement en 1990 et 1993 (Tanaka *et al.*, 1990; Vita *et al.*, 1993). La composition en acides aminés varie en fonction de l'espèce avec une structure de 418 acides aminés chez l'humain et 424 chez le rat. Sa structure présente quatre boucles intracellulaires et extracellulaires. La portion extracellulaire contient la région N-terminale ainsi que quatre sites de glycosylation. Le NTSR1, qui possède une masse de 47 kilodaltons (kDa), a été désigné comme le récepteur de plus haute affinité pour la NTS avec un $K_d = 0,1$ à $0,3$ nanomolaire (nM) qui est dix fois supérieur à celui du NTSR2 avec un K_d variant de 2 à 10 nM (Vincent *et al.*, 1999). Le NTSR1 se localise au niveau de l'endothélium vasculaire, du tractus gastro-intestinal (Azriel et Burcher, 2001; Coppola *et al.*, 2008) et dans le système nerveux central (SNC) (Roussy *et al.*, 2008). Le couplage du NTSR1 avec les protéines G va intervenir dans la modulation de différentes voies de signalisation. Trois protéines G vont intervenir dans ce couplage. La protéine $G_{q/11}$ sera impliquée dans l'activation de la phospholipase C (PLC) (Najimi *et al.*, 2002; Wang et Wu, 1996). La PLC par la suite sera responsable de la production d'inositol triphosphate (IP3) et de diacylglycérol à partir de phospholipides membranaires (PIP2). Ces derniers vont induire l'activation de la PKC et engendrer par la même occasion la mobilisation du calcium intracellulaire (Bozou *et al.*, 1986; Snider *et al.*, 1986). En fonction de sa localisation, le NTSR1 peut médier la voie de signalisation d'adénosine monophosphate cyclique (AMPC) à travers le couplage avec la protéine G_i qui va inhiber l'adénylate cyclase et la protéine G_s qui va l'activer (Bozou *et al.*, 1986; Yamada *et al.*, 1994).

La liaison de la NTS au NTSR1 s'effectue au niveau de la troisième boucle extracellulaire du récepteur précisément au niveau des domaines 3 et 7, et aussi au niveau de la jonction transmembranaire au niveau des domaines 6 et 7 (Richard *et al.*, 2001b). Des modifications post-traductionnelles telles que la glycosylation et la palmitoylation précèdent l'activation de la NTSR1 par son ligand la NTS. Ces modifications vont jouer un rôle essentiel au niveau de la localisation du récepteur le rendant mieux accessible pour son interaction avec les protéines G (Heakal *et al.*, 2011). Une fois l'activation effectuée par la NTS, le NTSR1 va subir une phosphorylation au niveau de sa portion C-terminale qui va engendrer l'internalisation du ligand et du récepteur et va faire intervenir la protéine β -arrestine (Law *et al.*, 2012). Après cette internalisation, le complexe formé va se dissocier menant d'une part à la dégradation du NTSR1 par des lysosomes et d'autre part au recyclage du NTS soit au travers d'endosomes tardifs ou par l'intermédiaire du réseau transgolgien (Mazella et Vincent, 2006; Vandenbulcke *et al.*, 2000). La stimulation du NTSR1 va être responsable de la modulation de nombreuses voies de signalisation intracellulaire impliquées au niveau de la prolifération cellulaire, la survie, la migration et l'invasion. Les principales voies de signalisation sont la voie de PKC/ERK, des Rho GTPase, et des protéines du complexe d'adhérence focale (FAK et Src) (Siveen *et al.*, 2017; Wu *et al.*, 2012; Xiao *et al.*, 2017). En outre, le système NT/NTSR1 est reconnu pour jouer plusieurs rôles au niveau des effets physiologiques du système nerveux central et dans la modulation de la motilité gastrointestinale et de son métabolisme (Kalafatakis et Triantafyllou, 2011; Liu *et al.*, 2016).

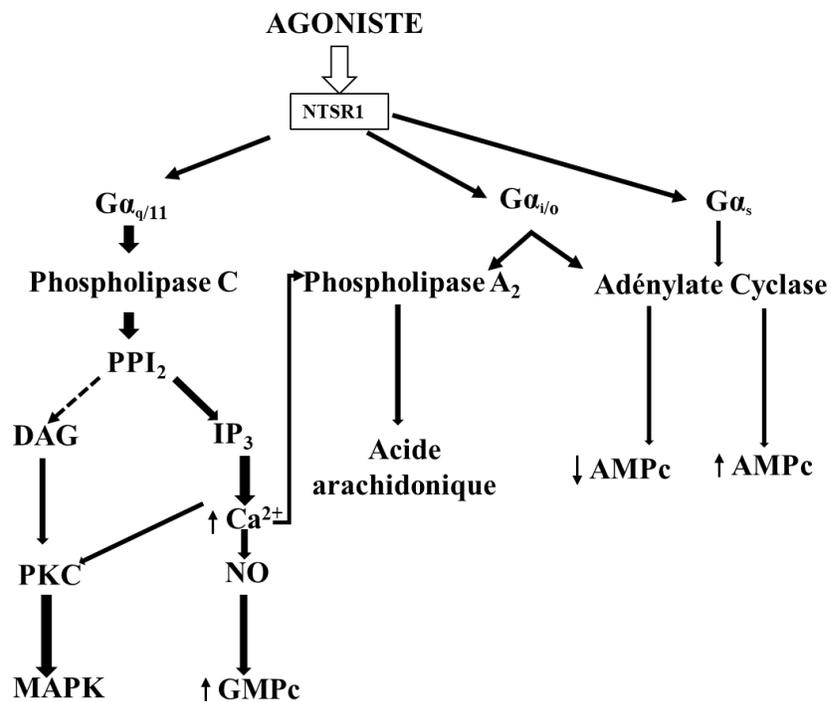


Figure 1.10 Illustration schématique des voies de signalisation de NTSR1. Le NTSR1, en fonction du sous type des protéines G auxquelles il est couplé, va être activé une fois lié à un ligand agoniste. À la suite de cette activation, le récepteur sera responsable de moduler différentes voies de signalisation [Adapté d'après Dupouy et al., 2011].

1.3.2.2 NTSR2

Le NTSR2, comme le NTSR1, fait partie de la famille des récepteurs couplés aux protéines G. Le NTSR2, bien qu'ayant la capacité à se lier au NTS, possède néanmoins, une plus forte affinité pour la lévocabastine, un antihistaminique H1, qui est capable de compétitionner avec la NTS pour se lier au récepteur (Schotte *et al.*, 1986). Ce récepteur a été cloné à partir du rat, de la souris et de l'humain basé sur l'homologie de séquence avec le NTSR1 (Chalon *et al.*, 1996; Mazella *et al.*, 1996; Vita *et al.*, 1998).

Au niveau protéique, la structure primaire est composée d'une séquence de 416 acides aminés chez le rat et la souris, et d'une séquence plus courte chez l'humain de 410 acides aminés. Le NTSR2 partage une identité de 43% et environ 60% d'homologie avec le NTSR1. Une comparaison entre les deux récepteurs montre des différences au niveau du domaine extracellulaire N-terminal qui est plus court et dans la troisième boucle intracellulaire qui est plus longue en C-terminal en comparaison au NTSR1 (figure 1.11) (Vincent *et al.*, 1999). Le NTSR2 est localisé au niveau du cerveau et faiblement dans les organes périphériques comme les reins, l'utérus et le cœur. Il est retrouvé principalement au niveau du système olfactif, dans le cortex cérébral et cérébelleux, dans l'hypothalamus et dans les zones modulant la perception de la douleur (Asselin *et al.*, 2001; Vita *et al.*, 1998). En outre, il est aussi situé au niveau du tractus intestinal et sera responsable de moduler le relargage de la NTS dans l'estomac et l'intestin (Schulz *et al.*, 2006).

La principale fonction du NTSR2 se retrouve au niveau de la modulation du processus de nociception induite par la NTS (Devader *et al.*, 2016). L'interaction du NTSR2 et de la NTS a été montrée comme pouvant induire certaines voies de signalisation, notamment la signalisation de l'inositol phosphate (IP) et la voie de signalisation de ERK qui peut impliquer soit la NTS ou la lévocabastine (Gendron *et al.*, 2004; Richard *et al.*, 2001a). Des recherches ont montré qu'une transfection de NTSR2 dans des cellules CHO issues d'ovaires engendre l'augmentation de l'IP qui va être responsable de la mobilisation du calcium induisant un relargage d'acide arachidonique qui va stimuler la signalisation MAPK (Gendron *et al.*, 2004; Vita *et al.*, 1998; Yamada *et al.*, 1998). Suivant l'internalisation à la suite de son activation au travers de sa liaison avec la NTS, un recyclage du récepteur à la membrane peut s'effectuer (Martin *et al.*, 2002b). Deux voies peuvent être utilisées lors du recyclage. La première voie implique un passage direct d'endosomes précoces à la membrane plasmique, tandis que la

deuxième voie fait intervenir des endosomes de recyclage (Botto *et al.*, 1998; Martin *et al.*, 2002b; Van Dam *et al.*, 2002).

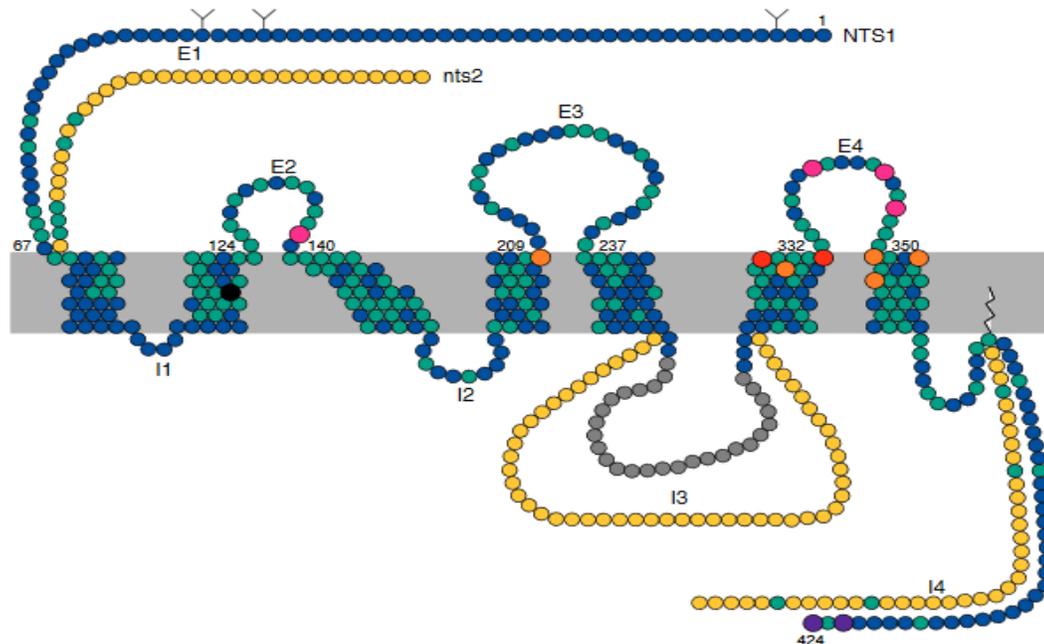


Figure 1.11 Différence structurelle entre le NTSR1 et le NTSR2. Les deux récepteurs de la NTS, faisant partie de la famille des récepteurs couplés aux protéines G, sont différents non seulement d'un point de vue fonctionnel mais aussi structurel. La structure diffère au niveau de la portion N-terminale et C-terminale ainsi qu'au niveau des boucles intracellulaires et extracellulaires. [Adapté d'après Vincent *et al.*, 1999].

1.3.2.3 NTSR3/Sortiline

La sortiline (NTSR3) apparaît comme le seul récepteur de la NTS ne faisant pas partie de la famille des récepteurs couplés aux protéines G (Mazella *et al.*, 1998). Ce récepteur possède une séquence de 800 acides aminés et un poids moléculaire de 100kDa. Elle s'avère être identique à 100% à la gp95sortiline, une protéine de tri qui a été caractérisée par sa capacité d'interaction avec une chaperonne intervenant lors de la

maturation des lipoprotéines à basse densité (LDL) et, contrairement aux NTSR1 et NTSR2, le NTSR3 ne porte qu'un seul domaine transmembranaire (Petersen *et al.*, 1997). Le NTSR3 est membre de la famille des récepteurs à domaine VPS 10p dans laquelle s'y retrouvent les protéines SorLA, la SorCS 1, 2 et 3, qui vont partager des caractéristiques communes telles que la présence de motifs riches en cystéines, au moins un site de clivage par la furine suggérant qu'il se déroule la maturation d'une forme précurseur durant l'adressage de la protéine, une courte queue cytoplasmique et un unique domaine transmembranaire (Hermeijer *et al.*, 1999; Marcusson *et al.*, 1994).

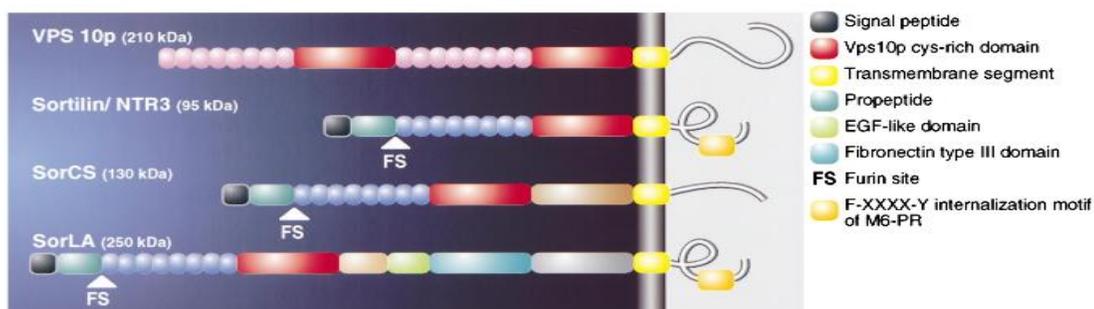


Figure 1.12 Représentation schématique des domaines structuraux des membres de la famille VPS 10p. L'organisation structurale des membres de la famille des récepteurs à domaine VPS 10p présente un ensemble de domaines communs qui vont être reconnus dans l'activité fonctionnelle des récepteurs. Cependant, d'un récepteur à un autre, on distingue des différences principalement au niveau de la taille, de l'organisation de certains domaines ainsi que la présence de domaines uniques à certains récepteurs. [Adapté d'après Mazella, 2001].

La structure complète du NTSR3 comprend un domaine N-terminal qui constitue la zone d'interaction avec les ligands, un domaine transmembranaire, un site de clivage putatif pour la furine, un large domaine luminal en N-terminal et un domaine C-terminal dans lequel se trouve une queue cytoplasmique où se situent des signaux de transport de même que des résidus qui vont subir des modifications post-traductionnelles requises pour la liaison du ligand à son récepteur (Hermeijer, 2009; Petersen *et al.*, 1997). La présence du site de clivage pour la furine qui précède le

domaine luminal suggère aussi qu'une maturation d'un précurseur est requise. En effet, le NTSR3 est d'abord synthétisé sous forme d'un précurseur contenant un propeptide de 44 acides aminés qui est ensuite clivé par une protéine convertase la furine dans le compartiment golgien qui va permettre le relargage du propeptide. Le rôle du propeptide est de contrôler la conformation et le transport du récepteur en modulant son habilité de liaison aux ligands cibles (Westergaard *et al.*, 2004). Une fois le propeptide clivé, la Sortiline mature sera capable d'accomplir ses activités fonctionnelles. Le rôle multifonctionnel de la Sortiline a été décrit dans plusieurs études. En effet, le NTSR3 sert de récepteur à une multitude de ligands soit la NTS, la lipoprotéine lipase, la forme précurseure du facteur de croissance des nerfs le pro-NGF, la forme précurseure de neutrophines et de protéines RAP (Munck Petersen *et al.*, 1999; Nykjaer *et al.*, 2004; Teng *et al.*, 2005). La Sortiline est retrouvée majoritairement dans le cerveau et est donc responsable d'un large éventail d'activité métabolique à ce niveau allant du développement embryonnaire au processus de différenciation (Hermans-Borgmeyer *et al.*, 1999). La NTSR3 est aussi présente au niveau de la moelle épinière, dans les testicules et dans les muscles squelettiques (Petersen *et al.*, 1997). En fonction de sa localisation et de son ligand, la Sortiline sera impliquée dans une diversité de fonctions telles que la modulation du métabolisme et de certaines voies de signalisation, le trafic et le triage de protéines (Nielsen *et al.*, 2001). La Sortiline a été impliquée dans le métabolisme des lipides. En effet, la Sortiline serait exprimée dans la majorité de tissus et de cellules impliquant le métabolisme lipidique tels les macrophages et le foie (Schmidt et Willnow, 2016). Le récepteur est impliqué dans le trafic de lipides en jouant le rôle de récepteur pour les LDLs. La Sortiline peut donc moduler le taux plasmatique de LDLs soit en réduisant leur production soit en augmentant leur catabolisme en servant de récepteur de surface et en les ciblant pour une dégradation lysosomale. Cela a pour but de moduler la production de cholestérol qui est responsable d'une multitude de maladies (Brown et Goldstein, 1986). Du fait de sa localisation dans le cerveau, la Sortiline va jouer d'importantes fonctions au niveau du système nerveux central à travers le trafic des neutrophines qui sont des

protéines activement impliquées dans le développement, la différenciation, la survie et la fonction des cellules du système nerveux qui sont à leur tour responsables de l'activité du cerveau. Les membres de la famille des neurotrophines comprennent : le facteur de croissance neuronale NGF, le facteur neurotrophique (BDNF), la neurotrophine 3 (NT3), NT4/5. L'action des neurotrophines est médiée par la liaison aux récepteurs tyrosine kinases (TKRs) (Tropomyosine-related kinase receptors) et régulée par le récepteur p75^{NTR}. La Sortiline va moduler la signalisation des neurotrophines régulant la reconnaissance du ligand à travers le p75^{NTR} et les TKRs, impliqués dans les processus de croissance et de mort cellulaire (Nykjaer et Willnow, 2012). Aussi, au travers de sa liaison à la NTS, la Sortiline va être impliquée dans le processus de migration de cellules microgliales, la libération de chémokines essentielles à la chimioattraction et à la maturation de cellules nerveuses (Dicou *et al.*, 2004; Gandou *et al.*, 2010; Martin *et al.*, 2003). Une fois l'accomplissement de ces fonctions, deux sorts sont réservés au NTSR3: il peut être recyclé grâce à des endosomes précoces qui vont le transporter vers la membrane cellulaire ou dégradé au travers de lysosomes (Mari *et al.*, 2008).

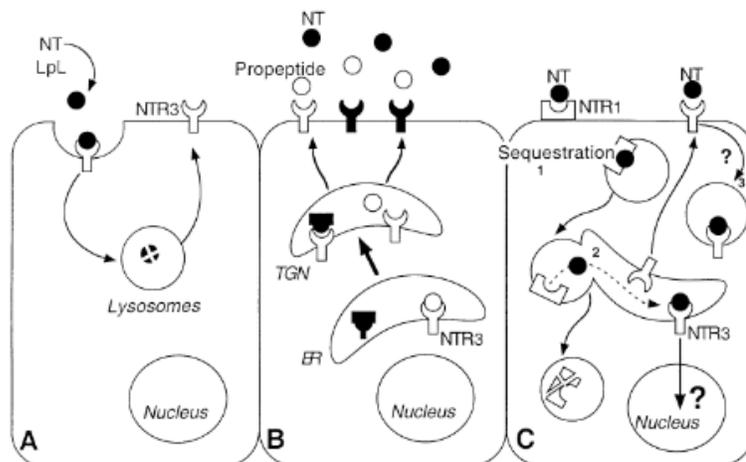


Figure 1.13 Représentation schématique des différents cheminements par lesquels la Sortiline va médier ses fonctions. En fonction du ligand avec lequel la Sortiline sera liée comme la NTS (NT) ou une lipoprotéine lipase (LpL), le récepteur NTSR3 (NTR3) a la possibilité d'emprunter différents circuits pour effectuer ses fonctions. A: La Sortiline comme récepteur endocytique. Le ligand cible du NTSR3 va se fixer au récepteur, qui va l'internaliser par endocytose et sera pris en compte par la suite par les lysosomes qui seront chargés de dégrader le ligand. Cette voie est principalement responsable de médier le métabolisme de certains nutriments comme les lipides. B : La Sortiline comme récepteur dans le trafic intracellulaire de la NTS et le tri cellulaire. La NTSR3 va intervenir au niveau de la biosynthèse de la NTS. La forme inactive du ligand va se lier au récepteur qui va l'internaliser de même que la NTS mature. C'est le complexe récepteur- ligand qui sera internalisé, et le NTSR3 va réguler la maturation du ligand permettant ensuite l'activation d'une panoplie de cascades. C: la Sortiline en tant que récepteur membranaire. Le NTSR3 peut interagir avec la NTS par suite de son internalisation avec d'autres récepteurs comme le NTSR1(NTR1). Ainsi, la NTSR3 va s'occuper des voies de signalisation impliquant la NTS au travers de compartiments intracellulaires. [Adapté d'après Mazella, 2001].

1.3.3 Les fonctions biologiques de la NTS

La NTS est impliquée dans une multitude de fonctions qui seront médiées au travers de ses trois différents récepteurs. Principalement situé au niveau du système nerveux

central et du tractus gastrointestinal, les fonctions biologiques du NTS dépendront de sa localisation (Mustain *et al.*, 2011).

Dans le système nerveux central, elle va jouer un rôle de neurotransmetteur et de neuromodulateur. Elle va avoir un impact sur divers systèmes : le système dopaminergique, cholinergique, gabaergiques et sérotoninergiques (Binder *et al.*, 2001; Ferraro *et al.*, 2008; Petkova-Kirova *et al.*, 2008). De nombreuses revues de la littérature ont montré que la NTS était colocalisée avec les neurones dopaminergiques (DA) au niveau de l'hypothalamus et du mésencéphale (Bean et Roth, 1992; Seroogy *et al.*, 1988). La localisation des récepteurs de la NTS sur les neurones DA dans certaines aires cérébrales comme l'aire tegmentale centrale soulève la possibilité d'une interaction fonctionnelle entre ces deux systèmes soit le système neurotensinergique et le système DA (Binder *et al.*, 2001). Une fois que la NTS se lie à ses récepteurs sur les cellules DA, le complexe NTS–NTSR va favoriser l'activation des récepteurs. Différents mécanismes d'action de la NTS sur le système DA sont induits en fonction du récepteur activé. La NTS peut moduler directement ou indirectement la neurotransmission de dopamine. Cette modulation peut se faire, par exemple, par l'augmentation de l'expression du gène de la tyrosine hydrolase qui est une enzyme intervenant dans la biosynthèse de la DA (Burgevin *et al.*, 1992). En outre, la modulation peut engendrer la diminution de l'affinité de liaison de la DA à un de ses récepteurs soit le récepteur DA D2 (D2R) (Fuxe *et al.*, 1992; Li *et al.*, 1995). La NTS pourrait également faciliter la libération de DA en diminuant la capacité du récepteur D2R à renverser l'inhibition présynaptique aux extrémités d'axones dopaminergiques (Legault *et al.*, 2002). La modulation de ce système va jouer un rôle sur les éléments tels que la régulation de la température du corps et la nociception (Nemeroff *et al.*, 1979). Des recherches antérieures ont pu aussi mettre en évidence une interaction entre la NTS et les neurones sérotoninergiques (Jolas et Aghajanian, 1997). Les NTSR sont retrouvés au niveau de certaines aires cérébrales sur les neurones sérotoninergiques. La

NTS pourra donc au travers de ses récepteurs moduler la transmission de la sérotonine (Jolas et Aghajanian, 1996; Li *et al.*, 2001). Le rôle fonctionnel de la NTS peut ainsi être de participer à la modulation de certaines des fonctions connues du système sérotoninergique, notamment la nociception, la régulation du cycle veille-sommeil et les réactions liées au stress (Buhler *et al.*, 2005; Corley *et al.*, 2002; Jolas et Aghajanian, 1997). La NTS par sa présence au niveau de l'hypothalamus et de l'hypophyse peut moduler la synthèse de certaines hormones telles que la corticotrophine, la gonadotrophine (Cooke *et al.*, 2009), l'hormone de croissance (GH) (Blackburn *et al.*, 1980), ainsi que la sécrétion de prolactine au niveau de l'hypophyse (Blackburn *et al.*, 1980; Cooke *et al.*, 2009; Memo *et al.*, 1986; Rostene et Alexander, 1997).

