

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

CARACTÉRISATION DE LA FIBRINOLYSE EN 3 DIMENSIONS CHEZ LES
HUVEC INDUITE PAR LE VEGF ET L'EFFET DE CERTAINS POLYPHÉNOLS
SUR CETTE FIBRINOLYSE

MÉMOIRE
PRÉSENTÉ
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN CHIMIE

PAR
SAMIRA MIHOUBI

MAI 2006

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 -Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

*À ma fille Myriam qui m'a donné la force d'aller toujours plus loin ;
À mes parents et à ma sœur pour le soutien qu'ils m'ont apporté dans
tous les niveaux ;*

*À mes amis pour leur présence de tous les instants,
Avec toute mon affection et ma reconnaissance*

Merci !

Samira Mihoubi

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier chaleureusement le Dr Richard Béliveau, mon directeur de recherche, pour sa confiance, sa motivation scientifique ainsi que pour son encadrement technique, professionnel et humain. Il m'a honoré en me donnant l'opportunité de faire partie de son équipe. Je tiens à exprimer ma reconnaissance au responsable de cette recherche, le Dr Denis Gingras, pour la loyauté qu'il m'a témoignée et pour le temps qu'il a consacré pour diriger cette étude. Ce travail étant un travail d'équipe, je remercie tout particulièrement Dr David Ratel et Mathieu Provençal pour leurs efforts dans cette étude, pour leur aide et pour avoir suivi de très près l'évolution de ce travail. J'associe à mes remerciements le Dr Edith Beaulieu pour sa précieuse collaboration, ses conseils mais aussi pour son amitié. Je tiens à remercier Dr Sylvie Lamy et Dr Dominique Boivin pour leur disponibilité à me guider dans mes démarches. Merci à mes collègues René, Geneviève, Eric, Xavier, Carine, Jessica, Nicole et Koula pour leur gentillesse, leur disponibilité mais surtout pour leur amitié. Ils animent et ont animé le Laboratoire de médecine moléculaire et grâce à eux mes deux années de maîtrise furent très plaisantes. Il m'est aussi essentiel de remercier ma collègue mais surtout amie, Mounia Bouzegrane pour sa présence, ses conseils et sa complicité. Je dédie également mes remerciements à mes amies, Karima, Inès et Intissar grâce à qui ma vie était pleine de moments de joies, et à mon fidèle ami Karim qui a su toujours être sincère, fiable et présent dans la joie comme dans la peine. Je voudrais particulièrement souligner l'appui de ma mère Tatiana et de mon père Mohammed tout au long de mes études, ce qui m'a permis de réaliser mes objectifs. Mais cette réalisation n'aurait jamais été possible sans la motivation que me procure ma chère et tendre fille Myriam. Je remercie l'Université du Québec à Montréal pour le soutien financier.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES	viii
LISTE DES TABLEAUX	x
LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES	xi
LISTE DES SYMBOLES ET DES UNITÉS	xiii
RÉSUMÉ	xiv

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1 Le cancer	1
1.1.1 Carcinogénèse.....	3
1.1.2 L'angiogénèse.....	5
1.1.3 Les MMP.....	9
1.2 Le système plasminolytique.....	15
1.2.1 Le plasminogène et la plasmine.....	15
1.2.2 Les activateurs du plasminogène.....	16
1.2.2.1 L'activateur de type urokinase (u-PA).....	16
1.2.2.2 L'activateur de type urokinase (t-PA).....	17
1.2.3 Le PAI-1.....	18
1.3 La nutrition et le cancer	18
1.3.1 Les polyphénols	23
1.3.2 Les anthocyanidines	26
1.3.3 Le curcumin.....	28
1.3.4 La biodisponibilité.....	28
1.4 Buts de la recherche	30
1.5 Modèle expérimental	31

CHAPITRE II

MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Matériel	33
2.2 Méthodes	35
2.2.1 Préparation des polyphénols.....	35
2.2.2 Essais de fibrinolyse <i>in vitro</i>	35
2.2.3 Zymographie caséinolytique.....	36
2.2.4 Zymographie sur fibrinogène.....	37
2.2.5 Analyse RT-PCR.....	38

