

UNIVERSITÉ DE QUÉBEC À MONTRÉAL

EFFET DES CYTOKINES SUR LE CYCLE CELLULAIRE DES CELLULES
SOUCHES MÉSENCHYMATEUSES

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAÎTRISE EN BIOCHIMIE

PAR

MERIEM BENHAMIDA

DÉCEMBRE 2023

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

J'aimerais tout d'abord remercier mon directeur de recherche, le professeur Borhane Annabi, pour m'avoir accueillie au sein de son équipe de recherche, de m'avoir introduite à la recherche scientifique ainsi que pour son aide et ses conseils durant ma maîtrise.

Je voudrais également remercier tous mes collègues du laboratoire. Principalement, Narjara Gonzalez Suarez et Souad Djediai pour leur patience accordée, leur aide et leurs précieux conseils. Je remercie aussi Célia Kassouri, Sima Torabidastgerdooei, Loraine Gresseau et Sahily Rodriguez Torres pour leur aide apportée quand j'en avais besoin.

Sur une note plus personnelle, je remercie très chaleureusement ma famille. Mes parents de m'avoir offert l'opportunité de réaliser mon rêve, pour leur amour inconditionnel et leur éducation, je leur en suis très reconnaissante. Sans leurs sacrifices et leur soutien, je ne serai jamais parvenue où j'en suis aujourd'hui. Ma réussite est la leur. Je remercie mes sœurs, mes confidentes et mes meilleures amies, pour leur écoute, leur soutien et leurs encouragements. Ainsi que, mon petit neveu que j'aime tant.

Enfin, je tiens à souligner la contribution de la Fondation UQAM qui m'a appuyée financièrement lors de cette maîtrise.

DÉDICACE

A la mémoire de mon grand-père,

L'être qui m'est très cher

Que dieu lui accorde sa miséricorde et l'accueille
dans son vaste paradis.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	ii
DÉDICACE.....	iii
LISTE DES FIGURES.....	vi
LISTE DES TABLEAUX.....	vii
LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES	viii
RÉSUMÉ.....	xii
CHAPITRE 1	1
INTRODUCTION.....	1
1.1 CANCER ET CELLULES SOUCHES	1
1.1.1 CANCER.....	1
1.1.1.1 Généralités.....	1
1.1.1.2 Processus de la cancérogenèse	2
1.1.1.3 Statistiques	4
1.1.2 LES CELLULES SOUCHES ADULTES	5
1.1.2.1 Cellules souches hématopoïétiques.....	6
1.1.2.2 Cellules souches mésenchymateuses	8
1.1.2.3 Cellules endothéliales progénitrices.....	12
1.1.2.4 Cellules souches cancéreuses	12
1.1.3 Contribution des cellules souches mésenchymateuses au développement tumoral.....	13
1.2 LES CYTOKINES.....	15
1.2.1 Définition	15
1.2.2 Rôle des cytokines dans le développement tumoral	16
1.2.3 Le facteur de croissance transformant beta.....	18
1.2.4 Le facteur de nécrose tumorale alpha.....	19
1.3 LE CYCLE CELLULAIRE.....	21
1.3.1 Les différentes phases du cycle cellulaire.....	22
1.3.2 Le contrôle du cycle cellulaire	23
1.3.3 Les complexes Cyclines-CDK et leurs régulateurs.....	25
1.3.4 L'implication de la voie SRC/STAT3	28
1.4 LA MORT CELLULAIRE.....	29
1.4.1 La mort cellulaire programmée.....	29
1.4.2 La mort cellulaire non programmée.....	31
1.5 LA CHIMIOPREVENTION PAR DES COMPOSÉS NATURELS.....	32
1.5.1 Les polyphénols	33
1.5.2 Les polyphénols du thé vert	34
1.5.3 L'épigallocatechine gallate	36

1.6 OBJECTIFS DE LA RECHERCHE	37
1.7 MODÈLE CELLULAIRE EXPÉRIMENTAL	37
CHAPITRE 2	39
MATÉRIEL ET MÉTHODES	39
2.1 MATÉRIEL	39
2.2 MÉTHODES.....	40
2.2.1 Culture cellulaire	40
2.2.2 Lyse cellulaire	40
2.2.3 Dosage des protéines selon la méthode de microBCA	40
2.2.4 Électrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE).....	41
2.2.5 Analyse par immunobuvardage.....	41
2.2.6 Immunodétection des protéines.....	41
2.2.7 Extraction de l'ARN total	42
2.2.8 Préparation de la bibliothèque d'ARN total	42
2.2.9 Séquençage de l'ARN	42
2.2.10 Lectures de l'alignement et l'analyse de l'expression différentielle.....	43
2.2.11 Analyse d'enrichissement d'ensembles de gènes.....	43
CHAPITRE 3	44
RÉSULTATS	44
3.1 Effet du TGF β et du TNF α sur le point de contrôle G2/M du cycle cellulaire	44
3.2 L'activité pharmacologique de l'EGCG sur la prolifération cellulaire et l'expression des cyclines et des cyclines dépendantes des kinases induite par le TGF β et le TNF α	48
3.3 Activation de la voie de signalisation SRC/STAT3 par le TGF β et le TNF α participant à la croissance cellulaire	49
3.4 Effet de l'EGCG sur l'induction de l'apoptose et l'expression de Bcl-xL.....	52
3.5 Induction de l'arrêt du cycle cellulaire par le TGF β et le TNF α et l'effet de l'EGCG sur l'expression du p53 et p21	52
CHAPITRE 4	55
DISCUSSION	55
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	66
BIBLIOGRAPHIE	68

LISTE DES FIGURES

Figure 1-1 : Représentation schématique des étapes de la carcinogenèse (Mongis 2017)	3
Figure 1-2 : Diagramme schématique de la différenciation de la lignée des MSCs (Oh, Choi et al. 2019).....	11
Figure 1-3 : Caractéristiques fondamentales des mécanismes participants au développement tumoral (Hanahan and Weinberg 2011)	14
Figure 1-4 : Phases du cycle cellulaire.....	24
Figure 1-5 : Les classifications détaillées et les sources de polyphénols végétaux (Yi, Li et al. 2019)	34
Figure 1-6 : Structure chimique des quatre principales catéchines du thé vert (Steinmann, Buer et al. 2013).....	35
Figure 3-1 : L'analyse transcriptomique révèle la réduction du point de contrôle G2/M du cycle cellulaire lors du traitement avec le TGF β des MSCs	45
Figure 3-2 : L'analyse transcriptomique révèle la réduction du point de contrôle G2/M du cycle cellulaire lors du traitement avec le TNF α des MSCs.....	47
Figure 3-3 : L'EGCG inhibe l'expression des protéines Cdk (cyclin-dependent protein kinases) dans les MSCs nécessaires à la prolifération cellulaire.....	50
Figure 3-4 : L'EGCG inhibe la phosphorylation de Src et STAT3 dans les MSCs.....	51
Figure 3-5 : L'EGCG régule à la baisse les niveaux de protéines des gènes cibles de STAT3 dans les MSCs impliqués dans la survie cellulaire.....	53
Figure 3-6: L'EGCG inhibe l'expression de l'inhibiteur de kinase cycline-dépendante 1 (P21) dans les MSCs.	54

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Fonctions des kinases cycline-dépendantes (Cdks) (Shuhui Lim et Philipp Kaldis, 2013)	26
Tableau 2 : Fonctions des cyclines (Shuhui Lim et Philipp Kaldis, 2013)	27
Tableau 3 : Fonctions des CKI (Shuhui Lim et Philipp Kaldis, 2013)	28

LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES

67LR	Récepteur à la laminine 67 kDa
α MEM	<i>Minimum Essential Medium α</i>
ADN	Acide désoxyribonucléique
ANHEJ	<i>Alternative non-homologous end-joining</i>
ALDH	Aldéhyde déshydrogénase
AP-1	<i>Activator protein 1</i>
ARN	Acide ribonucléique
SAC	Assemblage du fuseau mitotique
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
Bcl-xL	<i>C-cell lymphoma-extra large</i>
BM-MSC	Cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse
BSA	Albumine de sérum bovin
CK II	<i>Casein kinase 2</i>
CDK	Kinases dépendantes des cyclines
CD11b	<i>Cluster of differentiation 11b</i>
CD14	<i>Cluster of differentiation 14</i>
CD19	<i>Cluster of differentiation 19</i>
CD31	<i>Cluster of differentiation 31</i>
CD33	<i>Cluster of differentiation 33</i>
CD34	<i>Cluster of differentiation 34</i>
CD44	<i>Cluster of differentiation 44</i>
CD45	<i>Cluster of differentiation 45</i>
CD73	<i>Cluster of differentiation 73</i>
CD79	<i>Cluster of differentiation 79</i>
CD90	<i>Cluster of differentiation 90</i>
CD105	<i>Cluster of differentiation 105</i>
CD123	<i>Cluster of differentiation 123</i>
CD133	<i>Cluster of differentiation 133</i>

CD146	<i>Cluster of differentiation 146</i>
CIP/KIP	<i>Cdk Interacting Protein/Kinase Inhibitory Protein</i>
CLL-1	<i>C-Type Lectin-Like Molecule-1</i>
COX	Cyclooxygénase
CSC	Cellules souches cancéreuses
CKI	Protéines inhibitrices des CDK
ECL	Réactif de chemiluminescence
Erk-1	<i>Extracellular signal-regulated kinases 1</i>
Erk-2	<i>Extracellular signal-regulated kinases 2</i>
Erk 1/2	<i>Extracellular signal-regulated kinases 1/2</i>
EGCG	Epigallocatechine-3-gallate
EGC	Epigallocatechine
ECG	Epicatechine-3-gallate
EC	Epicatechine
EGFR	Récepteur du facteur de croissance épidermique
EPC	Cellules endothéliales progénitrices
FBS	Sérum de veau fœtal
FC	Facteurs de croissance
Flk-1/KDR	<i>Vascular endothelial growth factor receptor 2</i>
H2AX	<i>H2A histone family member X</i>
HLA-DR	<i>MHC class II cell surface receptor</i>
Her2	<i>Human Epidermal Growth Factor Receptor-2</i>
HSC	Cellules souches hématopoïétiques
INK4	Inhibiteurs de CDK4
IL-1RA	Récepteur de l'interleukine (IL)-1
IL-1	Interleukine 1
IL-4	Interleukine 4
IL-6	Interleukine 6
IL-8	Interleukine 8
IL-10	Interleukine 10
IL-11	Interleukine 11

IL-12	Interleukine 12
IL-13	Interleukine 13
IL-17	Interleukine 17
IL-18	Interleukine 18
IL-20	Interleukine 20
IL-22	Interleukine 22
IL-23	Interleukine 23
IL-33	Interleukine 33
IFN- γ	Interféron gamma
ISCT	Société internationale de thérapie cellulaire
KI-67	<i>Marker of proliferation Ki-67</i>
LIN28	<i>Lin-28 homolog A</i>
LPS	Lipopolysaccharide
LTGF- β	Protéine latente de liaison au TGF- β
MACC1-AS1	<i>MACC1 Antisense RNA 1</i>
MAP2	<i>Microtubule-associated protein 2</i>
MyD88	<i>Myeloid differentiation primary response 88</i>
NaCl	Chlorure de sodium
NaF	Fluorure de sodium
Na ₃ VO ₄	Sodium orthovanadate
Nanog	<i>Homeobox protein Nanog</i>
NF- κ B	<i>Nuclear factor-kappa B</i>
NK	Cellules tueuses naturelles
NO	Monoxyde d'azote
Oct-3/4	<i>Octamer-binding protein 3/4</i>
OCT4	<i>Octamer-binding protein 4</i>
PLA2	Phospholipase A2
PLC	Phospholipases C
PLD	Phospholipases D
P21	Protéine inhibitrice des CDK
P27	Protéine inhibitrice des CDK

P53	<i>Tumor protein 53</i>
PD1	Protéine de mort cellulaire programmée 1
PVDF	Difluorure de polyvinylidène
ROS	Espèces réactives de l'oxygène
Rb	Protéines du rétinoblastome
RTK	Récepteurs tyrosine kinase
SDS	Dodécylsulfate de sodium
SH2	<i>Src Homology 2</i>
Skp2	<i>S-phase kinase-associated protein 2</i>
SIDA	Syndrome d'immunodéficience acquise
SNAI1	<i>Zinc finger protein SNAI1</i>
SNAI2	<i>Zinc finger protein SNAI2</i>
SRC	<i>Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src</i>
STAT3	<i>Signal transducer and activator of transcription 3</i>
Sox2	<i>Sex-determining region Y (SRY) – box 2</i>
TEM	Transition épithelio-mésenchymateuse
TGFβ	<i>Transforming Growth Factor Beta</i>
TGFβRI	Récepteur TGF-β de type I
TGFβRII	Récepteur TGF-β de type II
Tie-2	<i>Tyrosine kinase with immunoglobulin and EGF homology domains</i>
TIM3	<i>T-cell immunoglobulin and mucin containing protein-3</i>
TNFR-1	<i>Tumor necrosis factor receptor 1</i>
TNFR-2	<i>Tumor Necrosis Factor Receptor 2</i>
Tris-HCl	Tris-Hydrochloride
TNFα	<i>Tumor Necrosis Factor α</i>
TWIST	<i>Twist-related protein 1</i>
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
ZEB	<i>Zinc finger E-box-binding homeobox 1</i>

RÉSUMÉ

Une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires et des voies de signalisation impliquées dans les processus induisant la progression tumorale et surtout la prolifération cellulaire pourrait permettre le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques afin de limiter la contribution des cellules souches mésenchymateuses (MSCs) à la pathologie néoplasique. Parmi ces stratégies thérapeutiques, l'utilisation d'inhibiteurs tel l'épigallocatechine-3-gallate (EGCG), une molécule chimiopréventive dérivée du thé vert, pourrait cibler des voies de signalisation impliquées dans la progression tumorale. Les MSCs sont des cellules de soutien aux cellules cancéreuses et peuvent être recrutées au sein des foyers tumoraux hypoxiques suite à la sécrétion des cytokines tels TGF β et TNF α par les cellules cancéreuses. Cela leur confère un rôle important dans la régulation de la progression tumorale, du fait de leur capacité à migrer et à participer aux différents processus tumoraux y compris la prolifération cellulaire par l'induction de diverses voies de signalisation. Cela fait intervenir la protéine kinase SRC et le facteur de transcription STAT3. Puisque cette voie induit la forte expression de la cycline D1 régulatrice des kinases dépendantes des cyclines (CDK) conduisant à la formation de complexes cycline/CDK et la séquestration des protéines inhibitrices des CDK (CKI) comme la P21, ce qui favorise la division et la prolifération cellulaire et régule l'apoptose via l'expression l'agent anti-apoptotique Bcl-xL. Nous avons étudié l'efficacité de l'EGCG -une molécule présente dans de notre alimentation aux propriétés chimiopréventives et anti-inflammatoires- sur la régulation transcriptionnelle et protéique du cycle cellulaire et de l'agent anti-apoptotique dans les MSCs. Nous avons démontré que le point de contrôle G2/M est réduit beaucoup plus par le TGF β que par le TNF α . Nous avons ensuite constaté que l'EGCG inhibe l'induction par le TGF β et le TNF α de l'expression de cycline, CDK, CKI ainsi que la phosphorylation de la SRC et du facteur de transcription STAT3. Par conséquent, le ciblage pharmacologique des voies TGF β et TNF α régulant les processus de tumorigènese des MSCs met en lumière un rôle majeur contrant leur mobilisation au sein des microenvironnements tumoraux.

Mots clés : Cellules souches mésenchymateuses, épigallocatechine-3-gallate, cycle cellulaire, cytokine

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

1.1 CANCER ET CELLULES SOUCHES

1.1.1 CANCER

1.1.1.1 Généralités

Le cancer est l'une des maladies les plus répandues dans le monde, considéré comme "une blessure qui ne guérit jamais", affectant les fonctions de plusieurs tissus de l'organisme. Il se caractérise par une croissance et une propagation incontrôlée de cellules anormales menant à la formation d'une ou de plusieurs tumeurs malignes (Yin, Wang et al. 2021). Les cellules cancéreuses peuvent ainsi migrer et envahir d'autres organes situés à des sites distants de la tumeur primaire. Cette caractéristique définit la métastase, qui est la principale cause de morbidité et de mortalité par le cancer (Feitelson, Arzumanyan et al. 2015). Le cancer est causé par des facteurs externes tels que le tabac, les organismes infectieux, les produits chimiques et les rayons ionisants, et par des facteurs internes incluant les mutations, les hormones, les conditions immunitaires et l'inflammation chronique (Luqman and Pezzuto 2010).

Il existe plusieurs types de cancers, mais ceux-ci sont tous caractérisés par certaines capacités acquises par les cellules. Ces caractéristiques fondamentales sont : le maintien d'un signal pro-prolifératif, l'évasion aux signaux suppresseurs de croissance, l'évasion à la destruction par le système immunitaire, la résistance à l'apoptose, l'immortalité répliative, l'activation de l'invasion et la formation de métastases, l'induction de l'angiogenèse, l'instabilité du génome et mutations, la dérégulation des processus énergétiques cellulaires, et finalement, la présence d'un environnement

inflammatoire favorable à la progression tumorale (Bailón-Moscoso, Romero-Benavides and Ostrosky-Wegman 2014). Le type de tumeur, le pronostic et l'agressivité sont également influencés par l'origine de la tumeur, comme analysé par exemple dans les cancers du sein. Les tumeurs mammaires provenant de progéniteurs luminaux sont associées à un bon pronostic, à l'exception de celles surexprimant Her2. Tandis que, les tumeurs provenant de progéniteurs de type basal présentent un phénotype très agressif (Walcher, Kistenmacher et al. 2020).

Sachant que différents facteurs environnementaux contribuent au développement du cancer, de nombreuses recherches portent sur la prévention du cancer et sur l'impact de notre mode de vie à son développement (Irigaray, Newby et al. 2007). Il n'est donc pas étonnant que certains cancers puissent être facilement évités en éliminant des facteurs de risques liés au mode de vie tels le tabagisme, les mauvaises habitudes alimentaires et la sédentarité (<https://www.who.int/fr>).

1.1.1.2 Processus de la cancérogenèse

La formation de tumeurs chez l'homme est un processus complexe qui implique de multiples événements et facteurs et qui se déroule généralement sur une longue période. Les cellules cancéreuses humaines acquièrent plusieurs capacités que la plupart des cellules normales (Jakowlew 2006).

Il y a un siècle, la croissance tumorale seule était considérée comme le dérèglement fondamental, et les tumeurs étaient classées et décrites en fonction de leur taux de croissance. Aujourd'hui, on pense que la cancérogenèse est déclenchée par des mutations et une inhibition des suppresseurs de croissance, et ce développement des tumeurs malignes se produit à travers une longue période de temps, impliquant une série d'événements en se caractérisant par trois étapes critiques : la prolifération cellulaire, l'invasion tissulaire et le risque de métastases (Brücher and Jamall 2014). L'initiation est interprétée par des altérations génétiques et des dommages irréversibles

à l'ADN de la cellule provoqués par des agents mutagènes tels les substances chimiques, les virus ou la radiation (Béliveau and Gingras 2007, Hanahan and Weinberg 2011). Dans le cas d'une induction carcinogène par un agent chimique, l'initiation implique la capture de l'agent carcinogène, sa bio-distribution et son transport vers les organes ou les tissus dans le but d'être métabolisé. L'interaction d'un métabolite avec l'ADN cellulaire entraîne des dommages génotoxiques et cause des mutations. La promotion est l'expansion des cellules endommagées pour former une tumeur précancéreuse composée de nombreuses cellules en prolifération active. La progression est un processus irréversible qui génère de nouvelles cellules tumorales aux propriétés prolifératives, invasives et métastatiques accrues (Surh 1999, Neergheen, Bahorun et al. 2010). La figure 1-1 résume les trois étapes du développement d'un cancer: l'initiation, la promotion et la progression.

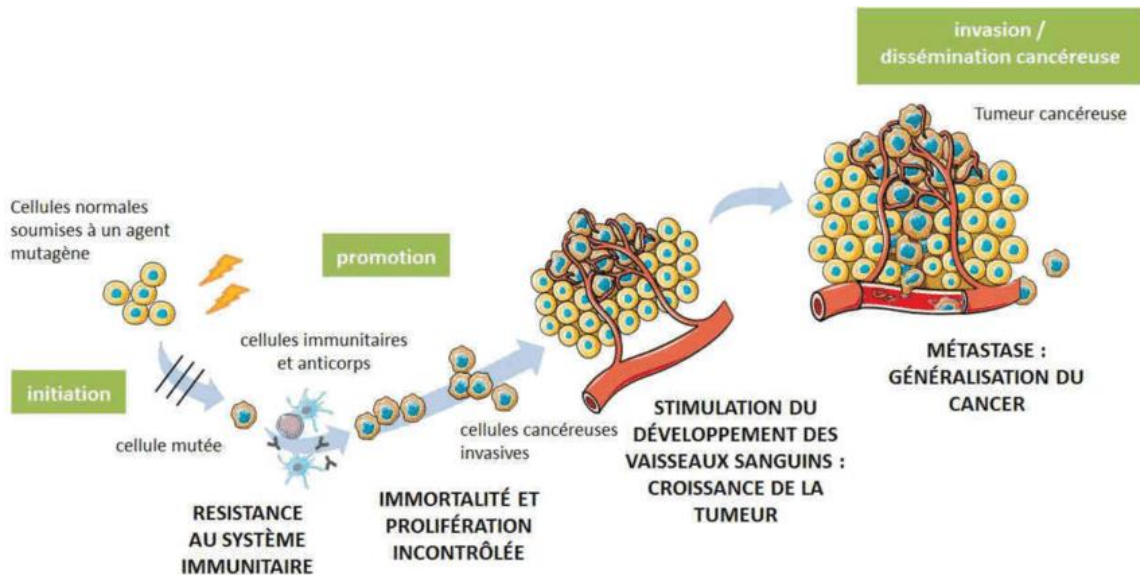


Figure 1-1 : Représentation schématique des étapes de la carcinogenèse (Mongis 2017)

1.1.1.3 Statistiques

Dans le monde, on estime à 18,1 millions le nombre de nouveaux cas de cancer (à l'exclusion du cancer de la peau sans mélanome) et à près de 10 millions le nombre de décès dus au cancer en 2020. Les taux de cancer et de la mortalité par cancer augmente rapidement (Ubago-Guisado, Rodríguez-Barranco et al. 2021). Ce phénomène est devenu l'un des problèmes de santé publique les plus importants dans les pays à revenu faible, moyen et élevé. L'Organisation mondiale de la santé a estimé qu'il y aura environ 22 millions de nouveaux cas de cancer, 13 millions de décès dus au cancer et environ 87 millions de personnes vivant avec le cancer en 2030. Les effets les plus importants de ces augmentations se produisent dans les pays à revenu faible et intermédiaire, où réside environ 82 % de la population mondiale (Mafrá da Costa, Ribeiro et al. 2021). Le risque global de développer un cancer est de 20,2 % (22,4 % chez les hommes et 18,2 % chez les femmes, respectivement). En ce qui concerne la mortalité, le cancer est la deuxième cause de décès dans le monde (8,97 millions de décès) après les cardiopathies ischémiques, mais deviendra probablement la première en 2060 (~18,63 millions de décès) (Mattiuzzi and Lippi 2019).