Du fait de sa localisation au niveau du tractus intestinal, la NTS aura des rôles très importants au niveau de ce système dont le but est de réguler les différents processus digestifs qui se déroulent dans l'estomac, l'intestin grêle et le côlon, tenant en compte des processus hormonaux et neuronaux (Nicholl *et al.*, 1985). La NTS peut donc participer à de nombreuses étapes de la physiologie digestive entérique. Au niveau du tractus intestinal, la libération de la NTS est stimulus dépendante et va lui permettre de participer à des fonctions telles que l'absorption intestinale ainsi que la sécrétion de fluides et d'électrolytes. Elle va favoriser l'absorption de nutriments que sont les lipides, les acides aminés et les glucides (Andrews *et al.*, 1983; Chen *et al.*, 1987; Gui *et al.*, 2001). La NTS va jouer un rôle crucial au niveau de la mobilité intestinale (Thor *et al.*, 1980). En effet, la NTS possède un effet myogénique direct au niveau des muscles intestinaux responsables de la production de mouvements dans le petit et le grand intestin (Al-Saffar, 1984; Mulè *et al.*, 1995; Thor *et al.*, 1982). En agissant au niveau nerveux, la NTS va moduler le système nerveux sympathique en augmentant la sécrétion de noradrénaline synaptique et, par conséquent, en inhibant la production d'un complexe moteur migrant qui est une activité motrice engagée dans la progression des aliments de la bouche à l'anus (Sakai *et al.*, 1984). La NTS exerce aussi un effet

endocrinien sur la motilité intestinale par la modulation hypothalamique (Parolaro *et al.*, 1987; Rosell *et al.*, 1984). De plus, elle va interagir avec des neuropeptides intestinaux liés à la motilité, tels que la substance P ou la bombésine (McLean et Fox, 1983). Elles seront responsables de l'induction de la sécrétion d'autres hormones liées à la motilité, notamment la somatostatine ou l'histamine, à partir de différents types de cellules entériques ou de cellules neuroendocrines (Rökæus, 1984; Takeda *et al.*, 1989). En outre, la NTS joue un rôle clé en modulant l'axe cerveau /intestin, qui régule l'appétit et l'apport d'aliments (Kim et Mizuno, 2010). La leptine, connue comme étant l'hormone de satiété, en présence de la NTS, peut engendrer un effet anorectique (Beck *et al.*, 1990; Beck *et al.*, 1998). En outre, en présence d'un excès de gras, la NTS va être impliquée dans la régulation du métabolisme des lipides intestinaux en association avec la cholécystokinine, une hormone sécrétée par la muqueuse duodénale impliquée dans la digestion et la satiété. Celles-ci vont contrôler la digestion des lipides en augmentant l'hydrolyse des graisses. Sous l'action de la NTS, il résultera une augmentation des concentrations plasmatiques totales en cholestérol et une nette diminution de la teneur en cholestérol dans l'intestin grêle et le foie (Beck *et al.*, 1996; Kalafatakis et Triantafyllou, 2011; Peric-Golia *et al.*, 1984).

1.3.4 Implication de l'axe NTS/NTSR dans le cancer

Depuis plusieurs années, les études portant sur la NTS ont documenté ses voies de signalisation, ses récepteurs, son profil biologique ainsi que sa contribution dans plusieurs pathologies telles que les maladies neurodégénératives, l'inflammation, les maladies cardiovasculaires et le cancer (Brun *et al.*, 2005; Elek *et al.*, 2000; Stopa *et al.*, 1999). De nombreuses études ont démontré la contribution de la NTS à différentes étapes de la cancérogénèse telles que la progression du cancer, la survie, la croissance et le processus métastatique en raison de l'expression différentielle de NTS et de NTSR

chez les personnes atteintes de cancer comparativement à des individus sains (Ouyang *et al.*, 2015b; Reubi *et al.*, 1999). L'axe NTS/NTSR aura donc une influence dans une variété de cancers : le cancer du sein, du colon, du pancréas, les gliomes ainsi que les leucémies. En fonction du type de cancer, un récepteur différent de NTS sera impliqué.

Des études ont documenté le potentiel tumorigène de la NTS au niveau du cancer du sein humain et cela se fait principalement via le NTSR1 en favorisant la croissance et la progression du cancer du sein. Le gène du récepteur NTSR1 va cibler des voies oncogènes comme la voie Wnt / APC liées au complexe de transcription β -caténine/Tcf, connu pour activer des gènes impliqués dans la prolifération et la transformation cellulaire (Souazé *et al.*, 2006; Souazé *et al.*, 2005). L'axe NTS/NTSR peut aussi altérer le processus d'apoptose principalement par l'activation du gène Bcl-2 connu comme étant un gène anti-apoptotique (Somaï *et al.*, 2002).

Au niveau du système gastrointestinal, des études ont pu mettre en évidence le rôle joué par la NTS et ses récepteurs dans l'oncogenèse du cancer colorectal (Myers *et al.*, 2009). Il apparaît que les NTSR sont retrouvés dans près de 40% des lignées cellulaires de cancer du côlon humain avec une forte expression comparativement aux cellules de colons normaux (Maoret *et al.*, 1994). De plus, l'expression de NTSR1 dans les cellules cancéreuses du côlon semble aussi être régulée positivement par la voie de signalisation Wnt / APC, une voie bien connue du cancer colorectal (Souazé *et al.*, 2005). Collectivement, la NTS va accroître les effets oncogènes en promouvant l'inflammation, la prolifération cellulaire et en altérant aussi le processus normal du cycle cellulaire normal au niveau de cellules de cancer colorectal (Martin *et al.*, 2002a; Müller *et al.*, 2011; Zhao *et al.*, 2003).

Au niveau cérébral, il a été montré que la NTS contribuait à promouvoir le caractère malin chez les patients atteints de glioblastomes. Les niveaux d'expression élevés de

NTS et de ses récepteurs majoritairement le NTSR1 indiquent un pronostic insatisfaisant chez les patients atteints de gliome (Ouyang *et al.*, 2015b). Plusieurs études ont pu mettre ce processus en lien avec l'activation de NTSR1 qui va conduire à l'activation de la protéine kinase activée par un mitogène de Ras, MAPK dépendante de Ras et de la voie NF- κ B, qui augmentent ensuite l'expression des protéines Wnt. L'activation de la signalisation Wnt déclenche l'activation et la contribution d'autres axes de signalisation en aval et l'activation de certains facteurs de transcription (Ouyang *et al.*, 2015a; Wu *et al.*, 2017; Xiao *et al.*, 2017).

L'axe NTS/NTSR a été documenté au niveau de la leucémie. Plusieurs études ont rapporté les mécanismes associés à la survie des cellules B au niveau de la leucémie et ceux associés dans la pathogénèse de ce cancer malin (Longo *et al.*, 2008; Schröttner *et al.*, 2010). Il a été démontré que la contribution de l'axe NTS/NTSR est non négligeable au niveau de la progression de la maladie via l'activation des NTSR (Abbaci *et al.*, 2018). En effet, l'expression différentielle de la NTS et de ses récepteurs a été rapportée au niveau des cellules B malignes, avec une forte expression comparativement aux cellules saines montrant leur implication potentielle dans les maladies telle la leucémie. La NTS peut aussi exercer un effet prolifératif et anti-apoptotique dans les lignées de cellules B (Furman *et al.*, 2000; Magazin *et al.*, 2004). Dépendamment du type de cancer, différentes voies de signalisation vont médier les effets des NTS / NTSR sur la prolifération, la survie, la migration et l'invasion cellulaire. De ce fait, l'axe NTS/NTSR ouvre de nombreuses perspectives du point de vue de la compréhension de l'ensemble des processus moléculaires, génétiques et épigénétiques qui vont contribuer à la modification de certains proto-oncogènes et de gènes suppresseurs de tumeurs conduisant au développement et la progression du cancer. En outre, cet axe apparaît comme une excellente cible du point de vue de la thérapie du cancer.

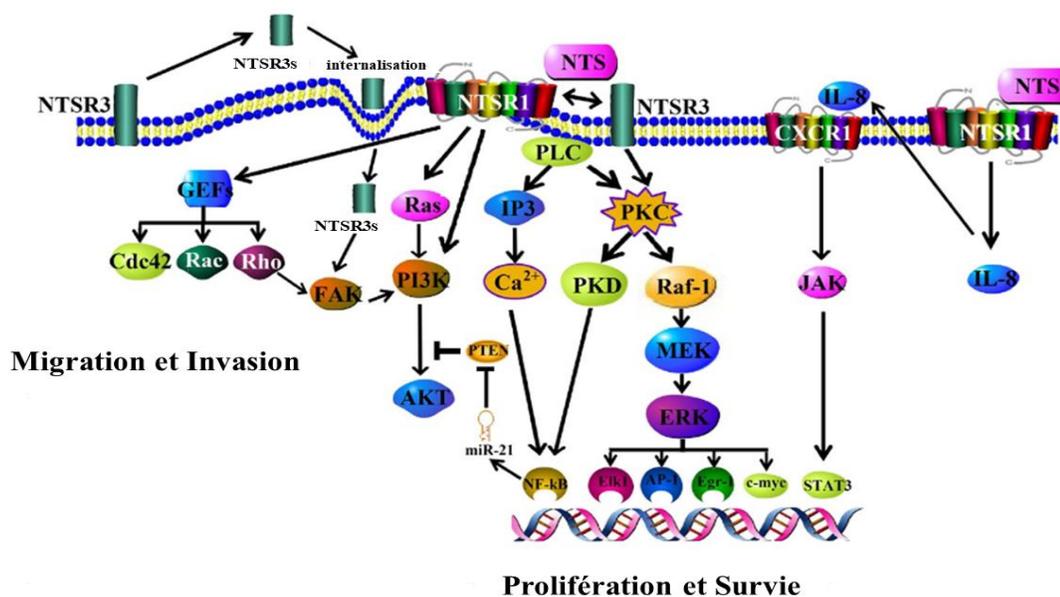


Figure 1.14 L'axe NTS/NTSR dans le cancer et les cascades de signalisation. La NTS va interagir avec ses récepteurs les NTSR pour activer un ensemble d'enzymes soit la protéine kinase C (PKC) ainsi que la phospholipase C (PLC) qui vont suivre des voies de signalisation différentes. Cette activation va varier en fonction du récepteur que liera la NTS. Ainsi dépendamment du récepteur impliqué la NTS va favoriser l'activation de certaines cascades qui seront impliquées dans la migration ou l'invasion cellulaire. La NTS peut contribuer aussi au niveau de la prolifération et la survie cellulaire. [Adapté d'après Ouyang et al., 2017].

1.4 Diète et chimioprévention

1.4.1 Les molécules phytochimiques dans la prévention du cancer

Aux vues des statistiques portant sur le nombre de personnes atteintes du cancer et le taux de survie de cette maladie, les recherches sur la prévention de cancer qui visent la réduction du risque d'apparition de cette maladie ne sont pas à négliger et peuvent représenter un tremplin à l'amélioration de la condition de vie saine au niveau mondial.

Les efforts portés vers ce volet ne sont donc pas vains et prennent en compte plusieurs actions. L'adoption d'un meilleur style de vie tient compte de l'alimentation qui encourage à inclure des fibres, des fruits, des légumes et des aliments non transformés (Béliveau et Gingras, 2014). L'activité physique serait un autre moyen de prévention non négligeable car celle-ci aura des effets bénéfiques sur plusieurs mécanismes. L'activité physique peut bonifier le système immunitaire, réguler les hormones stéroïdes sexuelles (œstrogènes et androgènes), réduire l'inflammation, augmenter la sensibilité à l'insuline, et réduire l'accumulation de graisse dans les tissus sous-cutanés qui est l'un des facteurs prédisposant au diabète et à l'obésité. Cet ensemble aiderait de manière considérable pour la prévention du cancer (Béliveau et Gingras, 2009).

De plus en plus de recherches se font sur l'utilisation de composés naturels comme agents chimiopréventifs pour le cancer en raison de leur faible toxicité. Plusieurs composés contenus dans l'alimentation quotidienne sont ciblés pour explorer leur pouvoir chimiopréventif et les modes d'action par lesquels ils agissent. Des liens ont déjà été établis avec les légumes crucifères comme le chou et le brocoli, les légumes allium comme l'ail et l'oignon, le thé vert, les agrumes, le soja, les tomates, les baies et le gingembre (Gullett *et al.*, 2010). Les légumes de la famille allium possèdent un effet protecteur associé à la présence d'un composé organosulfuré qui tend à inhiber la carcinogénèse au niveau de certains tissus et organes comme les glandes mammaires, l'œsophage et les poumons. Des glycosides de quercétine, d'autres composés de la famille allium, reconnus comme des substances bioactives ont été associées à l'inhibition de réponses génotoxiques, la promotion de l'apoptose ainsi que l'élimination de radicaux libres (Pourzand *et al.*, 2016). Les tomates ont aussi été impliquées dans la prévention du cancer due à la présence du lycopène, un membre de la famille des caroténoïdes qui confère aux tomates leur coloration rouge. Mis à part son potentiel antioxydant, des études ont montré son rôle dans la régulation du mécanisme de cancérogénèse en induisant l'apoptose en régulant la protéine p53 et Rb,

et en influençant le cycle cellulaire par l'induction de l'arrêt de la phase G0 / G1 et un blocage de la phase S (Trejo-Solís *et al.*, 2013). En outre, le rôle antioxydant n'est pas en reste car il favorise l'inactivation de dérivés réactifs de l'oxygène, ce qui contribuerait à la diminution du stress oxydatif et des effets inflammatoires. Mises ensemble, les propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires et pro-apoptotiques du lycopène pourraient ainsi contribuer à la prévention du cancer en modulant de nombreux processus associés à la cancérogénèse (Ben-Dor *et al.*, 2005; Palozza *et al.*, 2010). L'intérêt croissant sur l'utilisation des molécules naturelles dans la chimioprévention du cancer s'avère prometteur aux vues des diverses études menées mais aussi très bénéfique en raison de leur disponibilité, leur sûreté et leur faible coût.

1.4.2 Les polyphénols du thé vert : les catéchines

Le thé est l'un des breuvages les plus consommés dans le monde entier et se classifie en différents types en fonction de la couleur et des propriétés parmi lesquels se comptent le thé blanc, le thé noir et le thé vert. Le thé vert, très couramment utilisé dans l'alimentation, provient des feuilles du *Camellia sinensis* et se compose de pigments, de fibres, de minéraux, de macronutriments, de composés phénoliques oxydés et non oxydés encore appelés catéchines (Song et Seong, 2007) (Figure 1.15). Les catéchines sont les constituants majeurs du thé vert avec une prédominance de la catéchine (C), l'épicatéchine (EC), l'épicatéchine gallate (ECG), l'épigallocatechine (EGC) et l'épigallocatechine gallate (EGCG) (Suzuki *et al.*, 2012). Plusieurs effets bénéfiques ont pu être associés au thé vert principalement dû à la présence de ces catéchines (Chacko *et al.*, 2010).

La consommation du thé a été associée à la diminution du risque de plusieurs maladies prolifératives en lien avec certains effets protecteurs que possèdent les catéchines. Ils jouent un rôle dans le traitement de maladie hépatique en réduisant la galactosamine qui est modulée par la cytokine pro-inflammatoire TNF- α et des dommages au niveau du foie (Abe *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2018). Les effets bénéfiques des catéchines ont été étudiés au niveau de maladies cardiovasculaires grâce à la combinaison de leur potentiel anti-inflammatoire et antioxydant en réduisant le stress oxydatif. En effet, leur potentiel anti-inflammatoire engendre la suppression de facteurs inflammatoires comme les cytokines et une perturbation de la voie de signalisation NF- κ B qui joue un rôle majeur dans la promotion de l'inflammation (Suzuki *et al.*, 2012).

Un des aspects non négligeables et des plus importants des catéchines du thé vert serait leur utilisation au niveau de la prévention du cancer. En effet, de nombreuses recherches ont mis en exergue leur potentiel anticancéreux par l'inhibition de la prolifération cellulaire, la modulation de la protéine p53 et la réduction de l'angiogenèse en perturbant des voies de signalisation comme NF- κ B, JAK/STAT3, Ras/ERK (Suzuki *et al.*, 2012; Yang et Wang, 2016). En outre, d'autres études ont pu montrer que les catéchines du thé vert étaient capables de cibler plusieurs mécanismes moléculaires et cellulaires en lien avec le développement du cancer au travers de leur activité biologique (Demeule *et al.*, 2002). Un exemple bien illustré dans de nombreuses recherches est le potentiel de certaines catéchines à cibler les MMPs qui sont très bien connues pour leur rôle dans la progression tumorale. Il a été démontré que des catéchines comme l'EGCG étaient capables d'inhiber la sécrétion de certaines MMPs et aussi de réduire leur activité au niveau de cellules de glioblastome (Demeule *et al.*, 2002). L'importance des catéchines est indéniable et de ce fait la compréhension complète des mécanismes moléculaires impliqués pour leur action est d'une grande utilité.

catéchine (Khan *et al.*, 2006). L'EGCG possède de multiples propriétés : antioxydante, anti-cancéreuse, anti-inflammatoire, antivirale et antimicrobienne.

Le potentiel antioxydant de l'EGCG a été démontré dans de nombreuses études. En effet, l'EGCG peut contrôler la production des dérivés réactifs de l'oxygène (DRO) (Lambert et Elias, 2010). La structure du cycle phénolique de l'EGCG lui permet de piéger des électrons et d'éliminer les radicaux libres en passant par l'élimination des DRO. De façon directe, l'EGCG est capable de réduire et même d'inhiber le stress oxydatif qui est très néfaste car il peut causer des dommages aux tissus et être impliqué dans le processus de la carcinogénèse. Cependant, certaines études ont souligné quelques limites du potentiel antioxydant de l'EGCG, en montrant certains effets pro-oxydants avec des doses élevées de cette catéchine (Lambert et Elias, 2010).

Dans le domaine de la microbiologie, l'EGCG possède un large spectre d'activités antimicrobiennes qui prend en compte la prévention des bactéries responsables d'intoxications alimentaires, l'inhibition des toxines bactériennes et aussi l'inhibition de l'inflammation causée par des agents bactériens. Ces actions vont différer en fonction du type de pathogène (Nikoo *et al.*, 2018).

Au niveau de la virologie, plusieurs effets antiviraux ont pu être associés à l'EGCG contre plusieurs pathogènes viraux. L'activité antivirale de l'EGCG contre le VIH, qui est un rétrovirus responsable du développement du SIDA, a été démontrée. En effet, il serait capable d'interférer principalement avec l'étape de fixation du virus VIH-1 par le blocage de la liaison de la glycoprotéine VIH sur les lymphocytes, le désassemblage du virion et en dégradant une fraction peptidique responsable de l'amplification de l'infection virale, qui améliorerait la transmission du VIH-1 (Fassina *et al.*, 2002; Nance *et al.*, 2009).

Outre ces différents effets bénéfiques, un bon nombre d'études ont pu mettre en exergue le potentiel anticancéreux de l'EGCG par son implication sur l'inhibition de divers mécanismes associés à la progression du cancer en se liant à son récepteur, le récepteur à la laminine 67LR (Umeda *et al.*, 2008). En effet, l'EGCG a été impliqué dans la modulation en régulant la machinerie du cycle cellulaire à travers les protéines régulatrices du cycle (Gupta *et al.*, 2004). Cet effet peut induire l'arrêt du cycle cellulaire principalement en phase G0/G1 dans divers modèles de cellules cancéreuses en régulant la cycline D1, le cdk4, le cdk6, le p21 et le p27 qui sont des protéines clés du cycle et dont la dérégulation serait responsable de la progression du cancer. L'EGCG a aussi un potentiel anti-angiogénique dans différents cancers (Masuda *et al.*, 2001; Shankar *et al.*, 2007). L'angiogenèse est le développement de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux sanguins préexistants pour fournir un apport sanguin nutritif. Elle est indispensable à la croissance tumorale et à la survie. Il a été démontré que l'EGCG est en grande partie capable d'inhiber l'angiogenèse en régulant les facteurs de croissance de l'endothélium vasculaire et leur récepteur et aussi à travers la régulation de multiples cascades de signalisation telles MAPK/ERK et JAK/STAT (Shankar *et al.*, 2008). En outre, de nombreuses études ont démontré que l'EGCG était impliqué dans l'induction de l'apoptose par l'activation de certaines caspases et la régulation de protéines pro-apoptotiques comme BAD, BAX, BCL-XS (Singh *et al.*, 2011). Les recherches qui portent sur la compréhension des différents effets anticancéreux indiquent que l'EGCG, contenu dans le thé vert, pourrait être efficace dans la chimioprévention du cancer. Les nouvelles approches sur l'étude de l'EGCG dans toutes ses facettes visent à mieux cerner son mécanisme d'action, et à comprendre ses limites soit la toxicité, la biodisponibilité et la pharmacocinétique (Gan *et al.*, 2018; Narayanan *et al.*, 2015).

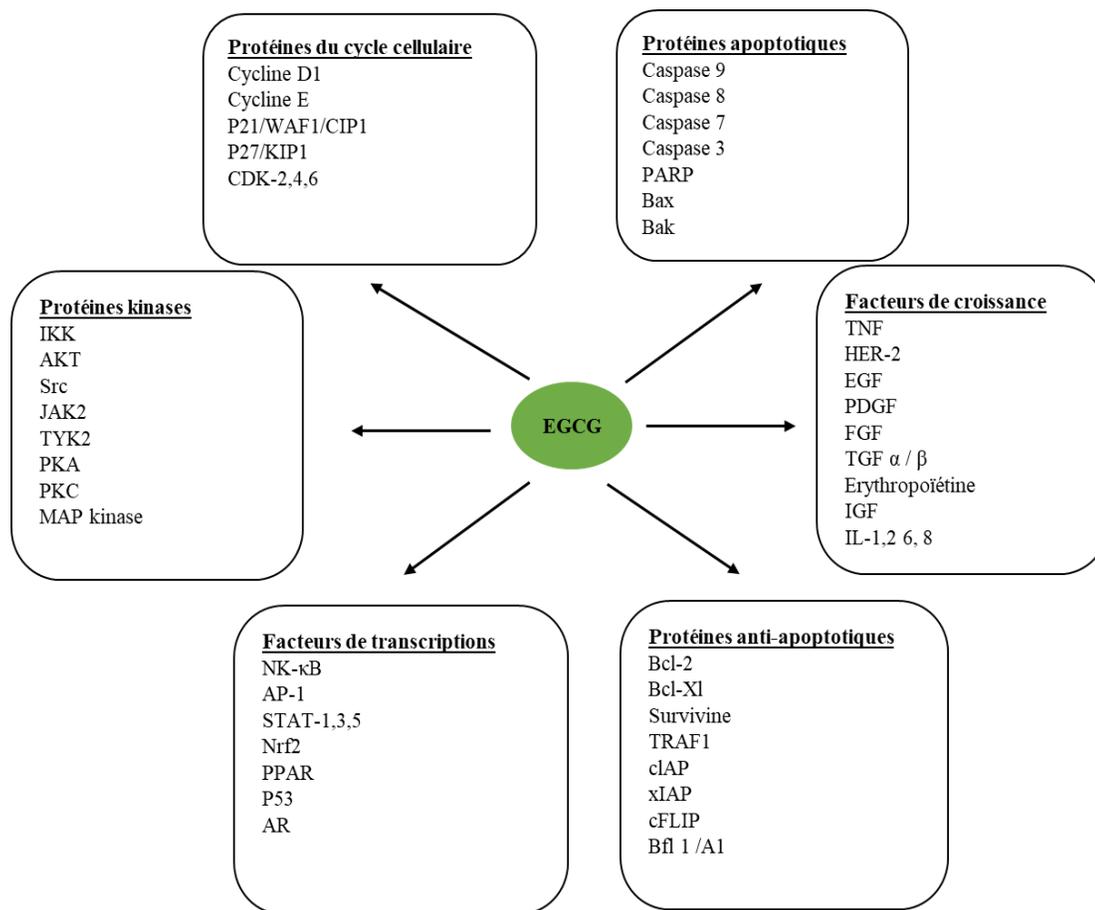


Figure 1.16 Les différentes cibles biochimiques de l'EGCG. L'EGCG possède un potentiel anticancéreux qui va impliquer l'inhibition du développement du cancer. Il peut moduler les activités des enzymes, des récepteurs et des molécules de signalisation qui affectent la croissance, l'apoptose et la prolifération cellulaire. [Adapté d'après Singh et al., 2011].

CHAPITRE II

PROJET DE RECHERCHE

2.1 Problématique

Plusieurs études ont démontré que l'axe NTS/NTSRs régule autant les processus de différenciation que de maturation des lymphocytes B. Aussi de la littérature, il a déjà été établi que les cellules promyélomonocytaires HL-60 avaient le potentiel de se différencier en macrophages à la suite d'une stimulation avec du PMA. La lignée HL-60 se présente donc comme un excellent modèle pour l'étude de différents processus moléculaires liés à la différenciation cellulaire. Il est déjà connu que le PMA peut engendrer l'activation de cascades de signalisation, principalement la voie MAPK, et va activer le facteur de transcription NF- κ B qui est impliqué dans la régulation de processus inflammatoires, dans la régulation du gène MMP-9, ainsi que dans la modulation de la cascade de signalisation impliquant les macrophages. Nous savons que les cellules HL-60 adoptent un phénotype de type « macrophage-like » et que l'axe NTS/NTSR peut être impliqué dans le processus de différenciation de lymphocytes B. Nous nous intéressons à savoir quel est l'effet de la différenciation d'un point de vue moléculaire et génique de notre lignée cellulaire d'intérêt sur l'axe NTS/NTSR.

Notre intérêt de recherche se porte donc sur la chimioprévention en utilisant une molécule naturelle dérivée du thé vert, l'EGCG, pour ainsi investiguer son utilisation dans un contexte de prévention du cancer.

2.2 Hypothèse

Nous émettons l'hypothèse que l'EGCG, une molécule extraite du thé vert, prévient l'acquisition d'un phénotype invasif lors de la différenciation des cellules HL-60 en macrophages induite suivant l'axe NTS/NTSR3.

2.3 Objectifs de recherche

Notre étude a été divisée en plusieurs objectifs spécifiques à la suite de la différenciation de la lignée cellulaire promyélocytaire HL-60 en monocytes/macrophages:

- Objectif 1 : Caractérisation de marqueurs de la différenciation
- Objectif 2 : Étude de l'expression de la neurotensine, de la Sortiline et de la métalloprotéinase MMP-9
- Objectif 3 : Détermination du rôle de la Sortiline dans le processus d'invasion et caractérisation des voies de signalisation associées
- Objectif 4 : Étude de l'effet de l'EGCG dans les différents processus induits par le PMA.