CHAPITRE III

RÉSULTATS

3.1 Le VEGF augmente l'activité fibrinolytique des cellules endothéliales dans une matrice de fibrine en trois dimensions.....	41
3.1.1 Les facteurs de croissance augmentent la fibrinolyse des cellules endothéliales dans la matrice de fibrine.....	41
3.1.2 L'effet du VEGF sur la fibrinolyse des HUVEC est dose dépendant.....	42
3.2 L'activité fibrinolytique des cellules endothéliales induite par le VEGF dépend de la sécrétion du t-PA, de la plasmine et implique aussi le système des métalloprotéines.....	43
3.2.1 L'effet du VEGF sur l'activité fibrinolytique des HUVEC est dépendant de la synthèse de nouvelles protéines.....	43
3.2.2 L'activité fibrinolytique des HUVEC induite par le VEGF dépend de la sécrétion du t-PA.....	43
3.2.3 L'activité fibrinolytique des HUVEC induite par le VEGF est inhibée par le PAI-1, le BB-94, TIMP-2, l'aprotinine et le PTK-787.....	44
3.2.4 L'activité fibrinolytique des HUVEC induite par le VEGF est dépendante de l'activité du t-PA et par conséquent de la plasmine qui est inhibée par le PAI-1, le BB-94 et le PTK-787.....	45

3.2.5	Effet du PAI-1, BB-94 et du PTK sur l'expression génique de M T1-MMP, de MT2-MMP, MT3-MMP, MMP-3, d'u-PA, du t-PA, et d'actine lors de l'activité fibrinolytique des HUVEC induite par le VEGF.....	46
3.3	Effet de certains flavonoïdes sur la fibrinolyse chez les HUVEC induite par le VEGF.....	46
3.3.1	Effet des anthocyanidines sur la fibrinolyse chez les HUVEC induite par le VEGF.....	46
3.3.2	Effet de différentes concentrations de delphinidine sur la fibrinolyse des HUVEC induite par le VEGF.....	47
3.3.3	Effet des catéchines sur la fibrinolyse chez les HUVEC induite par le VEGF.....	47
3.3.4	Effet de différents polyphénols sur la fibrinolyse chez les HUVEC induite par le VEGF.....	48
3.3.5	L'effet inhibiteur des polyphénols sur l'activité fibrinolytique des HUVEC induite par le VEGF est dépendant du t-PA.....	48
3.3.6	L'effet inhibiteur des polyphénols sur l'activité fibrinolytique des HUVEC induite par le VEGF est dépendant de la plasmine....	49
3.3.7	Effet de la delphinidine, de l'EGCG et de l'apigénine sur l'expression génique de MT2-MMP, MT3-MMP, MMP-3 et d'actine lors de l'activité fibrinolytique des HUVEC induite par le VEGF.....	49
CHAPITRE IV		
	DISCUSSION.....	64
CHAPITRE V		
	CONCLUSIONS	86
CHAPITRE VI		
	PERSPECTIVES.....	87
	RÉFÉRENCES	89

LISTE DES FIGURES

FIGURE		PAGE
1.1	Étapes moléculaires de l'angiogenèse tumorale.....	9
1.2	Domaines structuraux des MMP.....	11
1.3	Structure d'agents phytochimiques aux propriétés chimiopréventives et leurs sources alimentaires	22
1.4	Structure moléculaire des six principales classes de flavonoïdes.....	25
1.5	Structure moléculaire des anthocyanidines sélectionnées.....	27
3.1	La fibrinolyse des cellules endothéliales dans la matrice de fibrine en présence de facteurs de croissance.....	50
3.2	L'effet de différentes doses de VEGF sur la fibrinolyse des HUVEC..	51
3.3	L'effet de la synthèse protéique sur la stimulation de l'activité fibrinolytique des HUVEC par le VEGF	52
3.4	Le rôle du t-PA dans l'effet du VEGF sur l'activité fibrinolytique des HUVEC.....	53
3.5	L'inhibition de l'activité fibrinolytique des HUVEC induite par le VEGF par le PAI-1, le BB-94 et le PTK-787.....	54
3.6	Rôle du t-PA et de la plasmine dans l'activité fibrinolytique des HUVEC induite par le VEGF.....	55
3.7	Effets du PAI-1, BB-94 et du PTK sur l'expression génique de M T1-MMP, de MT2-MMP, MT3-MMP, MMP-3, d'u-PA, du t-PA, et d'actine lors de l'activité fibrinolytique des HUVEC induite par le VEGF.....	56