Au Canada en 2022, le nombre de nouveaux cas de cancer est estimé à 233 900 et le nombre de décès dus au cancer à 85 100. Les cancers les plus fréquemment diagnostiqués sont le cancer du poumon (30 000), le cancer du sein chez la femme (28 600) et le cancer de la prostate chez l'homme (24 600). Il a été prévu également que le cancer du poumon sera la principale cause de décès par cancer, représentant 24,3 % de tous les décès par cancer, suivi du cancer colorectal (11,0 %), du cancer du pancréas (6,7 %) et du cancer du sein (6,5 %) (Brenner, Poirier et al. 2022). Les taux d'incidence et de mortalité sont plus élevés dans les provinces de l'est du Canada que dans les provinces de l'ouest. Bien que les taux globaux de cancer soient en baisse, le nombre de cas et de décès continuent d'augmenter en raison de la croissance démographique et du vieillissement de la population. La charge élevée prévue pour le cancer du poumon

indique la nécessité de renforcer la lutte contre le tabagisme et d'améliorer la détection et le traitement précoces. Les succès obtenus dans le dépistage et le traitement des cancers du sein et colorectal expliquent probablement la baisse continue de leur charge. Les progrès limités en matière de détection précoce et de nouveaux traitements du cancer du pancréas expliquent pourquoi on s'attend à ce qu'il soit la troisième cause de décès par cancer au Canada (Brenner, Poirier et al. 2022).

Par conséquent, en raison de sa complexité le cancer est une maladie nécessitant un traitement multifactoriel. Il est donc essentiel de tenir compte de toutes les variables présentes dans le développement tumoral, telles que les cellules souches étant des facteurs majeurs contribuant à la métastase des cellules cancéreuses par leur capacité d'auto-renouvellement et leur potentiel de différenciation (Yang, Shi et al. 2020, Babaei, Aziz and Jaghi 2021).

1.1.2 LES CELLULES SOUCHES ADULTES

Au cours des dernières décennies, les chercheurs et les praticiens du cancer ont progressivement déplacé leur focus des cellules cancéreuses les cellules cancéreuses et les cellules souches. Les cellules souches sont capables de s'auto-renouveler, de se différencier en diverses cellules matures en fonction de leur tissu d'origine et de migrer sans restriction vers les tissus (pour certaines). Dans l'organisme, les cellules souches adultes sont responsables du renouvellement des cellules dans la plupart des tissus et de la réparation tissulaire en réponse à une blessure ou à une maladie. Cependant, leur nature proliférative les rend également dangereuses. Les mécanismes d'auto-régulation, quand il y a trop de progéniteurs, activent un signal dans les cellules souches pour les remettre dans un état de quiescence et pour produire moins de progéniteurs (Yin, Wang et al. 2021). Un dérèglement de ces mécanismes qui maintiennent les cellules souches dans un état quiescent et non prolifératif peut entraîner un cancer. Toutefois, à la suite de mutations génétiques ou dans certaines circonstances, ces processus peuvent être

perturbés, entraînant une transformation maligne des cellules souches. Ces cellules dotées de plasticité deviennent alors de plus en plus agressives et s'adaptent très bien aux conditions difficiles, par exemple aux traitements anticancéreux (Yin, Wang et al. 2021). Bien que de nombreux essais cliniques étudient l'utilisation des cellules souches adultes pour traiter des maladies, comme les cancers hématologiques et les maladies neurodégénératives -Parkinson et l'Alzheimer- (Gouvernement du Canada, 2006) peu d'entre eux ont abouti à des thérapies approuvées (Cable, Fuchs et al. 2020). La greffe de moelle osseuse, qui utilise des cellules souches hématopoïétiques (CSH) pour régénérer les cellules sanguines, est utilisée pour traiter plusieurs types de cancers hématologiques et d'autres affections, et la thérapie par cellules souches cutanées a réussi à régénérer la peau des brûlés. Aux États-Unis, les seuls produits à base de cellules souches approuvés par la Food and Drug Administration (FDA) sont les cellules progénitrices hématopoïétiques dérivées du sang de cordon. En Europe, une thérapie à base de cellules souches oculaires, Holoclar®, a été approuvée en 2015 pour les lésions cornéennes. D'autres utilisations des thérapies basées sur les cellules souches restent expérimentales (Cable, Fuchs et al. 2020).

1.1.2.1 Cellules souches hématopoïétiques

Les cellules souches hématopoïétiques (HSC) sont une population de cellules ayant la capacité de se reconstituer par auto-renouvellement et de donner naissance à des lignées cellulaires différenciées (Cao, Wang et al. 2019). L'hématopoïèse est l'un des systèmes pionniers dès 1908 qui a proposé et adapté le concept de "cellule souche" pour expliquer la diversité des lignées sanguines. Cette entité multipotente sont des cellules rares que l'on trouve dans la moelle osseuse, le sang périphérique, le placenta et ailleurs qui soutiennent le système hématopoïétique (Smith and Storms 2000, Clevers 2015).

Cependant, les preuves expérimentales de l'existence de telles cellules souches chez les mammifères étaient rares jusqu'à ce que deux canadiens de l'Université de Toronto réalisent une série d'expériences au début des années 1960, au cours desquelles McCulloch et Till ont injecté des cellules de moelle osseuse à des souris fortement irradiées. Après cette injection de petits nodules se sont développés sur la rate des souris irradiées 1 à 2 semaines plus tard, dont le nombre était proportionnel au nombre de cellules de moelle injectées (Steensma and Kyle 2021). Till et McCulloch ont nommé ces nodules « colonies de rate » et ont observé qu'ils se différenciaient en trois lignées sanguines primaires : les globules rouges, les globules blancs et les plaquettes. Les nodules étant rares, Till et McCulloch ont alors émis l'hypothèse que chaque nodule provenait d'une seule cellule souche (Steensma and Kyle 2021).

Plus tard, Till et McCulloch ont obtenu la preuve que certaines des cellules des colonies de rate s'auto-renouvelaient également, une autre propriété essentielle d'une cellule souche. Des études chromosomiques ont montré que les colonies de rate constituaient un groupe de cellules génétiquement identiques et représentaient donc un seul clone. D'autres expériences ont démontré que certaines souches de souris anémiques présentaient un microenvironnement médullaire défectueux qui ne pouvait pas supporter la production de cellules sanguines par les cellules souches hématopoïétiques (Steensma and Kyle 2021).

Deux types de HSC, le phénotype α et le phénotype β , sont maintenant connus pour avoir un potentiel de différenciation persistant. Le premier type produit des populations avec une concentration plus élevée de cellules myéloïdes (macrophages et granulocytes) que de cellules lymphoïdes (lymphocytes T et B). En revanche, le second type produit une population plus équilibrée suivant les deux types de différenciation (Dykstra, Kent et al. 2007).

Le potentiel de régénération des HSC a déjà été traduit avec succès en applications cliniques. Il est crucial pour le traitement de diverses maladies sanguines malignes et auto-immunes et est couramment utilisé en hématologie clinique actuelle. La modification génétique *ex vivo* des HSC pour la transplantation autologue ouvre de nouvelles voies thérapeutiques pour les maladies génétiques et infectieuses (Alessandrini, Krause et al. 2019). Des progrès majeurs ont été réalisés au cours des trois dernières décennies en matière de modification génétique des HSC et de stratégies de transplantation, aboutissant finalement à l'approbation de deux de ces thérapies en Europe (Strimvelis pour un déficit immunitaire primaire rare et LentiGlobin pour la bêta-thalassémie). De nouvelles technologies de modification génétique et de nouveaux schémas thérapeutiques sont également apparus, ce qui est très prometteur pour le développement de traitements plus sûrs et plus efficaces (Alessandrini, Krause et al. 2019).

Parallèlement à l'approbation de trois autres thérapies de modification génique en 2017, à savoir deux thérapies par cellules T à récepteur d'antigène chimérique (CAR) contre les tumeurs malignes des cellules B (axicabtagene ciloleucel (Gilead-Kite Pharma, États-Unis) et tisagenlecleucel (Novartis, Suisse), ainsi que Luxturna (Spark Therapeutics, USA)) pour une forme héréditaire de perte de vision – une nouvelle ère de la médecine moderne est entrée dans laquelle on peut imaginer l'utilisation de « remèdes à traitement unique » pour des maladies potentiellement mortelles et auparavant incurables (Alessandrini, Krause et al. 2019).

1.1.2.2 Cellules souches mésenchymateuses

Les cellules souches mésenchymateuses (MSCs) sont des cellules stromales qui ont la capacité de s'auto-renouveler et de se différencier en plusieurs lignées. Les MSC peuvent être isolées à partir de divers tissus, tels que le cordon ombilical, les polypes endométriaux, le sang menstruel, la moelle osseuse, le tissu adipeux, etc. En

effet, la facilité de prélèvement et la quantité obtenue rendent ces sources plus pratiques pour des applications expérimentales et cliniques (Ding, Shyu and Lin 2011), pour le traitement de maladies humaines, notamment les troubles neurologiques, les dysfonctionnements pulmonaires, les troubles métaboliques, les maladies liées au système endocrinien, les troubles de la reproduction, les brûlures cutanées et les problèmes cardiovasculaires (Hoang, Pham et al. 2022). En effet, les BM-MSCs sont potentiellement de bons candidats pour le traitement des lésions cérébrales et médullaires, les MSCs du tissu adipeux sont potentiellement de bons candidats pour le traitement des troubles de la reproduction et la régénération cutanée, et les MSCs provenant du cordon ombilical sont potentiellement de bons candidats pour les maladies pulmonaires et le traitement du syndrome de détresse respiratoire aiguë (Hoang, Pham et al. 2022).

Les MSCs peuvent se différencier en diverses lignées mésodermiques, ectodermiques et endodermiques (Figure 1-2). La plupart des MSCs provenant du sang menstruel ont la capacité de se différencier en cellules musculaires, et particulièrement cardiaques, elles peuvent aussi se différencier en neurones, donc elles sont neurogéniques et elles pourraient être utilisées à l'avenir dans le traitement des accidents vasculaires cérébraux (Ding, Shyu and Lin 2011). Les MSCs provenant de l'endomètre possèdent le marqueur CD146 et pourrait être responsables de sa croissance; c'est une nouvelle source pour les applications d'ingénierie tissulaire (Ding, Shyu and Lin 2011). Elles sont aussi capables de se différencier en diverses lignées : cellules cardio-myocytaires, épithéliales respiratoires, neurocytiques, myocytaires, endothéliales, pancréatiques, hépatiques, adipocystiques et ostéogéniques (Ding, Shyu and Lin 2011). En outre, celles dérivées des trompes de Fallope peuvent se différencier en lignées adipogéniques, chondrogéniques, oostogéniques et myogéniques (Ding, Shyu and Lin 2011). Les MSCs provenant des ligaments croisés peuvent se différencier en chondrocytes, adipocytes et ostéocytes; elles pourraient constituer une source alternative viable pour la médecine régénérative. Les cellules souches dérivées du cordon ombilical peuvent se différencier

en cellules neuronales et gliales et peuvent synthétiser différentes cytokines et servir de cellules thérapeutiques dans plusieurs modèles précliniques, tels que les maladies neurodégénératives, le cancer, les maladies cardiaques, etc (Ding, Shyu and Lin 2011).

Les MSC peuvent être identifiées selon la Société Internationale de Thérapie Cellulaire (ISCT) par des critères minimaux. Premièrement, les MSC doivent adhérer au plastique lorsqu'elles sont maintenues dans des conditions de culture standard. Deuxièmement, elles doivent exprimer un panel spécifique de marqueurs de surface cellulaire comme : CD105, CD73 et CD90 et ne pas exprimer les molécules de surface CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79alpha ou CD19 et HLA-DR. Troisièmement, les MSC doivent se différencier en ostéoblastes, adipocytes et chondroblastes *in vitro* (Brochard 2019).

. Leurs qualités biologiques polyvalentes, notamment leurs capacités immunomodulatrices, anti-inflammatoires et pro-régénératrices, reposent en grande partie sur leur capacité migratoire et sécrétoire. Elles peuvent interagir de manière robuste avec les cellules des systèmes immunitaires innés et adaptatifs, soit par contact direct cellule-cellule, soit par l'intermédiaire de leur sécrétome (Uccelli, Moretta and Pistoia 2008, Li and Hua 2017). Elles sont attirées par les sites de lésions tissulaires et sécrètent des facteurs qui favorisent l'autoréparation du tissu lésé. Il s'agit là d'une perspective importante pour les applications cliniques des MSCs en médecine vétérinaire et humaine et leur utilisation est moins problématique à l'égard des considérations éthiques et juridiques (Uder, Brückner et al. 2018).

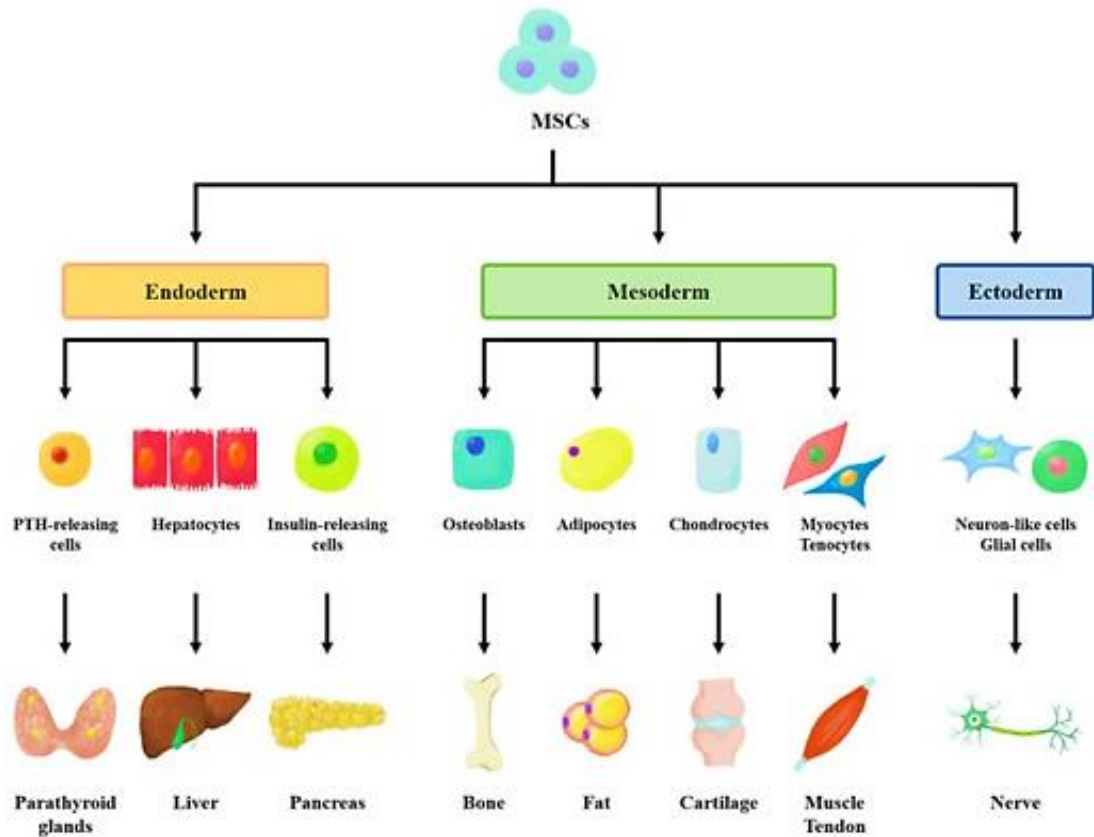


Figure 1-2 : Diagramme schématique de la différenciation de la lignée des MSCs. Les MSCs ont le potentiel de se différencier en lignées endodermiques (cellules libérant de l'insuline/PTH, hépatocytes), mésodermiques (ostéoblastes, chondrocytes, adipocytes,, myocytes et oocytes) et ectodermiques (cellules de type neurone ou gliales). Abréviations : PTH, hormone parathyroïdienne ; MSCs, cellules souches mésenchymateuses (Oh, Choi et al. 2019)

1.1.2.3 Cellules endothéliales progénitrices

Les cellules endothéliales progénitrices (EPC) sont une population de cellules souches présentes dans le sang périphérique possédant une origine endothéliale aussi bien qu'une origine hématopoïétique, provenant d'un précurseur commun avec les cellules souches hématopoïétiques, l'hémangioblaste (Peters 2018). Elles possèdent des marqueurs de surface tels que : CD34 et Flk-1/KDR, CD45, CD31, Tie-2. Il a été démontré qu'il était possible d'isoler des EPC surtout du sang périphérique, de la moelle osseuse et du sang du cordon ombilical (Peters 2018).

En outre, les EPC du sang périphérique adulte peuvent contribuer à l'angiogenèse thérapeutique, ce qui nous permet de les utiliser comme thérapie cellulaire autologue pour les patients souffrant de maladies cardiovasculaires (Peters 2018).

1.1.2.4 Cellules souches cancéreuses

La première preuve de l'existence des cellules souches cancéreuses (CSC) a été documentée en 1937 (Yin, Wang et al. 2021). Ces cellules considérées comme une sous-population de cellules cancéreuses -dont le potentiel d'initiation de la tumeur est fortement accru par rapport aux autres cellules cancéreuses au sein d'une tumeur- présentent un potentiel d'auto-renouvellement et la capacité d'engendrer une progéniture non CSC. À l'instar des cellules souches normales, un petit nombre de CSC peut donner naissance à une tumeur composée de cellules à prolifération rapide et de cellules différenciées (Yin, Wang et al. 2021). Leurs marqueurs de surface sont : CD33, CD123, CLL-1, TIM3 et les marqueurs intracellulaires sont : ALDH, Nanog, Oct-3/4, Sox2 et CD44 (Walcher, Kistenmacher et al. 2020).

Ces cellules souches cancéreuses sont un constituant majeur du microenvironnement tumoral et ont un rôle dans la tumorigenèse, la métastase, et dans la progression du cancer. Cependant, la transformation des cellules souches en cellules cancéreuses

nécessite encore quelques mutations pour devenir l'origine, ou le transmetteur des cancers en permettant une prolifération incontrôlée et indépendante de la niche (Walcher, Kistenmacher et al. 2020, Yin, Wang et al. 2021). Les tumeurs générées à partir des CSC sont censées suivre une hiérarchie unidirectionnelle, dans laquelle seule la population des CSC est capable d'initier la croissance tumorale. Au moment de l'initiation de la tumeur, les CSC se divisent de manière asymétrique pour maintenir le pool de CSC (Walcher, Kistenmacher et al. 2020).

1.1.3 Contribution des cellules souches mésenchymateuses au développement tumoral

L'initiation d'une tumeur peut être le fait de cellules différenciées transformées ou de cellules souches résidant dans les tissus transformés (Yin, Wang et al. 2021). De plus en plus de preuves suggèrent que les cellules souches mésenchymateuses (MSCs) contribuent de manière importante au développement de la résistance aux médicaments anticancéreux. Les MSCs se dirigent vers les sites de la tumorigénèse et participent à la formation du stroma tumoral, leur abondance dans les tissus tumoraux prédisait un mauvais pronostic chez les patients atteints de cancer (He, Liang et al. 2019).

La progression tumorale dépend de l'interaction entre les cellules tumorales et les cellules du microenvironnement. Les MSCs peuvent interagir avec les cellules tumorales via la signalisation paracrine. Plus récemment, il a été démontré que les interactions entre les cellules tumorales et les MSCs augmentent le potentiel métastatique et favorisent la transition épithéliale-mésenchymateuse (Ridge, Sullivan and Glynn 2017).

Les cellules cancéreuses subissent une reprogrammation métabolique pour soutenir leur croissance et leur progression dans le microenvironnement tumoral complexe. Pour cela, le TGF β 1 sécrété par les MSC active SMAD2/3 par l'intermédiaire des

récepteurs TGF β , ce qui induit ensuite l'expression de l'ARN non codant MACC1-AS1 dans les cellules cancéreuses favorisant le caractère souche et la chimiorésistance. Et cela en augmentant les niveaux d'expression des gènes du caractère souche tels : CD133, OCT4, Sox2 et LIN28 à la fois au niveau de l'ARNm et des protéines (He, Liang et al. 2019). L'expression de ces gènes indique une capacité d'auto-renouvellement accrue des cellules cancéreuses (He, Liang et al. 2019). Les MSCs jouent aussi un rôle complexe dans la transition épithelio-mésenchymateuse (TEM) et exercent des effets régulateurs multiples sur la pathogenèse tumorale (figure 1-3) dans son ensemble (Tu and Karnoub 2022).

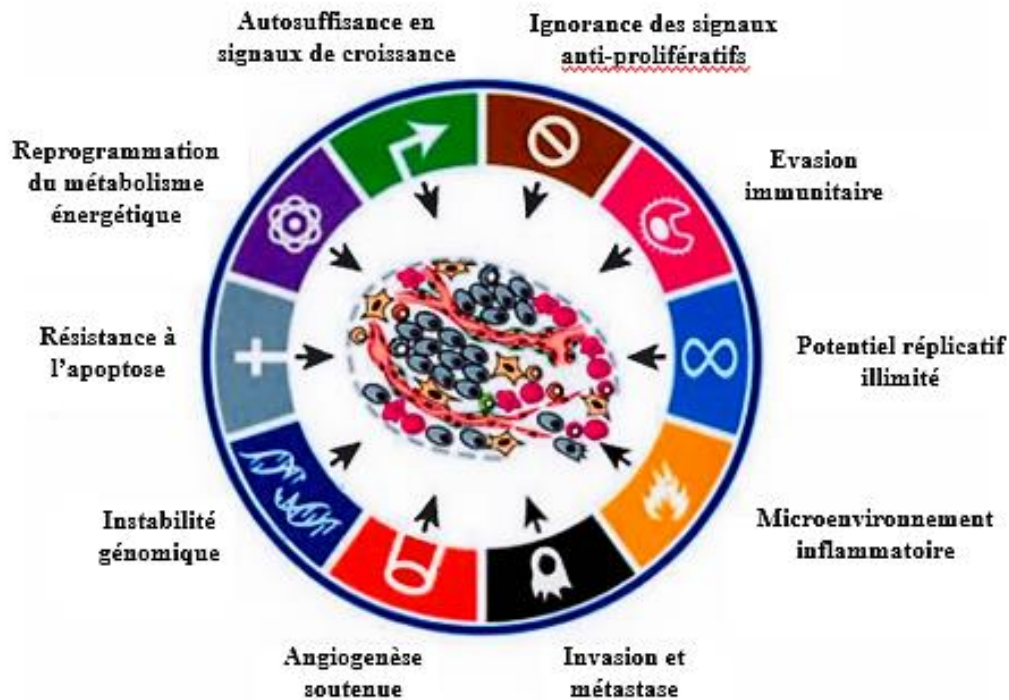


Figure 1-3 : Caractéristiques fondamentales des mécanismes participants au développement tumoral (Hanahan and Weinberg 2011)

1.2 LES CYTOKINES

1.2.1 Définition

Les systèmes immunitaires innés et adaptatifs de l'homme sont constitués de cellules effectrices produisant des cytokines (interleukines, interférons, chimiokines et de nombreux autres médiateurs). Les cytokines sont des protéines solubles de faible poids moléculaire (\approx 6-70 kDa), sécrétées par diverses cellules (lymphocytes, macrophages, cellules tueuses naturelles (NK), mastocytes et cellules stromales) avec différents modes d'action autocrine, paracrine ou endocrine (He, Rüker et al. 1992). Elles participent à la réponse immunitaire et agissent comme d'importants médiateurs associés au réseau de communication du système immunitaire. En général, un équilibre fragile entre les effets pro- et anti-inflammatoires est maintenu par des mécanismes de régulation complexes (Liu, Xu et al. 2022) (Jarczak and Nierhaus 2022).