CHAPITRE III

IMPACT OF DIET-DERIVED POLYPHENOL EGCG ON NEUROTENSIN RESPONSE UPON HL-60 PROMYELOCYTIC LEUKEMIA CELLS ACQUISITION OF A MACROPHAGE-LIKE PHENOTYPE

Tiziana Dao and Borhane Annabi

Article soumis dans le journal scientifique *OncoTargets and Therapy*

Contributions des co-auteurs :

Tiziana Dao: Expérimentation et essais biologiques, analyse des résultats, montage des figures, rédaction du manuscrit.

Borhane Annabi : Analyse des résultats, montage des figures, rédaction du manuscrit, financement et conception du projet.

Impact of diet-derived polyphenol EGCG on neurotensin response upon HL-60 promyelocytic leukemia cells acquisition of a macrophage-like phenotype

Tiziana Dao, and Borhane Annabi*

Laboratoire d'Oncologie Moléculaire, Département de Chimie, Centre de recherche BIOMED, Université du Québec à Montréal, Québec, Canada

Running title : EGCG inhibits NTSR3 upon macrophage differentiation

Key words: Neurotensin, neurotensin receptors, macrophages, leukemia, EGCG, NTSR3, Sortilin

** To whom correspondence and reprint requests should be directed*

Laboratoire d'Oncologie Moléculaire

Université du Québec à Montréal

C.P. 8888, Succ. Centre-ville

Montréal, Québec

CANADA

H3C 3P8

Phone : (514) 987-3000 ext. 7610

E-mail : annabi.borhane@uqam.ca

Abbreviations: AML: Acute myeloid leukemia; APL: Acute promyelocytic leukemia; BBB: Blood-brain barrier; CNS, Central nervous system; CSF, colony-stimulating factor; EGCG: Epigallocatechin-3-gallate; EMT: Epithelial-mesenchymal transition; MMP-9: Matrix metalloproteinase-9; NTS: Neurotensin; NTSR: Neurotensin receptor; PMA: Phorbol 12-myristate 13-acetate; TGF, Transforming growth factor

3.1 Abstract

Background: Differential expression of the neurotensin (NTS)/neurotensin receptor (NTSR) axis in chronic B cell leukemia was recently reported to regulate B cell proliferation and prosurvival signaling. Whether such NTS/NTSR axis is expressed and is functional in alternate acute myeloid leukemia (AML) is unknown and could represent a potential target for future therapeutic modalities.

Methods: In this study, analysis of NTS, NTSR1, NTSR2, and NTSR3 expression in acute myeloid leukemia (AML) patients using Kaplan-Meier plots specifically highlighted NTS and NTSR3 as poor clinical prognosis biomarkers. NTSR3 gene and protein expression was also explored in undifferentiated and upon phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)-mediated differentiation of HL-60 suspension cells, an acute promyelocytic leukemia subset cell line model from AML, into CD11b⁺/CD14⁻ adherent macrophages.

Results: We found that high level of gene, total protein, and cell surface expression of NTSR3 correlated with increased NTS internalization, matrix metalloproteinase-9 expression, and basal macrophage cell migration. Whereas NTS dose-dependently enhanced undifferentiated HL-60 cells chemotaxis, it rather inhibited cell migration in differentiated macrophages through decreased Erk, MEK and Src signaling pathways. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG), a diet-derived polyphenol with anti-inflammatory and chemopreventive properties, prevented PMA-induced CD11b expression, NTS internalization and NTSR3-induced expression.

Conclusions: Our study specifically evidences differential expression of NTSR3 as well as functional response to NTS observed upon promyelomonocytic HL-60 differentiation into macrophages. More importantly, targeting of the signaling mechanisms involved in the acquisition of such phenotype appears altered by the anti-cancer properties of EGCG.

3.2 Introduction

Soluble neuropeptide factors regulate a series of physiological functions in the central nervous system (CNS) and believed to stimulate the proliferation and migration of tumor cells (1). As such, the oncogenic actions of neurotensin (NTS) have been described in different types of human cancers to primarily occur during the early stages of cell transformation (2). Cell differentiation status may therefore play a crucial role in the extent of NTS physiological and pathological response levels. This has been reported, for instance, in the early stages of hemopoietic differentiation where NTS loses its physiological effect upon terminal differentiation, presumably through the down-regulation of NTS receptors (NTSRs) (3). On the other hand, cell differentiation status is also shown to regulate NTSRs expression in undifferentiated primary cultured neurons as they remain undetectable in the undifferentiated state but do increase during differentiation (4). Differential expression of NTS and NTSR must therefore be better understood in order to design optimized therapeutic interventions in line with specific cell differentiation status (5, 6).

Levels of NTSR1 and NTSR2, two NTSRs characterized as G protein-coupled receptors, were recently assessed in normal and malignant human B lymphocytes, suggesting that a NTS/NTSR axis regulates the onset of B cell diseases, especially in chronic B cell leukemia (7, 8). The third NTS receptor NTSR3, also referred to as Sortilin, is not a G protein-coupled receptor and belongs to the Vps10p intracellular protein family, predominantly located in the endoplasmic reticulum/Golgi compartment (9, 10). It is characterized by a C-terminal cytoplasmic tail that contains sorting motifs responsible for subcellular distribution of the receptors (11, 12). NTSR3 further exerts diverse cellular functions including intracellular sorting of proteins, such as acid sphingomyelinase, apolipoprotein B100 (apoB100), and PCSK9, as well as engaging in signaling as a (co)receptor in cell surface receptor complexes (13).

Interestingly, when expressed alone, NTSR3 serves as a functional receptor regulating cell migration (14). How their expression associates within a specific cell differentiation status remains unknown

Among the several leukemic cell lines that have been established over the years, the human HL-60 promyelocytic leukemia cells have proven useful in understanding the process whereby immature cells differentiate into cells of distinct mature myelomonocytic lineages (15). In particular, HL-60 cells can be induced to differentiate into mature functional monocytic/macrophagic-like cells by the tumor-promoting and protein kinase C activator phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) (16). Macrophage differentiation has also been shown to involve secretion and activation of collagenase MMP-9 (17, 18), a crucial matrix metalloproteinase involved in vascular disruption (19), extracellular matrix degradation during tumor metastasis, and in inflammatory disorders (20). Given chemokines play an important role in the recruitment of monocytes into cancer niches (21, 22), and that upon chemotactic migration into the tumor niche, monocytes differentiate into macrophages (23), it was valuable for us to assess in this study the expression of the three NTSRs in HL-60 cells during their differentiation process into macrophages.

CNS infiltration by circulating leukemic cells and enhanced *in vitro* transendothelial migration of promyelocytic leukemia HL-60-derived macrophages through a blood-brain barrier (BBB) model was indeed recently demonstrated (24). However, the physiological function of the NTS/NTSR axis in macrophage chemotaxis and implication in neuro-inflammation in the CNS are poorly understood (25, 26). In fact, anti-neuroinflammatory strategies have recently identified the diet-derived epigallocatechin-3-gallate (EGCG) as an efficient agent to prevent inflammation-associated neurodegenerative diseases by targeting pro-inflammatory mediator signaling (27-29). Here, we specifically evaluated how the NTS/NTSR signaling axis

correlated with macrophage differentiation, and whether EGCG could prevented NTS-mediated chemotactism upon macrophage differentiation.

3.3 Materials and Methods

Materials

Sodium dodecylsulfate (SDS), EGCG, PMA, and bovine serum albumin (BSA) were purchased from Sigma-Aldrich Canada (Oakville, ON). Electrophoresis reagents were from Bio-Rad (Mississauga, ON). The enhanced chemiluminescence (ECL) reagents were from Amersham Pharmacia Biotech (Baie d'Urfé, QC). Micro bicinchoninic acid protein assay reagents were from Pierce (Rockford, IL). The polyclonal antibodies against Src, phosphorylated Src, Akt, phosphorylated Akt, Erk, phosphorylated Erk, MEK, phosphorylated MEK were from Cell Signaling Technology Inc (Danvers, MA, USA), and NTSR3/Sortilin was from Abcam (Cambridge, UK). The monoclonal antibody against GAPDH (Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase) was from Advanced Immunochemical Inc. (Long Beach, CA). Horseradish peroxidase-conjugated donkey anti-rabbit and anti-mouse IgG secondary antibodies were from Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA).

Kaplan-Meier survival plot analysis

A Kaplan-Meier survival plot analysis was performed using the Bloodspot (<http://servers.binf.ku.dk/bloodspot/>) algorithm, which provides a plot of gene expression in hematopoietic cells at different maturation stages based on curated microarray data (30). For each of the four genes tested, we questioned the overall survival using the “Acute myeloid leukemia (AML) vs normal” dataset as follows : NTS (206291_at), NTSR1 (207360_s_at), NTSR2 (206899_at), and NTSR3 (SORT1,

212807_s_at). Human AML NK-AML and whole bone marrow cells (31) were compared to their nearest normal counterpart (32).

Cell culture

The human HL-60 acute promyelocytic leukemia cell line was purchased from American Type Culture Collection (Manassas, VA) and maintained in Iscove's modified Dulbecco's medium (Gibco Invitrogen Cell Culture Systems, Burlington, ON) containing 20% (v/v) fetal bovine serum (FBS) (HyClone Laboratories, Logan, UT), 2 mM glutamine, 100 units/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, and were cultured at 37°C under a humidified atmosphere containing 5% CO₂. Given that numerous protocols can be found in the literature to differentiate resting HL-60 cells into "macrophage-like cells" with PMA (between 1 to 8 days with various PMA concentrations, alone or in combination with other molecules), we wish to emphasize that we termed our cell model as follows throughout the text : The "HL-60 macrophage differentiation" condition represents the adherent subpopulation of HL-60 cells immediately harvested upon 24 hours treatment with 0.3 µM PMA.

Immunoblotting procedures

Undifferentiated suspensions or adherent PMA-differentiated HL-60 cells were lysed and proteins were separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). After electrophoresis, proteins (30 µg) were electrotransferred to polyvinylidene difluoride membranes, which were then blocked for one hour at room temperature with 5% nonfat dry milk in Tris-buffered saline (150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.5) containing 0.3% Tween-20 (TBST; Bioshop, TWN510-500). Membranes were further washed in TBST and incubated with the respective anti-primary antibodies (1/1,000 dilution) in TBST containing 3% BSA and 0.1% sodium azide (Sigma-Aldrich Canada, S2002), followed by a 1 hour incubation with horseradish peroxidase-conjugated donkey anti-rabbit or anti-mouse IgG at 1/2,500 dilutions in TBST containing 5%

nonfat dry milk. Immunoreactive material was visualized by ECL.

Gelatin zymography

Gelatin zymography was used to assess the extent of proMMP-9 gelatinolytic activity in serum-starved undifferentiated vs PMA-treated HL-60 cells as previously described (18). Briefly, an aliquot (20 μ L) of the culture medium was subjected to SDS-PAGE in a gel containing 0.1 mg/mL gelatin, a substrate that is efficiently hydrolyzed by proMMP-9. The gels were then incubated in 2.5% Triton X-100 and rinsed in nanopure distilled H₂O. Gels were further incubated at 37°C for 20 hrs in 20 mM NaCl, 5 mM CaCl₂, 0.02% Brij-35, 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.6, then stained with 0.1% Coomassie Brilliant blue R-250 and destained in 10% acetic acid, 30% methanol in H₂O. Gelatinolytic activity was detected as unstained bands on a blue background.

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

Total RNA was extracted from cell suspensions or monolayers using TriZol reagent (Life Technologies, Gaithersburg, MD). For cDNA synthesis, 2 μ g of total RNA were reverse-transcribed using a high capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems, Foster City, CA). cDNA was stored at -80°C prior to PCR. Gene expression was quantified by real-time quantitative PCR using iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad, Hercules, CA). DNA amplification was carried out using an Icyler iQ5 (Bio-Rad, Hercules, CA) and product detection was performed by measuring binding of the fluorescent dye SYBR Green I to double-stranded DNA. The QuantiTect primer sets were provided by Qiagen (Valencia, CA) : MMP-9 (QT00040040), NTSR1 (Hs_NTSR1_1_SG, QT00018494), NTSR3/Sortilin (Hs_SORT1_1_SG, QT00073318), PPIA (Hs_PPIA_4_SG, QT01866137), GAPDH (Hs_GAPDH_1_SG, QT00079247), and β -Actin (Hs_Actb_2_SG, QT01680476). The primer sets for NTSR2 were provided by Biorad (10041595). The relative quantities of

target gene mRNA compared against two internal controls, GAPDH and β -Actin mRNA, were measured by following a ΔC_T method employing an amplification plot (fluorescence signal *vs.* cycle number). The difference (ΔC_T) between the mean values in the triplicate samples of target gene and those of GAPDH and β -Actin mRNAs were calculated by iQ5 Optical System Software version 2.0 (Bio-Rad, Hercules, CA) and the relative quantified value (RQV) was expressed as $2^{-\Delta C_T}$.

Cell migration assay

Cell migration assay experiments were carried out using the Real-Time Cell Analyzer (RTCA) Dual-Plate (DP) Instrument of the xCELLigence system (Roche Diagnostics). Suspension cells or trypsinized adherent cells were seeded (20,000 cells/well) onto CIM-Plates 16 (Roche Diagnostics). These migration plates are similar to conventional Transwells (8 μ m pore size) but with gold electrode arrays on the bottom side of the membrane to provide a real-time measurement of cell migration. Prior to cell seeding, the underside of the wells from the upper chamber was coated with 25 μ L of 0.15% gelatin in PBS and incubated for 1 hour at 37°C. Cell migration was monitored for 6 hours in the exclusive response or not to 10 μ M NTS. The impedance values were measured by the RTCA DP Instrument software and were expressed in arbitrary units as Normalized Cell Migration Index. Each experiment was performed three times in triplicate.

Flow cytometry staining protocol and data acquisition

Following the *in vitro* PMA-mediated stimulation of HL-60 cells, culture cells in suspension and cells detached from adhesion were analyzed by multicolor flow cytometry. An Fc receptor blocking reagent (Miltenyi Biotec) was used to prevent non-specific binding of antibodies. Subsequently, cells were stained and incubated for 1 hour at 4°C with a cocktail of specific antibodies. To exclude dead cells, a viability dye kit (Invitrogen) was used. Cells were then fixed with a fixation buffer (BD Cytotfix)

and acquired on a BD Fortessa-X20 (BD Biosciences) flow cytometer. FlowJo V10.2 (FlowJo LLC) software was used to assess the frequencies and mean fluorescence intensities of various subsets of cells. Monocytes and macrophages were identified by their characteristic forward and side light scatter properties. Cells of the hematopoietic lineage were identified through their expression of CD45. Expressions of CD14 were used to identify classical, intermediate and non-classical monocytes. CD11b was used to identify cells known to exhibit phagocytosis, chemotaxis and cellular activation.

Statistical data analysis

Unless otherwise stated, data are representative of three or more independent experiments. Statistical significance was assessed using Student's unpaired t-test. Probability values of less than 0.05 were considered significant and an asterisk identifies such significance in the figures. Error bars in all figures represent standard error means (s.e.m.) values.

3.4 Results

High neurotensin and NTSR3 gene expression tend to correlate with poor prognosis in AML patients. Previous reports on neurotensin (NTS) and its receptors (NTSR) expression by T lymphocytes (33), macrophages (34), dendritic cells (35), and in B lymphocytes pro-survival signaling (8) suggest that NTS/NTSR axis could modulate immune response and become an appealing pharmacologic target of therapeutic interest. Modulations in the NTS/NTSR axis therefore warrants more investigation in blood malignancy. We thus addressed the levels of NTS, NTSR1, NTSR2, and NTSR3 transcript expression in AML patients using Kaplan-Meier analysis as described in the Methods section (Fig.1). We found that high NTS and NTSR3 gene expression tended

to correlate with poor prognosis in AML patients, whereas no significant difference was observed for NTSR1 and NTSR2 expression in those same patients. This analysis emphasises on NTSR3 expression as a potential poor prognosis biomarker in AML disease progression, and warrants further investigation regarding its molecular regulation.

PMA-induced differentiation of promyelocytic HL-60 suspension cells into macrophages triggers NTSR3 and MMP-9 expression. In order to address how any modulation of the NTS/NTSR axis correlates with the level of mobilisation of the cells, our choice was to work with the HL-60 acute promyelocytic leukemia cell line model, which was appropriately reclassified as an acute myeloblastic leukemia with maturation cell model FAB-M2, therefore better approximating AML (36-38). Such model allows one to further assess validated attractive molecular processes involved in *in vitro* differentiation into granulocytic/monocytic/macrophage lineage (39). Of particular interest, PMA-mediated differentiation of HL-60 cell suspensions triggered intense adherence to plastic (Fig.2A), and expression of a CD14^{Low}/CD11b^{High} macrophage-like phenotype (Fig.2B). When gene expression was compared between adherent differentiated cells and undifferentiated cells in suspension, NTSR3 was significantly induced as well as matrix metalloproteinase (MMP)-9, a MMP best known to be involved in BBB disruption (20, 40) and inflammatory processes (41). NTSR3 increased expression in differentiated adherent cells was further confirmed at the protein level in cell lysates (Fig.2D), whereas secreted MMP-9 was also found to be increased as assessed by zymography from isolated conditioned culture media (Fig.2E). NTSR3 cell surface immunophenotyping was performed by flow cytometry, and NTSR3 levels confirmed the increase upon cell differentiation (Fig.2F).

Neurotensin internalization is increased in PMA-differentiated macrophage-like HL-

60 cells and requires functional NTSR3. We next assessed the functionality of NTSR3 as it is, in contrast to NTSR1 and NTSR2 which rather transduce intracellular signaling upon ligand binding, involved in NTS trafficking from the cell surface within subcellular compartments (42). Undifferentiated and PMA-differentiated cells were incubated with fluorescent NTS as described in the Methods section, and levels of intracellular fluorescence assessed by flow cytometry. We found that NTS internalization was significantly increased in adherent macrophage-like cells (Fig.3A), and that excess of unlabeled NTS or NTSR3 ligand progranulin efficiently competed with fluorescent NTS uptake validating NTSR3 cell surface involvement (Fig.3B).

Differential chemotactic response to neurotensin between undifferentiated and differentiated macrophage-like HL-60 cells. In order to address the level of cell mobilisation upon differentiation, we next performed a real-time cell migration assay and observed that macrophage-like adherent HL-60 cells had significant higher migratory potential than their undifferentiated counterparts (Fig.4A). When chemotactic response to NTS was assessed, cell migration was found to increase dose-dependently in response to NTS in undifferentiated cells (Fig.4B), whereas NTS rather triggered a decrease in differentiated macrophage-like cell migration (Fig.4C). In order to document some of the downstream signaling intermediates involved in the NTS/NTSR axis, cell lysates from undifferentiated and differentiated macrophage-like HL-60 cells were harvested upon NTS stimulation and Western blotting performed. We observed that NTS triggered phosphorylation of the mitogen-activated protein kinase (MEK)/extracellular signal-regulated kinase (ERK) pathway (Fig.4D, first two columns). Increased basal migration of the macrophage-like differentiated HL-60 cell migration was also found to correlate with increased levels of phosphorylated MEK/Erk as well as of phosphorylated Src (Fig.4D, third column). Interestingly, NTS treatment of these cells resulted in the decrease of the phosphorylated status of

MEK/Erk/Src (Fig.4D, last column), in line with the decreased cell migration responsiveness to NTS (Fig.4C).

EGCG prevents PMA-induced NTSR3 gene expression in differentiated macrophages.

Green tea-derived polyphenol epigallocatechin-3-gallate (EGCG) was recently found to alter several processes upon PMA-induced macrophage differentiation of HL-60 cells, and included mRNA stabilizing factor HuR-mediated transcriptional control of MMP-9 expression (17), efficient targeting of NF- κ B downstream gene products (28), as well as targeting platelet-derived growth factors-mediated macrophage chemotaxis (43). We therefore assessed whether EGCG further altered NTSR3 expression and any aspects associated with differentiation into macrophages. Cell surface immunophenotyping was performed on undifferentiated HL-60 cells and compared to that of PMA-differentiated macrophage cells in the presence or not of EGCG. We found that EGCG did not prevent cells from adhering to culture plates. However, whereas the expression of CD14 remained low, that of CD11b was reduced to levels comparable to undifferentiated cells (Fig.5). Furthermore, EGCG prevented the increases in NTSR3 cell surface (Fig.5B) and transcript (Fig.5C) levels.

EGCG potentiates the reduced chemotactic response of HL-60 differentiated macrophages.

Whether EGCG's ability to decrease NTSR3 expression affected NTS chemotactic response was next assessed. We found that EGCG reduced basal migration of undifferentiated cells by ~20%, while concomitantly prevented NTS-induced chemotactism (Fig.6A). On the other hand, reduced chemotactic response was observed in response to NTS in macrophage-like HL-60 cells and EGCG further potentiated that effect (Fig.6B).

3.5 Discussion

NTS/NTSR signaling axis has been involved in the regulation of immunity and inflammation by T lymphocytes, macrophages and dendritic cells. Whereas NTS is involved in the regulation of cytokine production, neutrophil chemotaxis, NO generation and mast cell activation, its co-regulation with NTSRs remains unclear in several types of cancers. For instance, a quantitative study of gene expression in two malignant B cell diseases showed that NTSR2 was overexpressed, NTSR1 was decreased, and NTS was unexpressed in B cell leukemia patient's cells (8). However, these expressions did not significantly change in large diffuse B cell lymphoma lymph nodes as compared with benign ones. Recently, NTSR2 was suggested to be an essential driver of apoptosis resistance in B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) cells, where it was highly expressed, in contrast to NTS levels, which were minimal in both B-CLL cells and patient plasma (7). In the current study, we found that increased NTS and NTSR3 expression tended to correlate with poor prognosis in AML patients (Fig.1). Overall and given the roles NTSRs play in cancer cell survival, targeting of the NTS/NTSR functions and signaling axis may legitimately represent a promising therapeutic target.

Acute promyelocytic leukemia (APL) represents 5-15% of all cases of AML that results from an arrest of the terminal differentiation of promyelocytes into granulocytes (44). In the current study, we specifically investigated the differential expression of NTSR1, NTSR2, and NTSR3 that occurs upon PMA-mediated differentiation into a macrophage-like phenotype using an HL-60 promyelocytic cell model. As such, HL-60 cells have more appropriately been classified as an acute myeloblastic leukemia with maturation cell model FAB-M2, therefore better approximating AML (38). Among the three NTSRs tested, only the expression of NTSR3 was significantly

triggered upon macrophage differentiation (Fig.2), which supports the predicted poor patients' prognosis observed in Fig.1. Furthermore, macrophage differentiation also correlated with increased chemotactism, in part explained by the high MMP-9 levels. Previous research indicated that NTSR2 and NTSR3 are crucial for the anti-apoptotic effect of NTS on pancreatic beta-TC3 cells (45). Although NTSR1 was recently suggested as a prognosis marker in breast, lung, and head and neck squamous carcinomas (46), neither NTSR1 nor NTSR2 were here found differentially expressed between healthy and diseased leukemic patients, prompting for NTSR3 as the best potent biomarker to further be investigated.

In this study, NTS/NTSR3 axis therefore appears to play an important role in the PMA-mediated differentiation process of promyelocytic HL-60 cells into a macrophage-like phenotype as this correlated with increases in both NTS internalization and cell migration. Furthermore, NTS internalization and NTSR3-induced expression in macrophages was found reversed upon treatment with chemopreventive diet-derived EGCG. Altogether, our observations add up and support those observed previously in HL-60 macrophage-like cells, and which documented the pleiotropic EGCG targeting including the MMP-9 mRNA stabilizing factor HuR (17), numerous NF- κ B downstream gene products (18), as well as sphingosine-1-phosphate-mediated signalling (43). EGCG targeting of NTSR3 cell surface expression and cellular function now demonstrates that this can possibly also alter several other NTSR3 functions such as those involved in the control of inflammation through regulation of cytokine secretion (47). Recent evidence supporting such impact of EGCG on cytokine secretion was also provided on circulating mesenchymal stromal cells, which are believed to be avidly recruited within vascularizing tumors (48, 49), possibly through secretion of colony-stimulating factor (CSF)-2 and CSF-3 (50).

NTS implication in tumor growth processes includes anti-apoptotic and cell

proliferation functions as previously reported in various types of human cancer cell lines (colon, prostate, lung, pancreas, breast) (51). Involvement of NTS was also reported in inflammation (52, 53), cytokine production (54, 55), enhancement of phagocytosis (56), and nitric oxide (NO) generation (57). Tumor growth is associated with chronic inflammation and is mediated through various immune cells among which the highly infiltrative phenotype of macrophages account for ~30%-50% of the tumor mass (56). NTS signaling has also recently found to cross-link inflammation and epithelial-mesenchymal transition (EMT)-related tumor migration (1). NTS/NTSR signaling axis therefore plays an important role in the acquisition of an invasive phenotype which is in fact prerequisite to metastatic spread. How NTSR3 can participate to such process needs to be further investigated. Interestingly, NTSR3 association with transforming growth factor (TGF)- β family proteins was recently found to negatively down-regulate TGF- β signaling by enhancing lysosome-mediated degradation (58). In many cancers, especially at early stages, accumulating evidence has revealed the critical roles of TGF- β as a pro-tumorigenic factor regulating EMT induced by TGF- β (59). It is thus not surprising that recent findings also strongly suggest that targeting TGF- β signaling may be useful for the treatment or prevention of some cancers (60). In light of this, the chemopreventive properties of EGCG have been reported to inhibit TGF- β -induced EMT (61-64) and cell invasion (65).