3.8	Effets des anthocyanidines sur la fibrinolyse chez les HUVEC induite par le VEGF.....	57
3.9	Effet de différentes concentrations de delphinidine sur la fibrinolyse des HUVEC induite par le VEGF.....	58
3.10	Effet des catéchines sur la fibrinolyse chez les HUVEC induite par le VEGF.....	59
3.11	Effet de différents polyphénols sur la fibrinolyse chez les HUVEC induite par le VEGF.....	60
3.12	Le rôle du t-PA dans l'effet inhibiteur des polyphénols sur l'activité fibrinolytique des HUVEC induite par le VEGF.....	61
3.13	Le rôle de la plasmine dans l'effet inhibiteur des polyphénols sur l'activité fibrinolytique des HUVEC induite par le VEGF.....	62
3.14	Effet de la delphinidine, de l'EGCG et de l'apigénine sur l'expression génique de MT2-MMP, MT3-MMP, MMP-3 et d'actine lors de l'activité fibrinolytique des HUVEC induite par le VEGF.....	63
4.1	Représentation de l'interaction potentielle entre le système fibrinolytique (plasminogène/plasmine) et le système des MMP.....	74
4.2	Structure moléculaire des anthocyanidines impliquées dans la relation structure-fonction	77
4.3	Structure moléculaire des catéchines impliquées dans la relation structure-fonction.....	79
4.4	La structure chimique des flavonoïdes.....	81

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU		PAGE
1.1	Catégories de MMP, noms triviaux et substrats.....	14
2.2	Protocole d'optimisation pour l'analyse RT-PCR des ARN _m	40

LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES

ADN	acide désoxyribonucléique
AP	protéine activatrice
ARN	acide ribonucléique
ARNm	acide ribonucléique messenger
bFGF	<i>basic fibroblast growth factor</i>
Cya	cyanidine
D1-D2-D3	domaines homologues d'uPAR 1-2-3
Del	delphinidine
DMSO	diméthyle sulfoxyde
Dp3	delphinidine-3-O-glucoside
EGCG	épigallocatechine-3-gallate
EGF	facteur de croissance épidermal
EtOH	éthanol
FBS	sérum de veau foetal
GPI	glycosyl-phosphatidylinositol
HGF	Facteur de croissance des hépatocytes
EGFR	récepteur de l'EGF
HUVEC	<i>human umbilical vein endothelial cells</i>
IC ₅₀	Concentration de l'inhibiteur nécessaire à l'obtention de 50 % d'inhibition
Mal	malvidine
MMP	métalloprotéinase matricielle
MT-MMP	MMP de type membranaire
NaOH	hydroxyde de sodium
OH	hydroxyle
PAI-1	<i>plasminogen activator inhibitor-1</i>
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
Pel	pelargonidine
Peo	peonidine
Pet	petunidine
S1P	sphingosine-1-phosphate
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
TIMP	<i>tissue inhibitor of metalloproteinase</i>
TNF	<i>tumor necrosis factor</i>
t-PA	<i>tissue-type plasminogen activator</i>
u-PA	<i>urokinase-type plasminogen activator</i>
uPAR	<i>urokinase-type plasminogen activator receptor</i>
UV	ultraviolet

VEGF	facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
VEGFR	<i>vascular endothelial growth factor receptor</i>
VN	vitronectine

LISTE DES SYMBOLES ET UNITÉS

°C	degré Celsius
μg	microgramme
μm	micromètre
μM	micromolaire
cpm	coup par minute
Da	Dalton
g	gramme
g/L	gramme par litre
IC ₅₀	concentration permettant 50% d'inhibition
kDa	kiloDalton
mg	milligramme
min	minute
ml	millilitre
mm	millimètre
mM	millimolaire
ng	nanogramme
nM	nanomolaire
nm	nanomètre
pM	picomolaire
p/v	poids par volume
rpm	rotation par minute (unité de la force centrifuge)
U/ml	unité par millilitre
v/v	volume par volume