Les cytokines pro-inflammatoires, notamment l'IL-1 β , l'IL-6, l'IL-8, l'IL-12, le TNF- α et les interférons, facilitent les réactions inflammatoires et tendent à stimuler les cellules immunocompétentes. Les principales cytokines anti-inflammatoires comprennent l'antagoniste du récepteur de l'IL-1 (IL-1RA), l'IL-4, l'IL-10, l'IL-11, l'IL-13 et le TGF β (Opal and DePalo 2000, Liu, Xu et al. 2022). Dans des conditions physiologiques, ces cytokines anti-inflammatoires servent d'éléments immunomodulateurs qui limitent les effets potentiellement nocifs de réactions inflammatoires soutenues ou excessives. Dans des conditions pathologiques, ces médiateurs anti-inflammatoires peuvent soit (1) exercer un contrôle insuffisant sur les activités pro-inflammatoires dans les maladies à médiation immunitaire, soit (2) surcompenser et inhiber la réponse immunitaire, exposant ainsi l'hôte à un risque d'infection systémique. Les perturbations de ce réseau de régulation des cytokines par des éléments génétiques, environnementaux ou microbiens peuvent avoir des conséquences très néfastes (Opal and DePalo 2000). Cela peut provoquer des

sécrétions en excès de cytokines et des maladies notamment l'asthme, l'athérosclérose, le cancer, la dépression, les maladies cardiaques, le syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA), les lésions rénales, la septicémie, la polyarthrite rhumatoïde et d'autres maladies chroniques (Liu, Xu et al. 2022).

Au cours des 40 dernières années, les cytokines sont devenues un élément important de la médecine et occupent une place essentielle en tant qu'agents diagnostiques, pronostiques et thérapeutiques dans les maladies humaines (Dinarello 2007).

1.2.2 Rôle des cytokines dans le développement tumoral

Plusieurs études ont montré une relation entre les cytokines et le cancer. Certaines cytokines peuvent jouer un rôle dans l'immunité et dans la progression tumorale. Les interleukines peuvent favoriser un environnement propice au développement et à la progression du cancer tout en étant essentielles à une réponse immunitaire productive dirigée contre la tumeur (Tulotta and Ottewell 2018). Il y a une interaction mutuelle entre le système immunitaire et les cellules cancéreuses aboutissant au développement et à la progression du cancer. La résistance aux attaques immunitaires et la présence d'une inflammation protumorale sont deux des principales caractéristiques du cancer. Cependant, après un événement oncogène, la signalisation des interleukines dans les cellules cancéreuses peut devenir un mécanisme pathologique de croissance tumorale, de propagation métastatique et de progression du cancer (Briukhovetska, Dörr et al. 2021).

Dans le contexte d'une inflammation chronique, l'IL-1 peut favoriser directement la production de médiateurs cancérogènes, tels que l'oxyde nitrique et les espèces réactives de l'oxygène (Briukhovetska, Dörr et al. 2021). En outre, la signalisation de l'IL-1 induit la sécrétion d'IL-17 et d'IL-22 pro-tumorigènes. Cette dernière a été associée à l'activation et la phosphorylation de STAT3, fournissant des signaux de prolifération

et de migration aux cellules malignes, maintenant leur caractère souche par l'induction de Sox2 et de NANOG (Briukhovetska, Dörr et al. 2021). L'IL-20 agit de manière similaire à l'IL-22 dans le carcinome hépatocellulaire et les cancers du sein, de la prostate et de la bouche, et induit également une inhibition immunitaire par le biais de la régulation à la hausse de la protéine de mort cellulaire programmée 1 (PD1) dans le cancer du pancréas (Briukhovetska, Dörr et al. 2021). La sécrétion de l'IL-17 contribue à la tumorigenèse, dans des modèles murins de cancers de la peau et du côlon. Dans les cellules souches de la peau, la signalisation de l'IL-17A peut recruter le récepteur EGFR, ce qui induit l'expansion et la migration de ces cellules. Par conséquent, les réponses inflammatoires déclenchent des programmes cellulaires dans des conditions d'activation chronique incontrôlée et peuvent constituer un lien direct avec la tumorigenèse (Briukhovetska, Dörr et al. 2021).

Des travaux récents ont démontré que l'IL-33 peut créer une niche tumorigène qui favorise le développement d'une tumeur naissante en provoquant l'infiltration de macrophages associés à la tumeur et favorisant la signalisation du TGF β (Briukhovetska, Dörr et al. 2021). L'activation excessive de STAT3 par la surabondance d'IL-6 et d'IL-11, combinée à des mutations oncogènes, permet le développement de tumeurs malignes telles que les cancers du côlon et de l'estomac, du pancréas et du poumon. Il est important de noter que l'IL-6 induit également l'angiogenèse et la vascularisation des tumeurs par le biais du VEGF (Briukhovetska, Dörr et al. 2021). Il a été démontré que l'IL-23 favorise directement l'incidence et la croissance des tumeurs et que l'IL-18 favorise l'angiogenèse par l'activation de NF- κ B, qui déclenche la sécrétion de VEGF par les cellules cancéreuses, induit leur prolifération et leur invasion et empêche l'apoptose (Briukhovetska, Dörr et al. 2021).

En outre, l'activation chronique de STAT3 dans les cellules cancéreuses induit la prolifération, l'expression de métalloprotéinases matricielles et la migration, augmentant ainsi l'agressivité des carcinomes. Ces effets sont généralement associés à

la transition épithéliale-mésenchymateuse (TEM), qui est orchestrée par les facteurs de transcription tels que ZEB, SNAI1, SNAI2, SLUG et TWIST, et permet le détachement des cellules, la propagation métastatique et l'invasivité (Briukhovetska, Dörr et al. 2021). La TEM induite par le réseau intégré d'IL-1 β , IL-6, IL-17, IL-22 et IL-23 est le médiateur de l'invasivité de nombreux types de cancer (Briukhovetska, Dörr et al. 2021).

1.2.3 Le facteur de croissance transformant beta

Le TGF β est une cytokine anti-inflammatoire, molécule immunorégulatrice qui inhibe la réponse inflammatoire excessive des cytokines pro-inflammatoires (Liu, Xu et al. 2022). Les cytokines de la famille TGF β sont codées par 33 gènes chez les mammifères et comprennent des homo- et hétérodimères. Elles sont omniprésentes, multifonctionnelles et essentielles à la survie. Elles jouent un rôle important dans la croissance et le développement, l'inflammation, la réparation et l'immunité de l'hôte (Clark and Coker 1998) (Lichtman, Otero-Vinas and Falanga 2016).

Les isoformes TGF β (TGF β 1, TGF β 2 et TGF β 3) sont sécrétées sous forme de précurseurs latents, présentent une homologie significative (entre 60 et 80 %) et possèdent de multiples récepteurs à la surface des cellules, dont deux au moins assurent la transduction du signal. Les effets autocrines et paracrines du TGF β peuvent être modifiés par la matrice extracellulaire et d'autres cytokines (Clark and Coker 1998, Lichtman, Otero-Vinas and Falanga 2016). La superfamille du TGF β est un médiateur important de la cicatrisation des plaies en régulant la prolifération et la migration. Les trois protéines sont sécrétées dans un complexe latent dimérisé, qui contient également une protéine latente de liaison au TGF β (LTGF- β) (Morikawa, Derynck and Miyazono 2016). La thrombine et d'autres protéases sériques activent le TGF β en clivant la LTGF β . Le TGF β 1 exerce son effet par l'intermédiaire de l'hétérodimérisation de deux récepteurs transmembranaires primaires, le récepteur TGF β de type I (TGF β RI) et le

récepteur TGF β de type II (TGF β RII) (Lichtman, Otero-Vinas and Falanga 2016). Ces derniers assurent la transduction de la signalisation intracellulaire via la voie Smad en phosphorylant les Smads (Smad1, 2, 3, 5 et 8). Les récepteurs R-Smads activés forment des complexes avec un partenaire commun co-Smad (Smad4) (Lichtman, Otero-Vinas and Falanga 2016, Morikawa, Derynck and Miyazono 2016).

Aujourd'hui, il est largement admis que le TGF β régule une variété d'événements clés dans le développement normal et la physiologie, et la perturbation de la signalisation du TGF β a été impliquée dans la pathogenèse de maladies telles que les troubles du tissu conjonctif, la fibrose et le cancer (Morikawa, Derynck and Miyazono 2016). L'un des effets biologiques du TGF β est l'inhibition de la prolifération de la plupart des cellules épithéliales normales par un mécanisme d'action autocrine, ce qui suggère un rôle de suppresseur de tumeurs pour le TGF β . La perte de l'activité autocrine du TGF β conduit à une progression maligne de la croissance cellulaire. Cela suggère un rôle pro-oncogénique du TGF β en plus de son rôle de suppresseur de tumeurs (Jakowlew 2006). Le TGF β est apparu comme un puissant moteur de la progression du cancer, non seulement par ses rôles immunosuppresseurs et pro angiogéniques, mais aussi comme un puissant inducteur de la plasticité épithéliale conduisant à la TEM, dans laquelle les cellules épithéliales acquièrent un phénotype mésenchymateux, ce qui entraîne une augmentation de la motilité et de l'invasion (Nailing, Zhi and Xueling 2015).

1.2.4 Le facteur de nécrose tumorale alpha

Le TNF α est une protéine transmembranaire de type II avec une extrémité N intracellulaire. Il a un potentiel de signalisation à la fois en tant que protéine intégrée à la membrane et en tant que cytokine soluble libérée après clivage protéolytique (Balkwill 2006).

En 1975, le TNF α a été décrit pour la première fois en tant que protéine pouvant causer des lésions cérébrales. Le gène du TNF α se trouve sur le bras court du chromosome humain numéro 6, à proximité du gène de la lymphotoxine. Une pro-hormone de 233 acides aminés subit un clivage protéolytique d'un peptide signal de 76 résidus, ce qui donne la cytokine circulante, une protéine de 157 acides aminés d'un poids moléculaire de 17 KDa. Cette forme sécrétée contient une liaison disulfure intra-chaîne et existe sous forme de dimère ou de trimère en solution (Saklatvala, Davis and Guesdon 1996, van Horssen, Rens et al. 2006). Le TNF α est principalement produit suite à l'activation des macrophages, des monocytes et des lymphocytes T lors d'une inflammation aiguë. Sa production est augmentée par divers stimuli, notamment le lipopolysaccharide (LPS) composant la paroi cellulaire des bactéries gram négatives, le lipide A, l'interleukine-2, l'interféron-T, les protozoaires, les particules virales et pendant la privation de nourriture de l'hôte (Rock and Lowry 1991).

Les fonctions biologiques du TNF α sont variées et son mécanisme d'action est quelque peu complexe. Cette protéine joue plusieurs rôles thérapeutiques dans l'organisme, notamment l'immunostimulation, la résistance aux agents infectieux, la résistance aux tumeurs, la régulation du sommeil et le développement embryonnaire. D'autre part, les infections parasitaires, bactériennes et virales deviennent plus pathogènes ou fatales en raison de la circulation du TNF α , joue des rôles contradictoires. Ceci peut être lié au rôle du TNF α dans l'induction de l'inflammation aiguë et l'activation d'un large éventail d'événements de signalisation au sein des cellules, conduisant à la nécrose ou à l'apoptose (Idriss and Naismith 2000).

Le TNF α exerce ses effets en se liant à des récepteurs de haute affinité présents en grand nombre sur la plupart des membranes cellulaires, notamment le TNFR-1 (55 KDa) présent sur la majorité des cellules de l'organisme et TNFR-2 (75 KDa) qui s'exprime principalement sur les cellules hémopoïétiques. Le complexe

ligand/récepteur est rapidement internalisé via des puits recouverts de clathrine et aboutit dans les lysosomes secondaires où il est dégradé (Balkwill 2006).

Le TNF exerce ses effets en activant un certain nombre de protéines secondaires qui provoquent diverses réponses au sein de la cellule, telles que l'activation de la transcription des gènes et/ou la production de radicaux réactifs de l'oxygène ou de l'azote (le NO) (Idriss and Naismith 2000). Les protéines activées comprennent la Protein G les facteurs de transcription (NF- κ B, AP-1), les protéines kinases (CK II, erk-1, erk-2 et MAP2), les phospholipases (PLA2, PLC, PLD et sphingomyélinase), les protéines mitochondriales (manganèse superoxyde dismutase) et des protéases à sérine et à cystéine, connues sous le nom de caspases (Idriss and Naismith 2000).

Le TNF α est l'un des principaux médiateurs inflammatoires impliqués dans les cancers. Cependant, lorsqu'il est produit dans le microenvironnement tumoral, le TNF α peut agir comme un promoteur endogène de la tumeur (Balkwill 2006). Dans ce système, le NF- κ B a été identifié comme le lien moléculaire critique dans la promotion du développement tumoral. La voie NF- κ B a une double action dans la promotion de la tumeur : d'abord en empêchant la mort des cellules à potentiel malin, et d'autre part en stimulant la production de cytokines pro-inflammatoires (Frances Balkwill, 2006).

Il a été démontré que ce médiateur inflammatoire provoque une régression nécrotique rapide de certaines formes de tumeurs (d'où son nom) (Idriss and Naismith 2000). Le TNF α a été caractérisé comme le facteur clé dans la majorité des maladies inflammatoires (van Horssen, Rens et al. 2006).

1.3 LE CYCLE CELLULAIRE

Le cycle cellulaire est la série d'événements qui permettent à la cellule de se diviser et produire une nouvelle cellule fille (Wang 2021). La progression du cycle

cellulaire assure en temps voulu la croissance de la cellule, la duplication de son génome et sa division. Le processus est étroitement régulé par la présence de multiples points de contrôle qui assurent la progression à travers les différentes phases du cycle cellulaire (Dai, Zhao et al. 2018). La plupart des événements cellulaires, y compris la duplication de l'ADN, la transcription des gènes, la traduction des protéines et leur modification post-traductionnelle, se déroulent en fonction du cycle cellulaire (Wang 2022).

Au cours des dernières années, une vaste littérature a illustré la pertinence de la dérégulation du cycle cellulaire dans le cancer humain (Matthews, Bertoli and de Bruin 2022). Les mutations associées au cancer qui perturbent le contrôle du cycle cellulaire permettent une division cellulaire continue, principalement en compromettant la capacité des cellules à sortir du cycle cellulaire. Les cycles de division continus entraînent toutefois une dépendance accrue à l'égard d'autres mécanismes de contrôle du cycle cellulaire afin d'éviter des niveaux catastrophiques de dommages et de maintenir la viabilité des cellules (Matthews, Bertoli and de Bruin 2022).

1.3.1 Les différentes phases du cycle cellulaire

Le cycle cellulaire typique des eucaryotes se compose de quatre phases : G1, S, G2 et M (figure 1-4). Les phases G1, S et G2 sont appelées interphases. La phase M comprend la mitose, au cours de laquelle le noyau de la cellule se divise, et la cytokinèse, au cours de laquelle le cytoplasme de la cellule se divise pour former deux cellules filles. La mitose et la cytokinèse sont étroitement liées. La mitose est elle-même divisée en cinq sous-phases : prophase, prométaphase, métaphase, anaphase et télophase. Chaque phase de la progression du cycle cellulaire dépend de l'achèvement correct de la phase qui la précède (Wang 2022).

Au cours de la phase G1, la cellule se développe et grossit. La cellule entre en phase S lorsqu'elle atteint une certaine taille, au cours de laquelle la cellule duplique son ADN. De ce fait, la taille de la cellule est un facteur susceptible d'initier la division cellulaire : À mesure que la cellule grossit, elle devient inefficace sur le plan physiologique, en raison de l'accroissement de son rapport surface/volume. La solution à ce problème est donc la division. Durant la phase G2 qui suit, la cellule contrôle l'achèvement de la réplication de l'ADN et se prépare à la mitose. La ségrégation des chromosomes et la division cellulaire s'achèvent en phase M. La progression correcte du cycle cellulaire garantit que chacune des deux cellules filles reçoit un chromosome identique de la cellule mère. Après la division cellulaire, le cycle cellulaire est terminé et les cellules reviennent en phase G1. Les cellules en phase G1 peuvent sortir du cycle cellulaire et entrer en phase G0, un état de quiescence (Schönenberger, Deutzmann et al. 2015, Wang 2021). La durée du cycle cellulaire varie entre 10 et 30 heures dans la plupart des cellules de mammifères, la durée de la phase G1 est d'environ 11 heures, la durée de la phase S est de 8 heures, la durée de la phase G2 est de 4 heures et la durée de la phase M est d'environ 1 heure (Kamranvar, Gupta et al. 2022).

1.3.2 Le contrôle du cycle cellulaire

Il existe trois principaux points de contrôle du cycle cellulaire, notamment le point de contrôle G1/S (également appelé point de restriction), le point de contrôle des dommages à l'ADN G2/M et le point de contrôle de l'assemblage du fuseau mitotique (SAC). Les facteurs de croissance (FC) jouent un rôle important dans la régulation de la division cellulaire qui entraîne la prolifération des cellules et la stimulation du cycle cellulaire en activant les récepteurs tyrosine kinase (RTK) et les voies de signalisation en aval, qui régulent les complexes cycline-kinases dépendantes des cyclines (CDK) (Wang 2021). Parallèlement, les points de contrôle du cycle cellulaire surveillent des processus cellulaires essentiels, tels que la réplication correcte du génome et la ségrégation des chromosomes (Dai, Zhao et al. 2018). Ces mécanismes de surveillance

de l'ADN empêchent l'accumulation et la propagation d'erreurs génétiques pendant la division cellulaire. Ils peuvent retarder la progression du cycle cellulaire ou, en réponse à des dommages irréparables de l'ADN, induire la sortie du cycle cellulaire ou la mort cellulaire (Matthews, Bertoli and de Bruin 2022).

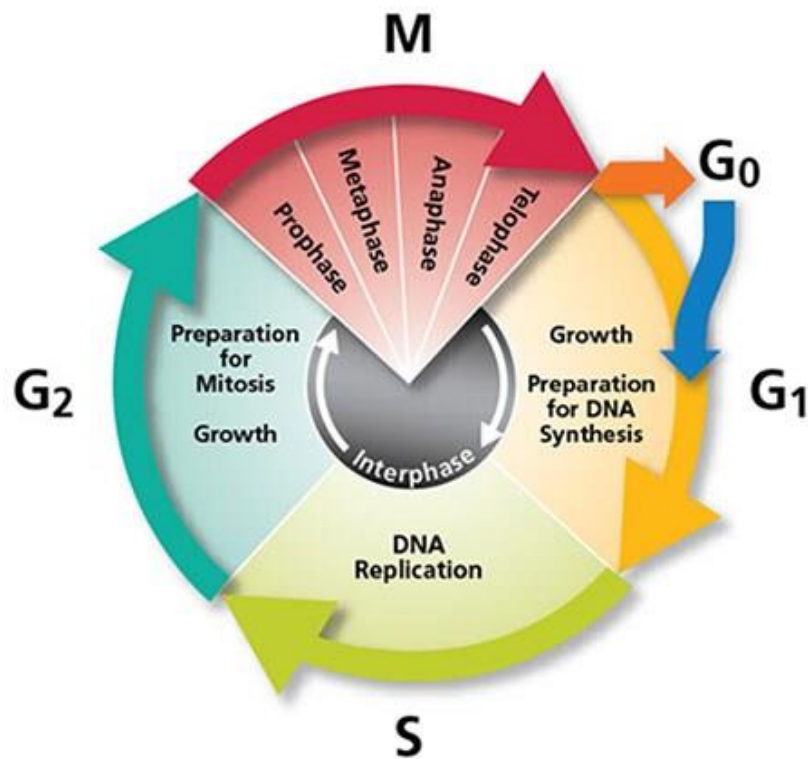


Figure 1-4 : Phases du cycle cellulaire. Les phases G1, S et G2 comprennent les interphases du cycle cellulaire. M (mitose) comprend 4 phases distinctes : prophase, métaphase, anaphase et télophase. G0 est la phase de repos où les cellules sont dans un état de repos et sans division. (<https://www.thermofisher.com/ca/en/home/life-science/cell-analysis/cell-viability-and-regulation/cell-cycle.html>)

1.3.3 Les complexes Cyclines-CDK et leurs régulateurs

La progression du cycle cellulaire est médiée par les CDK et leurs sous-unités cycline régulatrices (les cyclines de type A, B, D et E) (tableau 1, 2). Les CDK, telles que CDK4/6, CDK2 (interphasiques) et CDK1 (mitotique) sont des kinases possédant une grande variété de substrats. Les CDK sont principalement activées en se liant à leurs partenaires cyclines, dont les expressions augmentent et diminuent tout au long du cycle cellulaire afin de médier l'activation temporelle de chaque CDK. Différents points de contrôle du cycle cellulaire existent pour garantir que les processus critiques sont engagés avant la progression vers la phase suivante (Wang 2021). Les CDK4 et/ou CDK6 forment des complexes avec les cyclines de type D, ce qui active CDK4/6 et déclenche la phosphorylation de la famille des protéines du rétinoblastome (Rb) au début de la phase G1 induisant à la progression du cycle cellulaire. À la fin de la phase G1, la cycline E se lie au CDK2 et l'active, ce qui entraîne la phosphorylation complète de Rb et une nouvelle activation de la transcription et de la progression du cycle cellulaire. Ces événements conduisent au passage de la cellule de la phase G1/S à la phase S. Au début de la phase S, les cyclines de type A forment un complexe avec CDK2 induisant la réplication de l'ADN et entraînant la progression de la cellule vers la phase G2. À la fin de la phase G2, la CDK1/cycline A est formée et activée, ce qui est nécessaire pour la transition G2/M et l'initiation de la prophase. Enfin, les complexes CDK1/cycline B sont formés en phase M et conduisent à l'achèvement de la mitose (Wang 2021, Kamranvar, Gupta et al. 2022).

Tableau 1 : Fonctions des kinases cycline-dépendantes (CDK) (Lim and Kaldis 2013)

Table 1. Established and emerging functions of Cdk

Protein	Established function	Kinase activity	Emerging function	Kinase activity	Reference
Cdk1	Control of M phase of cell cycle in complex with cycA and cycB Myoblast proliferation through inhibition of MyoD	Yes	FoxM1 and FoxK2 transcription in complex with cycB	Yes	Chen et al., 2009; Marais et al., 2010
		Yes	ESC self-renewal through interaction with Oct4	No	Li et al., 2012b
			NSC self-renewal through inhibition of Ngn2	Yes	Ali et al., 2011
			HR-mediated DNA damage repair	Yes	Chen et al., 2011; Huertas et al., 2008
			Epigenetic regulation through Ezh2 and Dnmt1	Yes	Chen et al., 2010; Kaneko et al., 2010; Wei et al., 2011; Wu and Zhang, 2011; Lavoie and St-Pierre, 2011
Cdk2	Control of G1-S phase of cell cycle in complex with cycE and cycA; Rb/E2F transcription Myoblast proliferation through inhibition of MyoD	Yes	FoxM1 and FoxK2 transcription in complex with cycA	Yes	Chen et al., 2009; Marais et al., 2010
		Yes	NSC self-renewal through inhibition of Ngn2	Yes	Ali et al., 2011
		Yes	Epigenetic regulation through Ezh2 and Dnmt1	Yes	Chen et al., 2010; Kaneko et al., 2010; Wei et al., 2011; Wu and Zhang, 2011; Lavoie and St-Pierre, 2011
Cdk3			NHEJ-mediated DNA damage repair in complex with cycC	Yes	Tomashevski et al., 2010
Cdk4	Control of G1 phase of cell cycle in complex with cycD; Rb/E2F transcription	Yes	Epigenetic regulation through Mep50	Yes	Aggarwal et al., 2010
Cdk5	Neuronal function in complex with p35 and p39	Yes	Epigenetic regulation through Dnmt1	Yes	Lavoie and St-Pierre, 2011
Cdk6	Control of G1 phase of cell cycle in complex with cycD; Rb/E2F transcription	Yes	Glycogen synthesis	Yes	Tudhope et al., 2012
Cdk7	Cdk-activating kinase (CAK) and RNAPII transcription in complex with cycH	Yes			
Cdk8	RNAPII transcription in complex with cycC	Yes	Wnt/β-catenin pathway in complex with cycC	Yes	Firestein et al., 2008
			Inhibition of lipogenesis in complex with cycC	Yes	Zhao et al., 2012
Cdk9	RNAPII transcription in complex with cycT	Yes	DNA damage response in complex with cycK	Yes	Yu et al., 2010
Cdk10	Ets2 transcription	No			
Cdk11	RNA splicing in complex with cycl	Yes			
Cdk12			RNAPII transcription in complex with cycK	Yes	Bartkowiak et al., 2010; Blazek et al., 2011; Cheng et al., 2012
			DNA damage response in complex with cycK	Yes	Blazek et al., 2011
Cdk13			RNAPII transcription in complex with cycK	Yes	Bartkowiak et al., 2010; Blazek et al., 2011; Cheng et al., 2012
Cdk14			Wnt/β-catenin pathway in complex with cycY	Yes	Davidson et al., 2009
Cdk15					
Cdk16			Synaptic trafficking and remodeling in complex with cycY	Yes	Ou et al., 2010; Park et al., 2011
			Spermatogenesis in complex with cycY	Yes	Mikolcevic et al., 2012

cyc, cyclin; ESC, embryonic stem cell; HR, homologous recombination; NHEJ, non-homologous end-joining; NSC, neural stem cell; RNAPII, RNA polymerase II.