An important original and intriguing aspect of our study relies upon the dual functions that NTS appears to exert on cell migration upon HL-60 cell differentiation into macrophages. Whereas NTS-mediated chemoattraction of undifferentiated promyelocytic HL-60 cells triggered Erk and MEK phosphorylation, it rather reduced migration once cells adopted a macrophage-like phenotype (Fig.4D). While NTSR3 involvement in brain macrophage microglia migration was previously reported (66, 67), here we show that increased NTSR3 cell surface expression correlated with increased migratory phenotype in differentiated macrophages through, in part,

increased basal levels of phosphorylated Erk/MEK and Src (Fig.4D). This is in line with increased Src kinase activity which was recently shown to be associated with differentiating macrophages (68). Additionally, NTSR3 knockdown led to dramatic decreases in Src phosphorylation and neuroendocrine tumor cells migration (69), as well as in triple-negative MDA-MB-231 cells (14). In our study, NTS in conditions of high NTSR3 expression as found in macrophages, rather led to a decrease in Erk/MEK/Src phosphorylation status possibly because NTS was not made available for NTSRs signaling. A combination of two lines of evidence can, in part, explain such effect. The first evidence relies on the regulation of the subcellular localization of NTSR3 which controls NTS internalization and trafficking (70). In fact, it is postulated that two distinct NTSR3 pools are responsible for either NTS endocytosis from the cell surface, or sorting of internalized NTS to the Trans-Golgi network. Regulation of the partitioning processes of these NTSR3 pools upon macrophage differentiation remains to be addressed and may favor NTS internalization and degradation. The second evidence relies on the cell surface heterodimerization capacity of NTSRs/NTSR3 complexes which can ultimately modulate NTS signaling (71). As such, it was elegantly demonstrated that increased expression of NTSR3 led to increased NTSR1/NTSR3 complexes and decreased potency of NTSR1 to activate phospholipase C and to stimulate PI production (71). Moreover, similarly to the effects observed in our study, the presence of increased NTSR3 lowered the sensitivity of NTS to stimulate the phosphorylation of MAP kinases (71). Of interest, PMA-mediated shedding of a soluble form of NTSR3 was reported from HT29 colorectal cancer cell surface, where it was hypothesised to modulate NTS biological effects (72).

3.6 Conclusions

In conclusion, whereas we do acknowledge that further cell models must be tested including the use of CD34+ cells, our current study is the first that delineates a predicted correlation between NTS/NTSR3 biomarkers to poor clinical prognosis in AML patients. Next, we defined pleiotropic NTSR3 molecular functions associated with increased basal migratory phenotype upon macrophage differentiation, which will require to be further documented within other human AML cell lines and, more importantly, in AML cells derived from the bone marrow of AML patients. Given immune cells can migrate into the brain parenchyma by chemotaxis (73), addition of the increased MMP-9 involvement in vascular permeabilization, may further contribute to immune escape and pro-inflammatory processes associated with tumor development (74). Finally, we provide further support for the chemopreventive properties of diet-derived EGCG (summarized in Fig.7) through regulation of NTSR3 and MMP-9 expression at their mRNA level that may involve targeting of several upstream signaling pathways including Erk/MEK/Src and NF- κ B targeting.

3.7 Declarations

Ethics approval and consent to participate

Not applicable.

Consent for publication

Not applicable.

Availability of data and materials

The data analyzed during this study are included in this published article.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Funding

This study was funded by a grant from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC).

Authors' contributions

TD performed all the experiments, analyzed the data, participated in scientific discussions and wrote the manuscript; and BA provided the concept design and scientific direction, led scientific discussions and contributed to editing and drafting of the manuscript. All authors have read and approved the final manuscript.

3.8 Acknowledgments

BA holds an Institutional Research Chair in Cancer Prevention and Treatment.

3.9 References

1. Ye Y, Liu P, Wang Y, Li H, Wei F, Cheng Y, Han L, Yu J. (2016) Neurotensin, a Novel Messenger to Cross-Link Inflammation and Tumor Invasion via Epithelial-Mesenchymal Transition Pathway. *Int Rev Immunol.* 35(4):340-350.
2. Ouyang Q, Zhou J, Yang W, Cui H, Xu M, Yi L. (2017) Oncogenic role of neurotensin and neurotensin receptors in various cancers. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 44(8):841-846.
3. Choi SY, Chae HD, Park TJ, Ha H, Kim KT. (1999) Characterization of high affinity neurotensin receptor NTR1 in HL-60 cells and its down regulation during granulocytic differentiation. *Br J Pharmacol.* 126(4):1050-1056.
4. Chabry J, Checler F, Vincent JP, Mazella J. (1990) Colocalization of neurotensin receptors and of the neurotensin-degrading enzyme endopeptidase 24-16 in primary cultures of neurons. *J Neurosci.* 10(12):3916-3921.
5. Moody TW, Ramos-Alvarez I, Jensen RT. (2018) Neuropeptide G Protein-Coupled Receptors as Oncotargets. *Front Endocrinol (Lausanne).* 9:345.
6. Morgat C, Mishra AK, Varshney R, Allard M, Fernandez P, Hindié E. (2014) Targeting neuropeptide receptors for cancer imaging and therapy: perspectives with bombesin, neurotensin, and neuropeptide-Y receptors. *J Nucl Med.* 55(10):1650-1657.
7. Abbaci A, Talbot H, Saada S, Gachard N, Abraham J, Jaccard A, Bordessoule D, Fauchais AL, Naves T, Jauberteau MO. (2018) Neurotensin receptor type 2 protects B-cell chronic lymphocytic leukemia cells from apoptosis. *Oncogene.* 37(6):756-767.
8. Saada S, Marget P, Fauchais AL, Lise MC, Chemin G, Sindou P, Martel C, Delpy L, Vidal E, Jaccard A, Troutaud D, Lalloué F, Jauberteau MO. (2012) Differential expression of neurotensin and specific receptors, NTSR1 and NTSR2, in normal and malignant human B lymphocytes. *J Immunol.* 189(11):5293-5303.
9. Béraud-Dufour S, Devader C, Massa F, Roulot M, Coppola T, Mazella J. (2016) Focal Adhesion Kinase-Dependent Role of the Soluble Form of Neurotensin Receptor-3/Sortilin in Colorectal Cancer Cell Dissociation. *Int J Mol Sci.* 17(11). pii: E1860.

10. Willnow TE, Petersen CM, Nykjaer A. (2008) VPS10P-domain receptors - regulators of neuronal viability and function. *Nat Rev Neurosci.* 9(12):899-909.
11. Munck Petersen C, Nielsen MS, Jacobsen C, Tauris J, Jacobsen L, Gliemann J, Moestrup SK, Madsen P. (1999) Propeptide cleavage conditions sortilin/neurotensin receptor-3 for ligand binding. *EMBO J.* 18(3):595-604.
12. Nielsen MS, Madsen P, Christensen EI, Nykjaer A, Gliemann J, Kasper D, Pohlmann R, Petersen CM. (2001) The sortilin cytoplasmic tail conveys Golgi-endosome transport and binds the VHS domain of the GGA2 sorting protein. *EMBO J.* 20(9):2180-2190.
13. Schmidt V, Willnow TE. (2016) Protein sorting gone wrong--VPS10P domain receptors in cardiovascular and metabolic diseases. *Atherosclerosis.* 245:194-199.
14. Roselli S, Pundavela J, Demont Y, Faulkner S, Keene S, Attia J, Jiang CC, Zhang XD, Walker MM, Hondermarck H. (2015) Sortilin is associated with breast cancer aggressiveness and contributes to tumor cell adhesion and invasion. *Oncotarget.* 6(12):10473-10486.
15. Guo Q, Zhang L, Li F, Jiang G. (2012) The plasticity and potential of leukemia cell lines to differentiate into dendritic cells. *Oncol Lett.* 4(4):595-600.
16. Huberman E, Callahan MF. (1979) Induction of terminal differentiation in human promyelocytic leukemia cells by tumor-promoting agents. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1979;76(3):1293-7.
17. Annabi B, Currie JC, Moghrabi A, Béliveau R. (2007) Inhibition of HuR and MMP-9 expression in macrophage-differentiated HL-60 myeloid leukemia cells by green tea polyphenol EGCg. *Leuk Res.* 31(9):1277-1284.
18. Vezina A, Chokor R, Annabi B. (2012) EGCG targeting efficacy of NF- κ B downstream gene products is dictated by the monocytic/macrophagic differentiation status of promyelocytic leukemia cells. *Cancer Immunol Immunother.* 61(12):2321-2331.
19. Lakhan SE, Kirchgessner A, Tepper D, Leonard A. (2013) Matrix metalloproteinases and blood-brain barrier disruption in acute ischemic stroke. *Front Neurol.* 4:32. Erratum in: *Front Neurol.* (2018) 9:202.
20. Vandooren J, Van Damme J, Opdenakker G. (2014) On the structure and functions of gelatinase B/matrix metalloproteinase-9 in neuroinflammation. *Prog Brain Res.* 214:193-206.

21. Ben-Baruch A. (2006) The multifaceted roles of chemokines in malignancy. *Cancer Metastasis Rev.* 25(3):357-71.
22. Krasnikova TL, Arefieva TI, Pylaeva EA, Sidorova MV. (2016) Ingramon, a Peptide Inhibitor of MCP-1 Chemokine, Reduces Migration of Blood Monocytes Stimulated by Glioma-Conditioned Medium. *Bull Exp Biol Med.* 160(4):480-482.
23. Komohara Y, Ohnishi K, Kuratsu J, Takeya M. (2008) Possible involvement of the M2 anti-inflammatory macrophage phenotype in growth of human gliomas. *J Pathol.* 216(1):15-24.
24. Seidel G, Böcker K, Schulte J, Wewer C, Greune L, Humberg V, Schmidt MA (2011) Pertussis toxin permeabilization enhances the traversal of Escherichia coli K1, macrophages, and monocytes in a cerebral endothelial barrier model in vitro. *Int J Med Microbiol.* 301(3):204-212.
25. Corraliza I. (2014) Recruiting specialized macrophages across the borders to restore brain functions. *Front Cell Neurosci.* 8:262.
26. Perry VH, Teeling J. (2013) Microglia and macrophages of the central nervous system: the contribution of microglia priming and systemic inflammation to chronic neurodegeneration. *Semin Immunopathol.* 35(5):601-612.
27. Cheng-Chung Wei J, Huang HC, Chen WJ, Huang CN, Peng CH, Lin CL. (2016) Epigallocatechin gallate attenuates amyloid β -induced inflammation and neurotoxicity in EOC 13.31 microglia. *Eur J Pharmacol.* 770:16-24.
28. Lai SW, Chen JH, Lin HY, Liu YS, Tsai CF, Chang PC, Lu DY, Lin C. (2018) Regulatory Effects of Neuroinflammatory Responses Through Brain-Derived Neurotrophic Factor Signaling in Microglial Cells. *Mol Neurobiol.* (in press).
29. Lee YJ, Choi DY, Yun YP, Han SB, Oh KW, Hong JT. (2013) Epigallocatechin-3-gallate prevents systemic inflammation-induced memory deficiency and amyloidogenesis via its anti-neuroinflammatory properties. *J Nutr Biochem.* 24(1):298-310.
30. Bagger FO, Sasivarevic D, Sohi SH, Laursen LG, Pundhir S, Sønderby CK, Winther O, Rapin N, Porse BT. (2019) BloodSpot: a database of healthy and malignant haematopoiesis updated with purified and single cell mRNA sequencing profiles. *Nucleic Acids Research.* 47(D1): D881–D885.

31. Verhaak RG, Wouters BJ, Erpelinck CA, Abbas S, Beverloo HB, Lugthart S, Löwenberg B, Delwel R, Valk PJ. (2009) Prediction of molecular subtypes in acute myeloid leukemia based on gene expression profiling. *Haematologica*. 94(1):131-134.
32. Rapin N, Bagger FO, Jendholm J, Mora-Jensen H, Krogh A, Kohlmann A, Thiede C, Borregaard N, Bullinger L, Winther O, Theilgaard-Mönch K, Porse BT. (2014) Comparing cancer vs normal gene expression profiles identifies new disease entities and common transcriptional programs in AML patients. *Blood*. 123(6):894-904.
33. Magazin M, Poszepczynska-Guigné E, Bagot M, Bousmell L, Pruvost C, Chalon P, Culouscou JM, Ferrara P, Bensussan A. (2004) Sezary syndrome cells unlike normal circulating T lymphocytes fail to migrate following engagement of NT1 receptor. *J Invest Dermatol*. 122(1):111-118.
34. Kim H. S., S. Yumkham, J. H. Choi, S. H. Lee, T. H. Kim, S. H. Ryu, P. G. Suh. (2006) Neurotensin enhances nitric oxide generation via the JAK2-STAT1 pathway in murine macrophage Raw264.7 cells during costimulation with LPS and IFN γ . *Neuropeptides* 40: 221-229.
35. da Silva L, Neves BM, Moura L, Cruz MT, Carvalho E. (2011) Neurotensin downregulates the pro-inflammatory properties of skin dendritic cells and increases epidermal growth factor expression. *Biochim Biophys Acta*. 1813(10):1863-1871.
36. Asik A, Kayabasi C, Ozmen Yelken B, Yılmaz Susluer S, Dogan Sigva ZO, Balcı Okcanoglu T, Saydam G, Biray Avci C, Gunduz C. (2018) Antileukemic effect of paclitaxel in combination with metformin in HL-60 cell line. *Gene*. 647:213-220.
37. Birnie GD. (1988) The HL60 cell line: a model system for studying human myeloid cell differentiation. *Br J Cancer Suppl*. 9:41-45.
38. Dalton WT Jr, Ahearn MJ, McCredie KB, Freireich EJ, Stass SA, Trujillo JM. (1988) HL-60 cell line was derived from a patient with FAB-M2 and not FAB-M3. *Blood*. 71(1):242-7.
39. Collins SJ. (1987) The HL-60 promyelocytic leukemia cell line: proliferation, differentiation, and cellular oncogene expression. *Blood*. 70(5):1233-1244.
40. Turner RJ, Sharp FR. (2016) Implications of MMP9 for Blood Brain Barrier Disruption and Hemorrhagic Transformation Following Ischemic Stroke. *Front Cell Neurosci*. 10:56.

41. St-Pierre Y, Van Themsche C, Estève PO. (2003) Emerging features in the regulation of MMP-9 gene expression for the development of novel molecular targets and therapeutic strategies. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*. 2(3):206-215.
42. Wilson CM, Naves T, Saada S, Pinet S, Vincent F, Lalloué F, Jauberteau MO. (2014) The implications of sortilin/vps10p domain receptors in neurological and human diseases. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 13(8):1354-1365.
43. Chokor R, Lamy S, Annabi B. (2014) Transcriptional targeting of sphingosine-1-phosphate receptor S1P2 by epigallocatechin-3-gallate prevents sphingosine-1-phosphate-mediated signaling in macrophage-differentiated HL-60 promyelomonocytic leukemia cells. *Onco Targets Ther*. 7:667-677.
44. Akhtar K, Ahmad S, Sherwani RK. (2011) Acute promyelocytic leukemia, hypogranular variant: a rare presentation. *Clin Pract*. 1(1):e11.
45. Béraud-Dufour S, Coppola T, Massa F, Mazella J. (2009) Neurotensin receptor-2 and -3 are crucial for the anti-apoptotic effect of neurotensin on pancreatic beta-TC3 cells. *Int J Biochem Cell Biol*. 41(12):2398-2402.
46. Dupouy S, Mourra N, Doan VK, Gompel A, Alifano M, Forgez P. (2011) The potential use of the neurotensin high affinity receptor 1 as a biomarker for cancer progression and as a component of personalized medicine in selective cancers. *Biochimie*. 93(9):1369-1378.
47. Mortensen MB, Kjolby M, Gunnensen S, Larsen JV, Palmfeldt J, Falk E, Nykjaer A, Bentzon JF. (2014) Targeting sortilin in immune cells reduces proinflammatory cytokines and atherosclerosis. *J Clin Invest*. 124(12):5317-5322.
48. Annabi B, Naud E, Lee YT, Eliopoulos N, Galipeau J. (2004) Vascular progenitors derived from murine bone marrow stromal cells are regulated by fibroblast growth factor and are avidly recruited by vascularizing tumors. *J Cell Biochem*. 91(6):1146-1158.
49. Aghi M, Cohen KS, Klein RJ, Scadden DT, Chiocca EA. (2006) Tumor stromal-derived factor-1 recruits vascular progenitors to mitotic neovasculature, where microenvironment influences their differentiated phenotypes. *Cancer Res*. 66(18):9054-9064.
50. Zgheib A, Lamy S, Annabi B. (2013) Epigallocatechin gallate targeting of membrane type 1 matrix metalloproteinase-mediated Src and Janus kinase/signal

transducers and activators of transcription 3 signaling inhibits transcription of colony-stimulating factors 2 and 3 in mesenchymal stromal cells. *J Biol Chem.* 288(19):13378-13386.

51. Qiu S, Pellino G, Fiorentino F, Rasheed S, Darzi A, Tekkis P, Kontovounisios C. (2017) A Review of the Role of Neurotensin and Its Receptors in Colorectal Cancer. *Gastroenterol Res Pract.* 2017:6456257.
52. Brun P., C. Mastrotto, E. Beggiao, A. Stefani, L. Barzon, G. C. Sturniolo, G. Palù, I. Castagliuolo. (2005) Neuropeptide neurotensin stimulates intestinal wound healing following chronic intestinal inflammation. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 288:G621-G629.
53. Piliponsky A. M., C. C. Chen, T. Nishimura, M. Metz, E. J. Rios, P. R. Dobner, E. Wada, K. Wada, S. Zacharias, U. M. Mohanasundaram, et al. (2008) Neurotensin increases mortality and mast cells reduce neurotensin levels in a mouse model of sepsis. *Nat. Med.* 14:392-398.
54. Koon H. W., Y. S. Kim, H. Xu, A. Kumar, D. Zhao, I. Karagiannides, P. R. Dobner, C. Pothoulakis. (2009) Neurotensin induces IL-6 secretion in mouse preadipocytes and adipose tissues during 2,4,6,-trinitrobenzenesulphonic acid-induced colitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106: 8766-8771.
55. Zhao D., Y. Zhan, H. Zeng, H. W. Koon, M. P. Moyer, C. Pothoulakis. (2005) Neurotensin stimulates interleukin-8 expression through modulation of I kappa B alpha phosphorylation and p65 transcriptional activity: involvement of protein kinase C alpha. *Mol. Pharmacol.* 67: 2025-2031.
56. Goldman R., Z. Bar-Shavit, E. Shezen, S. Terry, S. Blumberg. (1982). Enhancement of phagocytosis by neurotensin, a newly found biological activity of the neuropeptide. *Adv. Exp. Med. Biol.* 155: 133–141.
57. Chen Y, Tan W, Wang C. (2018) Tumor-associated macrophage-derived cytokines enhance cancer stem-like characteristics through epithelial-mesenchymal transition. *Onco Targets Ther.* 11:3817-3826.
58. Kwon S, Christian JL. (2011) Sortilin associates with transforming growth factor-beta family proteins to enhance lysosome-mediated degradation. *J Biol Chem.* 286(24):21876-21885.
59. Miyazono K. (2009) Transforming growth factor-beta signaling in epithelial-mesenchymal transition and progression of cancer. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 85(8):314-323.

60. Miyazono K, Katsuno Y, Koinuma D, Ehata S, Morikawa M. (2018) Intracellular and extracellular TGF- β signaling in cancer: some recent topics. *Front Med.* (in press).
61. Ko H, So Y, Jeon H, Jeong MH, Choi HK, Ryu SH, Lee SW, Yoon HG, Choi KC. (2013) TGF- β 1-induced epithelial-mesenchymal transition and acetylation of Smad2 and Smad3 are negatively regulated by EGCG in human A549 lung cancer cells. *Cancer Lett.* 335(1):205-213.
62. Liu LC, Tsao TC, Hsu SR, Wang HC, Tsai TC, Kao JY, Way TD. (2012) EGCG inhibits transforming growth factor- β -mediated epithelial-to-mesenchymal transition via the inhibition of Smad2 and Erk1/2 signaling pathways in nonsmall cell lung cancer cells. *J Agric Food Chem.* 60(39):9863-9873.
63. Wang Y, Liu N, Su X, Zhou G, Sun G, Du F, Bian X, Wang B. (2015) Epigallocatechin-3-gallate attenuates transforming growth factor- β 1 induced epithelial-mesenchymal transition via Nrf2 regulation in renal tubular epithelial cells. *Biomed Pharmacother.* 70:260-267.
64. Yang N, Zhang H, Cai X, Shang Y. (2018) Epigallocatechin-3-gallate inhibits inflammation and epithelial-mesenchymal transition through the PI3K/AKT pathway via upregulation of PTEN in asthma. *Int J Mol Med.* 41(2):818-828.
65. Huang SF, Horng CT, Hsieh YS, Hsieh YH, Chu SC, Chen PN. (2016) Epicatechin-3-gallate reverses TGF- β 1-induced epithelial-to-mesenchymal transition and inhibits cell invasion and protease activities in human lung cancer cells. *Food Chem Toxicol.* 94:1-10.
66. Martin S, Vincent JP, Mazella J. (2003) Involvement of the neurotensin receptor-3 in the neurotensin-induced migration of human microglia. *J Neurosci.* 23(4):1198-1205.
67. Martin S, Dicou E, Vincent JP, Mazella J. (2005) Neurotensin and the neurotensin receptor-3 in microglial cells. *J Neurosci Res.* 81(3):322-326.
68. Xu YZ, Thuraisingam T, Kanagaratham C, Tao S, Radzioch D. (2018) c-Src kinase is involved in the tyrosine phosphorylation and activity of SLC11A1 in differentiating macrophages. *PLoS One.* 13(5):e0196230.
69. Kim JT, Napier DL, Weiss HL, Lee EY, Townsend CM Jr, Evers BM. (2018) Neurotensin Receptor 3/Sortilin Contributes to Tumorigenesis of Neuroendocrine

Tumors Through Augmentation of Cell Adhesion and Migration. *Neoplasia*. 20(2):175-181.

70. Morinville A, Martin S, Lavallée M, Vincent JP, Beaudet A, Mazella J. (2004) Internalization and trafficking of neurotensin via NTS3 receptors in HT29 cells. *Int J Biochem Cell Biol*. 36(11):2153-2168.
71. Martin S, Navarro V, Vincent JP, Mazella J. (2002) Neurotensin receptor-1 and -3 complex modulates the cellular signaling of neurotensin in the HT29 cell line. *Gastroenterology*. 123(4):1135-1143.
72. Navarro V, Vincent JP, Mazella J. (2002) Shedding of the luminal domain of the neurotensin receptor-3/sortilin in the HT29 cell line. *Biochem Biophys Res Commun*. 298(5):760-764.
73. Korbecki J, Gutowska I, Kojder I, Jeżewski D, Goschorska M, Łukomska A, Lubkowska A, Chlubek D, Baranowska-Bosiacka I. (2018) New extracellular factors in glioblastoma multiforme development: neurotensin, growth differentiation factor-15, sphingosine-1-phosphate and cytomegalovirus infection. *Oncotarget*. 9(6):7219-7270.
74. Razavi SM, Lee KE, Jin BE, Aujla PS, Gholamin S, Li G. (2016) Immune Evasion Strategies of Glioblastoma. *Front Surg*. 2016 Mar 2;3:11.

3.10 Figure Legends

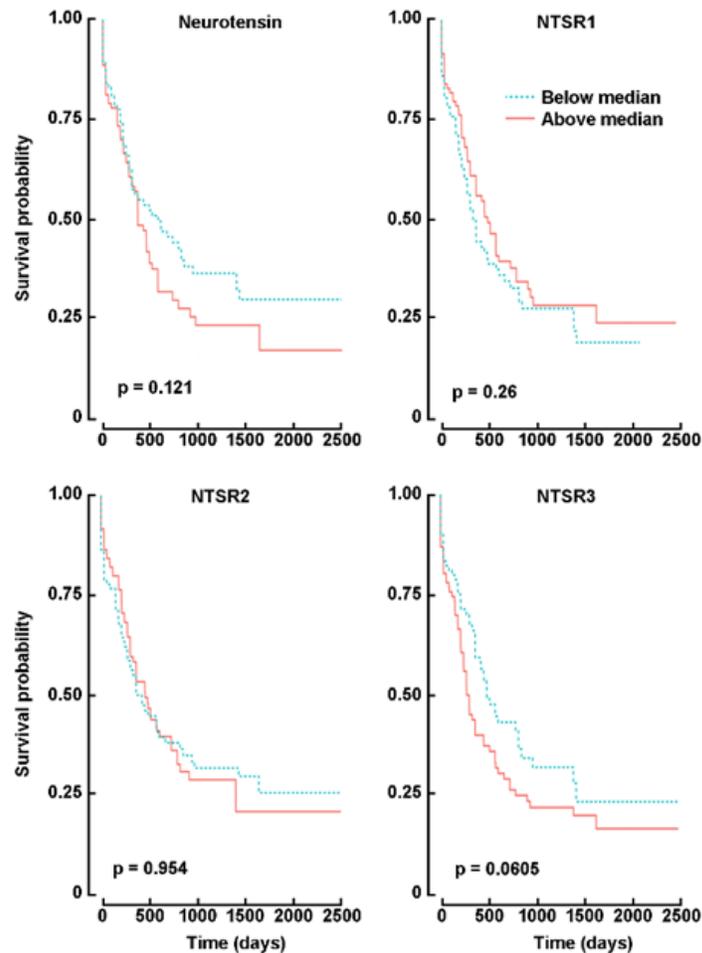


Fig 3.1: High neurotensin and NTSR3 gene expression correlate with poor prognosis in AML patients. Kaplan-Meier analysis was performed using transcriptional programs (<http://servers.binf.ku.dk/bloodspot/>) addressing a database of gene expression profiles from healthy and malignant haematopoiesis (30). The four panels show a survival plot based on a high-quality AML data set displaying a full Kaplan-Meier analysis of Neurotensin, NTSR1, NTSR2, and NTSR3. Survival plot was based on a high-quality AML data set from The Cancer Genome Atlas (TCGA). The survival plots are only available for human data sets, sharing probes with the microarray platform used by the TCGA. Green lines show patients with gene expression below median levels, whereas red lines show patients with gene expression above median. Numbers at risk are shown for each gene tested in all panels.