RÉSUMÉ

L'invasion des matrices de fibrine par les cellules endothéliales est un événement clé dans l'angiogenèse. Dans ce travail, nous avons utilisé un modèle d'angiogenèse *in vitro* qui consiste en des cellules endothéliales humaines cultivées dans une matrice de fibrine en trois dimensions (3D). Ce modèle reproduit au mieux le microenvironnement cellulaire en 3D *in vivo*. En parallèle, nous avons testé plusieurs molécules nutraceutiques sur ce modèle cellulaire afin de démontrer leur effet sur la fibrinolyse lors de l'angiogenèse. Nous démontrons que l'habilité des cellules endothéliales à pénétrer dans une matrice de fibrine en 3 dimensions est induite par le VEGF. La fibrinolyse dépendante du VEGF a été complètement contrée par le PAI-1, BB-94, aprotinine et TIMP-2 suggérant l'implication du système activateur de plasminogène/plasmine ainsi que celui des métalloprotéinases. De plus, les anticorps neutralisants anti t-PA ont complètement inhibé la fibrinolyse. Dans l'étude nutraceutique, nous avons prouvé que certaines molécules dérivées de l'alimentation ont un pouvoir antiangiogénique en bloquant la fibrinolyse dans notre modèle cellulaire en agissant principalement sur la sécrétion du t-PA. Ces résultats suggèrent une relation étroite entre le système des MMP et celui des activateurs du plasminogène pour une protéolyse efficace de la matrice de fibrine, et précise l'effet antiangiogénique des polyphénols par leur action sur le t-PA et probablement sur les MMP.

Mots clés : Activateur de type tissulaire du plasminogène, facteur de croissance de l'endothélium vasculaire, dégradation de fibrine, métalloprotéinases, polyphénols, antiangiogenèse.

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1 Le cancer

Le cancer, du latin crabe, résulte d'altérations génétiques héréditaires ou liées à l'environnement qui conduisent à la prolifération anarchique d'une cellule anormale qui mène à plus de 100 différentes maladies. Cette cellule peut se développer aux dépens de n'importe quel organe. Le corps humain se compose d'un million de milliards de cellules, différenciées en environ 200 familles, dont les fonctions sont variées et spécifiques, et qui s'organisent et se regroupent pour former des tissus ou organes (poumons, cerveau, cellules sanguines...). Ces cellules se renouvellent en permanence : une partie d'entre elles meurent et est remplacées par de nouvelles cellules. Par contre, il arrive parfois que des cellules se divisent anarchiquement sans que le tissu d'origine en ait besoin. Ce surplus de cellules va former une masse appelée tumeur. La tumeur peut être bénigne (cancéreuse : croissance lente, non envahissante) ou maligne (cancéreuse : prolifération rapide, infiltration tissulaire) (Alberts *et al.*, 1994; Surh, 2003).

Suivant les statistiques de la Société canadienne du cancer, on estime que 149 000 nouveaux cas de cancer et 69 500 décès causés par cette maladie surviendront au Canada en 2005. Le cancer est la principale cause de décès prématurés au Canada, devant les maladies cardio-vasculaires. Cette maladie est diagnostiquée chez 38 % et

43 % des femmes et des hommes respectivement. Les taux de mortalité sont de 23 % et 28 % pour les femmes et les hommes respectivement, correspondant à environ un canadien sur quatre. Les cancers les plus diagnostiqués demeurent le cancer du sein chez la femme (21 200 cas) et le cancer de la prostate (20 100 cas) chez l'homme. Toutefois, le cancer du poumon reste la principale cause de mortalité (18 900 décès), autant chez les femmes que chez les hommes. On évalue à près de 14.2 milliards de dollars les coûts totaux engendrés par cette maladie au Canada (Statistiques Canada 2005).