Tableau 10 : Fonctions des cyclines (Lim and Kaldis 2013)

Table 2. Established and emerging functions of cyclins

Protein	Established function	Kinase activity	Emerging function	Kinase activity	Reference
Cyclin A	Control of S phase of cell cycle in complex with Cdk2 or Cdk1	Yes	FoxM1 and FoxK2 transcription in complex with Cdk2	Yes	Chen et al., 2009; Marais et al., 2010
Cyclin B	Control of M phase of cell cycle in complex with Cdk1	Yes	FoxM1 and FoxK2 transcription in complex with Cdk1	Yes	Chen et al., 2009; Marais et al., 2010
Cyclin C	RNAPII transcription in complex with Cdk8	Yes	Wnt/ β -catenin pathway in complex with Cdk8	Yes	Firestein et al., 2008
			NHEJ-mediated DNA damage repair in complex with Cdk3	Yes	Tomashevski et al., 2010
			Inhibition of lipogenesis in complex with Cdk8	Yes	Zhao et al., 2012
Cyclin D	Control of G1 phase of cell cycle in complex with Cdk4 or Cdk6; Rb/E2F transcription	Yes	NF- γ , Stat, Creb2, Elk1, Znf423 and Cux1 transcription	No	Bienvenu et al., 2010
			HR-mediated DNA damage repair	No	Jirawatnotai et al., 2011; Li et al., 2010
			Epigenetic regulation through Mep50	Yes	Aggarwal et al., 2010
			Inhibition of lipogenesis	Yes, No	Hanse et al., 2012
Cyclin E	Control of G1-S phase of cell cycle in complex with Cdk2; Rb/E2F transcription	Yes	Inhibition of neuronal function of Cdk5	No	Odajima et al., 2011
Cyclin F			DNA damage response	No	Lu et al., 2009
			SCF-mediated proteolysis	No	D'Angiolella et al., 2010; D'Angiolella et al., 2012a
Cyclin H	Cdk-activating kinase (CAK) and RNAPII transcription in complex with cych	Yes			
Cyclin K			RNAPII transcription in complex with Cdk12 and Cdk13	Yes	Bartkowiak et al., 2010; Blazek et al., 2011; Cheng et al., 2012
			DNA damage response in complex with Cdk9	Yes	Yu et al., 2010
			DNA damage response in complex with Cdk12	Yes	Blazek et al., 2011
Cyclin L	RNA splicing in complex with Cdk11	Yes			
Cyclin T	RNAPII transcription in complex with Cdk9	Yes			
Cyclin Y			Wnt/ β -catenin pathway in complex with Cdk14	Yes	Davidson et al., 2009
			Synaptic trafficking and remodeling in complex with Cdk16	Yes	Ou et al., 2010; Park et al., 2011
			Spermatogenesis in complex with Cdk16	Yes	Mikolcevic et al., 2012

HR, homologous recombination; NHEJ, non-homologous end-joining; RNAPII, RNA polymerase II; SCF, Skp1-Cul1-F-box protein.

L'activité des CDK est régulée par deux familles d'inhibiteurs : Les protéines INK4 « Inhibitors of Cdk4 », comprenant INK4A, INK4B, INK4C et INK4D, et la famille CIP/KIP « Cdk Interacting Protein/Kinase Inhibitory Protein », composée de P21, P27 et P57 (tableau 3). Il a été démontré que ces inhibiteurs du cycle cellulaire bloquent la prolifération des cellules souches adultes dans de multiples types de tissus. Par exemple, P21 et P27 peuvent contrôler l'auto-renouvellement des progéniteurs neuronaux, intestinaux et hématopoïétiques. De même, INK4A, INK4B et INK4C sont impliqués

dans la modulation de l'auto-renouvellement des cellules souches et progénitrices hématopoïétiques, cérébrales, pulmonaires et pancréatiques. Ces informations que les CDK interphasiques telles que CDK2 ou CDK4 sont modulées par les CKI pour contrôler le potentiel prolifératif et les capacités d'auto-renouvellement des cellules souches ou progénitrices normales. Dans les tumeurs humaines, une régulation inappropriée des CDK dans les cellules souches cancéreuses putatives peut induire la tumorigénèse (Malumbres and Barbacid 2009).

Tableau 18 : Fonctions des CKI (Lim and Kaldis 2013)

Table 3. Established and emerging functions of CKIs

Protein	Established function	Emerging function	Reference
p21	Inhibition of Cdk/cyclin complexes	NSC differentiation through silencing of Sox2 expression	Marques-Torrejón et al., 2013
p27	Inhibition of Cdk/cyclin complexes Neuron induction through stabilization of Ngn2	Recruitment of transcriptional co-repressors ESC differentiation through silencing of Sox2 expression	Pippa et al., 2012 Li et al., 2012a
p57	Inhibition Cdk/cyclin complexes Myoblast differentiation through stabilization of MyoD		

ESC, embryonic stem cell; NSC, neural stem cell.

Cette régulation est liée aussi à l'expression des cyclines induites par l'activation constitutive de STAT3 qui est profondément impliquée dans la prolifération cellulaire. La liaison directe de STAT3 au promoteur de la cycline D augmente l'expression des gènes cibles, notamment la cycline D1 et D2 nécessaires à la croissance persistante des cellules cancéreuses (Park, Lee et al. 2019, Okabe, Kobayashi et al. 2021). La régulation et l'activation de la voie oncogénique STAT3 par la tyrosine kinase SRC est en effet associée à un mauvais pronostic, par l'induction de gènes impliqués dans la prolifération et la survie induisant la progression tumorale (Berthenet 2015).

1.3.4 L'implication de la voie SRC/STAT3

Src, une tyrosine kinase non réceptrice, est activée par de nombreux facteurs, tels que le glucose, le palmitate, la leptine, le TNF α et l'IFN- γ (Pan, Brink et al. 2016).

L'activation de Src peut entraîner la promotion des voies de survie et de prolifération, et même induire des tumeurs malignes (v-SRC). De nombreuses protéines régulatrices du cycle cellulaire impliquées dans la prolifération cellulaire sont induites par Src, telles que les cyclines A, E, D1, le complexe A/CDK2, P27 et P53. La SRC active induit la phosphorylation de P27, puis régule à la baisse son niveau de protéines (Pan, Brink et al. 2016).

STAT3 est le substrat en aval de SRC, et se lie à ses sites correspondant au domaine SH2. Il peut être activé par la tyrosine phosphorylée de SRC en réponse à une grande variété de cytokines et de facteurs de croissance (Pan, Brink et al. 2016). La SRC induit la dimérisation de STAT3 et son entrée dans le noyau, où ses dimères et tétramères se lient à des éléments de réponse spécifiques de l'ADN entraînant l'activation de la transcription et de la traduction des gènes cibles. Le blocage de la voie SRC/STAT3 favorise la fonction de P27 dans les cellules, ce qui conduit à l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 (Pan, Brink et al. 2016).

Cette voie favorise la croissance et la survie des cellules par de multiples mécanismes, y compris l'augmentation de l'expression des oncogènes, tels que c-myc, Skp2 et la cycline D1 (Pan, Brink et al. 2016).

1.4 La mort cellulaire

1.4.1 La mort cellulaire programmée

Le terme apoptose a été utilisé pour la première fois dans un article désormais classique de Kerr, Wyllie et Currie en 1972 pour décrire une forme morphologiquement distincte de mort cellulaire (Obeng 2021). Elle peut affecter des cellules individuelles ou des groupes de cellules et est contrôlée et dépendante de l'énergie. Elle est considérée comme une composante vitale de divers processus, notamment le renouvellement normal des cellules, le développement et le fonctionnement adéquats

du système immunitaire, l'atrophie hormono-dépendante, le développement embryonnaire et la mort cellulaire induite par des produits chimiques (Obeng 2021).

Au cours du processus précoce d'apoptose, le rétrécissement des cellules et la rétraction du noyau (la pycnose) sont visibles au microscope optique. Dans le cas du rétrécissement cellulaire, les cellules sont plus petites, le cytoplasme est dense et les organites sont plus serrés. La pycnose est le résultat de la condensation de la chromatine et c'est le trait le plus caractéristique de l'apoptose. Une hémorragie importante de la membrane plasmique se produit, suivie d'une fragmentation destructive du noyau (une caryorrhexis) et d'une séparation des fragments cellulaires en corps apoptotiques au cours d'un processus appelé "bourgeonnement". Les corps apoptotiques sont constitués de cytoplasme avec des organites étroitement emballés, avec ou sans fragment nucléaire. L'intégrité des organites est maintenue et le tout est enfermé dans une membrane plasmique intacte. Ces corps sont ensuite phagocytés par les macrophages, les cellules parenchymateuses ou les cellules néoplasiques et dégradés dans les phagolysosomes. Il n'y a pratiquement pas de réaction inflammatoire associée au processus d'apoptose ni à l'élimination des cellules apoptotiques (Elmore 2007). À ce jour, la recherche indique qu'il existe deux voies apoptotiques principales : la voie extrinsèque, ou voie des récepteurs de la mort, et la voie intrinsèque ou voie mitochondriale (Roberts, Crawford and Longley 2022). Il existe une autre voie qui implique la cytotoxicité médiée par les lymphocytes T et la destruction de la cellule dépendante de la perforine-granzyme. Ces trois voies convergent vers la même voie d'exécution; initiée par le clivage de la caspase-3 (Elmore 2007).

L'apoptose est également nécessaire pour débarrasser l'organisme des cellules envahies par des agents pathogènes. Elle constitue également un processus vital de la cicatrisation des plaies, et elle est également nécessaire pour éliminer les cellules immunitaires activées ou auto-agressives; on parle donc d'apoptose physiologique (Wong 2011). Il existe aussi l'apoptose pathologique (apoptose insuffisante/ apoptose

excessive) où les anomalies dans la régulation de la mort cellulaire peuvent être une composante importante de maladies telles que le cancer, le syndrome lymphoprolifératif auto-immun, le SIDA, l'ischémie et les maladies neurodégénératives (Wong 2011). Il a été rapporté que la suppression de l'apoptose au cours de la carcinogenèse joue un rôle central dans le développement et la progression de certains cancers. Les cellules tumorales peuvent acquérir une résistance à l'apoptose par l'expression de protéines anti-apoptotiques telles que Bcl-2 ou par la régulation à la baisse ou la mutation de protéines pro-apoptotiques telles que Bax, dont leur expression est régulée par le gène suppresseur de tumeur P53 (Elmore 2007).

1.4.2 La mort cellulaire non programmée

Appelée aussi « nécrose », est un processus incontrôlé et passif qui affecte généralement de vastes champs de cellules. Parmi les principaux changements morphologiques qui accompagnent la nécrose, on peut citer le gonflement des cellules, la formation de vacuoles cytoplasmiques, la distension du réticulum endoplasmique, la formation de taches cytoplasmiques, la condensation, le gonflement ou la rupture des mitochondries, la désagrégation et le détachement des ribosomes, la rupture des membranes des organites, le gonflement et la rupture des lysosomes et, enfin, la rupture de la membrane cellulaire (Elmore 2007). Cette perte d'intégrité de la membrane cellulaire entraîne la libération du contenu cytoplasmique dans le tissu environnant, ce qui envoie des signaux chimiotactiques et entraîne le recrutement de cellules inflammatoires. Comme les cellules apoptotiques ne libèrent pas leurs constituants cellulaires dans le tissu interstitiel environnant et qu'elles sont rapidement phagocytées par les macrophages ou les cellules normales adjacentes, il n'y a pratiquement pas de réaction inflammatoire (Elmore 2007). La nécrose conduit à la mort cellulaire avec caryolyse (décomposition complète du noyau cellulaire) et gonflement des cellules, tandis que l'apoptose conduit à la mort des cellules avec rétrécissement, pycnose et caryorrhexis. Le fait qu'une cellule meure par nécrose ou par apoptose dépend en partie

de la nature du signal de mort cellulaire, du type de tissu, du stade de développement du tissu et du milieu physiologique (Elmore 2007).

Le développement d'un cancer invasif implique un passage progressif d'une mort cellulaire tumorale principalement apoptotique (programmée) à une mort nécrotique (non programmée). Ce passage est associé à la libération chronique et croissante de facteurs intracellulaires qui, à leur tour, favorisent l'angiogenèse réactive et la prolifération du stroma, et qui sont à l'origine du microenvironnement tumoral désordonné associé à la suppression immunitaire locale (Zhang, Trojel-Hansen et al. 2023).

De ce fait, pour contrer tout cela, la prise en charge multidisciplinaire est essentielle afin d'offrir le meilleur plan de traitement possible aux patient(e)s. Cependant, la base du traitement est souvent la combinaison de la chirurgie et de la chimiothérapie. Aussi, on peut diminuer le risque de cancer par l'introduction de composés naturels dans notre alimentation tels les flavonoïdes et leurs dérivés. Ces derniers ont une capacité perceptible à inhiber la formation de tumeurs et la croissance des cellules cancéreuses. Par conséquent, les flavonoïdes pourraient être utilisés comme médicaments chimiopréventifs, ce qui indique leur utilité clinique potentielle dans le traitement du cancer (Al-Jumaili, Siddique et al. 2023).

1.5 LA CHIMIOPREVENTION PAR DES COMPOSÉS NATURELS

La consommation de fruits et légumes a un effet protecteur contre le cancer colorectal, le cancer du sein et le cancer du poumon, alors que seuls les fruits ont un effet protecteur contre le cancer de la prostate (Ubago-Guisado, Rodríguez-Barranco et al. 2021). Une plus grande consommation de poisson et une moindre consommation de viande rouge et de viande transformée étaient liées à un risque plus faible de cancer colorectal, et une plus grande consommation de poissons gras à un risque plus faible

de cancer du sein. La consommation de calcium et de yaourt protège contre le cancer colorectal et le cancer de la prostate (Ubago-Guisado, Rodríguez-Barranco et al. 2021).

1.5.1 Les polyphénols

Les polyphénols constituent le plus grand groupe de substances phytochimiques, et un grand nombre d'entre eux se trouvent dans les aliments d'origine végétale (Tsao 2010). Les fruits, les légumes, les céréales complètes et d'autres types d'aliments et de boissons tels que le thé et le vin sont de riches sources de polyphénols. Ces derniers ont été classés en fonction de leur source d'origine, de leur fonction biologique et de leur structure chimique. Ils sont un groupe de composés naturels présentant des caractéristiques structurelles phénoliques. Des études ont également montré que différents sous-groupes de polyphénols peuvent différer de manière significative en termes de stabilité, de biodisponibilité et de fonctions physiologiques liées à la santé humaine (Tsao 2010).

Les classifications détaillées et les sources de ces polyphénols végétaux sont résumées dans la figure 1-5 montrant que les polyphénols sont classés en cinq groupes; à savoir les acides phénoliques, les flavonoïdes, les curcuminoïdes, les stilbènes et les lignanes, en fonction de leurs structures et de leurs fonctions, les flavonoïdes étant composés de flavanols, de flavonols, de flavones, de flavanones, d'anthocyanines et d'isoflavones (Yi, Chen et al. 2020).

Les régimes riches en polyphénols ont été associés à de nombreux avantages pour la santé. Les recherches menées ces dernières années confirment le rôle des polyphénols dans la prévention des maladies dégénératives, en particulier les cancers, les maladies cardiovasculaires et les maladies neurodégénératives (Tsao 2010, Yi, Chen et al. 2020).

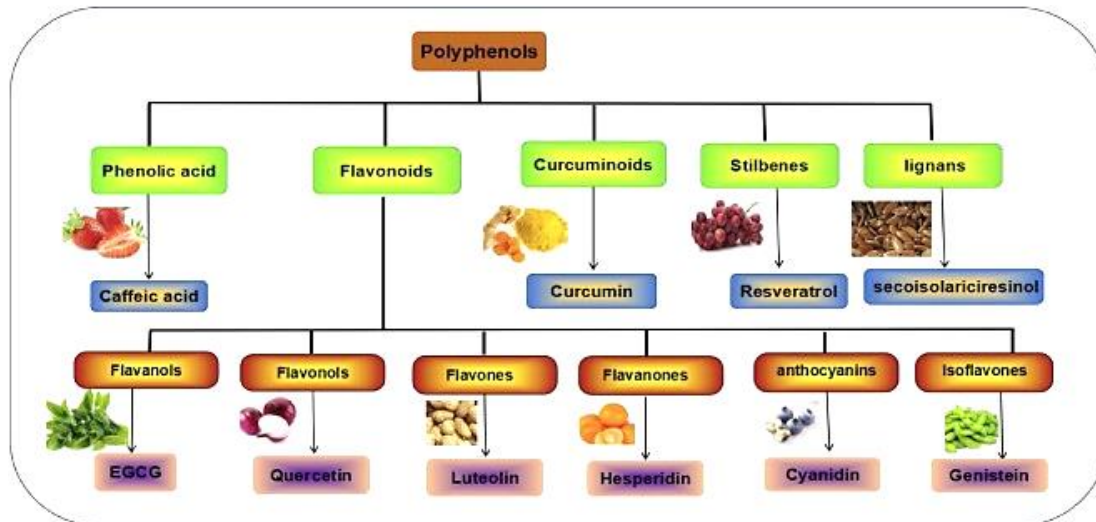


Figure 1-5 : Les classifications détaillées et les sources de polyphénols végétaux (Yi, Li et al. 2019).

1.5.2 Les polyphénols du thé vert

Le thé est la boisson la plus répandue dans le monde. C'est une source riche en molécules pharmacologiquement actives qui ont été impliquées dans divers bénéfices pour la santé. Les polyphénols sont les principaux composés actifs présents dans les théés. Les catéchines sont les composés polyphénoliques distinctifs présents dans le thé vert (*Camellia sinensis*), qui comprennent l'épigallocatechine-3-gallate (EGCG), l'épigallocatechine (EGC), l'épicatéchine-3-gallate (ECG) et l'épicatéchine (EC) (Figure 1-6). L'EGCG est la catéchine prédominante la plus étudiée dans le thé vert. Elle représente 50 à 70 % des catéchines. Une consommation convenable de thé vert est de trois à cinq tasses par jour, une tasse de thé vert infusé à partir de 2,5 g de feuilles de thé vert contient jusqu'à 200 mg d'EGCG (Khan and Mukhtar 2018, Hayakawa, Ohishi et al. 2020).

Il contient également une large gamme de composés chimiques, mais ce sont principalement les polyphénols qui sont à l'origine de l'arôme et des effets bénéfiques du thé sur la santé. Les polyphénols du thé vert sont reconnus pour leurs propriétés bénéfiques contre plusieurs maladies pathologiques, notamment le cancer, le diabète et les maladies cardiovasculaires. Ces polyphénols sont présents en concentrations beaucoup plus élevées dans le thé vert que dans le thé noir ou le thé oolong, ce qui explique leurs propriétés antioxydantes (Khan and Mukhtar 2018). Ces molécules sont largement décrites comme étant efficaces dans la prévention du cancer du poumon, du cancer du sein, du cancer de l'œsophage, du cancer de l'estomac, du cancer du foie et du cancer de la prostate (Musial, Kuban-Jankowska and Gorska-Ponikowska 2020).

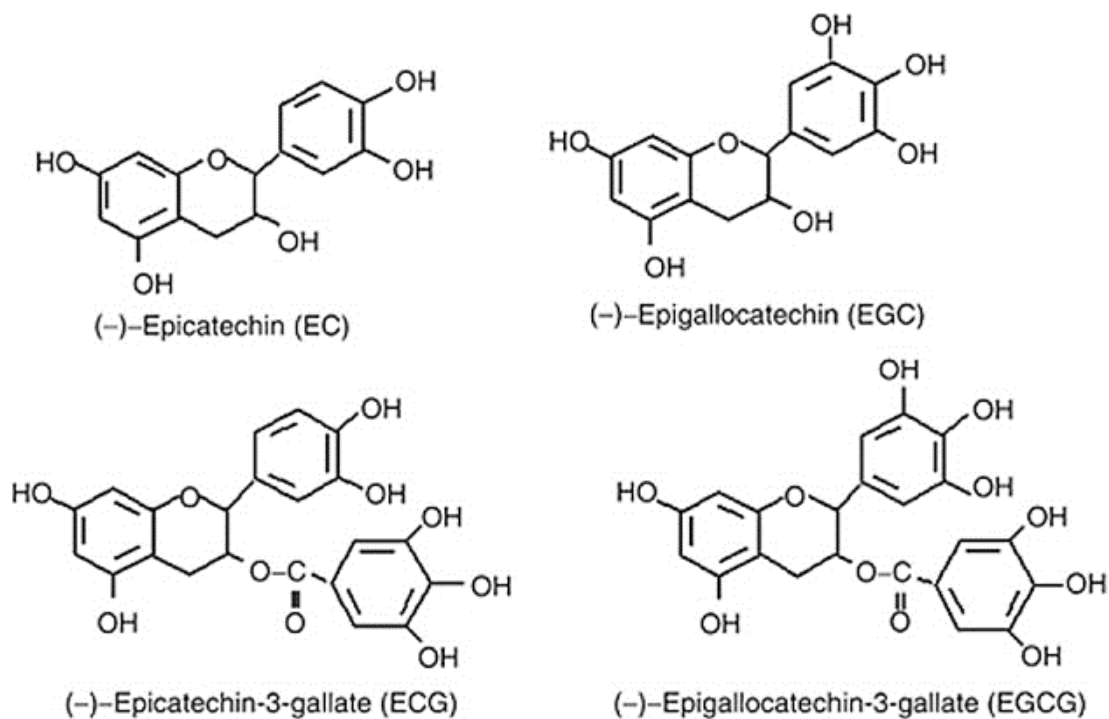


Figure 1-6: Structure chimique des quatre principales catéchines du thé vert (Steinmann, Buer et al. 2013)

1.5.3 L'épigallocatechine gallate

L'épigallocatechine-3-gallate (EGCG) est la principale catéchine du thé vert et est à l'origine de la plupart des recherches menées sur le thé vert. C'est un antioxydant de premier plan qui neutralise les espèces réactives de l'oxygène (ROS) ce qui entraîne des effets chimiopréventifs/chimiothérapeutiques contre plusieurs types de cancers (Steinmann, Buer et al. 2013, Khan and Mukhtar 2018)

Cette catéchine bloque la progression du cycle cellulaire et module les voies de signalisation qui affectent la prolifération et la différenciation cellulaire. Elle favorise également l'apoptose en réduisant l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 (Hayakawa, Ohishi et al. 2020), module négativement différentes étapes impliquées dans la métastase et cible l'angiogénèse en inhibant l'expression des protéines HIF-1 α et VEGF (Romano and Martel 2021). L'EGCG a des effets anti-inflammatoires en inhibant l'activation de facteurs de transcription tels que NF- κ B, la protéine activatrice-1 (AP-1), la voie de signalisation dépendante de MyD88, et l'expression des gènes inflammatoires, y compris la cyclooxygénase (COX), la NO synthase et le TNF α (Fujimura, Watanabe et al. 2022). Il exerce ces divers effets lorsqu'il est détecté par le récepteur 67-kDa de la laminine, une protéine de surface cellulaire (67LR) (Fujimura, Watanabe et al. 2022).