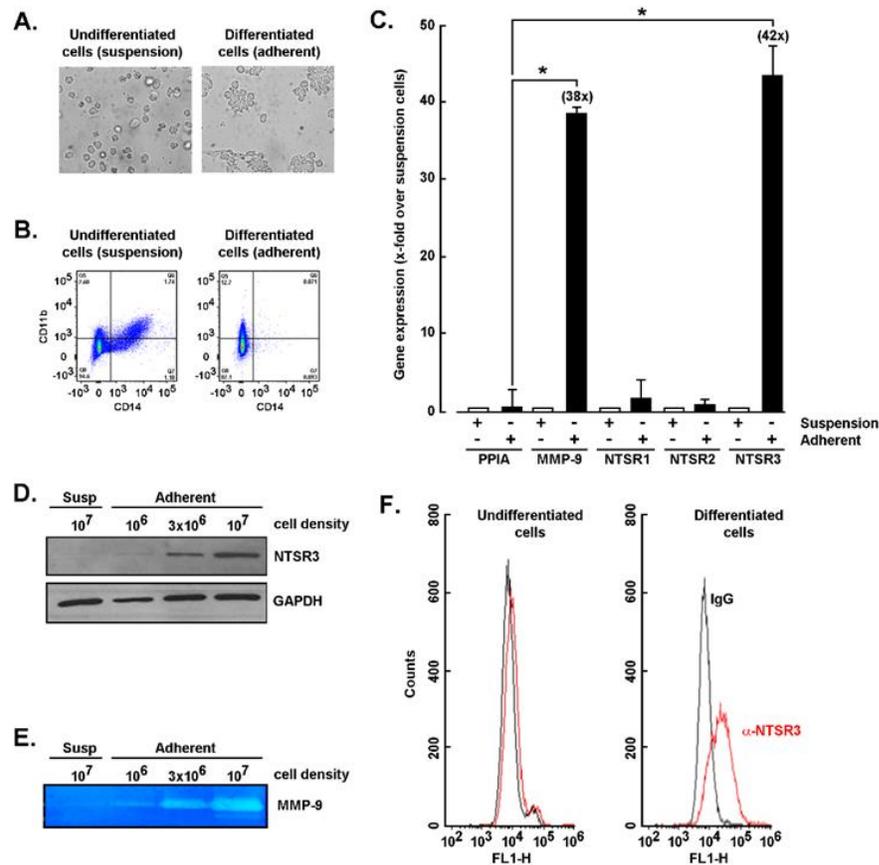


Fig 3.2: Increased NTS3 and MMP-9 expression upon PMA-induced differentiation of promyelomonocytic HL-60 suspension cells into macrophage-like adherent cells. A) Undifferentiated HL-60 cells classically grow in suspension and can be differentiated into adherent macrophage-like cells with 0.3 μ M PMA. B) CD11b and CD14 cell surface immunophenotyping was performed by flow cytometry as described in the Methods section to assess the extent of macrophage differentiation. Serum-starved undifferentiated HL-60 cell cells were cultured and differentiated or not with 0.3 μ M PMA for 24 hours. C) Cells were harvested in order to isolate total RNA and gene expression assessed by qRT-PCR as described in the Methods section. D) Lysates were also analysed for protein content by Western blotting and immunodetection performed as described in the Methods section in order to detect NTSR3 and GAPDH. E) The conditioned media of the above experimental conditions were harvested and the extent of proMMP-9 secretion assessed using gelatin zymography. F) Cell surface immunophenotyping of NTSR3 was performed in undifferentiated HL-60 cells as well as in PMA-mediated differentiated macrophage-like cells as described in the Methods section. Probability values of less than 0.05 were considered significant and an asterisk identifies such significance.

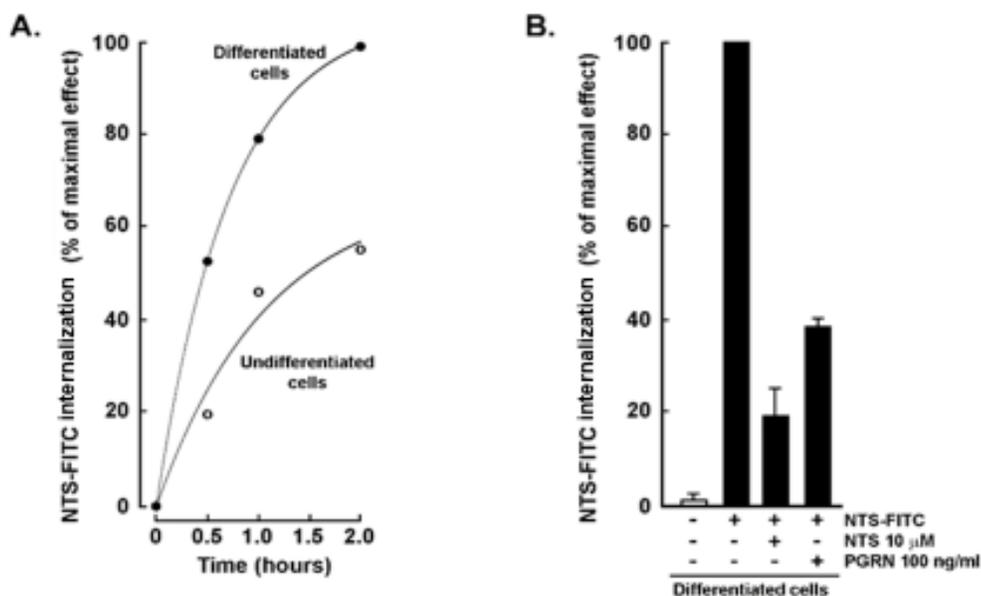


Fig 3.3: Neurotensin internalization is increased in PMA-differentiated HL-60 macrophages and requires NTSR3. A) A representative uptake assay of fluorescent NTS-FITC was performed as described in the Methods section in undifferentiated HL-60 cell suspensions (open circles) and in 0.3 μ M PMA-differentiated macrophage-like cells (closed circles). NTS-FITC internalization for up to 2 hours was measured using flow cytometry. B) NTS-FITC internalization was measured in PMA-differentiated cells in the presence or not of non-fluorescent excess NTS (10 μ M), or progranulin (PGRN, 100 ng/ml). Extent of fluorescence was measured using flow cytometry.

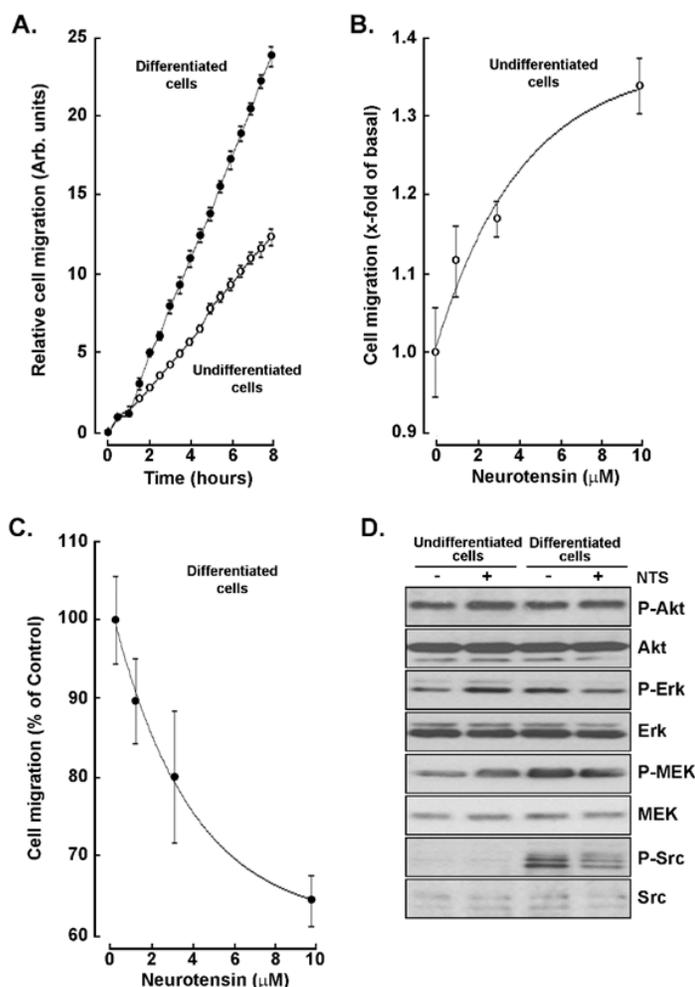


Fig 3.4: Differential chemotactic response to neurotensin between undifferentiated and differentiated macrophage-like HL-60 cells. A) Real-time cell migration was performed using the xCELLigence system as described in the Methods section in undifferentiated HL-60 cell suspensions (open circles) and in 0.3 μM PMA-differentiated macrophage-like cells (closed circles). Chemotactic response to 10 μM NTS was performed and cell migration assessed in B) undifferentiated cells, and in C) 0.3 μM PMA-differentiated macrophage-like cells. D) Cell lysates were harvested upon 18 hours NTS stimulation. Protein lysates were then processed for SDS-PAGE and Western blotting in order to assess the phosphorylation status of Akt, Erk, MEK, and Src as described in the Methods section.

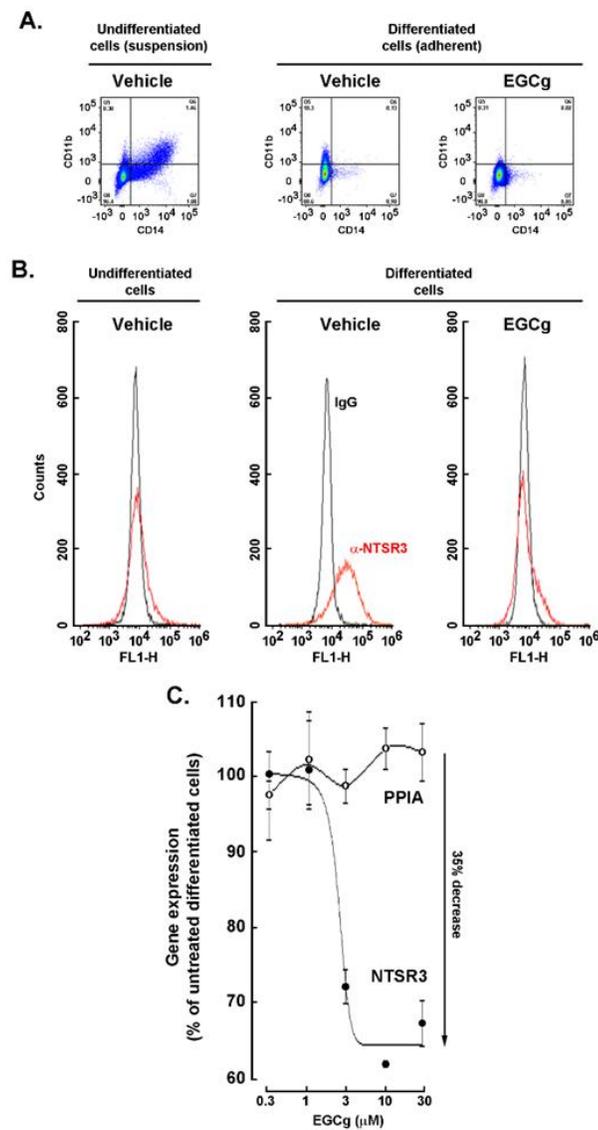


Fig 3.5: EGCG prevents PMA-induced NTSR3 gene expression in differentiated macrophages. A) Undifferentiated HL-60 cell suspensions were differentiated into adherent macrophage-like cells with 0.3 μ M PMA or a combination of PMA and 30 μ M EGCG. Cells were then immunophenotyped for CD11b and CD14 cell surface expression by flow cytometry as described in the Methods section. B) NTSR3 immunophenotyping was similarly performed as above on undifferentiated cells, and differentiated cells in the presence or not of 30 μ M EGCG. C) Total RNA was isolated as described in the Methods differentiated cells in the presence or not of 30 μ M EGCG and RT-qPCR performed in order to assess PPIA and NTSR3 gene expression levels.

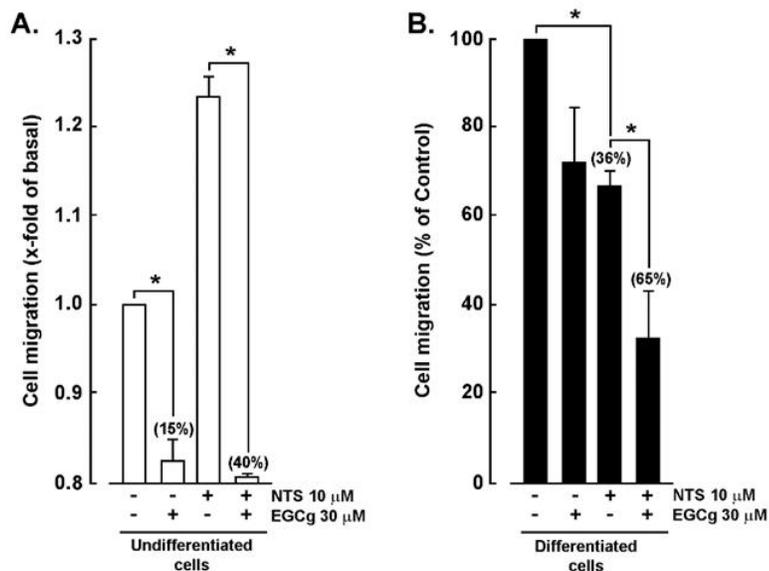


Fig 3.6: EGCG potentiates the reduction in chemotactic response of HL-60 differentiated macrophages. A) Real-time cell migration assay was performed using the xCELLigence system as described in the Methods section. Chemotactic response to 10 μ M NTS in the presence or not of 30 μ M EGCG was performed in A) undifferentiated HL-60 cell suspensions, and in B) 0.3 μ M PMA-differentiated macrophage-like cells. Probability values of less than 0.05 were considered significant and an asterisk identifies such significance. % decreases are shown in between brackets.

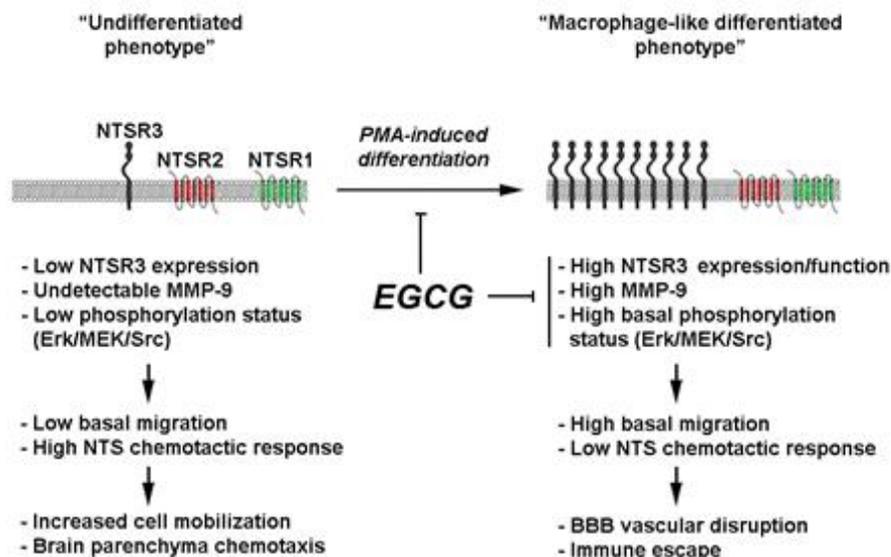


Fig 3.7: Schematic representation of the molecular signature associated to the PMA-induced macrophage-like phenotype, and implications in brain immune evasion strategies. Undifferentiated promyelocytic HL-60 cells express basal levels of NTSR1, NTSR2, and NTSR3. PMA-induced differentiation triggers a macrophage-like phenotype associated with increased NTSR3 expression and function (high NTS internalization), as well as increased MMP-9 and phosphorylation status of Erk/MEK/Src. High basal migration is associated with lower NTS responsive index. Treatment with EGCG inhibits the acquisition of a macrophage-like phenotype, lowers NTSR3 and MMP-9 expression, and potentiates the NTS decrease in cell migration. Altogether, given immune cells can migrate into the brain parenchyma, acquisition of a macrophage-like phenotype may contribute to immune evasion strategies.

CHAPITRE IV

DISCUSSION

Le cancer représente l'une des principales causes de mortalité et apparaît comme l'un des plus grands fléaux de notre siècle. De nombreuses recherches ne font que s'accroître en se diversifiant sur différents volets allant de la compréhension des mécanismes de développement de cette maladie en passant par les processus portant sur l'établissement de médicaments et ultimement de vaccins contre le cancer. Les études portant sur les différents systèmes et cascades de signalisation impliqués dans l'organisation et l'activité des cellules du corps humain s'avèrent non seulement importantes pour la compréhension de leurs mécanismes fonctionnels mais de leur possible lien envers des anomalies comme le cancer. Cette démarche implique donc l'identification d'axes susceptibles d'être impliqués dans les processus clés du développement du cancer.

Le système neurotensinergique a été impliqué dans la progression du cancer en raison de quelques cascades de signalisation oncogéniques induites par la NTS dans certaines tumeurs (Carraway et Plona, 2006). Celle-ci a été associée à la modulation d'un large éventail de fonctions biologiques telles que la réponse immunitaire et les processus inflammatoires (Kalafatakis et Triantafyllou, 2011; Zhao *et al.*, 2001). La NTS se montre aussi cruciale dans la régulation du fonctionnement des macrophages mettant en emphase l'implication de cascades de signalisation inflammatoire (Barchetta *et al.*, 2018). Parmi la grande diversité des effets biologiques de la NTS médiés au travers de

ses récepteurs, des recherches ont pu indiquer que la NTS n'était pas seulement impliquée dans la régulation de la croissance des tissus normaux mais pourrait contribuer grandement à la progression tumorale (Mustain *et al.*, 2011). De nombreuses études ont pu soulever le rôle que jouait la NTS à chaque étape de la progression du cancer. Les mécanismes sous-jacents mettant en lien la NTS et les NTSR ont été identifiés dans plusieurs types de cancer soulignant ainsi une dérégulation de l'axe NTS/NTSR (Carraway et Plona, 2006).

La LAM est une maladie néoplasique agressive se caractérisant par un défaut de différenciation qui provoque un taux élevé de cellules myéloïdes immatures au niveau de la moelle osseuse (Lowenberg *et al.*, 1999). Bien que de nombreuses recherches se sont focalisées sur l'identification de marqueurs génétiques dans le but d'améliorer les traitements déjà offerts, le taux de survie, d'environ 5 ans demeure assez faible chez les personnes plus âgées avec néanmoins une espérance de vie plus satisfaisantes chez les plus jeunes (Schlenk et Dohner, 2013). Les recherches concernant la pathogenèse de la maladie montrent que c'est l'aberration chromosomique au niveau du gène RARA qui va engendrer la fusion des gènes RAR α et PML générant deux gènes chimériques PML-RAR α . La protéine PML-RAR α va agir comme un oncogène en induisant d'une part une prolifération et d'autre part une inhibition de la différenciation terminale des cellules hématopoïétiques. Cela résulte en une expansion de cellules leucémiques blastiques immatures bloquées au stade promyélocytaire. Au cours des décennies, des traitements ont été développés dont le but était de cibler le processus de différenciation avec l'introduction de l'ATRA comme agent de différenciation pour le traitement de l'APL, un sous type de la LAM (Gocek et Marcinkowska, 2011). L'ATRA est capable d'induire une différenciation en granulocytes ainsi que la maturation des cellules myéloïdes. Cet agent est donc capable de cibler le gène PML-RAR α en engendrant un changement conformationnel. Ce qui va contribuer à une dégradation de ce dernier et permettre par la même occasion une activation des processus d'apoptose et une

inhibition de la croissance cellulaire en perturbant le cycle cellulaire. L'efficacité de l'ATRA a été observée dans le traitement de patients atteints d'APL avec une rémission complète chez une grande majorité de ceux-ci (Gocek et Marcinkowska, 2011). D'autres agents comme la vitamine D et certains esters de phorbols sont aussi capables de différencier des cellules d'APL telles que les HL-60 en cellules de types macrophages altérant ainsi le processus de prolifération cellulaire (McCarthy *et al.*, 1983; Ryves *et al.*, 1994). En parallèle, le processus de différenciation peut être impliqué dans la dérégulation de certaines cascades qui vont compromettre certaines activités fonctionnelles importantes conduisant à la résistance et aux rechutes associées aux traitements (Liu *et al.*, 2014). L'étude portant sur la compréhension des processus en lien avec la différenciation de cellules leucémiques se montre donc d'une grande importance.

Dans cette étude, les cellules HL-60 utilisées représentent un excellent modèle pour ce qui concerne notre compréhension de la différenciation grâce à la capacité qu'elles ont à se différencier en plusieurs types cellulaires différents. Notre intérêt au cours de ce travail, s'est focalisé sur la capacité des cellules HL-60 à se différencier en cellules de types « macrophage-like » avec le PMA qui a été validé dans de nombreuses études en essayant de comprendre si l'axe NTS/NTSR avait une implication lors de ce processus de différenciation. Dans un premier temps, nous avons procédé à une estimation de la probabilité de survie par l'intermédiaire de la méthode de Kaplan Meier chez des patients atteints de LAM en utilisant une base de données qui renferme le profil génétique de cellules hématopoïétiques saines et cancéreuses. L'analyse *in silico* a révélé une corrélation entre une surexpression de gène de la Sortiline ainsi que la NTS et une faible probabilité de survie chez les patients atteints de LAM, ce qui suggère que la NTS et son récepteur la Sortiline participe à la progression du LAM (figure 3.1).

En second lieu, nous avons été en mesure d'analyser l'impact qu'avait l'état de différenciation des cellules HL-60 sur le système neurotensinergique et sur un biomarqueur, le MMP-9, impliqué dans l'invasion tumorale et les métastases. Nous avons d'abord pu constater que les cellules HL-60 traitées avec le PMA passaient de l'état de cellules en suspension à celui de cellules adhérentes. Ces cellules incubées en présence de PMA pendant 24 heures, se différencient de manière irréversible en cellules de type macrophage. Nous avons pu réaliser un immunophénotypage en utilisant le CD11b et le CD14 qui sont deux marqueurs de différenciation. Une comparaison de ces deux marqueurs en tenant compte de l'état de différenciation des cellules montrent une acquisition d'un phénotype CD11b⁺ dans les cellules HL-60 différenciées montrant bien le phénotype macrophages de ces cellules (figure 3.2). En effet, des études ont pu rapporter que la différenciation de cellules pouvait s'accompagner d'une forte induction de molécules de surface cellulaire, nécessaires à la fonction des macrophages, telles que CD11b, une protéine membre de la famille d'intégrine β 2, impliquée dans l'adhésion cellulaire (Gocek *et al.*, 2012).

L'étude de l'axe NTS/NTSR lors du processus de différenciation, nous a révélé une forte induction de l'expression génique et protéique de la NTSR3 dans les cellules différenciées ainsi qu'une forte induction de l'expression de la Sortiline extracellulaire à la surface des cellules HL-60 différenciées. Nous avons pu constater que les deux récepteurs de la NTS qui sont membres de la famille des protéines couplées aux protéines G ne semblaient pas être modulés par le processus de différenciation (figure 3.2). Ces résultats viennent renforcer la corrélation obtenue indiquant que plus l'expression de la Sortiline est accrue, plus le pronostic de survie tend à être faible. Nous nous sommes ensuite intéressés à la réponse de la NTS à la suite de la différenciation, nous avons remarqué une forte internalisation du peptide chez les cellules différenciées, ce qui était prévisible (figure 3.3). En effet, l'augmentation de

l'expression de la NTSR3 corrèle avec une augmentation du récepteur et de la disponibilité de ce dernier, ce qui donne l'opportunité au peptide de pouvoir avoir accès au récepteur et être internalisé. C'est donc la NTSR3 qui va contrôler le trafic du peptide. Dans ce contexte, il a été démontré que l'internalisation et le transport de la NTS pourrait stimuler la croissance tumorale au travers de la NTSR3 montrant la possibilité pour que ce récepteur soit impliqué dans la stimulation de la prolifération cellulaire dans des cancers comme celui du colon, du pancréas et de la prostate (Dal Farra *et al.*, 2001).