Des études *in vivo* ont montré que l'administration orale d'EGCG entraîne une réduction de la croissance tumorale et des effets anti métastatiques et anti angiogéniques dans des modèles animaux de xéno greffe et d'allo greffe (Romano and Martel 2021).

1.6 OBJECTIFS DE LA RECHERCHE

Les MSCs sont des cellules de soutien aux cellules cancéreuses au niveau des foyers tumoraux de par leur capacité de s'auto-renouveler et de proliférer, suite à leur recrutement via la sécrétion des cytokines tels TGF β et TNF α par les cellules cancéreuses. Les MSCs fusionnent avec ces dernières qui activent la signalisation cellulaire aboutissant à la prolifération et la progression tumorale. Ainsi l'objectif de notre étude est de:

- 1- Étudier l'effet des cytokines TGF β et TNF α sur le fonctionnement et l'avancement du cycle cellulaire,
- 2- Évaluer le rôle de l'EGCG sur l'expression des protéines impliquées dans la progression du cycle cellulaire.

1.7 MODÈLE CELLULAIRE EXPÉRIMENTAL

Les cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse (BM-MSc) humaines ont été utilisées comme modèle cellulaire dérivé de la moelle osseuse pour la présente étude sur l'activation du point de contrôle des dommages à l'ADN avec le TGF β et le TNF α et la progression et l'avancement du cycle cellulaire. Les MSC sont recrutées au niveau du microenvironnement tumoral et semblent importantes dans la régulation de la progression tumorale (Li and Hua 2017). En effet, différentes études ont démontré la capacité des MSCs à migrer et à s'intégrer dans la tumeur (Lin, Wu et al. 2022). Ces cellules sont recrutées au site tumoral suite à la sécrétion des cytokines par les cellules cancéreuses leur permettant de contribuer aux différents processus tumoraux suite à l'activation de différentes voies de signalisation intracellulaires tels que; l'angiogenèse, la métastase, l'invasion, la migration et la prolifération cellulaire (Li and Hua 2017). Cette dernière est la clé de tous les autres processus tumoraux.

Ainsi, une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires et des voies de signalisations impliquées dans les processus induisant la progression tumorale et surtout la prolifération cellulaire pourrait permettre le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques afin de limiter la contribution des MSCs à la pathologie néoplasique. Parmi ces stratégies thérapeutiques, l'utilisation d'inhibiteurs tel l'EGCG, une molécule chimiopréventive dérivée du thé vert, pourrait cibler des voies de signalisation impliquées dans la progression tumorale.

Les BM-MSCs pourraient être largement utilisées dans des applications thérapeutiques en raison de leur excellente capacité d'auto-renouvellement et de leur potentiel de différenciation en plusieurs types cellulaires (Hong, Xu et al. 2020).

CHAPITRE 2

MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 MATÉRIEL

Le dodécylsulfate de sodium (SDS) et l'albumine de sérum bovin (BSA) ont été achetés auprès de Sigma-Aldrich Corp (St Louis, MO). Le milieu de culture, la streptomycine/pénicilline, le sérum de veau fœtal (FBS) et la trypsine ont été obtenus de Life Technologies (Burlington, ON). Les réactifs de dosage des protéines de l'acide bicinchoninique (micro-BCA) proviennent de Pierce (Rockford, IL). Les réactifs d'électrophorèse ont été achetés aux laboratoires Bio-Rad (Mississauga, ON). Le réactif de chimioluminescence (ECL) provient d'Amersham Pharmacia Biotech (Baie d'Urfé, QC). Les anticorps dirigés contre CDK2, CDK4, CDK6, P53 et P21 sont de Cell Signaling Technology Inc. (Danvers, MA, USA). Les anticorps polyclonaux contre Src, Src phosphorylé, STAT3, STAT3 phosphorylé, Cycline D1 et Bcl-xL ont été obtenus auprès de Cell Signaling Technology Inc. L'anticorps monoclonal contre le glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) provient de Advanced Immunochemical Inc. (Long Beach, CA, USA). Les anticorps secondaires anti-lapin et anti-souris de type immunoglobuline (IgG) conjugués à la peroxydase (HRP) ont été obtenus auprès de Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA, USA). L'extraction de l'ARN total est réalisée à l'aide de TRizol (Invitrogen, Burlington, ON). L'EGCG provient de MP Biomedicals, Inc (CA).

2.2 MÉTHODES

2.2.1 Culture cellulaire

Les cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse (BM-MSC) humaines ont été achetées à l'American Type Culture Collection (ATCC ; Manassas, VA, USA). Les BM-MSC ont été utilisées du 4^{ème} jusqu'au 6^{ème} passage après avoir été cultivées à 37°C sous une atmosphère humide à 5 % de CO₂ et 95 % d'air dans le milieu α MEM (GibcoBRL) contenant 100 unités/ml de pénicilline/streptomycine et 10% (v/v) de sérum foetal bovin inactivé (iFBS) (Hyclone Laboratories, Logan, UT).

2.2.2 Lyse cellulaire

Les cellules sont cultivées dans des pétris de 60 mm jusqu'à atteindre 80% de confluence, elles sont ensuite traitées avec 0.03 μ g/ml de TGF β ou 0.3 μ g/ml de TNF α et avec une concentration de 30 μ M d'EGCG. Après le traitement, les cellules ont été lysées dans un tampon RIPA contenant 1 mM de NaF et Na₃VO₄ et le cocktail d'inhibiteurs de protéases Millipore Set I dilué à 1/100 et récoltées à l'aide d'un policeman. Les débris cellulaires ont été éliminés par une centrifugation à 13 000 rpm pendant 30 minutes à 4 °C.

2.2.3 Dosage des protéines selon la méthode de microBCA

Les lysats de protéines ont été quantifiées par la méthode microBCA selon les directives du fournisseur (Pierce). Chaque condition a été effectuée en triplicata. Plus précisément, une courbe standard a été effectuée avec différentes concentrations d'albumine sérique bovine (BSA). Un volume de 150 μ l pour chaque échantillon ou solution standard combinés à 150 μ l de réactif microBCA a été ajouté dans une plaque de 96 puits. Par la suite, la plaque a été incubée à 37°C pendant 2 heures à l'obscurité.

Finalement, le produit de réaction pourpre formé par une liaison de coordination a été mesuré à une longueur d'onde de 562 nm.

2.2.4 Électrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE)

Une quantité égale de protéine de chaque échantillon (10-15µg) a été solubilisée dans un tampon réducteur. Les échantillons sont incubés à 95°C pendant 5 minutes avant d'être soumis à l'électrophorèse. Les protéines ont été séparées selon leur poids moléculaire par électrophorèse sur gel polyacrylamide dodécyl sulfate de sodium (SDS-PAGE).

2.2.5 Analyse par immunobuvardage

Les protéines ont été électro-transférées sur une membrane de difluorure de polyvinylidène (PVDF) avec le Trans-Blot Turbo RTA transfer kit de Bio-Rad, qui ont ensuite été bloquées pendant une heure à température ambiante avec 5% de lait écrémé en poudre dans une solution saline tamponnée au Tris (NaCl 150 mM, Tris-HCl 20 mM, pH 7,5) contenant 0,3 % de Tween- 20 (TBST; Bioshop, TWN510-500) pour bloquer les sites possibles de réaction croisée non spécifique.

2.2.6 Immunodétection des protéines

Les membranes ont été lavées successivement 3 fois pendant 10 minutes dans le TBST et incubées pendant une nuit avec les anticorps primaires appropriés (dilution 1/1000) dans du TBST contenant 3 % de BSA et 0,1 % d'azide de sodium (Sigma-Aldrich) à 4°C sous agitation constante, cette étape a été suivie d'une autre série de lavages dans le TBST à température pièce. Ensuite, les membranes ont été incubées 1 heure avec des IgG anti-lapin ou anti-souris conjuguées à la peroxydase de raifort à des dilutions de 1/2500 dans du TBST contenant 5% de poudre de lait écrémé. La membrane de PVDF est par la suite mise en contact avec un milieu d'ECL (enhanced chemiluminescence), le temps d'exposition variait d'une protéine à l'autre. Les photons

émis par le matériau immunoréactif ont été visualisés par un film photographique (autoradiographie). Les bandes ont été quantifiées avec le logiciel ImageJ (National Institute of Health).

2.2.7 Extraction de l'ARN total

L'ARN total a été extrait des monocouches BM-MSC à l'aide de 1 ml de réactif TRizol pour un maximum de $1,5 \times 10^5$ cellules, conformément aux instructions du fabricant (Life Technologies, Gaithersburg, MD). Les échantillons ont été congelés à -80°C jusqu'à utilisation.

2.2.8 Préparation de la bibliothèque d'ARN total

L'ARN total (500 ng) a été extrait des cellules BM-MSC traitées et utilisé pour la préparation de la bibliothèque. La qualité de l'ARN a été évaluée avec le test Bioanalyzer RNA 6000 Nano sur le système 2100 Bioanalyzer (Agilent technologies, Mississauga, ON), et tous les échantillons avaient un numéro d'intégrité de l'ARN (RIN) supérieur à huit. La préparation de la bibliothèque a été réalisée avec le kit KAPA mRNA-Seq HyperPrep (KAPA, Cat no. KK8581). La ligation a été réalisée avec l'UMI à double indice Illumina et 10 cycles de PCR ont été nécessaires pour amplifier les bibliothèques d'ADNc. Les bibliothèques ont été quantifiées par QuBit et BioAnalyzer DNA1000. Toutes les bibliothèques ont été diluées à 10 nM et normalisées par qPCR à l'aide du kit de quantification de bibliothèque KAPA (KAPA; Cat no. KK4973). Les bibliothèques ont été regroupées à des concentrations équimolaires. Trois répliques biologiques ont été générées.

2.2.9 Séquençage de l'ARN

La haute qualité de l'ARN a été validée comme ci-dessus et les échantillons ont été séquencés à l'aide du séquenceur Illumina NextSeq500 en utilisant le kit de cycles

Nextseq High Output 75 (1x75bp) et cela a été réalisé à la plateforme de génomique de l'Institut de Recherche en Immunologie et en Cancérologie (IRIC, Montréal, QC).

2.2.10 Lectures de l'alignement et l'analyse de l'expression différentielle

Les lectures ont été alignées et triées par coordonnées sur la version 38 du génome humain (GRCh38.p13) avec la version 37 des annotations du gène Gencode, à l'aide de l'aligneur STAR (STAR_2.7.1a) (Chen et al., 2018 ; Dobin et al., 2013). La quantification des gènes a été réalisée lors de l'alignement par STAR. Les gènes exprimés de manière différentielle entre les groupes ont été identifiés à l'aide des packages R DESeq2 (v 1.30.1) (Love et al., 2014). Après analyse, seuls les gènes avec des valeurs p ajustées ($\text{adjp} < 0,05$) et un changement de facteur $\log_2 \geq 1,0$ ont été considérés comme significatifs. Le regroupement hiérarchique des gènes exprimés de manière différentielle a été utilisé pour représenter les résultats (paquet R ggplot2).

2.2.11 Analyse d'enrichissement d'ensembles de gènes

L'analyse d'enrichissement de l'ensemble de gènes a été réalisée avec la version 4.2.3 du logiciel GSEA (Subramanian et al., 2005) avec l'ensemble complet des valeurs d'entrée normalisées, en utilisant le Hallmark, les ensembles de gènes de la voie canonique (perturbations chimiques et génétiques, BioCarta, Reactome, et Kegg), et ensembles de gènes d'ontologie génétique (processus biologique). Les logiciels utilisés pour l'analyse des données au cours de ce projet comprenaient GraphPad Prism et R (version > 3.4). Pour toutes les analyses statistiques, les différences étaient considérées comme statistiquement significatives si l'adjp calculé par le test t de Student avec correction de Bonferroni était $< 0,05$. Séquençage ARN des lignées cellulaires BM-MSK.

CHAPITRE 3

RÉSULTATS

3.1 Effet du TGF β et du TNF α sur le point de contrôle G2/M du cycle cellulaire

Afin de mieux comprendre la régulation transcriptionnelle différentielle qui se produit lors d'un traitement par le TGF β et le TNF α des cellules souches mésenchymateuses (MSCs), l'ARN total a été isolé et une analyse transcriptomique a été effectuée telle que décrite auparavant dans la section méthodologique. L'analyse a révélé que les MSCs traitées avec le TGF β (Fig.3-1) affichaient une signature d'expression génique différente de celle des MSCs traitées avec le TNF α (Fig.3-2) et que celle des MSCs traitées est distincte de celle des MSCs témoins. Pour cela, nous avons effectué une analyse d'enrichissement de l'ensemble de gènes (GSEA) afin de mieux interpréter ces différences. Parmi les processus qui se sont avérés induits de manière significative dans les cellules traitées au TGF β sont : l'expression du TGF β , de l'IL-6 et du VEGF, l'activation de la voie erk1/2 et la méthylation (Fig.3-1. B, points rouges). Dans les cellules traitées au TNF α sont : l'expression du TNF α , de l'IFN, la réponse immunitaire et l'apoptose (Fig.3-2.B, points rouges). Par contre ceux qui se sont avérés réduits dans les cellules traitées au TGF β comprenaient : l'expression de l'IFN, l'induction de la réponse immunitaire, l'apoptose et le point de contrôle G2/M du cycle cellulaire et dans les cellules traitées au TNF α était principalement le point de contrôle G2/M du cycle cellulaire, qui est un processus réduit significativement en commun à la fois par le TGF β et le TNF α mais d'une manière moindre avec le TNF α (Fig.3-1.C et 3-2.C, points bleus). Donc, la signature différentielle entre le TGF β et le TNF α est que le TGF β est immunosuppresseur et réduit l'apoptose alors que TNF α est pro-apoptotique et active la réponse immunitaire. Aussi, la signature commune entre le TGF β et le TNF α est la diminution du point de contrôle G2/M.

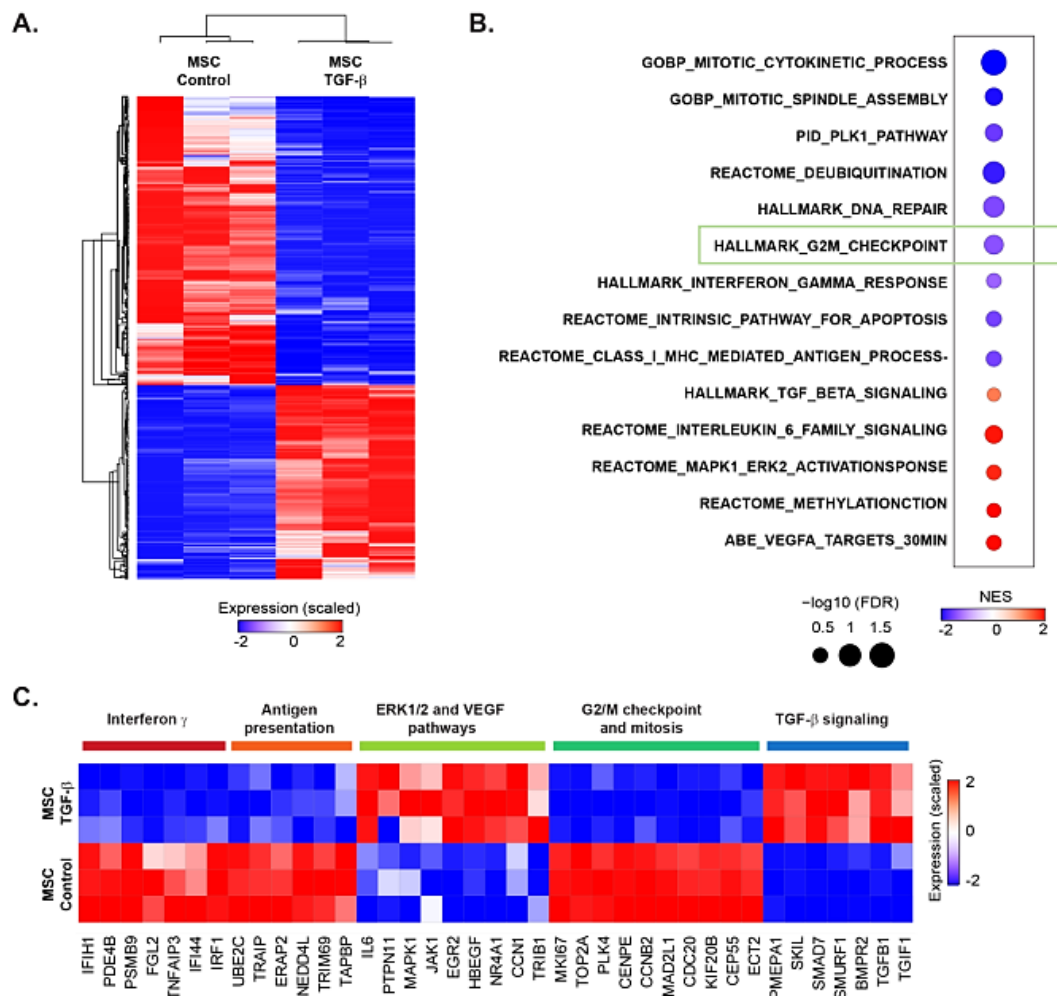


Figure 3-1: L'analyse transcriptomique révèle la réduction du point de contrôle G2/M du cycle cellulaire lors du traitement des MSCs avec 0.03 $\mu\text{g/ml}$ de TGF β pendant 24h. L'ARN total a été extrait des MSCs contrôle ou des MSCs traitées au TGF β dans le cadre de trois expériences indépendantes. (A) Le regroupement hiérarchique non supervisé de tous les gènes différentiellement exprimés. (B) Dot plot montrant les changements dans le score d'enrichissement normalisé pour les voies les plus enrichies dans les MSCs traitées au TGF β par rapport aux MSCs non traitées. (C) Représentation sous forme de carte thermique de l'expression relative de certains marqueurs phénotypiques connus pour chacun des processus cellulaires indiqués.

Dans les cellules traitées au TGF β , cela a été associé à une diminution significative des niveaux de transcription de l'antigène identifié par l'anticorps monoclonal Ki-67 (*MKI67*) qui code pour l'antigène KI-67, un marqueur de prolifération cellulaire et de la transcription de l'ARN ribosomique (Bullwinkel, Baron-Lühr et al. 2006). La transcription du gène *TOP2A* codant pour l'enzyme ADN topoisomérase II α ayant un rôle d'assurer le bon déroulement de la condensation et de la décondensation des chromosomes au cours de la division cellulaire a été diminuée (Deweese and Osheroff 2009). Le gène *PLK4* code pour l'enzyme sérine/thréonine-protéine kinase PLK4 qui régule la duplication des centrioles au cours du cycle cellulaire a été réduit (Godinho, Picone et al. 2014). Le gène *CENPE* codant pour la protéine E associée au centromère qui est responsable du mouvement des chromosomes des mammifères et/ou de l'allongement du fuseau mitotique (Testa, Zhou et al. 1994) a également été considérablement réduit. Le gène *CCNB2* qui code pour la protéine cycline-B2 ayant un rôle clé dans le contrôle du cycle cellulaire (Liu, Wei et al. 1999), le gène *MAD2L1* codant pour la protéine du point de contrôle de l'assemblage du fuseau mitotique MAD2A (Li, Tong et al. 2023) et le gène *CEP55* qui code pour la protéine centrosomale de 55 kDa (Cep55) ayant un rôle clé dans la cytokinèse et la dernière étape de la division cellulaire (van der Horst, Simmons and Khanna 2009) ont été réduits. Notamment, le TGF β a diminué le niveau transcriptionnel du gène *CDC20* qui code pour l'homologue de la protéine 20 du cycle de division cellulaire, une protéine essentielle dans la régulation de la division cellulaire (Wang, Wan et al. 2013), le gène *KIF20B* qui code pour le membre de la famille des kinésines 20B, une protéine impliquée dans la régulation positive de la prolifération cellulaire et la régulation positive de la cytokinèse (Kamimoto, Zama et al. 2001) et le gène *ECT2* codant pour la protéine ECT2, une protéine transformante liée aux régulateurs du cycle cellulaire et à un rôle important dans la régulation de la cytokinèse (Liu, Ishida et al. 2004) (figure 3-1.C).

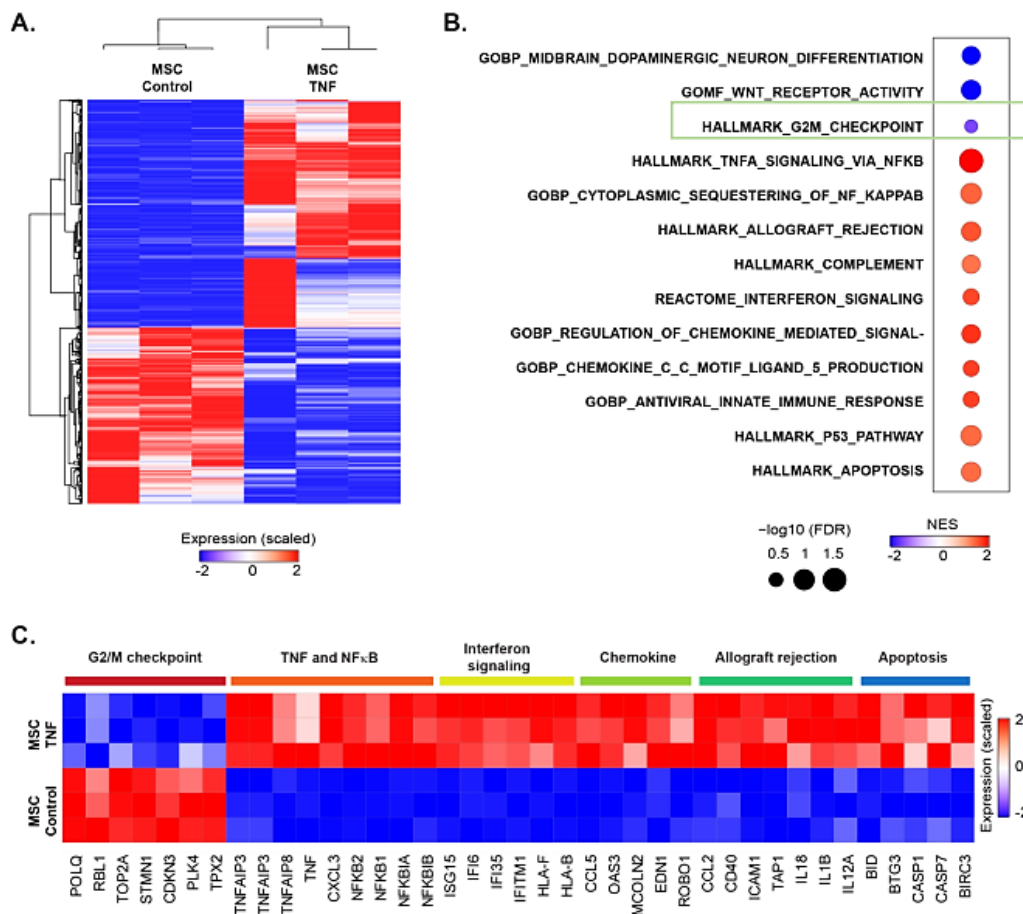


Figure 3-2 : L'analyse transcriptomique révèle la réduction du point de contrôle G2/M du cycle cellulaire lors du traitement des MSCs avec 0.3 $\mu\text{g/ml}$ de $\text{TNF}\alpha$ pendant 24h. L'ARN total a été extrait des MSCs contrôle ou des MSCs traitées au $\text{TNF}\alpha$ dans le cadre de trois expériences indépendantes. (A) Le regroupement hiérarchique non supervisé de tous les gènes différentiellement exprimés. (B) Dot plot montrant les changements dans le score d'enrichissement normalisé pour les voies les plus enrichies dans les MSCs traitées au $\text{TNF}\alpha$ par rapport aux MSCs non traitées. (C) Représentation sous forme de carte thermique de l'expression relative de certains marqueurs phénotypiques connus pour chacun des processus cellulaires indiqués.

Dans les cellules traitées au $TNF\alpha$, on a remarqué une réduction significative des niveaux de transcription des gènes : *POLQ* codant pour l'ADN polymérase thêta, un composant principal de la voie alternative de réparation de l'ADN (Liddiard, Aston-Evans et al. 2022). *RBL1* qui code pour le Retinoblastoma-like 1 (p107) étant impliquée dans la régulation du cycle cellulaire (Rual, Venkatesan et al. 2005). *STMN1* codant pour la stathmine qui est cruciale pour la régulation du cytosquelette cellulaire (Rubin and Atweh 2004). *CDKN3* qui code pour l'enzyme inhibiteur de kinase cycline-dépendante 3 (Yeh, Lu et al. 2003). *TPX2* codant pour la protéine de ciblage pour Xklp2 qui a un rôle clé dans l'induction de l'assemblage et de la croissance des microtubules pendant la phase M (Trieselmann, Armstrong et al. 2003). Aussi, le $TNF\alpha$ a réduit le niveau transcriptionnel des gènes *PLK4* d'une manière plus significative que celle pour le *TOP2A*. Ce qui a été le cas avec le $TGF\beta$ mais inversement, donc le niveau transcriptionnel de *TOP2A* a été réduit d'une manière plus significative que pour le *PLK4* (figure 3-2.C).

3.2 L'activité pharmacologique de l'EGCG sur la prolifération cellulaire et l'expression des cyclines et des cyclines dépendantes des kinases induite par le $TGF\beta$ et le $TNF\alpha$

Afin de déterminer l'impact de l'EGCG sur la prolifération cellulaire, nous avons analysé l'expression protéique des biomarqueurs impliqués dans la division et la prolifération cellulaire telles les cyclines et des cycline-kinases dépendantes (CDK) lors du traitement avec l'EGCG des MSCs stimulées au $TGF\beta$ ou au $TNF\alpha$. Les cellules ont étéensemencées et cultivées pendant 24 h, puis traitées à 0.03 $\mu\text{g/ml}$ de $TGF\beta$ ou à 0.3 $\mu\text{g/ml}$ de $TNF\alpha$ plus ou moins 30 μM d'EGCG en co-traitement pendant 24 h. Les lysats ont été analysés par électrophorèse, suivi d'un immunobuvardage de type Western. Les résultats obtenus dans la Figure 3-3 montrent que l'EGCG réduit l'expression des CDK2, CDK4 et CDK6 induite par le $TGF\beta$ et le $TNF\alpha$, le CDK2 été induit par le $TGF\beta$ et le $TNF\alpha$. Ces résultats montrent aussi que l'EGCG inhibe

l'expression du complexe CDK4/6 induite plus avec le TNF α qu'avec le TGF β . Aussi l'expression de la cycline D1 été plus induite avec le TNF α qu'avec le TGF β et que cette induction a été inhibée par l'EGCG montré dans la figure 3-5.

3.3 Activation de la voie de signalisation SRC/STAT3 par le TGF β et le TNF α participant à la croissance cellulaire

Comme la voie SRC/STAT3 est activée dans de nombreuses tumeurs et a un effet sur la prolifération et la survie cellulaire (Vigneron, Cherier et al. 2006), il nous fallait confirmer ceci par l'effet du TGF β et du TNF α dans les MSCs. Aussi de déterminer l'impact de l'EGCG sur la régulation de la voie oncogénique SRC/STAT3 dont l'activation est associée à un mauvais pronostic, par l'induction de gènes impliqués dans la prolifération et la survie cellulaire en lui procurant un rôle dans la progression tumorale (Berthenet 2015). Pour ceci, nous avons analysé le statut de phosphorylation de la protéine oncogène SRC et du facteur de transcription STAT3 après le traitement à l'EGCG, dans les MSCs stimulées au TGF β et au TNF α . La phosphorylation de SRC et de STAT3 a été observée après 24h de stimulation au TGF β et au TNF α . La figure 3-4 montre que l'EGCG inhibe la phosphorylation et l'expression de SRC et de STAT3 induite par le TGF β et le TNF α , et cela a été beaucoup plus avec le TGF β qu'avec le TNF α .

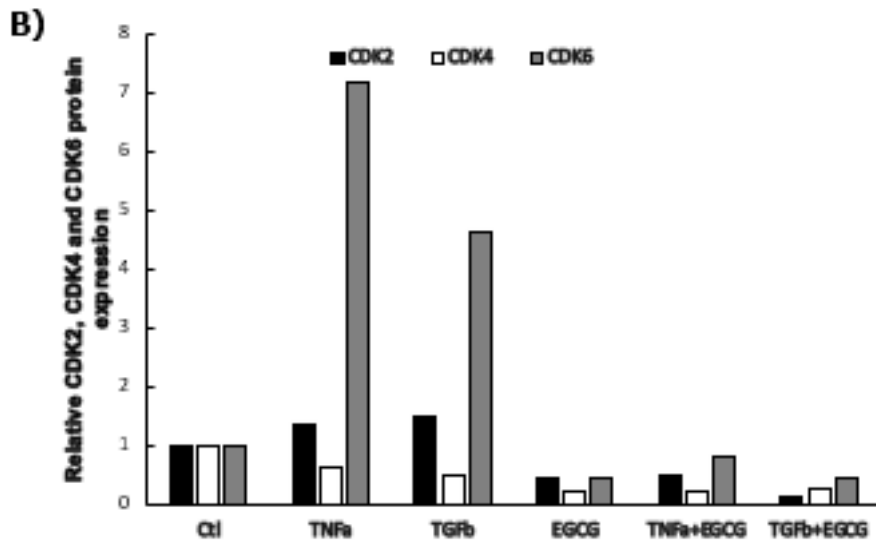
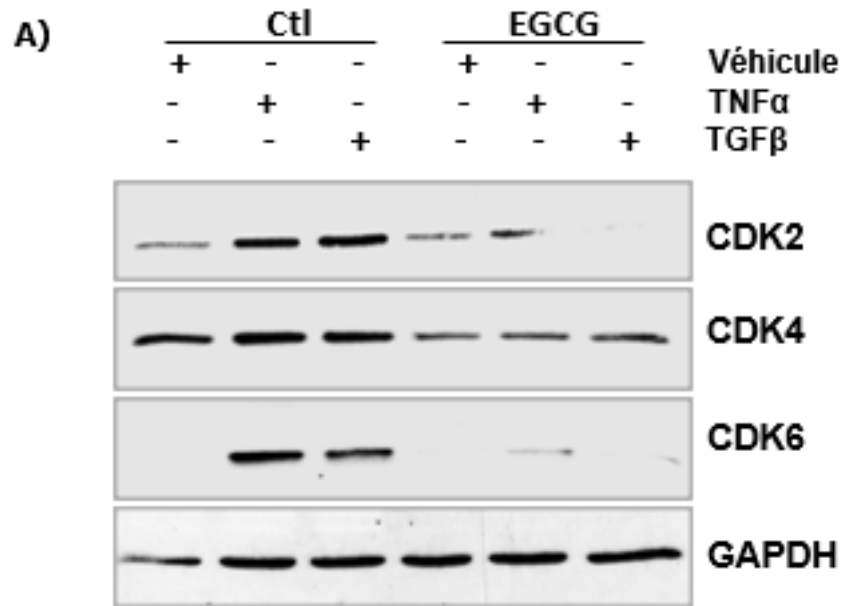


Figure 3-3 : L'EGCG inhibe l'expression des protéines Cdk (cyclin-dependent protein kinases) dans les cellules souches mésenchymateuses nécessaires à la prolifération cellulaire. A) Analyses par immunobuvardage de type Western des MSCs traitées avec 0.3 μ g/ml de TNF α ou 0.03 μ g/ml de TGF β en présence ou en absence de 30 μ M d'EGCG pendant 24h. GAPDH a été utilisé comme contrôle de charge. B) Analyse densitométrique de CDK2, CDK4 et CDK6 normalisé sur GAPDH.

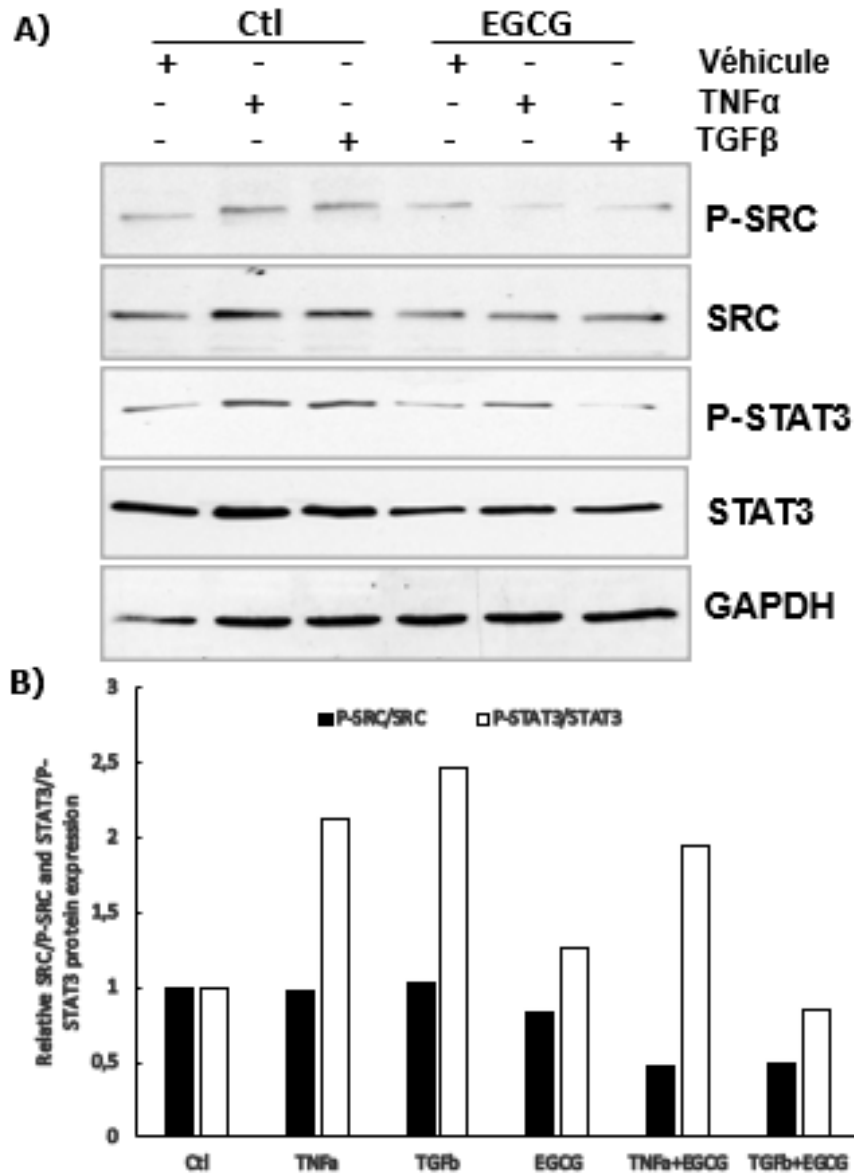


Figure 3-4 : L'EGCG inhibe la phosphorylation de Src et STAT3 dans les cellules souches mésenchymateuses. A) Analyses par Western Blot des MSCs traitées avec 0.3 μ g/ml de TNF α ou 0.03 μ g/ml de TGF β en présence ou en absence de 30 μ M d'EGCG pendant 24h. GAPDH a été utilisé comme contrôle de charge. B) Analyse densitométrique de SRC, STAT3 et SRC, STAT3 phosphorylées normalisé sur GAPDH.

3.4 Effet de l'EGCG sur l'induction de l'apoptose et l'expression de Bcl-xL

Afin de confirmer les résultats obtenus auparavant (Figure 3-1 et 3-2), montrant que le TNF α et le TGF β réduisent le point de contrôle G2/M et que donc les cellules MSCs n'entrent pas en phase mitotique et ne se divisent pas et probablement meurent par apoptose. À ce stade-ci, il fallait investiguer l'expression protéique de la protéine anti-apoptotique Bcl-xL dans les MSCs traitées avec le TNF α ou le TGF β , ainsi qu'étudier l'effet de l'EGCG sur son expression. Nous pouvons donc remarquer sur la figure 3-5 que l'expression de Bcl-xL a été plus induite avec le TNF α qu'avec le TGF β , et que cette induction a été inhibée remarquablement à 50 % avec l'EGCG.

3.5 Induction de l'arrêt du cycle cellulaire par le TGF β et le TNF α et l'effet de l'EGCG sur l'expression du p53 et p21

Confirmer l'induction de l'expression du facteur de transcription p53 et de l'inhibiteur de CDKs (p21) par le TGF β et le TNF α , était nécessaire pour pouvoir établir un lien entre le TGF β et le TNF α et l'arrêt du cycle cellulaire des MSCs. Nous avons analysé l'expression protéique de ces biomarqueurs dans les MSCs stimulées au TGF β ou au TNF α et soumises à des traitements avec l'EGCG. Nous pouvons donc remarquer sur la figure 3-6 que l'EGCG réduit l'expression du p53 faiblement induite par le TGF β et le TNF α , et il inhibe aussi l'expression du p21 induite beaucoup plus avec le TGF β qu'avec le TNF α .

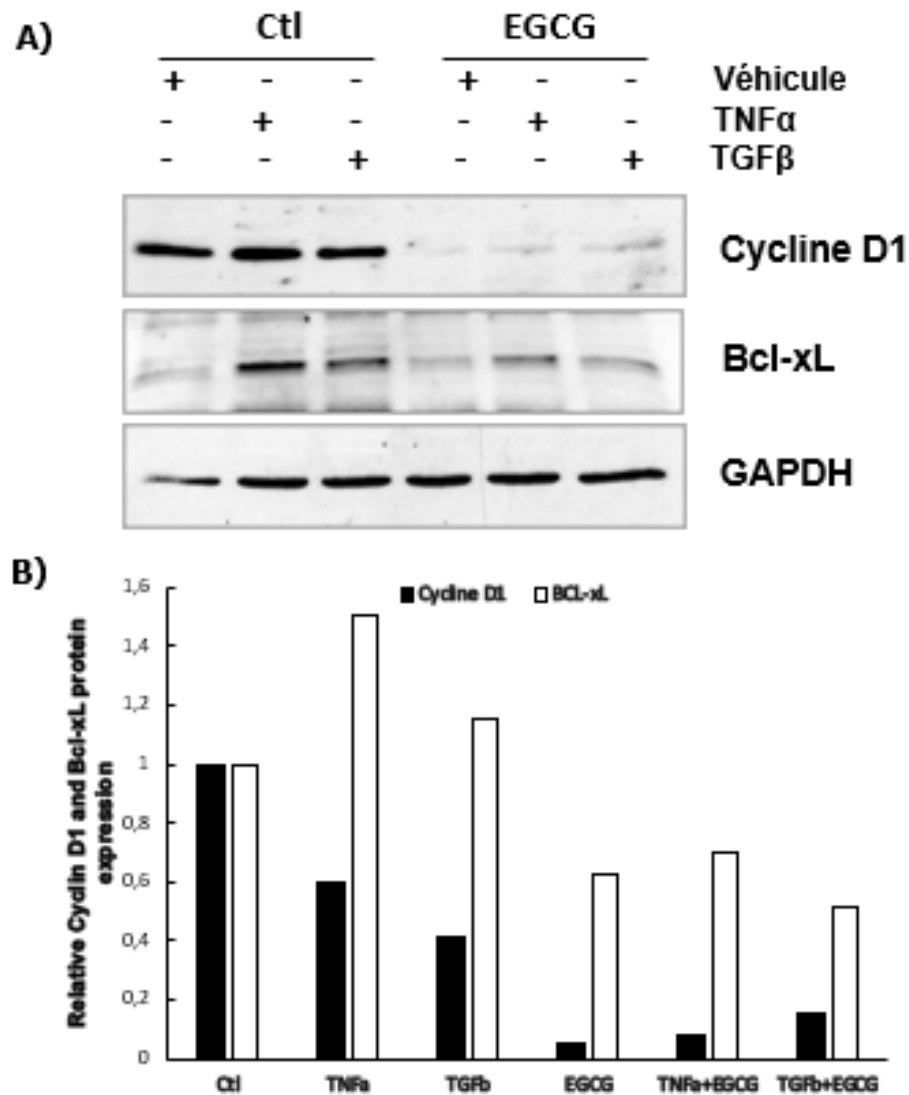


Figure 3-5 : L'EGCG régule à la baisse les niveaux de protéines des gènes cibles de STAT3 dans les cellules souches mésenchymateuses impliqués dans la survie cellulaire. A) Analyses par immunobuvardage de type Western des MSCs traitées avec 0.3 μ g/ml de TNF α ou 0.03 μ g/ml de TGF β en présence ou en absence de 30 μ M d'EGCG pendant 24h. GAPDH a été utilisé comme contrôle de charge. B) Analyse densitométrique de cycline D1 et Bcl-xL normalisé sur GAPDH.

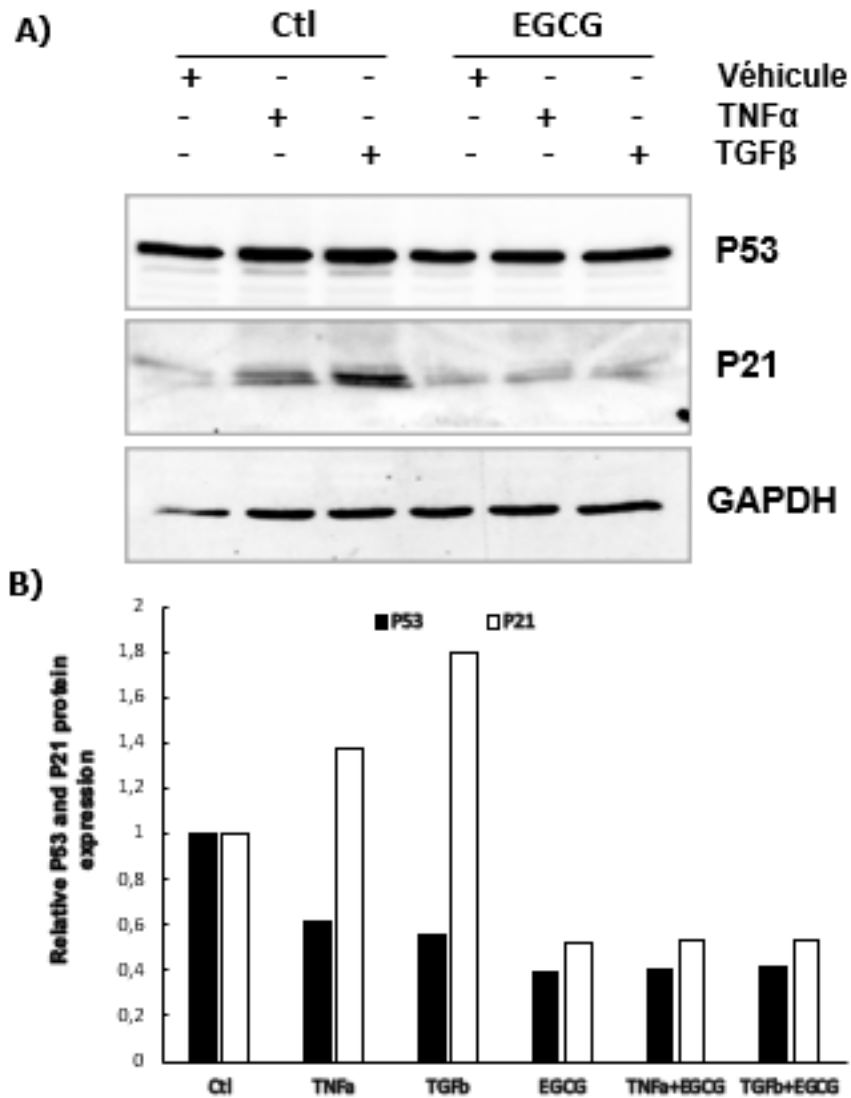


Figure 3-6 : L'EGCG inhibe l'expression de l'inhibiteur de kinase cycline-dépendante 1 (P21) dans les cellules souches mésenchymateuses. Analyses par immunobuvardage de type Western des MSCs traitées avec 0.3 $\mu\text{g/ml}$ de TNF α ou 0.03 $\mu\text{g/ml}$ de TGF β en présence ou en absence de 30 μM d'EGCG pendant 24h. GAPDH a été utilisé comme contrôle de charge. B) Analyse densitométrique de P53 et P21 normalisé sur GAPDH.

CHAPITRE 4

DISCUSSION

De nombreuses études ont indiqué que les MSCs jouent un rôle essentiel dans la biologie du cancer (Lin, Wu et al. 2022). De ce fait, elles sont recrutées au niveau des sites tumoraux suite à la sécrétion des cytokine pro-inflammatoires tels le TGF β et le TNF α par les cellules cancéreuses nécessitant un soutien nutritionnel et de l'oxygène (Lin, Wu et al. 2022). Une fois recrutées au microenvironnement tumoral, les MSCs fusionnent avec les cellules cancéreuses et participent à de nombreux processus tumoraux, tels que la prolifération, la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) et la métastase (Lin, Wu et al. 2022). La prolifération fait appel aux protéines du cycle cellulaire, parmi lesquelles : les cyclines et les CDKs, leur forte expression prolongée a été observée dans diverses maladies provoquant une prolifération cellulaire excessive, notamment dans les cancers (Vadiveloo 1999, Saleban, Harris and Poulter 2023).