Nous avons pu effectuer des essais pour suivre la réponse migratoire des cellules en temps réel. Nous avons pu clairement montrer que les cellules différenciées présentaient une migration cellulaire accrue comparativement aux HL-60 non différenciées (figure 3.4). Notre étude montre que les propriétés migratoires lors du processus de différenciation pourraient être en lien avec la MMP-9. Nos données ont pu révéler que dans les cellules différenciées, il y avait une très forte induction de l'expression génique et protéique de MMP-9 (Figure 3.2). La MMP-9 est une métalloprotéinase matricielle dont l'expression augmente de manière significative durant la progression tumorale et qui est associée à l'ouverture de la barrière hémato-encéphalique (Shigemori *et al.*, 2006). Plusieurs études antérieures ont pu démontrer le lien entre la surexpression de MMP-9 et la migration cellulaire qui pouvait être induit à la suite de traitements avec le PMA (Annabi *et al.*, 2008). De plus, il n'est pas exclu que cette MMP contribue à promouvoir le caractère invasif tumoral (Paupert *et al.*, 2008). En outre, l'augmentation du phénotype migratoire dans les cellules différenciées, peut s'expliquer aussi par l'activation des cascades de signalisation Src et MAPK qui résulte de l'augmentation de la phosphorylation de Erk, MEK, et Src (figure 3.2). Des études antérieures ont suggéré l'implication de la phosphorylation de Src dans les réponses inflammatoires médiées par les macrophages ainsi que dans la propagation et la migration des cellules. En effet, dépendamment de certains stimuli,

le Src va jouer un rôle essentiel dans le recrutement d'un certain nombre de molécules de signalisation cellulaire ce qui va contribuer à augmenter son activité lui permettant de moduler de multiples voies qui influencent la migration cellulaire, l'adhésion, la phagocytose, le cycle cellulaire ainsi que la survie cellulaire (Byeon *et al.*, 2012). La phosphorylation de Src peut activer certaines voies de signalisation y compris plusieurs cascades MAPK et NF- κ B. Ces cascades jouent un rôle dans la production de cytokines, de chimiokines et de métalloprotéinases matricielles pro-inflammatoires (Byeon *et al.*, 2012). Il a été aussi démontré dans certaines études que le PMA était capable d'induire l'activation de la cascade NF- κ B qui pouvait induire la transcription de MMP-9 (Shin *et al.*, 2007; Vézina *et al.*, 2012). Cependant, nous avons également observé que la réponse migratoire des cellules HL-60 en présence de NTS exogène était différente selon l'état de différenciation avec une forte induction de la migration dans les cellules en suspension tandis que la NTS exogène a tendance à inhiber la migration dans les cellules adhérentes (figure 3.4). Ces données suggèrent que la NTS serait un modulateur polyvalent de la migration *in vitro* des cellules HL-60. Au vu des données rapportées dans la littérature, les résultats de la présente étude s'alignent bien avec d'autres études qui ont pu illustrer l'implication de la NTS dans la modulation de la migration de cellules d'adénocarcinome pancréatique, suggérant fortement que la NTS pourrait soit réduire la migration soit l'augmenter de manière significative dépendamment de la cascade de signalisation impliquée (Mijatovic *et al.*, 2007). Les voies induites par la NTS semblent être principalement modulées par la Sortiline qui va influencer de façon notable selon que les cellules migrent soit individuellement, soit collectivement, ce qui semble être dépendant de l'état de différenciation des cellules (Lautenschläger *et al.*, 2009; Mijatovic *et al.*, 2007).

À la suite de notre étude, compte tenu de nos résultats qui ont pu montrer clairement l'implication de l'axe NTS/NTSR3 dans le phénotype invasif acquis lors du processus de différenciation des cellules HL-60, nous avons cherché à savoir quel était l'effet de

l'EGCG au cours du processus de différenciation. Dans un premier temps du point de vue de la morphologie des cellules, nous avons noté que l'action du PMA en présence de l'EGCG n'affectait pas l'adhérence des cellules mais cependant affectait le phénotype CD11b⁺ acquis en le réduisant. En comparant les cellules différenciées avec le PMA, nous observerons une réduction du pourcentage de marqueurs de surface cellulaire CD11b dans le groupe traité avec l'EGCG par rapport au groupe non traité (figure 3.5). Nous avons ensuite évalué l'effet de l'EGCG sur l'expression protéique et génique de la Sortiline (Figure 3.5). Nous avons pu observer le potentiel de l'EGCG à réduire l'expression génique de la NTSR3 ainsi qu'à diminuer son expression à la surface des cellules différenciées montrant que cette catéchine peut avoir un pouvoir inhibiteur sur le récepteur. Ce pouvoir inhibiteur se perçoit aussi au niveau de l'internalisation de la NTS. Nous avons montré que la présence de l'EGCG venait perturber l'internalisation de la NTS corrélant avec la diminution de la NTSR3. Nous mettons donc en lumière le fait que l'EGCG peut cibler l'axe NTS/NTSR3 en réduisant l'expression du récepteur et en inhibant le trafic cellulaire de la NTS, ce qui potentiellement contribuerait à renverser le phénotype invasif induit par cet axe. En outre, les résultats obtenus ont révélé que l'EGCG était aussi capable de réduire l'expression de MMP-9. Des études ont démontré que l'EGCG était capable d'inhiber l'activation induite par le PMA de la protéine kinase extra-cellulaire régulée (Erk) et de la kinase N-terminale c-jun (JNK) (Kim *et al.*, 2004). Ces données suggèrent que l'EGCG pourrait exercer au moins une partie de son effet anti-invasif dans certains cancers en contrôlant l'expression des MMPs comme le MMP-9 par la suppression de l'activation de MAPK (Annabi *et al.*, 2007; Vézina *et al.*, 2012). En outre, nos résultats laissent percevoir que l'EGCG serait responsable de diminuer la réponse migratoire tant au niveau des cellules différenciées que des cellules non différenciées. De cela, on peut ainsi comprendre que l'axe NTS/NTSR3 ainsi que la MMP-9 sont impliqués dans la migration et l'invasion de la tumeur, et que l'EGCG a la capacité d'inhiber leur activité. Des travaux antérieurs ont pu démontrer que la plupart des effets anticancéreux de l'EGCG bloque la cancérogenèse en affectant un large éventail de voies, notamment

en jouant un rôle via plusieurs voies de transduction, notamment JAK / STAT, MAPK, PI3K / AKT (Singh *et al.*, 2011). L'EGCG peut aussi inhiber la cascade de signalisation de NF- κ B pour réduire les processus inflammatoires (Jiang *et al.*, 2012; Vézina *et al.*, 2012). De nos résultats qui précèdent, nous notons que le mécanisme d'effet anticancéreux et anti-inflammatoire lié au traitement avec l'EGCG est considérablement multiple. Nous avons pu clairement démontrer aussi que le traitement par l'EGCG entraînait une baisse significative de l'expression de CD11b. Nos résultats confirment des travaux antérieurs qui ont eu à rapporter une augmentation de l'expression de CD11b à la suite d'une activation cellulaire et de plus ils ont mis en lumière le fait que l'EGCG, le polyphénol du thé vert pouvait provoquer une diminution de l'expression de CD11b sur les monocytes dans certaines cellules tumorales engendrant par la suite une diminution des propriétés adhésives et migratoires dans certains lymphocytes T au niveau des sites d'inflammation prouvant son pouvoir anti-inflammatoire (Kawai *et al.*, 2004; Kawai *et al.*, 2011).

CONCLUSION

En conclusion, nos travaux nous ont permis de montrer l'implication de l'axe NTS/NTSR3 dans le caractère invasif lors du processus de différenciation des cellules HL-60. Cette étude constitue un premier pas vers la compréhension de l'action de la Sortiline et la NTS dans l'acquisition d'un phénotype invasif qui correspond à un pronostic insatisfaisant chez les patients atteints de LAM. L'étude réalisée sur nos modèles de cellules HL-60 démontre clairement que les polyphénols du thé vert et ici l'EGCG peuvent inhiber certains caractères en lien avec l'invasion tumorale. Cette inhibition présente de multiples facettes et est attribuée à de nombreuses propriétés telles que les propriétés anticancéreuses, anti-inflammatoires et antiprolifératives.

L'EGCG, à travers ses différentes propriétés, joue un rôle fort important étant donné son implication dans l'inhibition au niveau de l'invasion tumorale, appuyant ainsi son potentiel au niveau de la chimioprévention. Les travaux présentés au cours de notre étude ont permis d'identifier un axe impliqué dans l'invasion tumorale et de comprendre les mécanismes épigénétiques mis en cause dans le développement du caractère invasif. L'étude a permis d'identifier l'EGCG qui apparaît indéniablement comme un agent chimiopréventif. De ce fait, une compréhension approfondie des mécanismes par lesquels l'EGCG renverse le phénotype invasif ainsi que les événements moléculaires impliqués sont d'une importance capitale pour promouvoir la prévention du cancer par l'utilisation de composés phytochimiques qui pour la grande majorité proviennent et sont naturellement présents dans notre alimentation. Cette stratégie préventive représente non seulement un défi du point de vue de son développement mais sans aucun doute un grand pas pour permettre de réduire l'incidence du cancer et potentiellement accentuer une meilleure rentabilité en raison

de l'importance des fonds alloués aux traitements du cancer qui sont pour la plupart chers et peu efficaces.

PERSPECTIVES

En somme, notre travail nous a permis de faire ressortir que la Sortiline et la NTS contribuaient à promouvoir l'invasion tumorale. Nous avons été en mesure aussi d'identifier un polyphénol du thé vert, l'EGCG, qui est capable de renverser certains caractères invasifs induit par l'axe NTS/NTSR3, acquis lors de la différenciation des cellules HL-60. Notre découverte ouvre une voie pour donner l'occasion d'explorer d'autres catéchines du thé vert et leurs effets sur le processus de différenciation. À ce stade, nos données suggèrent que les catéchines dérivées de l'alimentation pourraient exercer des propriétés chimio-préventives qui pourraient contourner la signalisation induite par l'axe NTS/NSTR3 qui régule les phénotypes invasifs dans les cellules leucémiques promyélocytaires différenciées. Parmi les catéchines testées, autre que l'EGCG, celles portant le groupement gallate qui sont CG, ECG et GCG sont impliquées dans l'inhibition de la migration cellulaire induite lors de la différenciation cellulaire ainsi que dans la réduction de la sécrétion de la métalloprotéinase matricielle MMP-9 (voir Annexe (figure 4.1 et 4.2)) lors du processus de différenciation des HL-60. Ces données appuient le fait que le potentiel anti-cancéreux des polyphénols du thé qui a été décrit dans de nombreuses études. De ce qui a été déjà obtenu, il serait donc convenable d'essayer de comprendre les cascades de signalisation en rapport avec le renversement du phénotype invasif médié par les catéchines portant un groupement gallate. Les pistes à ce jour seraient de cibler premièrement les voies MAPK et Src qui comme démontré dans nos résultats précédents sont responsable de l'augmentation de la migration cellulaire. À cela, il serait intéressant de procéder à la caractérisation des macrophages de type M1 et M2 dans nos cellules « macrophage-like » qui découlent de la différenciation des HL-60. De ce fait, en étant en mesure de révéler la signalisation et des signatures génétiques et fonctionnelles acquises au cours de la différenciation des HL-60, il sera possible de savoir à quel modèle actuel de

polarisation des macrophages M1 ou M2 nos cellules correspondent. En fait, Les macrophages peuvent présenter des phénotypes polarisés de type M1 ou M2, en fonction de leur statut de différenciation et de leur rôle fonctionnel dans le système immunitaire (Martinez et Gordon, 2014). Des preuves montrent que ce spectre diversifié de sous-types de macrophages joue un rôle essentiel dans diverses fonctions homéostatiques et immunitaires, en plus de leurs rôles dans des conditions physiologiques normales (Aras et Zaidi, 2017). Les macrophages jouent également un rôle crucial dans des maladies telles que le cancer car ceux-ci s'avèrent être des acteurs clés dans la tumorigenèse en régulant différentes étapes impliquées dans l'invasion et représente donc une cible pour des stratégies thérapeutiques prometteuses en lien avec le cancer (Aras et Zaidi, 2017). Par ailleurs, nous aimerions aussi procéder à des tests fonctionnels de nos « macrophages-like » en nous focalisant sur les fonctions des macrophages du point de vue de phagocytose et en évaluant les effets des catéchines sur le processus phagocytaire.

ANNEXES

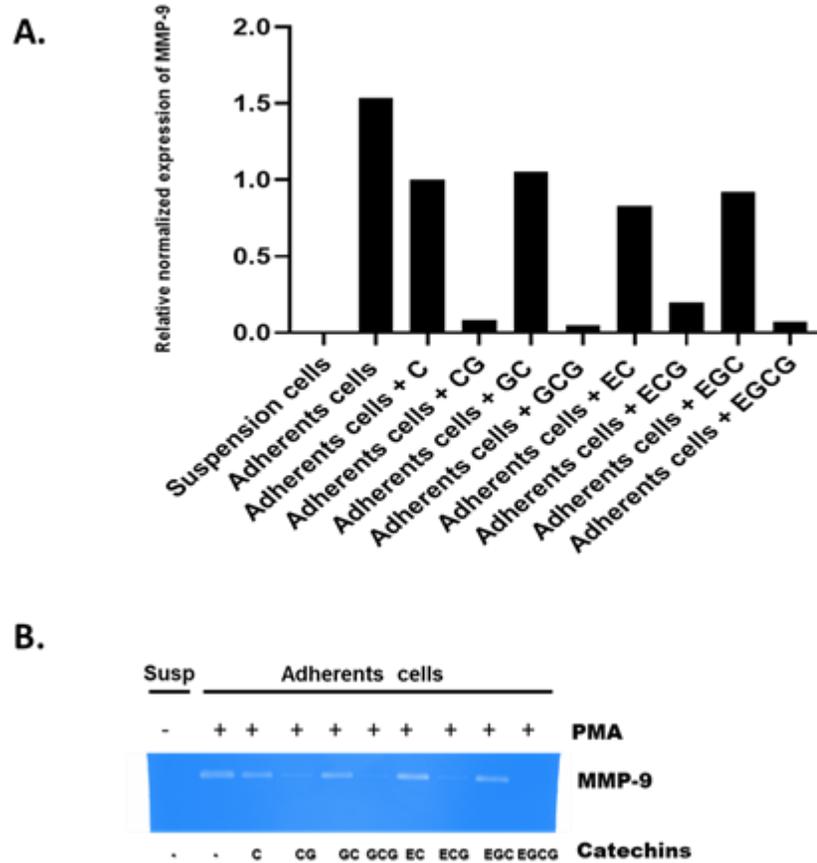


Figure A.1 The galloyl moiety of green tea catechins trigger the inhibition of MMP-9 activity. A) Undifferentiated HL-60 cell suspensions were differentiated into adherent macrophage-like cells with 0,6 μ M PMA or a combination of PMA and 30 μ M of each catechins (C, CG, GC, GCG, EC, ECG, EGC, EGCG). Total RNA was isolated as described in the Methods differentiated cells and RT-qPCR performed in order to assess PPIA and MMP-9 gene expression levels. B) The conditioned media of the above experimental conditions were harvested and the extent of proMMP-9 secretion assessed using gelatin zymography.

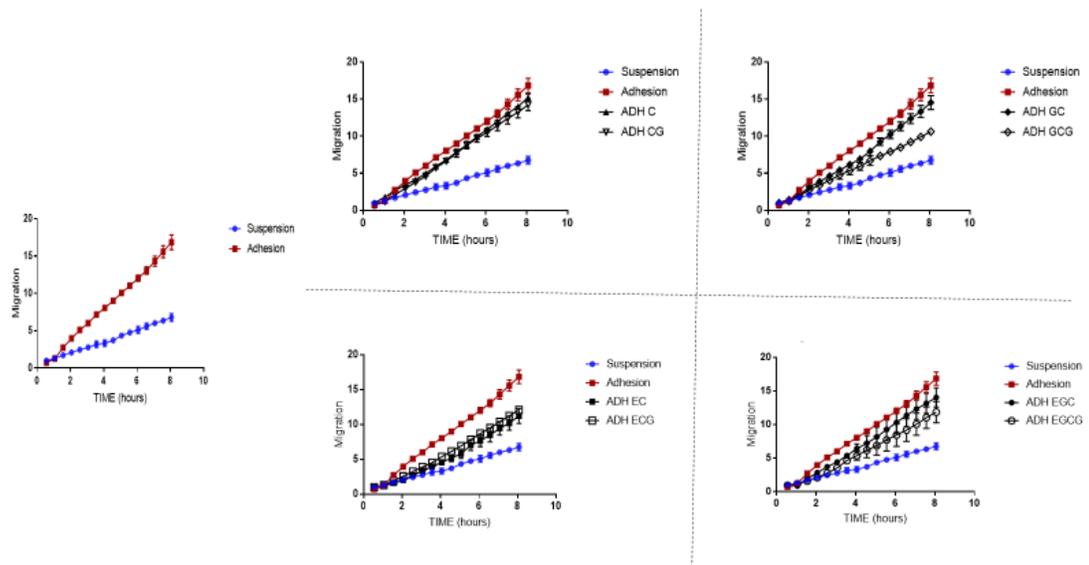


Figure A.2 Tea polyphenols inhibit migration of differentiated HL-60 cells. Real-time cell migration was performed using the xCELLigence system as described in the Methods section in undifferentiated HL-60 cells and in 0,6 μM PMA-differentiated macrophage-like cells in the presence of 30 μM of different catechins.

BIBLIOGRAPHIE

- Abbaci A, Talbot H, Saada S, Gachard N, Abraham J, Jaccard A, Bordessoule D, Fauchais A-L, Naves T et Jauberteau M (2018) Neurotensin receptor type 2 protects B-cell chronic lymphocytic leukemia cells from apoptosis. *Oncogene* 37: 756.
- Abe K, Suzuki T, Ijiri M, Koyama Y, Isemura M et Kinae N (2007) The anti-fibrotic effect of green tea with a high catechin content in the galactosamine-injured rat liver. *Biomedical Research* 28: 43-48.
- Adams J et Nassiri M (2015) Acute promyelocytic leukemia: a review and discussion of variant translocations. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine* 139: 1308-1313.
- Al-Saffar A (1984) Analysis of the control of intestinal motility in fasted rats, with special reference to neurotensin. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 19: 422-428.
- Alatrash G, Jakher H, Stafford PD et Mittendorf EA (2013) Cancer immunotherapies, their safety and toxicity. *Expert Opinion on Drug Safety* 12: 631-645.
- Alessi DR, Saito Y, Campbell DG, Cohen P, Sithanandam G, Rapp U, Ashworth A, Marshall CJ et Cowley S (1994) Identification of the sites in MAP kinase kinase-1 phosphorylated by p74raf-1. *European molecular biology organization journal* 13: 1610-1619.
- Alvarez Gomez L (1977) [Antigens from *Giardia lamblia* trophozoites and cysts. Detection and immunoallergic evaluation]. *Revista Cubana de Medicina Tropical* 29: 61-65.
- Andrews N, Rinno-Barmada S, Burdett K et Elder J (1983) Effects of porcine gastric fundic factor, somatostatin, substance P, glucagon, neurotensin, bombesin, VIP, motilin, and pentagastrin on jejunal glucose absorption in the rat. *Gut* 24: 326-332.

- Annabi B, Currie J-C, Moghrabi A et Béliveau R (2007) Inhibition of HuR and MMP-9 expression in macrophage-differentiated HL-60 myeloid leukemia cells by green tea polyphenol EGCG. *Leukemia Research* 31: 1277-1284.
- Annabi B, Rojas-Sutterlin S, Laroche M, Lachambre MP, Moundjian R et Béliveau R (2008) The diet-derived sulforaphane inhibits matrix metalloproteinase-9-activated human brain microvascular endothelial cell migration and tubulogenesis. *Molecular Nutrition & Food Research* 52: 692-700.
- Aras S et Zaidi MR (2017) TAMEless traitors: macrophages in cancer progression and metastasis. *British Journal of Cancer* 117: 1583.
- Asselin ML, Dubuc I, Coquerel A et Costentin J (2001) Localization of neurotensin NTS2 receptors in rat brain, using. *Neuroreport* 12: 1087-1091.
- Austin C (2009) Does oxidative damage contribute to the generation of leukemia? *Leukemia Research* 33: 1297.
- Azriel Y et Burcher E (2001) Characterization and autoradiographic localization of neurotensin binding sites in human sigmoid colon. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 297: 1074-1081.
- Barbero P, Rovere C, De Bie I, Seidah N, Beaudet A et Kitabgi P (1998) PC5-A-mediated processing of pro-neurotensin in early compartments of the regulated secretory pathway of PC5-transfected PC12 cells. *Journal of Biological Chemistry* 273: 25339-25346.
- Barchetta I, Cimini F, Capoccia D, Bertocchini L, Ceccarelli V, Chiappetta C, Leonetti F, Di Cristofano C, Silecchia G et Orho-Melander M (2018) Neurotensin is a lipid-induced gastrointestinal peptide associated with visceral adipose tissue inflammation in obesity. *Nutrients* 10: 526.
- Bean AJ, Dagerlind A, Hokfelt T et Dobner PR (1992) Cloning of human neurotensin/neuromedin N genomic sequences and expression in the ventral mesencephalon of schizophrenics and age/sex matched controls. *Neuroscience* 50: 259-268.
- Bean AJ et Roth RH (1992) Dopamine-neurotensin interactions in mesocortical neurons. Evidence from microdialysis studies. *Annals of the New York Academy of Sciences* 668: 43-53.

- Beck B, Bulet A, Nicolas J-P et Bulet C (1990) Hyperphagia in obesity is associated with a central peptidergic dysregulation in rats. *The Journal of nutrition* 120: 806-811.
- Beck B, Bulet A, Nicolas J-P et Bulet C (1996) Opposite influence of carbohydrates and fat on hypothalamic neurotensin in Long-Evans rats. *Life Sciences* 59: 349-356.
- Beck B, Stricker-Krongrad A, Richey S et Bulet C (1998) Evidence that hypothalamic neurotensin signals leptin effects on feeding behavior in normal and fat-preferring rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 252: 634-638.
- Béliveau R et Gingras D (2009) *La santé par le plaisir de bien manger: la médecine préventive au quotidien*. Trécarré, Montréal, Canada.
- Béliveau R et Gingras D (2014) *Prévenir le Cancer: Comment Réduire les Risques*. Editions du Trécarré, Québecor Média Montréal, Canada.
- Ben-Dor A, Steiner M, Gheber L, Danilenko M, Dubi N, Linnewiel K, Zick A, Sharoni Y et Levy J (2005) Carotenoids activate the antioxidant response element transcription system. *Molecular Cancer Therapeutics* 4: 177-186.
- Betancur C, Azzi M et Rostene W (1997) Nonpeptide antagonists of neuropeptide receptors: tools for research and therapy. *Trends in Pharmacological Sciences* 18: 372-386.
- Binder EB, Kinkead B, Owens MJ et Nemeroff CB (2001) Neurotensin and dopamine interactions. *Pharmacological Reviews* 53: 453-486.
- Blackadar CB (2016) Historical review of the causes of cancer. *World Journal of Clinical Oncology* 7: 54.
- Blackburn AM, Fletcher DR, Adrian TE et Bloom SR (1980) Neurotensin infusion in man: pharmacokinetics and effect on gastrointestinal and pituitary hormones. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 51: 1257-1261.
- Bloomfield CD, Lindquist LL, Arthur D, McKenna RW, LeBien TW, Peterson BA et Nesbit ME (1981) Chromosomal abnormalities in acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Research* 41: 4838-4843.
- Botto JM, Chabry J, Sarret P, Vincent JP et Mazella J (1998) Stable expression of the mouse levocabastine-sensitive neurotensin receptor in HEK 293 cell line:

binding properties, photoaffinity labeling, and internalization mechanism. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 243: 585-590.

- Bozou JC, Amar S, Vincent JP et Kitabgi P (1986) Neurotensin-mediated inhibition of cyclic AMP formation in neuroblastoma N1E115 cells: involvement of the inhibitory GTP-binding component of adenylate cyclase. *Molecular Pharmacology* 29: 489-496.
- Breitman TR, Selonick SE et Collins SJ (1980) Induction of differentiation of the human promyelocytic leukemia cell line (HL-60) by retinoic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 77: 2936-2940.
- Brock A, Huang S et Ingber DE (2003) Identification of a distinct class of cytoskeleton-associated mRNAs using microarray technology. *BMC Molecular and Cell Biology* 4: 6.
- Brown MS et Goldstein JL (1986) A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* 232: 34-47.
- Brun P, Mastrotto C, Beggiao E, Stefani A, Barzon L, Sturniolo GC, Palù G et Castagliuolo I (2005) Neuropeptide neurotensin stimulates intestinal wound healing following chronic intestinal inflammation. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 288: G621-G629.
- Buhler AV, Choi J, Proudfit HK et Gebhart GF (2005) Neurotensin activation of the NTR1 on spinally-projecting serotonergic neurons in the rostral ventromedial medulla is antinociceptive. *Pain* 114: 285-294.
- Burgevin MC, Castel MN, Quarteronet D, Chevet T et Laduron PM (1992) Neurotensin increases tyrosine hydroxylase messenger RNA-positive neurons in substantia nigra after retrograde axonal transport. *Neuroscience* 49: 627-633.
- Byeon SE, Yi Y-S, Oh J, Yoo BC, Hong S et Cho JY (2012) The role of Src kinase in macrophage-mediated inflammatory responses. *Mediators of Inflammation* 2012: 18.
- Campos-Sanchez E, Toboso-Navasa A, Romero-Camarero I, Barajas-Diego M, Sanchez-Garcia I et Cobaleda C (2011) Acute lymphoblastic leukemia and developmental biology: a crucial interrelationship. *Cell Cycle* 10: 3473-3486.

- Carella F, Feist SW, Bignell JP et De Vico G (2015) Comparative pathology in bivalves: Aetiological agents and disease processes. *Journal of Invertebrate Pathology* 131: 107-120.
- Carraway R et Leeman SE (1973) The isolation of a new hypotensive peptide, neurotensin, from bovine hypothalami. *Journal of Biological Chemistry* 248: 6854-6861.
- Carraway R, Ruane SE et Kim HR (1982) Distribution and immunochemical character of neurotensin-like material in representative vertebrates and invertebrates: apparent conservation of the COOH-terminal region during evolution. *Peptides* 3: 115-123.
- Carraway RE et Plona AM (2006) Involvement of neurotensin in cancer growth: evidence, mechanisms and development of diagnostic tools. *Peptides* 27: 2445-2460.
- Chacko SM, Thambi PT, Kuttan R et Nishigaki I (2010) Beneficial effects of green tea: a literature review. *Chinese Medicine* 5: 13.
- Chalon P, Vita N, Kaghad M, Guillemot M, Bonnin J, Delpech B, Le Fur G, Ferrara P et Caput D (1996) Molecular cloning of a levocabastine-sensitive neurotensin binding site. *FEBS Letters* 386: 91-94.
- Chang C et Werb Z (2001) The many faces of metalloproteases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis. *Trends in Cell Biology* 11: S37-43.
- Chang MS, Chen BC, Yu MT, Sheu JR, Chen TF et Lin CH (2005) Phorbol 12-myristate 13-acetate upregulates cyclooxygenase-2 expression in human pulmonary epithelial cells via Ras, Raf-1, ERK, and NF-kappaB, but not p38 MAPK, pathways. *Cellular Signalling* 17: 299-310.
- Chatterjee D, Han Z, Mendoza J, Goodglick L, Hendrickson EA, Pantazis P et Wyche JH (1997) Monocytic differentiation of HL-60 promyelocytic leukemia cells correlates with the induction of Bcl-xL. *Cell Growth and Differentiation* 8: 1083-1089.
- Chen YF, Feng Z-T, Wen S-H et Lu G-J (1987) Effect of vasoactive intestinal peptide, somatostatin, neurotensin, cholecystokinin octapeptide, and secretin on intestinal absorption of amino acid in rat. *Digestive Diseases and Sciences* 32: 1125-1129.