Pour cela, dans notre étude nous avons traité les MSCs avec TGF β ou TNF α , des cytokines de phénomènes participants à la tumorigénèse tels la TEM et l'inflammation, et ces traitements étaient effectués en présence ou en absence d'EGCG pour étudier son impact pharmacologique. Nous avons donc eu des résultats du séquençage de l'ARN, permettant de déterminer une signature importante commune entre le TGF β et le TNF α qui se présente en la réduction du point de contrôle G2/M (point de transition induit par la mitose) et que c'est l'un des deux points de contrôle majeurs du cycle cellulaire (le second étant la phase G1/S, point d'initiation de la synthèse de l'ADN). Cette réduction a été associée à la diminution significative des niveaux de certains gènes par le TGF β et le TNF α comme : PLK4 qui code pour des protéines kinases à sérine/thréonine régulant la duplication des centrioles au cours du cycle cellulaire (Godinho, Picone et al. 2014), où d'autres résultats ont indiqué que l'expression du

gène PLK4 a été réduite par le TGF β contrairement au TNF α qui a favorisé son expression (Hu, Wang et al. 2013, Tian, Han et al. 2020). Et le TOP2A codant pour l'ADN topoisomérase II α impliquée dans la condensation des chromosomes et la séparation des chromatides (Deweese and Osheroff 2009), où il a été montré pour la première fois dans la présente étude que son expression est réduite par le TGF β et le TNF α . L'expression d'autres gènes a été réduite par le TGF β tels : MKI67 code pour la protéine Ki-67, un marqueur de prolifération cellulaire impliqué dans la régulation de la division nucléaire mitotique et biomarqueur de plusieurs maladies, dont le cancer des glandes endocrines et le cancer du système gastro-intestinal (Sobecki, Mrouj et al. 2016). Il a été déjà montré que les voies de signalisation du cancer telles la signalisation TGF- β étaient associées à une faible expression de MKI67 et une prolifération cellulaire réduite (Murthy, Oshi et al. 2021), or qu'une autre étude a révélé des niveaux d'expression élevés du gène MKI67 induits par le TGF β liés à une forte prolifération cellulaire et une agressivité cancéreuse (Oshi, Newman et al. 2020). ECT2 qui code pour une protéine ayant un rôle important dans la régulation de la cytokinèse (Liu, Ishida et al. 2004). CENPE code pour une protéine motrice qui s'accumule dans la phase G2 du cycle cellulaire et est l'un des moteurs responsables du mouvement des chromosomes des mammifères et/ou de l'allongement du fuseau (Testa, Zhou et al. 1994). Pour ces deux gènes ECT2 et CENPE, il a été prouvé dans une autre étude que leur expression était régulée à la hausse par le TGF β en favorisant le processus du cycle cellulaire mitotique (Saito, Tatsumoto et al. 2003, Luo and Gellad 2020). CDC20 codant pour la protéine cdc20 essentielle dans la régulation de la division cellulaire lors de la promotion de l'anaphase et un biomarqueur de certains cancers (Luo and Gellad 2020). KIF20B codant pour la protéine impliquée dans la régulation positive de la prolifération des populations cellulaires et la régulation positive de la cytokinèse (Kamimoto, Zama et al. 2001). CCNB2 code pour la protéine cycline-B2 spécifique à la mitose G2, joue un rôle clé dans le contrôle du cycle cellulaire (Liu, Wei et al. 1999). CEP55 codant une phosphoprotéine mitotique qui joue un rôle clé dans la cytokinèse (van der Horst, Simmons and Khanna 2009). Et le MAD2L1 codant pour la protéine

du point de contrôle de l'assemblage du fuseau mitotique qui empêche l'apparition de l'anaphase jusqu'à ce que tous les chromosomes soient correctement alignés sur la plaque métaphasique (Li, Tong et al. 2023). Par contre pour ces quatre derniers gènes, il a été prouvé pour la première fois dans la présente étude que TGF β réduisait leur expression impliquée dans la prolifération et la division cellulaire. Ces résultats, nous permettent de déduire que le TGF β diminue l'expression de certains gènes impliqués dans le point de contrôle G2/M et donc inhibe la division cellulaire.

Le TGF β contribue aussi au développement tumoral par l'induction de la prolifération et la TEM. Bien que le rôle du TGF β dans la TEM ait été bien établi, il est probable que les cellules subissant des modifications morphologiques et fonctionnelles drastiques cessent de proliférer pour faciliter la transition, afin que ces changements puissent être adaptés (Iordanskaia and Nawshad 2011). Par conséquent, l'arrêt de la prolifération cellulaire et l'activation de l'arrêt du cycle cellulaire pourraient être des conditions préalables à la différenciation et/ou à la TEM des cellules. Le contrôle de la prolifération par le TGF β est un modulateur important de la migration cellulaire et un régulateur clé de la TEM. Il a été démontré que l'arrêt de la croissance est une condition préalable à la différenciation des cellules. En réponse au TGF β , les cellules en phase G2/M subissent l'apoptose, tandis que si elles sont en phase G1/S, elles sont transférées à la TEM et sans arrêt du cycle cellulaire, ces deux phénomènes ne peuvent pas avoir lieu (Iordanskaia and Nawshad 2011). Dans une autre étude, il a été montré que le TGF β joue un double rôle dans la carcinogenèse. Aux premiers stades du cancer, le TGF β présente des effets suppresseurs de tumeurs en inhibant la progression du cycle cellulaire et en favorisant l'apoptose. Cependant, l'expression du TGF β est élevée aux stades avancés du cancer et les cellules deviennent résistantes aux effets suppresseurs induits par le TGF β , répondant à cette cytokine subissant une TEM, qui contribue à la migration et à l'invasion cellulaire (Syed 2016, Soukupova, Malfettone et al. 2021). Cela peut expliquer nos résultats démontrant que le TGF β réduit le point de contrôle

G2/M et induit l'arrêt du cycle cellulaire, vue que nous avons fait des traitements de 24h.

D'autres gènes ont eu une diminution significative de leurs niveaux de transcription suite au traitement des cellules par le TNF α tels : POLQ codant pour l'ADN polymérase θ , un composant principal de la voie alternative de réparation de l'ADN par jonction d'extrémité non homologues (ANHEJ) qui ligature les cassures double brin de l'ADN (Liddiard, Aston-Evans et al. 2022), où il a été démontré pour la première fois dans notre étude qu'il y a un lien direct avec le TNF α et que ce dernier réduit son expression. RBL1 code pour le Retinoblastoma-like 1, une protéine impliquée dans la régulation du cycle cellulaire, elle est phosphorylée dans la transition de phase S à M (Rual, Venkatesan et al. 2005), et il a été montré auparavant que cette phosphorylation et l'augmentation des niveaux d'expression de RBL1 a été activé par le TNF α induisant une prolifération cellulaire accrue (Wong, Jamal et al. 2017). STMN1 code pour la stathmine, une protéine cruciale dans la régulation du cycle cellulaire en régulant le cytosquelette cellulaire (Rubin and Atweh 2004); par contre d'après les données antérieures, l'expression de ce gène STMN1 a été régulée à la baisse par le TNF α réduisant la migration et l'invasion des cellules (Wang, Feng et al. 2017). Et le TPX2 code pour la protéine de ciblage pour Xklp2 qui a un rôle intégral dans l'assemblage des microtubules (la mitose), TPX2 est surexprimé dans différents types de cancers humains et contribue à la croissance tumorale et aux métastases (Trieselmann, Armstrong et al. 2003), et l'expression à la baisse du TPX2 par le TNF α a été montré pour la première fois dans la présente étude. Il a été montré que l'appauvrissement en TPX2 a été lié à une instabilité génomique, entraînant des dommages à l'ADN. Cette instabilité peut agir comme un mécanisme de suppression de la tumeur en entraînant la mort cellulaire (Neumayer and Nguyen 2014). De ce fait, nous pouvons dire que le TNF α entraîne des dommages à l'ADN dans les MSCs traitées, ce qui va induire une diminution de l'expression de certains gènes impliqués dans le point de contrôle G2/M et donc la division cellulaire va être réduite.

Nos résultats sont en cohérence avec les résultats des études précédentes montrant que le TNF α a fait sortir les cellules cancéreuses du sein de la phase de repos G0/G1, les faisant entrer dans des phases de prolifération. En conséquence, le TNF α a provoqué davantage de dommages à l'ADN en régulant positivement la formation de H2AX phosphorylé -un marqueur des cassures double brin de l'ADN- à des niveaux plus élevés et a renforcé l'arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M et S (Wu, Wu et al. 2017), où la plupart des cellules meurent (subissent une lyse) (Darzynkiewicz, Traganos et al. 1984). Il peut donc déclencher différentes formes de mort cellulaire programmée qui se distinguent morphologiquement tels l'apoptose et la nécroptose (nécrose programmée) (Wu, Wu et al. 2017). Le TNF α a démontré une activité anticancérogène dans les cellules en fonction de la dose et du temps (Jeoung, Allen et al. 1995). Par conséquent, le TNF α a déjà été utilisé comme agent antitumoral en raison de son large spectre d'effets cytotoxiques contre diverses cellules cancéreuses, notamment le cancer colorectal, le mélanome et le sarcome (Wu, Wu et al. 2017). Cependant, l'application clinique du TNF α a été limitée, en grande partie en raison de son induction de la transcription de gènes pro-inflammatoires et anti-apoptotiques (Wu, Wu et al. 2017). Et comme le TNF α est un médiateur clé de l'inflammation, il induit et améliore la survie cellulaire en favorisant la prolifération et en inhibant l'apoptose de manière dose-dépendante (Hu, Wang et al. 2015, Rossi, da Silva Manoel-Caetano et al. 2022). Des événements courants dans l'initiation et la promotion d'une maladie maligne, permettant la contribution à la cancérogenèse. Par exemple, le TNF α stimule la croissance tumorale et les métastases dans un modèle murin de cancer du pancréas, des tumeurs cutanées, ovariennes et intestinales (Hu, Wang et al. 2015).

A partir de ces résultats et pour les confirmer, nous avons procédé à vérifier l'expression des protéines impliquées dans le cycle cellulaire comme, la cycline D1 et les CDK 2, 4 et 6 suites au traitement au TGF β ou au TNF α en présence ou en absence d'EGCG. La cycline D1 en se liant au CDK4 et/ou CDK6, induit la formation du complexe CDK4/6 et l'inhibition de la protéine du rétinoblastome (Rb) (un suppresseur

tumoral) par sa phosphorylation au début de la phase G1 conduisant à la progression du cycle cellulaire (Zhu, Yu et al. 2017). Donc, le passage de la phase G1 à la phase S est assuré par l'activité des CDK4/6, une étape du cycle cellulaire déterminant ou non cette division. Lorsque l'activité des CDK4/6 est bloquée par un inhibiteur, la division cellulaire est stoppée. Les inhibiteurs de CDK4/6 permettent donc d'empêcher la réplication des cellules cancéreuses (Carassou, Meijer et al. 2012). À la fin de la phase G1, la cycline E se lie au CDK2 et l'active, ce qui entraîne la phosphorylation complète de pRb et la progression du cycle cellulaire conduisent au passage de la cellule de la phase G1/S à la phase S. Suite à cela, les cyclines A forment un complexe avec CDK2 entraînant la progression de la cellule vers la phase G2 (Wang 2021, Kamranvar, Gupta et al. 2022). D'après nos résultats sur la figure 3-3, l'activation de CDK6 par le TGF β et par le TNF α d'une manière plus élevée a conduit à l'activation du complexe CDK4/CDK6 induisant l'inhibition de la pRb et normalement la poursuite de la division cellulaire mais par la suite la CDK2 a été activée mais d'une manière très minime. Donc, pas de liaison avec la cycline E ou la cycline A, ce qui a probablement inhibé le passage de la cellule de la phase G1/S à la phase S et la progression de la cellule vers la phase G2. Cela peut expliquer la réduction du point de contrôle G2/M par le TNF α et plus significativement par le TGF β .

Des résultats des études antérieures sur deux lignées cellulaires de leucémie humaine sont en cohérence avec les nôtres, où il a été démontré que le TGF β a un rôle inhibiteur et régulateur négatif de l'activité cycline/CDK en phase G1 et bloque la transition G1/S, liée à la destruction de l'assemblage cycline E – CDK2 et à l'inhibition de la synthèse de CDK4 (Hu, Cui et al. 2007). Il régule négativement aussi l'expression de plusieurs kinases du point de contrôle G2/M. De plus, le TGF β a un effet inhibiteur sur la phosphorylation de pRb, conduisant à l'inhibition de la transcription de l'ADN (Hu, Cui et al. 2007). Ces mécanismes majeurs représentés par l'inhibition des activités kinases du point de contrôle G1 et la déphosphorylation de pRb sont donc liés à l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 et à l'inhibition de la prolifération cellulaire (Hu, Cui et al. 2007).

Contrairement au TNF α où d'autres études ont montré qu'il induit l'activation de NF- κ B stimulant les transcriptions de la cycline D1, de la cycline D2, de la cycline E, de CDK4 et de CDK6 et la diminution de l'expression de la protéine Rb (Jeoung, Allen et al. 1995, Hu, Cui et al. 2007), pour accélérer la progression du cycle cellulaire à partir de G0/G1 vers phase S. En conséquence, le TNF α a fait sortir les cellules cancéreuses au repos de la phase G0/G1, les faisant entrer dans des phases de prolifération sensibles au traitement (Yang, Li et al. 2012, Wu, Wu et al. 2017, Zhu, Yu et al. 2017), suggérant que le TNF α est un régulateur de la transition du cycle cellulaire G1 \rightarrow S via la voie NF- κ B (Wu, Wu et al. 2017).

Dans notre étude, nous avons remarqué que cette expression de la cycline D1 et des CDK2, 4 et 6 induite par le TGF β et le TNF α dans les MSCs a été inhibée par l'EGCG, ce qui nous laisse déduire que cette molécule a un rôle similaire au rôle des CKI. En inhibant ces protéines kinases du cycle cellulaire, l'EGCG inhibe la formation de complexes cycline D1 /CDK4,6, ce qui induit à l'activation de la protéine Rb par phosphorylation et donc le blocage de la division cellulaire. Cela a été prouvé dans les précédentes études montrant que l'EGCG supprime la division des cellules lymphocytaires T en entravant le cycle cellulaire. La division cellulaire a été significativement inhibée par l'EGCG induisant son arrêt en phase G0/G1, la diminution de l'activité de synthèse de l'ADN en phase S et la diminution de la progression vers le phase G2/M (Wang, Niu et al. 2015). Il a été montré en outre que l'EGCG réduisait l'expression des protéines cyclines A, B et D liées au cycle cellulaire. Conformément à cela, l'EGCG inhibait également l'expression des CDK 2, 4, 5 et 6. De plus, L'EGCG a empêché la phosphorylation (inactivation) de la protéine du rétinoblastome (Rb) suppresseur du cycle cellulaire et a réduit l'expression des inhibiteurs de CDK P27 et P21. Ce qui montre que l'effet inhibiteur de l'EGCG est dû à une progression entravée du cycle cellulaire, qui à son tour est liée à une activité altérée et/ou à l'expression de plusieurs molécules connues pour réguler la progression du cycle cellulaire (Wang, Niu et al. 2015). L'EGCG inhibe la division et la

prolifération des cellules cancéreuses grâce à la régulation des complexes pRb-CDK et donc il inhibe de manière significative leur prolifération, par le mécanisme de déphosphorylation considérable de la pRb et la régulation négative de la formation de complexes CDK4-pRb et CDK6-pRb. Ces derniers mécanismes favorisent tous la liaison de Rb aux facteurs de transcription E2F et empêchent l'entrée de la cellule en phase S, conduisant à une inhibition de la croissance cellulaire et l'arrêt du développement de la tumeur (Henry, Brumaire and Hu 2018).

La prolifération et la survie cellulaire dans de nombreuses tumeurs sont associées à l'activation de la voie SRC/STAT3 qui induit l'expression de gènes impliqués dans ces phénomènes tel la cycline D1 (Berthenet 2015, Rodriguez Torres, Gresseau et al. 2023). Nous avons tenté de vérifier ceci par immunobuvardage de type Western (Western blot) dans les MSCs après traitement au TGF β ou au TNF α . Notre présente étude démontre pour la première fois que le TNF α active dans les MSCs la voie SRC/STAT3 impliquée dans la progression du cycle cellulaire, contrairement à d'autres études sur les cellules cancéreuses du sein où le TNF α induisait la stimulation de l'expression des cyclines et CDKs participants à la division et prolifération cellulaire en activant la voie NF- κ B (Wu, Wu et al. 2017). Quant au TGF β , il était rapporté qu'il induisait la protéine TGFBI (Korvatska, Munier et al. 1998) qui, en se liant avec l'intégrine $\alpha\beta$ 5 activait la phosphorylation de la tyrosine kinase SRC, régulant ainsi positivement la voie STAT3, achevant un effet pro-tumorigène et la promotion de la prolifération des cellules souches cancéreuses dans diverses tumeurs (Peng, Zhu et al. 2022). Ces résultats et les résultats des figures 3-1 et 3-2 montrent que le TGF β et TNF α , en plus de réduire le point de contrôle G2/M et donc la division cellulaire, induisent aussi la division et la prolifération. Cela peut être expliqué par le double rôle des deux cytokines -inducteur et réducteur- de la division et la prolifération cellulaire. Pour le TNF α , la balance se penche vers l'induction de la division cellulaire, cependant pour le TGF β elle se penche vers la réduction de la division cellulaire. Les résultats de la figure 3-4 nous montrent aussi que l'utilisation de l'EGCG, après avoir traité les MSCs au TGF β ou au TNF α ,

inhibe l'expression de SRC et la phosphorylation et l'activation de STAT3 conduisant à l'inhibition de la synthèse de la cycline D1 et à la suppression de la promotion du cycle cellulaire (figure 3-5). Des résultats antérieurs ont montré que l'EGCG était capable de supprimer l'expression de pSRC et d'inhiber également l'expression de STAT3 dans les tumeurs du cancer de l'ovaire (Rodriguez Torres, Gresseau et al. 2023).

Étant donné que les produits génétiques régulés par STAT3, tels que Bcl-xL et la cycline D1, sont impliqués dans une prolifération cellulaire accrue (Aziz, Sarwar et al. 2021), l'inhibition sélective de la signalisation STAT3 peut supprimer la prolifération et inhiber la croissance de diverses cellules cancéreuses, notamment celles de l'estomac, du foie, de la tête et du cou, de la peau et des poumons et elle induit aussi l'apoptose dans les cellules cancéreuses (Park, Park et al. 2016, Aziz, Sarwar et al. 2021). Nous pouvons remarquer sur la figure 3-5 qu'après le traitement des MSCs au TGF β ou au TNF α , l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-xL a été induite beaucoup plus avec TNF α qu'avec TGF β confirmant nos précédents résultats montrant que le TGF β a quand même un effet pro-apoptotique vu que l'expression du Bcl-xL est minime contrairement au TNF α ayant un rôle anti-apoptotique. Ces propriétés anti-apoptotiques du TNF α sont liées à l'activation de la voie NF- κ B induisant à la transcription de ses gènes cibles tel Bcl-xL (Wang and Lin 2008). D'autres publications ont montré que le TGF β a un rôle de suppresseur tumoral en induisant l'apoptose via la voie pRb/E2F (Korah, Canaff and Lebrun 2016). Pour la première fois à notre connaissance, notre étude supporte un rôle inducteur de l'apoptose de TGF β et TNF α par la régulation de l'expression du Bcl-xL. Notre étude montre aussi que l'expression de cette protéine anti-apoptotique a été inhibée par l'EGCG dans les MSC traitées avec TGF β ou TNF α , ce qui est en cohérence avec les résultats d'une étude précédente, démontrant l'impact pro-apoptotique de l'EGCG sur les cellules cancéreuses surexprimant des protéines anti-apoptotiques tels que Bcl-xL, Bcl-2 et pAKT en diminuant leur expression (Rodriguez Torres, Gresseau et al. 2023).

La régulation négative de l'expression des protéines anti-apoptotiques comme Bcl-xL régulée par STAT3, augmente l'expression de la protéine p53 induisant l'arrêt du cycle cellulaire par l'activation transcriptionnelle d'un de ses produits géniques régulateurs du cycle cellulaire tel le P21 (Park, Park et al. 2016). D'après la figure 3-6 (plus précisément la figure 3-6 A), l'expression de P53 est constante dans les MSCs contrôle et dans les MSCs traitées au TGF β ou au TNF α et peut être un peu plus induite dans les MSCs traitées au TGF β ou au TNF α (ce que nous ne voyons pas sur la figure 3-6 B, après normalisation sur GAPDH qui n'est pas exprimé d'une manière constante et est moins exprimé dans les cellules contrôle -erreur de manipulation-). En parallèle, l'expression de P21 est induite beaucoup plus par le TGF β que par le TNF α suggérant que la P53 a activé la P21 qui a inhibé les protéines du cycle cellulaire et arrêté la division des cellules. Cela a été prouvé auparavant, où d'autres études ont montré que le TNF α diminue l'expression de la protéine Rb et augmente le niveau d'expression de la protéine suppresseur de tumeur P53 qui à son tour, induit l'expression de la protéine P21 inhibant la cycline D en formant un complexe. Ce qui montre que les protéines Rb, P53 et P21 médient l'activité antimitogène du TNF α et que ce dernier conduit à l'arrêt du cycle cellulaire (Jeoung, Allen et al. 1995). Aussi, le TGF β inhibe la prolifération cellulaire dans les cellules épithéliales par plusieurs voies, notamment la régulation positive des inhibiteurs (CDK) comme le P21, un inducteur de l'arrêt du cycle cellulaire à la phase G1 à la suite de sa liaison au CDK 4 ou 6 et empêche son interaction avec la cycline D (Iordanskaia and Nawshad 2011). Pris ensemble, ces résultats sont en cohérence avec ceux qu'on a eu précédemment indiquant que le TGF β réduisait beaucoup plus la division cellulaire et le point de contrôle G2/M que le TNF α .

De plus, nos résultats démontrent que l'EGCG a un effet inhibiteur sur l'expression de P53, ce qui n'est en cohérence avec une autre étude montrant pour la première fois que l'EGCG pouvait activer la voie apoptotique mitochondriale en inhibant la voie de signalisation SIRT1-P53 et enfin en induisant l'apoptose dans les lignées cellulaires (Jiang, Huang et al. 2022). Par contre, pour la P21 qui a été inhibée par l'EGCG dans

notre étude, c'est contradictoire par rapport aux études antérieures où l'EGCG augmentait l'expression de la P21 (Thakur, Ruhul Amin et al. 2010). Seulement en cohérence avec une seule étude, où ils ont trouvé que l'EGCG a inversé la régulation positive de P21 dans des maladies auto-immunes médiées par les lymphocytes T, suggérant que P21 pourrait ne pas être impliqué dans l'effet de l'EGCG sur la fonction des lymphocytes T (Niu, Liu et al. 2023). Des recherches plus approfondies sont donc nécessaires pour comprendre les mécanismes sous-jacents.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

La compréhension des rôles centraux des facteurs pro-inflammatoires, telles les cytokines secrétées par les cellules cancéreuses dans le contrôle et la progression tumorale impliquant les MSCs, constitue un grand défi des recherches cliniques et fondamentales et une cible intéressante pour le traitement du cancer. Cependant, le double rôle du TGF β et du TNF α en tant que suppresseurs et amplificateurs de tumeur présente un défi important dans le développement de traitements ciblant leur signalisation.

Le TGF β et le TNF α , deux importantes cytokines jouant un rôle crucial dans l'inflammation, la migration et l'invasion cellulaire ainsi que dans la métastase. De ce fait, l'identification d'agents thérapeutiques susceptibles d'inhiber la transduction du signal induite par ces facteurs revêt une grande importance. Ceci est crucial pour prévenir ou atténuer la progression de diverses maladies, en particulier le cancer. L'EGCG a été notre agent nutraceutique sélectionné pour l'étude, en raison de son importance bien documentée dans la prévention du cancer en ciblant les mécanismes sous-jacents qui facilitent la progression tumorale.

Nous avons démontré ses effets bénéfiques dans l'inhibition de la voie de signalisation SRC/STAT3 impliquée dans la prolifération (cycle cellulaire), la différenciation et l'apoptose induites par le TGF β et le TNF α dans les cellules MSCs. Dans cette condition, cela se traduit par l'inhibition de l'expression de la cycline D1, des CDK2, 4 et 6 et de la molécule anti-apoptotique Bcl-xL. Or que, l'EGCG peut avoir un rôle défavorable en induisant l'inhibition de la P53 et en inhibant l'expression de la P21 une protéine inhibitrice des CDK régulée par la P53, permettant ainsi la division et la poursuite du cycle cellulaire.

Pour comprendre les mécanismes sous-jacents, il serait intéressant d'étudier les voies utilisées par l'EGCG pour remplir sa fonction, car il a été établi qu'il interagit avec le récepteur de la laminine 67LR, mais pas dans toutes les cellules. Il serait également intéressant de réaliser une cytométrie en flux pour évaluer et étudier plus profondément l'effet de l'EGCG sur la progression du cycle cellulaire et l'expression des protéines intracellulaires impliquées dans celui-ci, notamment P21 et en relation avec P53. Des recherches plus approfondies sur le rôle du crosstalk entre le TGF β et le TNF α sont également possibles, car les résultats et la littérature suggèrent un lien entre ces voies de signalisation, favorisant ainsi la progression tumorale.