- Chiorazzi N, Rai KR et Ferrarini M (2005) Chronic lymphocytic leukemia. *New England Journal of Medicine* 352: 804-815.
- Collins SJ (1987) The HL-60 promyelocytic leukemia cell line: proliferation, differentiation, and cellular oncogene expression. *Blood* 70: 1233-1244.
- Collins SJ, Gallo RC et Gallagher RE (1977) Continuous growth and differentiation of human myeloid leukaemic cells in suspension culture. *Nature* 270: 347-349.
- Colmone A, Amorim M, Pontier AL, Wang S, Jablonski E et Sipkins DA (2008) Leukemic cells create bone marrow niches that disrupt the behavior of normal hematopoietic progenitor cells. *Science* 322: 1861-1865.
- Comen EA, Bowman RL et Kleppe M (2018) Underlying causes and therapeutic targeting of the inflammatory tumor microenvironment. *Frontiers in cell and developmental biology* 6: 56.
- Cooke JH, Patterson M, Patel SR, Smith KL, Ghatei MA, Bloom SR et Murphy KG (2009) Peripheral and central administration of xenin and neurotensin suppress food intake in rodents. *Obesity (Silver Spring)* 17: 1135-1143.
- Coppola T, Beraud-Dufour S, Antoine A, Vincent JP et Mazella J (2008) Neurotensin protects pancreatic beta cells from apoptosis. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 40: 2296-2302.
- Corley KC, Phan TH, Daugherty WP et Boadle-Biber MC (2002) Stress-induced activation of median raphe serotonergic neurons in rats is potentiated by the neurotensin antagonist, SR 48692. *Neurological Science* 319: 1-4.
- Coussens LM et Werb Z (2002) Inflammation and cancer. *Nature* 420: 860-867.
- Dal Farra C, Sarret P, Navarro V, Botto JM, Mazella J et Vincent JP (2001) Involvement of the neurotensin receptor subtype NTR3 in the growth effect of neurotensin on cancer cell lines. *International Journal of Cancer* 92: 503-509.
- Davis AS, Viera AJ et Mead MD (2014) Leukemia: An overview for primary care. *American Family Physician* 89: 731-738.
- De Thé H et Chen Z (2010) Acute promyelocytic leukaemia: novel insights into the mechanisms of cure. *Nature Reviews Cancer* 10: 775.
- Demeule M, Michaud-Levesque J, Annabi B, Gingras D, Boivin D, Jodoin J, Lamy S, Bertrand Y et Beliveau R (2002) Green tea catechins as novel antitumor and

antiangiogenic compounds. *Current Medicinal Chemistry-Anticancer Agents* 2: 441-463.

Deryugina EI et Quigley JP (2015) Tumor angiogenesis: MMP-mediated induction of intravasation-and metastasis-sustaining neovasculature. *Matrix Biology* 44: 94-112.

Devader C, Moreno S, Roulot M, Deval E, Dix T, Morales CR et Mazella J (2016) Increased Brain Neurotensin and NTSR2 Lead to Weak Nociception in NTSR3/Sortilin Knockout Mice. *Frontiers in Neuroscience* 10: 542.

Devi PU (2004) Basics of carcinogenesis. *Health Administrator* 17: 16-24.

Dicou E, Vincent JP et Mazella J (2004) Neurotensin receptor-3/sortilin mediates neurotensin-induced cytokine/chemokine expression in a murine microglial cell line. *Journal of Neuroscience Research* 78: 92-99.

Dolgachev V et Lukacs N (2010) Chapter 2-Acute and Chronic Inflammation Induces Disease Pathogenesis. Dans *Essential Concepts in Molecular Pathology*. Academic Press. San Diego, United States.

Du GJ, Zhang Z, Wen XD, Yu C, Calway T, Yuan CS et Wang CZ (2012) Epigallocatechin Gallate (EGCG) is the most effective cancer chemopreventive polyphenol in green tea. *Nutrients* 4: 1679-1691.

Dupouy S, Mourra N, Doan VK, Gompel A, Alifano M et Forgez P (2011) The potential use of the neurotensin high affinity receptor 1 as a biomarker for cancer progression and as a component of personalized medicine in selective cancers. *Biochimie* 93: 1369-1378.

Durante M et Loeffler JS (2010) Charged particles in radiation oncology. *Nature Reviews Clinical Oncology* 7: 37-43.

Elek J, Pinzon W, Park K et Narayanan R (2000) Relevant genomics of neurotensin receptor in cancer. *Anticancer Research* 20: 53-58.

Faderl S, Kantarjian HM et Talpaz M (1999) Chronic myelogenous leukemia: update on biology and treatment. *Oncology (Williston Park, NY)* 13: 169-184.

Falzone L, Salomone S et Libra M (2018) Evolution of Cancer Pharmacological Treatments at the Turn of the Third Millennium. *Frontiers in Pharmacology* 9: 1300.

- Fassina G, Buffa A, Benelli R, Varnier OE, Noonan DM et Albin A (2002) Polyphenolic antioxidant (–)-epigallocatechin-3-gallate from green tea as a candidate anti-HIV agent. *AIDS* 16: 939-941.
- Ferraro L, Tomasini MC, Mazza R, Fuxe K, Fournier J, Tanganelli S et Antonelli T (2008) Neurotensin receptors as modulators of glutamatergic transmission. *Brain Research Reviews* 58: 365-373.
- Fey MF (2007) Normal and malignant hematopoiesis. *Annals of Oncology* 18 Suppl 1: i9-i13.
- Fleck RA, Romero-Steiner S et Nahm MH (2005) Use of HL-60 cell line to measure opsonic capacity of pneumococcal antibodies. *Clinical and Vaccine Immunology* 12: 19-27.
- Foreman KJ, Marquez N, Dolgert A, Fukutaki K, Fullman N, McGaughey M, Pletcher MA, Smith AE, Tang K et Yuan C-W (2018) Forecasting life expectancy, years of life lost, and all-cause and cause-specific mortality for 250 causes of death: reference and alternative scenarios for 2016–40 for 195 countries and territories. *The Lancet* 392: 2052-2090.
- Franz CM, Jones GE et Ridley AJ (2002) Cell migration in development and disease. *Developmental Cell* 2: 153-158.
- Furman RR, Asgary Z, Mascarenhas JO, Liou H-C et Schattner EJ (2000) Modulation of NF- κ B activity and apoptosis in chronic lymphocytic leukemia B cells. *The Journal of Immunology* 164: 2200-2206.
- Furtado VF, Santos GR, de Carvalho DS, Staziaki PV, Pasquini R et Funke VAM (2015) Accelerated phase chronic myeloid leukemia: evaluation of clinical criteria as predictors of survival, major cytogenetic response and progression to blast phase. *Revista brasileira de hematologia e hemoterapia* 37: 341-347.
- Fuxe K, Agnati LF, von Euler G, Tanganelli S, O'Connor WT, Ferre S, Hedlund P et Zoli M (1992) Neuropeptides, excitatory amino acid and adenosine A2 receptors regulate D2 receptors via intramembrane receptor-receptor interactions. Relevance for Parkinson's disease and schizophrenia. *Neurochemistry International* 20 Suppl: 215S-224S.
- Gabay C et Kushner I (1999) Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *New England Journal of Medicine* 340: 448-454.

- Gan R-Y, Li H-B, Sui Z-Q et Corke H (2018) Absorption, metabolism, anti-cancer effect and molecular targets of epigallocatechin gallate (EGCG): An updated review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 58: 924-941.
- Gandou C, Ohtani A, Senzaki K et Shiga T (2010) Neurotensin promotes the dendrite elongation and the dendritic spine maturation of the cerebral cortex in vitro. *Neuroscience Research* 66: 246-255.
- Garcia-Munoz R, Galiacho VR et Llorente L (2012) Immunological aspects in chronic lymphocytic leukemia (CLL) development. *Annals of Hematology* 91: 981-996.
- Gendron L, Perron A, Payet MD, Gallo-Payet N, Sarret P et Beaudet A (2004) Low-affinity neurotensin receptor (NTS2) signaling: internalization-dependent activation of extracellular signal-regulated kinases 1/2. *Molecular Pharmacology* 66: 1421-1430.
- Gerber DE (2008) Targeted therapies: a new generation of cancer treatments. *American Family Physician* 77: 311-319.
- Gialeli C, Theocharis AD et Karamanos NK (2011) Roles of matrix metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting. *FEBS Journal* 278: 16-27.
- Gilmore TD (2006) Introduction to NF- κ B: players, pathways, perspectives. *Oncogene* 25: 6680.
- Gocek E, Bauraska H, Marchwicka A et Marcinkowska E (2012) Regulation of leukemic cell differentiation through the vitamin D receptor at the levels of intracellular signal transduction, gene transcription, and protein trafficking and stability. *Leukemia research and treatment* 2012: 713243.
- Gocek E et Marcinkowska E (2011) Differentiation therapy of acute myeloid leukemia. *Cancers* 3: 2402-2420.
- Goel G, Makkar HP, Francis G et Becker K (2007) Phorbol esters: structure, biological activity, and toxicity in animals. *International Journal of Toxicology* 26: 279-288.
- Grignani F, Fagioli M, Alcalay M, Longo L, Pandolfi PP, Donti E, Biondi A, Coco FL et Pelicci P (1994) Acute promyelocytic leukemia: from genetics to treatment. *Blood* 83: 10-25.

- Grove C et Marchant P (2016) *Understanding Surgery: A Guide for People with Cancer, Their Families and Friends*. Cancer Council Australia, Sydney, Australia.
- Gui X, Dobner PR et Carraway RE (2001) Endogenous neurotensin facilitates enterohepatic bile acid circulation by enhancing intestinal uptake in rats. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 281: G1413-G1422.
- Gupta S, Hastak K, Afaq F, Ahmad N et Mukhtar H (2004) Essential role of caspases in epigallocatechin-3-gallate-mediated inhibition of nuclear factor kappaB and induction of apoptosis. *Oncogene* 23: 2507.
- Han ZT, Zhu XX, Yang RY, Sun JZ, Tian GF, Liu XJ, Cao GS, Newmark HL, Conney AH et Chang RL (1998) Effect of intravenous infusions of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) in patients with myelocytic leukemia: preliminary studies on therapeutic efficacy and toxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 5357-5361.
- Hanahan D et Weinberg RA (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144: 646-674.
- Haworth O et Buckley CD (2007) Resolving the problem of persistence in the switch from acute to chronic inflammation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104: 20647-20648.
- Heakal Y, Woll MP, Fox T, Seaton K, Levenson R et Kester M (2011) Neurotensin receptor-1 inducible palmitoylation is required for efficient receptor-mediated mitogenic-signaling within structured membrane microdomains. *Cancer Biology & Therapy* 12: 427-435.
- Helfenberger KE, Villalba NM, Buchholz B, Boveris A, Poderoso JJ, Gelpi RJ et Poderoso C (2018) Subcellular distribution of ERK phosphorylation in tyrosine and threonine depends on redox status in murine lung cells. *PloS One* 13: e0193022.
- Hermans-Borgmeyer I, Hermey G, Nykjaer A et Schaller C (1999) Expression of the 100-kDa neurotensin receptor sortilin during mouse embryonal development. *Molecular Brain Research* 65: 216-219.
- Hermey G (2009) The Vps10p-domain receptor family. *Cellular and Molecular Life Sciences* 66: 2677-2689.

- Hermey G, Riedel IB, Hampe W, Schaller HC et Hermans-Borgmeyer I (1999) Identification and characterization of SorCS, a third member of a novel receptor family. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 266: 347-351.
- Horwitz R et Webb D (2003) Cell migration. *Current Biology* 13: R756-759.
- Inaba H, Greaves M et Mullighan CG (2013) Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* 381: 1943-1955.
- Jiang J, Mo Z-C, Yin K, Zhao G-J, Lv Y-C, Ouyang X-P, Jiang Z-S, Fu Y et Tang C-K (2012) Epigallocatechin-3-gallate prevents TNF- α -induced NF- κ B activation thereby upregulating ABCA1 via the Nrf2/Keap1 pathway in macrophage foam cells. *International Journal of Molecular Medicine* 29: 946-956.
- Johnstone RW, Ruefli AA et Lowe SW (2002) Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy. *Cell* 108: 153-164.
- Jolas T et Aghajanian GK (1996) Neurotensin excitation of serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus of the rat in vitro. *European Journal of Neuroscience* 8: 153-161.
- Jolas T et Aghajanian GK (1997) Neurotensin and the serotonergic system. *Progress in Neurobiology* 52: 455-468.
- Juliusson G, Antunovic P, Derolf A, Lehmann S, Mollgard L, Stockelberg D, Tidefelt U, Wahlin A et Hoglund M (2009) Age and acute myeloid leukemia: real world data on decision to treat and outcomes from the Swedish Acute Leukemia Registry. *Blood* 113: 4179-4187.
- Kalafatakis K et Triantafyllou K (2011) Contribution of neurotensin in the immune and neuroendocrine modulation of normal and abnormal enteric function. *Regulatory Peptides* 170: 7-17.
- Karlitepe A, Ozalp O et Avci CB (2015) New approaches for cancer immunotherapy. *Tumour Biology* 36: 4075-4078.
- Kawai K, Tsuno NH, Kitayama J, Okaji Y, Yazawa K, Asakage M, Hori N, Watanabe T, Takahashi K et Nagawa H (2004) Epigallocatechin gallate attenuates adhesion and migration of CD8⁺ T cells by binding to CD11b. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 113: 1211-1217.

- Kawai K, Tsuno NH, Kitayama J, Sunami E, Takahashi K et Nagawa H (2011) Catechin inhibits adhesion and migration of peripheral blood B cells by blocking CD11b. *Immunopharmacology and Immunotoxicology* 33: 391-397.
- Keller R (2005) Cell migration during gastrulation. *Current Opinion in Cell Biology* 17: 533-541.
- Kennedy JA et Barabe F (2008) Investigating human leukemogenesis: from cell lines to in vivo models of human leukemia. *Leukemia* 22: 2029-2040.
- Khan N, Afaq F, Saleem M, Ahmad N et Mukhtar H (2006) Targeting multiple signaling pathways by green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate. *Cancer Research* 66: 2500-2505.
- Kim ER et Mizuno TM (2010) Role of neurotensin receptor 1 in the regulation of food intake by neuromedins and neuromedin-related peptides. *Neuroscience Letters* 468: 64-67.
- Kim HS, Kim MH, Jeong M, Hwang YS, Lim SH, Shin BA, Ahn BW et Jung YD (2004) EGCG blocks tumor promoter-induced MMP-9 expression via suppression of MAPK and AP-1 activation in human gastric AGS cells. *Anticancer Research* 24: 747-754.
- Kislauskis E, Bullock B, McNeil S et Dobner PR (1988) The rat gene encoding neurotensin and neuromedin N. Structure, tissue-specific expression, and evolution of exon sequences. *Journal of Biological Chemistry* 263: 4963-4968.
- Klaunig JE, Kamendulis LM et Xu Y (2000) Epigenetic mechanisms of chemical carcinogenesis. *Human and Experimental Toxicology* 19: 543-555.
- Kovacic P (2007) Unifying mechanism for anticancer agents involving electron transfer and oxidative stress: clinical implications. *Medical Hypotheses* 69: 510-516.
- Kumar R, Clermont G, Vodovotz Y et Chow CC (2004) The dynamics of acute inflammation. *Journal of Theoretical Biology* 230: 145-155.
- Lambert JD et Elias RJ (2010) The antioxidant and pro-oxidant activities of green tea polyphenols: a role in cancer prevention. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 501: 65-72.

- Lambert PD, Gross R, Nemeroff CB et Kilts CD (1995) Anatomy and mechanisms of neurotensin-dopamine interactions in the central nervous system. *Annals of the New York Academy of Sciences* 757: 377-389.
- Lamson DW et Brignall MS (1999) Antioxidants in cancer therapy; their actions and interactions with oncologic therapies. *Alternative Medicine Review* 4: 304-329.
- Laouar A, Collart FR, Chubb CB, Xie B et Huberman E (1999) Interaction between alpha 5 beta 1 integrin and secreted fibronectin is involved in macrophage differentiation of human HL-60 myeloid leukemia cells. *Journal of Immunology* 162: 407-414.
- Lautenschläger F, Paschke S, Schinkinger S, Bruel A, Beil M et Guck J (2009) The regulatory role of cell mechanics for migration of differentiating myeloid cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106: 15696-15701.
- Law IKM, Murphy JE, Bakirtzi K, Bunnett NW et Pothoulakis C (2012) Neurotensin-induced proinflammatory signaling in human colonocytes is regulated by β -arrestins and endothelin-converting enzyme-1-dependent endocytosis and resensitization of neurotensin receptor 1. *Journal of Biological Chemistry* 287: 15066-15075.
- Lee HW, Ahn DH, Crawley SC, Li JD, Gum JR, Jr., Basbaum CB, Fan NQ, Szymkowski DE, Han SY, Lee BH, et al. (2002) Phorbol 12-myristate 13-acetate up-regulates the transcription of MUC2 intestinal mucin via Ras, ERK, and NF-kappa B. *Journal of Biological Chemistry* 277: 32624-32631.
- Legault M, Congar P, Michel FJ et Trudeau LE (2002) Presynaptic action of neurotensin on cultured ventral tegmental area dopaminergic neurones. *Neuroscience* 111: 177-187.
- Leukemia & Lymphoma Society of Canada (2016) *Blood Cancer in Canada Facts & Stats 2016*. Canadian Cancer Statistics Report, Canada.
- Li AH, Yeh TH, Tan PP, Hwang HM et Wang HL (2001) Neurotensin excitation of serotonergic neurons in the rat nucleus raphe magnus: ionic and molecular mechanisms. *Neuropharmacology* 40: 1073-1083.
- Li S, Tan HY, Wang N, Cheung F, Hong M et Feng Y (2018) The potential and action mechanism of polyphenols in the treatment of liver diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2018: 8394818.

- Li XM, Ferraro L, Tanganelli S, O'Connor WT, Hasselrot U, Ungerstedt U et Fuxe K (1995) Neurotensin peptides antagonistically regulate postsynaptic dopamine D2 receptors in rat nucleus accumbens: a receptor binding and microdialysis study. *Journal of Neural Transmission* 102: 125-137.
- Liu FS (2009) Mechanisms of chemotherapeutic drug resistance in cancer therapy--a quick review. *Taiwanese Journal of Obstetrics & Gynecology* 48: 239-244.
- Liu H, Tian Y, Ji B, Lu H, Xin Q, Jiang Y, Ding L, Zhang J, Chen J et Bai B (2016) Heterodimerization of the kappa opioid receptor and neurotensin receptor 1 contributes to a novel beta-arrestin-2-biased pathway. *Biochimica et Biophysica Acta* 1863: 2719-2738.
- Liu SM, Chen W et Wang J (2014) Distinguishing between cancer cell differentiation and resistance induced by all-trans retinoic acid using transcriptional profiles and functional pathway analysis. *Scientific Reports* 4: 5577.
- Longo PG, Laurenti L, Gobessi S, Sica S, Leone G et Efremov DG (2008) The Akt/Mcl-1 pathway plays a prominent role in mediating antiapoptotic signals downstream of the B-cell receptor in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood* 111: 846-855.
- Lowenberg B, Downing JR et Burnett A (1999) Acute myeloid leukemia. *New England Journal of Medicine* 341: 1051-1062.
- Ma H, Das T, Pereira S, Yang Z, Zhao M, Mukerji P et Hoffman RM (2009) Efficacy of dietary antioxidants combined with a chemotherapeutic agent on human colon cancer progression in a fluorescent orthotopic mouse model. *Anticancer Research* 29: 2421-2426.
- Magazin M, Chalon P, Culouscou J-M, Ferrara P, Poszepczynska-Guigné E, Bagot M, Boumsell L, Pruvost C et Bensussan A (2004) Sezary syndrome cells unlike normal circulating T lymphocytes fail to migrate following engagement of NT1 receptor. *Journal of Investigative Dermatology* 122: 111-118.
- Malarkey DE, Hoenerhoff M et Maronpot RR (2013) Carcinogenesis: Mechanisms and manifestations. Dans *Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology*. Elsevier. North Carolina, USA.
- Maoret J-J, Pospai D, Rouyerfessard C, Couvineau A, Laboisie C, Voisin T et Laburthe M (1994) Neurotensin receptor and its mRNA are expressed in many human colon cancer cell lines but not in normal colonic epithelium: binding studies

- and RT-PCR experiments. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 203: 465-471.
- Marcusson EG, Horazdovsky BF, Cereghino JL, Gharakhanian E et Emr SD (1994) The sorting receptor for yeast vacuolar carboxypeptidase Y is encoded by the VPS10 gene. *Cell* 77: 579-586.
- Mari M, Bujny MV, Zeuschner D, Geerts WJ, Griffith J, Petersen CM, Cullen PJ, Klumperman J et Geuze HJ (2008) SNX1 defines an early endosomal recycling exit for sortilin and mannose 6-phosphate receptors. *Traffic* 9: 380-393.
- Marrett LD, De P, Airia P, Dryer D et Steering Committee of Canadian Cancer S (2008) Cancer in Canada in 2008. *Canadian Medical Association Journal* 179: 1163-1170.
- Martin OA, Anderson RL, Russell PA, Cox RA, Ivashkevich A, Swierczak A, Doherty JP, Jacobs DH, Smith J, Siva S, et al. (2014) Mobilization of viable tumor cells into the circulation during radiation therapy. *International Journal of Radiation Oncology • Biology • Physics* 88: 395-403.
- Martin S, Navarro V, Vincent JP et Mazella J (2002a) Neurotensin receptor-1 and-3 complex modulates the cellular signaling of neurotensin in the HT29 cell line. *Gastroenterology* 123: 1135-1143.
- Martin S, Vincent JP et Mazella J (2002b) Recycling ability of the mouse and the human neurotensin type 2 receptors depends on a single tyrosine residue. *Journal of Cell Science* 115: 165-173.
- Martin S, Vincent JP et Mazella J (2003) Involvement of the neurotensin receptor-3 in the neurotensin-induced migration of human microglia. *Journal of Neuroscience* 23: 1198-1205.
- Martinez FO et Gordon S (2014) The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000prime reports* 6: 13.
- Masuda M, Suzui M et Weinstein IB (2001) Effects of epigallocatechin-3-gallate on growth, epidermal growth factor receptor signaling pathways, gene expression, and chemosensitivity in human head and neck squamous cell carcinoma cell lines. *Clinical Cancer Research* 7: 4220-4229.
- Mazella J (2001) Sortilin/neurotensin receptor-3: a new tool to investigate neurotensin signaling and cellular trafficking? *Cellular Signalling* 13: 1-6.

- Mazella J, Botto JM, Guillemare E, Coppola T, Sarret P et Vincent JP (1996) Structure, functional expression, and cerebral localization of the levocabastine-sensitive neurotensin/neuromedin N receptor from mouse brain. *Journal of Neuroscience* 16: 5613-5620.
- Mazella J et Vincent JP (2006) Internalization and recycling properties of neurotensin receptors. *Peptides* 27: 2488-2492.
- Mazella J, Zsurger N, Navarro V, Chabry J, Kaghad M, Caput D, Ferrara P, Vita N, Gully D, Maffrand JP, et al. (1998) The 100-kDa neurotensin receptor is gp95/sortilin, a non-G-protein-coupled receptor. *Journal of Biological Chemistry* 273: 26273-26276.
- McCarthy DM, San Miguel JF, Freake HC, Green PM, Zola H, Catovsky D et Goldman JM (1983) 1,25-dihydroxyvitamin D₃ inhibits proliferation of human promyelocytic leukaemia (HL60) cells and induces monocyte-macrophage differentiation in HL60 and normal human bone marrow cells. *Leukemia Research* 7: 51-55.
- McLean J et Fox J (1983) Mechanisms of action of neurotensin on motility of canine gastric corpus in vitro. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 61: 29-34.
- Medzhitov R (2010a) Inflammation 2010: new adventures of an old flame. *Cell* 140: 771-776.
- Medzhitov R (2010b) Inflammation 2010: new adventures of an old flame. *Cell* 140: 771-776.
- Melo JV (1996) The diversity of BCR-ABL fusion proteins and their relationship to leukemia phenotype. *Blood* 88: 2375-2384.
- Memo M, Castelletti L, Valerio A, Missale C et Spano PF (1986) Identification of neurotensin receptors associated with calcium channels and prolactin release in rat pituitary. *Journal of Neurochemistry* 47: 1682-1688.
- Mijatovic T, Gailly P, Mathieu V, De Nève N, Yeaton P, Kiss R et Decaestecker C (2007) Neurotensin is a versatile modulator of in vitro human pancreatic ductal adenocarcinoma cell (PDAC) migration. *Analytical Cellular Pathology* 29: 315-326.

- Moding EJ, Kastan MB et Kirsch DG (2013) Strategies for optimizing the response of cancer and normal tissues to radiation. *Nature Reviews Drug Discovery* 12: 526-542.
- Mollinedo F, Gajate C, Tugores A, Flores I et Naranjo JR (1993) Differences in expression of transcription factor AP-1 in human promyelocytic HL-60 cells during differentiation towards macrophages versus granulocytes. *Biochemical Journal* 294 (Pt 1): 137-144.
- Mulè F, Serio R et Postorino A (1995) Motility pattern of isolated rat proximal colon and excitatory action of neurotensin. *European Journal of Pharmacology* 275: 131-137.
- Müller KM, Tveteraas IH, Aasrum M, Ødegård J, Dawood M, Dajani O, Christoffersen T et Sandnes DL (2011) Role of protein kinase C and epidermal growth factor receptor signalling in growth stimulation by neurotensin in colon carcinoma cells. *BMC Cancer* 11: 421.
- Munck Petersen C, Nielsen MS, Jacobsen C, Tauris J, Jacobsen L, Gliemann J, Moestrup SK et Madsen P (1999) Propeptide cleavage conditions sortilin/neurotensin receptor-3 for ligand binding. *EMBO Journal* 18: 595-604.
- Murao S, Gemmell MA, Callahan MF, Anderson NL et Huberman E (1983) Control of macrophage cell differentiation in human promyelocytic HL-60 leukemia cells by 1,25-dihydroxyvitamin D₃ and phorbol-12-myristate-13-acetate. *Cancer Research* 43: 4989-4996.
- Mustain WC, Rychahou PG et Evers BM (2011) The role of neurotensin in physiologic and pathologic processes. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity* 18: 75-82.
- Myers RM, Shearman JW, Kitching MO, Ramos-Montoya A, Neal DE et Ley SV (2009) Cancer, chemistry, and the cell: molecules that interact with the neurotensin receptors. *ACS Chemical Biology* 4: 503-525.
- Najimi M, Maloteaux JM et Hermans E (2002) Cytoskeleton-related trafficking of the EAAC1 glutamate transporter after activation of the G(q/11)-coupled neurotensin receptor NTS1. *FEBS Letters* 523: 224-228.
- Nance CL, Siwak EB et Shearer WT (2009) Preclinical development of the green tea catechin, epigallocatechin gallate, as an HIV-1 therapy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 123: 459-465.

- Narayanan S, Mony U, Vijaykumar DK, Koyakutty M, Paul-Prasanth B et Menon D (2015) Sequential release of epigallocatechin gallate and paclitaxel from PLGA-casein core/shell nanoparticles sensitizes drug-resistant breast cancer cells. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* 11: 1399-1406.
- Nemeroff CB, Osbahr AJ, Manberg PJ, Ervin GN et Prange AJ (1979) Alterations in nociception and body temperature after intracisternal administration of neurotensin, beta-endorphin, other endogenous peptides, and morphine. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 76: 5368-5371.
- Nicholl CG, Polak JM et Bloom SR (1985) The hormonal regulation of food intake, digestion, and absorption. *Annual Review of Nutrition* 5: 213-239.
- Nielsen MS, Madsen P, Christensen EI, Nykjaer A, Gliemann J, Kasper D, Pohlmann R et Petersen CM (2001) The sortilin cytoplasmic tail conveys Golgi-endosome transport and binds the VHS domain of the GGA2 sorting protein. *EMBO Journal* 20: 2180-2190.
- Nikoo M, Regenstein JM et Ahmadi Gavlighi H (2018) Antioxidant and Antimicrobial Activities of (-)-Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) and its Potential to Preserve the Quality and Safety of Foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 17: 732-753.
- Nykjaer A, Lee R, Teng KK, Jansen P, Madsen P, Nielsen MS, Jacobsen C, Kliemann M, Schwarz E, Willnow TE, et al. (2004) Sortilin is essential for proNGF-induced neuronal cell death. *Nature* 427: 843-848.
- Nykjaer A et Willnow TE (2012) Sortilin: a receptor to regulate neuronal viability and function. *Trends in Neurosciences* 35: 261-270.
- Oliveira PA, Colaco A, Chaves R, Guedes-Pinto H, De-La-Cruz PL et Lopes C (2007) Chemical carcinogenesis. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 79: 593-616.
- Organisation mondiale de la santé (2018) Cancer. Dans Centre des médias-Principaux repères. OMS, United States.
- Osiecki H, Schloss J, Domagala C et Johnson B (2002) *Cancer: A Nutritional*. Eagle Farm, Queensland, Australia.
- Ouyang Q, Chen G, Zhou J, Li L, Dong Z, Yang R, Xu L, Cui H, Xu M et Yi L (2015a) Neurotensin signaling stimulates glioblastoma cell proliferation by

- upregulating c-Myc and inhibiting miR-29b-1 and miR-129-3p. *Neuro-oncology* 18: 216-226.
- Ouyang Q, Gong X, Xiao H, Zhou J, Xu M, Dai Y, Xu L, Feng H, Cui H et Yi L (2015b) Neurotensin promotes the progression of malignant glioma through NTSR1 and impacts the prognosis of glioma patients. *Molecular Cancer* 14: 21.
- Ouyang Q, Zhou J, Yang W, Cui H, Xu M et Yi L (2017) Oncogenic role of neurotensin and neurotensin receptors in various cancers. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 44: 841-846.
- Pagani A, Gaeta S, Savchenko AI, Williams CM et Appendino G (2017) An improved preparation of phorbol from croton oil. *Beilstein Journal of Organic Chemistry* 13: 1361-1367.
- Palozza P, Simone R, Catalano A, Boninsegna A, Böhm V, Fröhlich K, Mele MC, Monego G et Ranelletti FO (2010) Lycopene prevents 7-ketocholesterol-induced oxidative stress, cell cycle arrest and apoptosis in human macrophages. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 21: 34-46.
- Palumbo MO, Kavan P, Miller W, Panasci L, Assouline S, Johnson N, Cohen V, Patenaude F, Pollak M et Jagoe RT (2013) Systemic cancer therapy: achievements and challenges that lie ahead. *Frontiers in Pharmacology* 4: 57.
- Pardoll D (2015) Cancer and the Immune System: Basic Concepts and Targets for Intervention. *Seminars in Oncology* 42: 523-538.
- Parolaro D, Sala M, Patrini G, Biffi E, Pecora N et Gori E (1987) Further investigations on neurotensin as central modulator of intestinal motility in rats. *Regulatory Peptides* 17: 111-117.
- Paupert J, Mansat-De Mas V, Demur C, Salles B et Muller C (2008) Cell-surface MMP-9 regulates the invasive capacity of leukemia blast cells with monocytic features. *Cell Cycle* 7: 1047-1053.
- Peric-Golia L, Gardner CF, Wilson DE et Peric-Golia M (1984) The effect of neurotensin on the concentration of cholesterol and bile acids in the guinea pig. *Lipids* 19: 749-755.
- Petersen CM, Nielsen MS, Nykjaer A, Jacobsen L, Tommerup N, Rasmussen HH, Roigaard H, Gliemann J, Madsen P et Moestrup SK (1997) Molecular identification of a novel candidate sorting receptor purified from human brain

by receptor-associated protein affinity chromatography. *Journal of Biological Chemistry* 272: 3599-3605.

Petkova-Kirova P, Rakovska A, Della Corte L, Zaekova G, Radomirov R et Mayer A (2008) Neurotensin modulation of acetylcholine, GABA, and aspartate release from rat prefrontal cortex studied in vivo with microdialysis. *Brain Research Bulletin* 77: 129-135.

Pourzand A, Tajaddini A, Pirouzpanah S, Asghari-Jafarabadi M, Samadi N, Ostadrahimi A-R et Sanaat Z (2016) Associations between dietary allium vegetables and risk of breast cancer: A hospital-based matched case-control study. *Journal of Breast Cancer* 19: 292-300.

Purizaca J, Meza I et Pelayo R (2012) Early lymphoid development and microenvironmental cues in B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Archives of Medical Research* 43: 89-101.

Qian BZ et Pollard JW (2010) Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell* 141: 39-51.

Rebois RV et Patel J (1985) Phorbol ester causes desensitization of gonadotropin-responsive adenylate cyclase in a murine Leydig tumor cell line. *Journal of Biological Chemistry* 260: 8026-8031.

Reed MJ, Karres N, Eyman D, Cruz A, Brekken RA et Plymate S (2007) The effects of aging on tumor growth and angiogenesis are tumor-cell dependent. *International Journal of Cancer* 120: 753-760.

Reubi JC, Waser B, Schaer JC et Laissue JA (1999) Neurotensin receptors in human neoplasms: high incidence in Ewing's sarcomas. *International Journal of Cancer* 82: 213-218.

Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM et Aggarwal BB (2010) Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? *Free Radical Biology and Medicine* 49: 1603-1616.

Richard F, Barroso S, Martinez J, Labbé-Jullié C et Kitabgi P (2001a) Agonism, inverse agonism, and neutral antagonism at the constitutively active human neurotensin receptor 2. *Molecular Pharmacology* 60: 1392-1398.

Richard F, Barroso S, Nicolas-Etheve D, Kitabgi P et Labbe-Jullie C (2001b) Impaired G protein coupling of the neurotensin receptor 1 by mutations in extracellular loop 3. *European Journal of Pharmacology* 433: 63-71.

- Ridley AJ, Schwartz MA, Burridge K, Firtel RA, Ginsberg MH, Borisy G, Parsons JT et Horwitz AR (2003) Cell migration: integrating signals from front to back. *Science* 302: 1704-1709.
- Rökaeus Å (1984) Increase in neurotensin-like immunoreactivity in rat plasma after administration of calcium, bombesin and fat and its inhibition by somatostatin. *Acta Physiologica Scandinavica* 122: 261-267.
- Rorth P (2009) Collective cell migration. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 25: 407-429.
- Rosell S, Al-Saffar A et Thor K (1984) The role of neurotensin in gut motility. *Scandinavian Journal of Gastroenterology Supplement* 96: 69-75.
- Rostene WH et Alexander MJ (1997) Neurotensin and neuroendocrine regulation. *Frontiers in Neuroendocrinology* 18: 115-173.
- Rousseau M, Ferraiuolo MA, Crutchley JL, Wang XQD, Miura H, Blanchette M et Dostie J (2014) Classifying leukemia types with chromatin conformation data. *Genome Biology* 15: R60.
- Roussy G, Dansereau MA, Dore-Savard L, Belleville K, Beaudet N, Richelson E et Sarret P (2008) Spinal NTS1 receptors regulate nociceptive signaling in a rat formalin tonic pain model. *Journal of Neurochemistry* 105: 1100-1114.
- Rovera G, O'Brien TG et Diamond L (1979) Induction of differentiation in human promyelocytic leukemia cells by tumor promoters. *Science* 204: 868-870.
- Rovere C, Barbero P et Kitabgi P (1996) Evidence that PC2 is the endogenous pro-neurotensin convertase in rMTC 6-23 cells and that PC1- and PC2-transfected PC12 cells differentially process pro-neurotensin. *Journal of Biological Chemistry* 271: 11368-11375.
- Rybin VO, Guo J, Gertsberg Z, Feinmark SJ et Steinberg SF (2008) Phorbol 12-myristate 13-acetate-dependent protein kinase C delta-Tyr311 phosphorylation in cardiomyocyte caveolae. *Journal of Biological Chemistry* 283: 17777-17788.
- Ryves WJ, Dimitrijevic S, Gordge PC et Evans FJ (1994) HL-60 cell differentiation induced by phorbol- and 12-deoxyphorbol-esters. *Carcinogenesis* 15: 2501-2506.

- Sakai Y, Daniel E, Jury J et Fox J (1984) Neurotensin inhibition of canine intestinal motility in vivo via α -adrenoceptors. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 62: 403-411.
- Savill J, Dransfield I, Gregory C et Haslett C (2002) A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immune responses. *Nature Reviews Immunology* 2: 965-975.
- Schlenk RF et Dohner H (2013) Genomic applications in the clinic: use in treatment paradigm of acute myeloid leukemia. *Hematology: the American Society of Hematology Education Program 2013*: 324-330.
- Schmidt V et Willnow TE (2016) Protein sorting gone wrong--VPS10P domain receptors in cardiovascular and metabolic diseases. *Atherosclerosis* 245: 194-199.
- Schotte A, Leysen JE et Laduron PM (1986) Evidence for a displaceable non-specific [3H]neurotensin binding site in rat brain. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 333: 400-405.
- Schröttner P, Leick M et Burger M (2010) The role of chemokines in B cell chronic lymphocytic leukaemia: pathophysiological aspects and clinical impact. *Annals of Hematology* 89: 437-446.
- Schultz SG, Rauner BB, Wood JD et Society AP (1989) *The Gastrointestinal System: Motility and circulation*. American Physiological Society, Bethesda, United States.
- Schulz S, Rocken C, Ebert MP et Schulz S (2006) Immunocytochemical identification of low-affinity NTS2 neurotensin receptors in parietal cells of human gastric mucosa. *Journal of Endocrinology* 191: 121-128.
- Seroogy K, Ceccatelli S, Schalling M, Hokfelt T, Frey P, Walsh J, Dockray G, Brown J, Buchan A et Goldstein M (1988) A subpopulation of dopaminergic neurons in rat ventral mesencephalon contains both neurotensin and cholecystokinin. *Brain Research* 455: 88-98.
- Shankar S, Ganapathy S, Hingorani SR et Srivastava RK (2008) EGCG inhibits growth, invasion, angiogenesis and metastasis of pancreatic cancer. *Frontiers in Bioscience* 13: 440-452.

- Shankar S, Suthakar G et Srivastava RK (2007) Epigallocatechin-3-gallate inhibits cell cycle and induces apoptosis in pancreatic cancer. *Frontiers in Bioscience* 12: 50.
- Shao C, Folkard M, Michael BD et Prise KM (2004) Targeted cytoplasmic irradiation induces bystander responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 13495-13500.
- Shchemelinin I, Sefc L et Necas E (2006) Protein kinases, their function and implication in cancer and other diseases. *Folia biologica* 52: 81.
- Shigemori Y, Katayama Y, Mori T, Maeda T et Kawamata T (2006) Matrix metalloproteinase-9 is associated with blood-brain barrier opening and brain edema formation after cortical contusion in rats. Dans *Brain Edema XIII*. Springer, Michigan, United States.
- Shin Y, Yoon SH, Choe EY, Cho SH, Woo CH, Rho JY et Kim JH (2007) PMA-induced up-regulation of MMP-9 is regulated by a PKC α -NF- κ B cascade in human lung epithelial cells. *Experimental and Molecular Medicine* 39: 97-105.
- Singh BN, Shankar S et Srivastava RK (2011) Green tea catechin, epigallocatechin-3-gallate (EGCG): mechanisms, perspectives and clinical applications. *Biochemical Pharmacology* 82: 1807-1821.
- Siveen KS, Uddin S et Mohammad RM (2017) Targeting acute myeloid leukemia stem cell signaling by natural products. *Molecular Cancer* 16: 13.
- Snider RM, Forray C, Pfenning M et Richelson E (1986) Neurotensin stimulates inositol phospholipid metabolism and calcium mobilization in murine neuroblastoma clone N1E-115. *Journal of Neurochemistry* 47: 1214-1218.
- Somaï S, Gompel A, Rostène W et Forgez P (2002) Neurotensin counteracts apoptosis in breast cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 295: 482-488.
- Song JM et Seong BL (2007) Tea catechins as a potential alternative anti-infectious agent. *Expert Review of Anti-Infective Therapy* 5: 497-506.
- Souazé F, Dupouy S, Viardot-Foucault V, Bruyneel E, Attoub S, Gespach C, Gompel A et Forgez P (2006) Expression of neurotensin and NT1 receptor in human breast cancer: a potential role in tumor progression. *Cancer Research* 66: 6243-6249.

- Souazé F, Viardot-Foucault V, Rouillet N, Toy-Miou-Leong M, Gompel A, Bruyneel E, Comperat E, Faux MC, Mareel M et Rostène W (2005) Neurotensin receptor 1 gene activation by the Tcf/ β -catenin pathway is an early event in human colonic adenomas. *Carcinogenesis* 27: 708-716.
- Sprenger CC, Plymate SR et Reed MJ (2008) Extracellular influences on tumour angiogenesis in the aged host. *British Journal of Cancer* 98: 250-255.
- Statistique Canada (2016) Increasing survival from leukemia among adolescents and adults in Canada: A closer look. Dans Statistics Canada, Catalogue no 82-003-X • Health Reports. Statistics Canada, Canada.
- Statistique Canada (2017) Deaths and causes of death, 2017. Dans Component of Statistics Canada catalogue no 11-001-X. Statistics Canada, Canada.
- Steinberg SF (2008) Structural basis of protein kinase C isoform function. *Physiological Reviews* 88: 1341-1378.
- Sternlicht MD, Coussens LM, Vu TH et Werb Z (2001) Biology and regulation of the matrix metalloproteinases. Dans *Matrix metalloproteinase inhibitors in cancer therapy*. Inc HP, ed. Springer. Totowa, United States.
- Stopa EG, Volicer L, Kuo-Leblanc V, Harper D, Lathi D, Tate B et Satlin A (1999) Pathologic evaluation of the human suprachiasmatic nucleus in severe dementia. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 58: 29-39.
- Suzuki Y, Miyoshi N et Isemura M (2012) Health-promoting effects of green tea. *Proceedings of the Japan Academy, Series B, Physical and Biological Sciences* 88: 88-101.
- Takeda T, Taniyama K, Baba S et Tanaka C (1989) Putative mechanisms involved in excitatory and inhibitory effects of somatostatin on intestinal motility. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 257: G532-G538.
- Tallman MS, Gilliland DG et Rowe JM (2005) Drug therapy for acute myeloid leukemia. *Blood* 106: 1154-1163.
- Tanaka K, Masu M et Nakanishi S (1990) Structure and functional expression of the cloned rat neurotensin receptor. *Neuron* 4: 847-854.

- Taylor CJ, Motamed K et Lilly B (2006) Protein kinase C and downstream signaling pathways in a three-dimensional model of phorbol ester-induced angiogenesis. *Angiogenesis* 9: 39-51.
- Teng HK, Teng KK, Lee R, Wright S, Tevar S, Almeida RD, Kermani P, Torkin R, Chen ZY, Lee FS, et al. (2005) ProBDNF induces neuronal apoptosis via activation of a receptor complex of p75NTR and sortilin. *Journal of Neuroscience* 25: 5455-5463.
- Thor K, Rokaeus A, Kager L et Rosell S (1980) (Gln4)-neurotensin and gastrointestinal motility in man. *Acta Physiologica Scandinavica* 110: 327-328.
- Thor K, Rosell S, Rökaeus Å et Kager L (1982) (Gln4)-neurotensin changes the motility pattern of the duodenum and proximal jejunum from a fasting-type to a fed-type. *Gastroenterology* 83: 569-574.
- Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J et Jemal A (2015) Global cancer statistics, 2012. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 65: 87-108.
- Trejo-Solis C, Pedraza-Chaverri J, Torres-Ramos M, Jiménez-Farfán D, Cruz Salgado A, Serrano-García N, Osorio-Rico L et Sotelo J (2013) Multiple molecular and cellular mechanisms of action of lycopene in cancer inhibition. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2013: 705121.
- Udensi UK et Tchounwou PB (2014) Dual effect of oxidative stress on leukemia cancer induction and treatment. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research* 33: 106.
- Umeda D, Yano S, Yamada K et Tachibana H (2008) Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate signaling pathway through 67-kDa laminin receptor. *Journal of Biological Chemistry* 283: 3050-3058.
- Van Dam EM, Ten Broeke T, Jansen K, Spijkers P et Stoorvogel W (2002) Endocytosed transferrin receptors recycle via distinct dynamin and phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathways. *Journal of Biological Chemistry* 277: 48876-48883.
- Vandenbulcke F, Nouel D, Vincent JP, Mazella J et Beaudet A (2000) Ligand-induced internalization of neurotensin in transfected COS-7 cells: differential intracellular trafficking of ligand and receptor. *Journal of Cell Science* 113 (Pt 17): 2963-2975.

- Vardiman JW, Harris NL et Brunning RD (2002) The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood* 100: 2292-2302.
- Varela ML, Mogildea M, Moreno I et Lopes A (2018) Acute Inflammation and Metabolism. *Inflammation* 41: 1115-1127.
- Vézina A, Chokor R et Annabi B (2012) EGCG targeting efficacy of NF- κ B downstream gene products is dictated by the monocytic/macrophagic differentiation status of promyelocytic leukemia cells. *Cancer Immunology, Immunotherapy* 61: 2321-2331.
- Vincent B, Vincent JP et Checler F (1994) Neurotensin and neuromedin N undergo distinct catabolic processes in murine astrocytes and primary cultured neurons. *European Journal of Biochemistry* 221: 297-306.
- Vincent JP, Mazella J et Kitabgi P (1999) Neurotensin and neurotensin receptors. *Trends in Pharmacological Sciences* 20: 302-309.
- Visse R et Nagase H (2003) Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circulation Research* 92: 827-839.
- Vita N, Laurent P, Lefort S, Chalon P, Dumont X, Kaghad M, Gully D, Le Fur G, Ferrara P et Caput D (1993) Cloning and expression of a complementary DNA encoding a high affinity human neurotensin receptor. *FEBS Letter* 317: 139-142.
- Vita N, Oury-Donat F, Chalon P, Guillemot M, Kaghad M, Bachy A, Thurneyssen O, Garcia S, Poinot-Chazel C, Casellas P, et al. (1998) Neurotensin is an antagonist of the human neurotensin NT2 receptor expressed in Chinese hamster ovary cells. *European Journal of Pharmacology* 360: 265-272.
- Wang HL et Wu T (1996) G alpha q/11 mediates neurotensin excitation of substantia nigra dopaminergic neurons. *Molecular Brain Research* 36: 29-36.
- Wang J et Yi J (2008) Cancer cell killing via ROS: to increase or decrease, that is the question. *Cancer Biology & Therapy* 7: 1875-1884.
- Weiner LM (2015) Cancer immunology for the clinician. *Clinical Advances in Hematology & Oncology* 13: 299-306.
- Westergaard UB, Sorensen ES, Herney G, Nielsen MS, Nykjaer A, Kirkegaard K, Jacobsen C, Gliemann J, Madsen P et Petersen CM (2004) Functional

- organization of the sortilin Vps10p domain. *Journal of Biological Chemistry* 279: 50221-50229.
- Wu XZ (2006) A new classification system of anticancer drugs - based on cell biological mechanisms. *Medical Hypotheses* 66: 883-887.
- Wu Z, Galmiche A, Liu J, Stadler N, Wendum D, Segal-Bendirdjian E, Paradis V et Forgez P (2017) Neurotensin regulation induces overexpression and activation of EGFR in HCC and restores response to erlotinib and sorafenib. *Cancer Letters* 388: 73-84.
- Wu Z, Martinez-Fong D, Tredaniel J et Forgez P (2012) Neurotensin and its high affinity receptor 1 as a potential pharmacological target in cancer therapy. *Frontiers in Endocrinology (Lausanne)* 3: 184.
- Xiao H, Zeng Y, Wang Q, Wei S et Zhu X (2017) A Novel Positive Feedback Loop Between NTSR1 and Wnt/beta-Catenin Contributes to Tumor Growth of Glioblastoma. *Cellular Physiology and Biochemistry* 43: 2133-2142.
- Yamada M, Yamada M, Lombet A, Forgez P et Rostene W (1998) Distinct functional characteristics of levocabastine sensitive rat neurotensin NT2 receptor expressed in Chinese hamster ovary cells. *Life Sciences* 62: PL 375-380.
- Yamada M, Yamada M, Watson MA et Richelson E (1994) Deletion mutation in the putative third intracellular loop of the rat neurotensin receptor abolishes polyphosphoinositide hydrolysis but not cyclic AMP formation in CHO-K1 cells. *Molecular Pharmacology* 46: 470-476.
- Yang CS et Wang H (2016) Cancer Preventive Activities of Tea Catechins. *Molecules* 21: 12.
- You YN, Lakhani VT et Wells SA, Jr. (2007) The role of prophylactic surgery in cancer prevention. *World Journal of Surgery* 31: 450-464.
- Yue B (2014) Biology of the extracellular matrix: an overview. *Journal of Glaucoma* 23: S20-S23.
- Zenz T, Mertens D, Küppers R, Döhner H et Stilgenbauer S (2010) From pathogenesis to treatment of chronic lymphocytic leukaemia. *Nature Reviews Cancer* 10: 37.
- Zhao D, Keates AC, Kuhnt-Moore S, Moyer MP, Kelly CP et Pothoulakis C (2001) Signal transduction pathways mediating neurotensin-stimulated interleukin-8

expression in human colonocytes. *Journal of Biological Chemistry* 276: 44464-44471.

Zhao D, Kuhnt-Moore S, Zeng H, Wu JS, Moyer MP et Pothoulakis C (2003) Neurotensin stimulates IL-8 expression in human colonic epithelial cells through Rho GTPase-mediated NF- κ B pathways. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 284: C1397-C1404.

Zhou F, Zhang W, Wei Y, Zhou D, Su Z, Meng X, Hui L et Tian W (2007a) The changes of oxidative stress and human 8-hydroxyguanine glycosylase1 gene expression in depressive patients with acute leukemia. *Leukemia Research* 31: 387-393.

Zhou H, Zou P, Chen ZC et You Y (2007b) A novel vicious cycle cascade in tumor chemotherapy. *Medical Hypotheses* 69: 1230-1233.

Zupanc GK (1996) Peptidergic transmission: from morphological correlates to functional implications. *Micron* 27: 35-91.