BIBLIOGRAPHIE

- Al-Jumaili, M. H. A., et al. (2023). "Analysis and prediction pathways of natural products and their cytotoxicity against HeLa cell line protein using docking, molecular dynamics and ADMET." J Biomol Struct Dyn **41**(3): 765-777.
- Alessandrini, M., et al. (2019). "Transplantation of gene-modified haematopoietic stem cells: Application and clinical considerations." S Afr Med J **109**(8b): 64-69.
- Aziz, M. A., et al. (2021). "Polyphenolic molecules targeting STAT3 pathway for the treatment of cancer." Life Sci **268**: 118999.
- Babaei, G., et al. (2021). "EMT, cancer stem cells and autophagy; The three main axes of metastasis." Biomed Pharmacother **133**: 110909.
- Bailón-Moscoso, N., et al. (2014). "Development of anticancer drugs based on the hallmarks of tumor cells." Tumour Biol **35**(5): 3981-3995.
- Balkwill, F. (2006). "TNF-alpha in promotion and progression of cancer." Cancer Metastasis Rev **25**(3): 409-416.
- Béliveau, R. and D. Gingras (2007). "Role of nutrition in preventing cancer." Can Fam Physician **53**(11): 1905-1911.
- Berthenet, K. (2015). HSP110 : role in colorectal cancer development and immunogenicity
- Brenner, D. R., et al. (2022). "Projected estimates of cancer in Canada in 2022." Cmaj **194**(17): E601-e607.
- Briukhovetska, D., et al. (2021). "Interleukins in cancer: from biology to therapy." Nat Rev Cancer **21**(8): 481-499.
- Brochard, C. (2019). Caractérisation des cellules stromales mésenchymateuses équinés dérivées de moelle osseuse-partie 1.
- Brücher, B. L. and I. S. Jamall (2014). "Cell-cell communication in the tumor microenvironment, carcinogenesis, and anticancer treatment." Cell Physiol Biochem **34**(2): 213-243.

- Bullwinkel, J., et al. (2006). "Ki-67 protein is associated with ribosomal RNA transcription in quiescent and proliferating cells." J Cell Physiol **206**(3): 624-635.
- Cable, J., et al. (2020). "Adult stem cells and regenerative medicine-a symposium report." Ann N Y Acad Sci **1462**(1): 27-36.
- Cao, Z., et al. (2019). "Interaction between autophagy and the NLRP3 inflammasome." Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai) **51**(11): 1087-1095.
- Carassou, P., et al. (2012). "[Cell cycle and molecular targets: CDK inhibition]." Bull Cancer **99**(2): 163-171.
- Clark, D. A. and R. Coker (1998). "Transforming growth factor-beta (TGF-beta)." Int J Biochem Cell Biol **30**(3): 293-298.
- Clevers, H. (2015). "STEM CELLS. What is an adult stem cell?" Science **350**(6266): 1319-1320.
- Dai, L., et al. (2018). "Modulation of Protein-Interaction States through the Cell Cycle." Cell **173**(6): 1481-1494.e1413.
- Darzynkiewicz, Z., et al. (1984). "Accessibility of DNA in situ to various fluorochromes: relationship to chromatin changes during erythroid differentiation of Friend leukemia cells." Cytometry **5**(4): 355-363.
- Deweese, J. E. and N. Osheroff (2009). "The DNA cleavage reaction of topoisomerase II: wolf in sheep's clothing." Nucleic Acids Res **37**(3): 738-748.
- Dinareello, C. A. (2007). "Historical insights into cytokines." Eur J Immunol **37 Suppl 1**(Suppl 1): S34-45.
- Ding, D. C., et al. (2011). "Mesenchymal stem cells." Cell Transplant **20**(1): 5-14.
- Dykstra, B., et al. (2007). "Long-term propagation of distinct hematopoietic differentiation programs in vivo." Cell Stem Cell **1**(2): 218-229.
- Elmore, S. (2007). "Apoptosis: a review of programmed cell death." Toxicol Pathol **35**(4): 495-516.

- Feitelson, M. A., et al. (2015). "Sustained proliferation in cancer: Mechanisms and novel therapeutic targets." Semin Cancer Biol **35 Suppl**(Suppl): S25-s54.
- Fujimura, Y., et al. (2022). "Metabolic Profiling for Evaluating the Dipeptidyl Peptidase-IV Inhibitory Potency of Diverse Green Tea Cultivars and Determining Bioactivity-Related Ingredients and Combinations." J Agric Food Chem **70**(21): 6455-6466.
- Godinho, S. A., et al. (2014). "Oncogene-like induction of cellular invasion from centrosome amplification." Nature **510**(7503): 167-171.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation." Cell **144**(5): 646-674.
- Hayakawa, S., et al. (2020). "Anti-Cancer Effects of Green Tea Epigallocatechin-3-Gallate and Coffee Chlorogenic Acid." Molecules **25**(19).
- He, W., et al. (2019). "MSC-regulated lncRNA MACC1-AS1 promotes stemness and chemoresistance through fatty acid oxidation in gastric cancer." Oncogene **38**(23): 4637-4654.
- He, X. M., et al. (1992). "Structure of a human monoclonal antibody Fab fragment against gp41 of human immunodeficiency virus type 1." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(15): 7154-7158.
- Henry, D., et al. (2018). "Rb may play a key role in green tea-induced growth inhibition of human myeloid leukemia cells." Cancer Research **78**(13_Supplement): 4311-4311.
- Hoang, D. M., et al. (2022). "Stem cell-based therapy for human diseases." Signal Transduct Target Ther **7**(1): 272.
- Hong, Y., et al. (2020). "Isolation and Cultivation of Mandibular Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells in Rats." Journal of Visualized Experiments **2020**.
- Hu, J., et al. (2013). "Polo-like kinase 1 (PLK1) is involved in toll-like receptor (TLR)-mediated TNF- α production in monocytic THP-1 cells." PLoS One **8**(10): e78832.
- Hu, X., et al. (2007). "TGF β regulates the expression and activities of G2 checkpoint kinases in human myeloid leukemia cells." Cytokine **37**(2): 155-162.

- Hu, X., et al. (2015). "Corrigendum: Sterol metabolism controls TH17 differentiation by generating endogenous ROR γ agonists." Nat Chem Biol **11**(9): 741.
- Idriss, H. T. and J. H. Naismith (2000). "TNF α and the TNF receptor superfamily: Structure-function relationship(s)." Microscopy Research and Technique **50**(3): 184-195.
- Iordanskaia, T. and A. Nawshad (2011). "Mechanisms of transforming growth factor β induced cell cycle arrest in palate development." J Cell Physiol **226**(5): 1415-1424.
- Irigaray, P., et al. (2007). "Lifestyle-related factors and environmental agents causing cancer: an overview." Biomed Pharmacother **61**(10): 640-658.
- Jakowlew, S. B. (2006). "Transforming growth factor-beta in cancer and metastasis." Cancer Metastasis Rev **25**(3): 435-457.
- Jarczak, D. and A. Nierhaus (2022). "Cytokine Storm-Definition, Causes, and Implications." Int J Mol Sci **23**(19).
- Jeoung, D.-i., et al. (1995). "Mitogenic and receptor activities of human growth hormone 108ndash;129." Journal of Biological Chemistry **270**(44): 26721.
- Jiang, S., et al. (2022). "EGCG Inhibits Proliferation and Induces Apoptosis Through Downregulation of SIRT1 in Nasopharyngeal Carcinoma Cells." Front Nutr **9**: 851972.
- Kamimoto, T., et al. (2001). "Identification of a Novel Kinesin-related Protein, KRMP1, as a Target for Mitotic Peptidyl-prolyl Isomerase Pin1 *." Journal of Biological Chemistry **276**(40): 37520-37528.
- Kamranvar, S. A., et al. (2022). "Integrin-Mediated Adhesion Promotes Centrosome Separation in Early Mitosis." Cells **11**(8).
- Khan, N. and H. Mukhtar (2018). "Tea Polyphenols in Promotion of Human Health." Nutrients **11**(1).
- Korah, J., et al. (2016). "The Retinoblastoma Tumor Suppressor Protein (pRb)/E2 Promoter Binding Factor 1 (E2F1) Pathway as a Novel Mediator of TGF β -induced Autophagy." J Biol Chem **291**(5): 2043-2054.

- Korvatska, E., et al. (1998). "Mutation hot spots in 5q31-linked corneal dystrophies." Am J Hum Genet **62**(2): 320-324.
- Li, N. and J. Hua (2017). "Interactions between mesenchymal stem cells and the immune system." Cell Mol Life Sci **74**(13): 2345-2360.
- Li, Q., et al. (2023). "MAD2L1 is transcriptionally regulated by TEAD4 and promotes cell proliferation and migration in colorectal cancer." Cancer Gene Therapy **30**(5): 727-737.
- Lichtman, M. K., et al. (2016). "Transforming growth factor beta (TGF- β) isoforms in wound healing and fibrosis." Wound Repair Regen **24**(2): 215-222.
- Liddiard, K., et al. (2022). "POLQ suppresses genome instability and alterations in DNA repeat tract lengths." NAR Cancer **4**(3): zcac020.
- Liddiard, K., et al. (2022). "POLQ suppresses genome instability and alterations in DNA repeat tract lengths." NAR Cancer **4**(3).
- Lim, S. and P. Kaldis (2013). "Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation." Development **140**(15): 3079-3093.
- Lin, Z., et al. (2022). "Mesenchymal stem cell-derived exosomes in cancer therapy resistance: recent advances and therapeutic potential." Molecular Cancer **21**(1): 179.
- Lin, Z., et al. (2022). "Mesenchymal stem cell-derived exosomes in cancer therapy resistance: recent advances and therapeutic potential." Mol Cancer **21**(1): 179.
- Liu, C., et al. (2022). "Synthesis and biological evaluation of BU-4664L derivatives as potential anticancer agents." Bioorg Med Chem Lett **55**: 128474.
- Liu, J. H., et al. (1999). "Functional association of TGF- β receptor II with cyclin B." Oncogene **18**(1): 269-275.
- Liu, X. F., et al. (2004). "Nucleotide exchange factor ECT2 interacts with the polarity protein complex Par6/Par3/protein kinase Czeta (PKCzeta) and regulates PKCzeta activity." Mol Cell Biol **24**(15): 6665-6675.
- Luo, J. and W. F. Gellad (2020). "Origins of the Crisis in Insulin Affordability and Practical Advice for Clinicians on Using Human Insulin." Curr Diab Rep **20**(1): 2.

- Luqman, S. and J. M. Pezzuto (2010). "NFkappaB: a promising target for natural products in cancer chemoprevention." Phytother Res **24**(7): 949-963.
- Mafra da Costa, A., et al. (2021). "Impact of COVID-19 Pandemic on Cancer-Related Hospitalizations in Brazil." Cancer Control **28**: 10732748211038736.
- Malumbres, M. and M. Barbacid (2009). "Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm." Nat Rev Cancer **9**(3): 153-166.
- Matthews, H. K., et al. (2022). "Cell cycle control in cancer." Nat Rev Mol Cell Biol **23**(1): 74-88.
- Mattiuzzi, C. and G. Lippi (2019). "Current Cancer Epidemiology." J Epidemiol Glob Health **9**(4): 217-222.
- Mongis, A. (2017). Une nouvelle stratégie d'immunothérapie: cibler directement des immunostimulants à la surface des cellules tumorales par ligation bio-orthogonale, Université d'Orléans.
- Morikawa, M., et al. (2016). "TGF- β and the TGF- β Family: Context-Dependent Roles in Cell and Tissue Physiology." Cold Spring Harb Perspect Biol **8**(5).
- Murthy, V., et al. (2021). "Increased apoptosis is associated with robust immune cell infiltration and cytolytic activity in breast cancer." Am J Cancer Res **11**(7): 3674-3687.
- Musial, C., et al. (2020). "Beneficial Properties of Green Tea Catechins." Int J Mol Sci **21**(5).
- Nailing, T., et al. (2015). "Cryoablation induced the change of TGF- β pathway in CWR-22RV prostate cancer cell line." Cryobiology **71**(1): 130-134.
- Neerghen, V. S., et al. (2010). "Targeting specific cell signaling transduction pathways by dietary and medicinal phytochemicals in cancer chemoprevention." Toxicology **278**(2): 229-241.
- Neumayer, G. and M. D. Nguyen (2014). "TPX2 impacts acetylation of histone H4 at lysine 16: implications for DNA damage response." PLoS One **9**(11): e110994.

- Niu, X., et al. (2023). "Green tea EGCG inhibits naïve CD4(+) T cell division and progression in mice: An integration of network pharmacology, molecular docking and experimental validation." Curr Res Food Sci **7**: 100537.
- Obeng, E. (2021). "Apoptosis (programmed cell death) and its signals - A review." Braz J Biol **81**(4): 1133-1143.
- Oh, S.-Y., et al. (2019). "Application of Tonsil-Derived Mesenchymal Stem Cells in Tissue Regeneration: Concise Review." Stem Cells **37**(10): 1252-1260.
- Okabe, N., et al. (2021). "An autopsy case study of lymphocytic hypophysitis induced by nivolumab treatment for esophageal malignant melanoma." Pathology International **71**(12): 831-836.
- Opal, S. M. and V. A. DePalo (2000). "Anti-inflammatory cytokines." Chest **117**(4): 1162-1172.
- Oshi, M., et al. (2020). "High G2M Pathway Score Pancreatic Cancer is Associated with Worse Survival, Particularly after Margin-Positive (R1 or R2) Resection." Cancers (Basel) **12**(10).
- Pan, Y., et al. (2016). "Acute esophagitis for patients with local-regional advanced non small cell lung cancer treated with concurrent chemoradiotherapy." Radiother Oncol **118**(3): 465-470.
- Park, J. E., et al. (2016). "Carnosic acid induces apoptosis through inactivation of Src/STAT3 signaling pathway in human renal carcinoma Caki cells." Oncol Rep **35**(5): 2723-2732.
- Park, S. Y., et al. (2019). "The JAK2/STAT3/CCND2 Axis promotes colorectal Cancer stem cell persistence and radioresistance." J Exp Clin Cancer Res **38**(1): 399.
- Peng, P., et al. (2022). "TGFBI secreted by tumor-associated macrophages promotes glioblastoma stem cell-driven tumor growth via integrin $\alpha\beta$ 5-Src-Stat3 signaling." Theranostics **12**(9): 4221.
- Peters, E. B. (2018). "Endothelial Progenitor Cells for the Vascularization of Engineered Tissues." Tissue Eng Part B Rev **24**(1): 1-24.

- Ridge, S. M., et al. (2017). "Mesenchymal stem cells: key players in cancer progression." Mol Cancer **16**(1): 31.
- Roberts, J. Z., et al. (2022). "The role of Ubiquitination in Apoptosis and Necroptosis." Cell Death Differ **29**(2): 272-284.
- Rock, C. S. and S. F. Lowry (1991). "Tumor necrosis factor-alpha." J Surg Res **51**(5): 434-445.
- Rodriguez Torres, S., et al. (2023). "Epigallocatechin-3-Gallate Prevents the Acquisition of a Cancer Stem Cell Phenotype in Ovarian Cancer Tumorspheres through the Inhibition of Src/JAK/STAT3 Signaling." Biomedicines **11**(4).
- Romano, A. and F. Martel (2021). "The Role of EGCG in Breast Cancer Prevention and Therapy." Mini Rev Med Chem **21**(7): 883-898.
- Rossi, A. F. T., et al. (2022). "Downregulation of TNFR2 decreases survival gene expression, promotes apoptosis and affects the cell cycle of gastric cancer cells." World J Gastroenterol **28**(24): 2689-2704.
- Rual, J.-F., et al. (2005). "Towards a proteome-scale map of the human protein–protein interaction network." Nature **437**(7062): 1173-1178.
- Rubin, C. I. and G. F. Atweh (2004). "The role of stathmin in the regulation of the cell cycle." J Cell Biochem **93**(2): 242-250.
- Saito, S., et al. (2003). "Rho exchange factor ECT2 is induced by growth factors and regulates cytokinesis through the N-terminal cell cycle regulator-related domains." J Cell Biochem **90**(4): 819-836.
- Saklatvala, J., et al. (1996). "Interleukin 1 (IL1) and tumour necrosis factor (TNF) signal transduction." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **351**(1336): 151-157.
- Saleban, M., et al. (2023). "D-Type Cyclins in Development and Disease." Genes **14**(7): 1445.
- Schönenberger, F., et al. (2015). "Discrimination of cell cycle phases in PCNA-immunolabeled cells." BMC Bioinformatics **16**: 180.

- Smith, C. and B. Storms (2000). "Hematopoietic stem cells." Clin Orthop Relat Res(379 Suppl): S91-97.
- Sobecki, M., et al. (2016). "The cell proliferation antigen Ki-67 organises heterochromatin." eLife **5**: e13722.
- Soukupova, J., et al. (2021). "Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) Induced by TGF- β in Hepatocellular Carcinoma Cells Reprograms Lipid Metabolism." Int J Mol Sci **22**(11).
- Steensma, D. P. and R. A. Kyle (2021). "James Till and Ernest McCulloch: Hematopoietic Stem Cell Discoverers." Mayo Clin Proc **96**(3): 830-831.
- Steinmann, J., et al. (2013). "Anti-infective properties of epigallocatechin-3-gallate (EGCG), a component of green tea." Br J Pharmacol **168**(5): 1059-1073.
- Surh, Y. (1999). "Molecular mechanisms of chemopreventive effects of selected dietary and medicinal phenolic substances." Mutat Res **428**(1-2): 305-327.
- Syed, V. (2016). "TGF- β Signaling in Cancer." J Cell Biochem **117**(6): 1279-1287.
- Testa, J. R., et al. (1994). "Chromosomal Localization of the Genes Encoding the Kinetochores Proteins CENPE and CENPF to Human Chromosomes 4q24 \rightarrow q25 and 1q32 \rightarrow q41, Respectively, by Fluorescence in Situ Hybridization." Genomics **23**(3): 691-693.
- Thakur, V. S., et al. (2010). "p53-Dependent p21-mediated growth arrest pre-empts and protects HCT116 cells from PUMA-mediated apoptosis induced by EGCG." Cancer Lett **296**(2): 225-232.
- Tian, X., et al. (2020). "Distal tibial tuberosity high tibial osteotomy using an image enhancement technique for orthopedic scans in the treatment of medial compartment knee osteoarthritis." Comput Methods Programs Biomed **191**: 105349.
- Trieselmann, N., et al. (2003). "Ran modulates spindle assembly by regulating a subset of TPX2 and Kid activities including Aurora A activation." Journal of Cell Science **116**(23): 4791-4798.
- Tsao, R. (2010). "Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols." Nutrients **2**(12): 1231-1246.

- Tu, Z. and A. E. Karnoub (2022). "Mesenchymal stem/stromal cells in breast cancer development and management." Semin Cancer Biol **86**(Pt 2): 81-92.
- Tulotta, C. and P. Ottewell (2018). "The role of IL-1B in breast cancer bone metastasis." Endocr Relat Cancer **25**(7): R421-r434.
- Ubago-Guisado, E., et al. (2021). "Evidence Update on the Relationship between Diet and the Most Common Cancers from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) Study: A Systematic Review." Nutrients **13**(10).
- Uccelli, A., et al. (2008). "Mesenchymal stem cells in health and disease." Nat Rev Immunol **8**(9): 726-736.
- Uder, C., et al. (2018). "Mammalian MSC from selected species: Features and applications." Cytometry Part A **93**(1): 32-49.
- Vadiveloo, P. K. (1999). "Macrophages--proliferation, activation, and cell cycle proteins." J Leukoc Biol **66**(4): 579-582.
- van der Horst, A., et al. (2009). "Cep55 stabilization is required for normal execution of cytokinesis." Cell Cycle **8**(22): 3742-3749.
- van Horsen, R., et al. (2006). "Intratumoural expression of TNF-R1 and EMAP-II in relation to response of patients treated with TNF-based isolated limb perfusion." Int J Cancer **119**(6): 1481-1490.
- Vigneron, A., et al. (2006). "The cell cycle inhibitor p21waf1 binds to the myc and cdc25A promoters upon DNA damage and induces transcriptional repression." J Biol Chem **281**(46): 34742-34750.
- Walcher, L., et al. (2020). "Cancer Stem Cells-Origins and Biomarkers: Perspectives for Targeted Personalized Therapies." Front Immunol **11**: 1280.
- Wang, J., et al. (2015). "Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) Inhibits Murine CD4+ T cell Division and Cell Cycle Progression through Modulating Cell Cycle Related-proteins." The FASEB Journal **29**(S1): 593.510.
- Wang, X. and Y. Lin (2008). "Tumor necrosis factor and cancer, buddies or foes?" Acta Pharmacol Sin **29**(11): 1275-1288.

- Wang, Z. (2021). "Regulation of Cell Cycle Progression by Growth Factor-Induced Cell Signaling." Cells **10**(12).
- Wang, Z. (2022). "Cell Cycle Progression and Synchronization: An Overview." Methods Mol Biol **2579**: 3-23.
- Wang, Z., et al. (2017). "Both degradation and AOX accumulation are significantly enhanced in UV/peroxymonosulfate/4-chlorophenol/Cl⁻ system: two sides of the same coin?" RSC advances **7**(20): 12318-12321.
- Wang, Z., et al. (2013). "Cdc20: a potential novel therapeutic target for cancer treatment." Curr Pharm Des **19**(18): 3210-3214.
- Wong, P. F., et al. (2017). "Deregulation of hsa-miR-20b expression in TNF- α -induced premature senescence of human pulmonary microvascular endothelial cells." Microvasc Res **114**: 26-33.
- Wong, R. S. (2011). "Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment." J Exp Clin Cancer Res **30**(1): 87.
- Wu, X., et al. (2017). "TNF- α sensitizes chemotherapy and radiotherapy against breast cancer cells." Cancer cell international **17**: 1-12.
- Yang, C., et al. (2012). "Long non-coding RNA UCA1 regulated cell cycle distribution via CREB through PI3-K dependent pathway in bladder carcinoma cells." Gene **496**(1): 8-16.
- Yang, L., et al. (2020). "Targeting cancer stem cell pathways for cancer therapy." Signal Transduct Target Ther **5**(1): 8.
- Yeh, C.-T., et al. (2003). "Abolishment of the interaction between cyclin-dependent kinase 2 and Cdk-associated protein phosphatase by a truncated KAP mutant." Biochemical and Biophysical Research Communications **305**(2): 311-314.
- Yi, J., et al. (2020). "Radioprotection of EGCG based on immunoregulatory effect and antioxidant activity against 60Co γ radiation-induced injury in mice." Food and Chemical Toxicology **135**: 111051.

- Yi, J., et al. (2019). "Potential applications of polyphenols on main ncRNAs regulations as novel therapeutic strategy for cancer." Biomed Pharmacother **113**: 108703.
- Yin, W., et al. (2021). "Cancer and stem cells." Exp Biol Med (Maywood) **246**(16): 1791-1801.
- Zhang, J., et al. (2023). "Necroside 1 mediates necrotic cell death and immunogenic response in human cancer cells." Cell Death Dis **14**(4): 238.
- Zhu, Q., et al. (2017). "Inhibition of Aurora A Kinase by Alisertib Induces Autophagy and Cell Cycle Arrest and Increases Chemosensitivity in Human Hepatocellular Carcinoma HepG2 Cells." Curr Cancer Drug Targets **17**(4): 386-401.