Le mot cancer est un terme générique désignant une tumeur maligne, mais il existe en fait plus d'une centaine de types de cancers, selon la cellule initiale dont ils sont issus. Si l'on commence à peine à connaître le mécanisme qui induit la cancérisation des cellules, on sait en revanche que les propriétés de la cellule cancéreuse telles que la prolifération infinie, l'immortalité, la capacité à se déplacer et la résistance et dominance vis-à-vis des autres cellules sont toujours liées à des altérations du génome cellulaire (Kellof *et al.*, 2000; Hanahan et Weinberg, 2000). Ces propriétés peuvent être soit héréditaires (5 % environ) ou, beaucoup plus souvent, dues à des facteurs liés à l'environnement (radiation, infection...), à notre mode de vie (tabac, alcool, alimentation, reproduction...) ou à nos hormones. En effet, le tabac, l'alcool, la pollution industrielle, les radiations atomiques et l'exposition excessive aux UV favorisent les mutations ou d'autres formes d'altérations de l'ADN, support de patrimoine génétique. De même, certains virus, qui se transmettent par voie sanguine ou sexuelle, sont mis en cause: le papillomavirus dans les cancers du col de l'utérus, les virus des hépatites B, C et D dans les cancers hépatiques, le HIV dans le sarcome de Kaposi. Ces virus n'agissent pas de leur fait, mais en association avec d'autres facteurs (Hanahan et Weinberg, 2000).

1.1.1 Carcinogénèse

Le cancer n'est pas une maladie spontanée. Il est plutôt le résultat d'une série de transformations moléculaires et cellulaires d'une cellule normale, échelonnées sur une longue période de temps. Ces transformations se produisent à l'intérieur d'un processus cancérogène qu'on appelle également carcinogénèse. (Kellof *et al.*, 2000 ; Tamimi *et al.*, 2002). La carcinogénèse se divise en trois étapes (Surh, 2003):

1.1.1.1 L'initiation

Elle se caractérise par l'apparition d'une première cellule transformée ayant acquise de nouvelles propriétés. Cette transformation, pouvant être spontanée, est plus souvent induite par des agents génotoxiques qui endommagent irréversiblement l'ADN (acide désoxyribonucléique) cellulaire (Gescher *et al.*, 1998). Il existe une multitude d'agents génotoxiques : les rayons ultraviolets, la pollution, les radiations, le stress cellulaire, des composés présents dans notre alimentation; ils peuvent tous être à l'origine de cette première mutation (Go, Wong et Butrum, 2001). Ces mutations touchent principalement des gènes de la croissance, de la division cellulaire et de la réparation de l'ADN. Généralement, deux familles de gènes sont la cible de ces agents. La première, les proto-oncogènes reliés à la croissance et au développement, sont présents dans toutes les cellules et ont un fonctionnement normal et nécessaire (Hanahan et Weinberg, 2000). Leur activation incontrôlée mène à une désorganisation du développement et de la croissance. La protéine Ras, active dans la prolifération cellulaire, est un exemple commun de proto-oncogène. Elle est présente dans 30 % des cas de cancer (Nosse, 2003). Cette protéine joue un rôle dans la signalisation intracellulaire induite par certains facteurs de croissance. Cependant, une mutation altérant Ras empêche celle-ci de s'autoréguler et provoque son activation permanente, ce qui produit une prolifération incontrôlée (Nosse, 2003). La seconde famille est formée des gènes de suppression de tumeur (anti-oncogène). Contrairement aux oncogènes, ceux-ci protègent une cellule en contrôlant

l'expression de proto-oncogènes ou en régularisant la division cellulaire (Tortora et Grabowski, 1995). La protéine p53 est un exemple commun d'anti-oncogène puisqu'en liant l'ADN, elle provoque une cascade de synthèses qui bloque la division cellulaire. Une mutation modifiant la p53 empêchera celle-ci de lier l'ADN, menant à une division cellulaire anarchique (Tortora et Grabowski, 1995). Cependant, près d'une dizaine de ces mutations seront nécessaires pour produire une cellule au caractère tumoral (Tortora et Grabowski, 1995). Par exemple, il y aura perte d'inhibition de contact, immortalisation, prolifération excessive, résistance aux mécanismes de défense, altération de la signalisation induite par les facteurs de croissance et augmentation de la motilité (Hanahan et Weinberg, 2000 ; Go, Wong et Butrum, 2001).

1.1.1.2 La promotion

La promotion s'échelonne sur une plus longue période de temps (± 10 ans) et est réversible, comparativement à l'initiation (Gescher *et al.*, 1998). Après l'apparition d'une cellule au développement désorganisé, celle-ci devra survivre aux mécanismes normaux d'élimination comme le système immunitaire, certains mécanismes de réparation et de mort programmée. Toutefois, si cette cellule survit et que sa division se poursuit, il y a apparition de cellules prénéoplasiques.

1.1.1.3 La progression

Cette dernière étape consiste en la formation d'une masse cellulaire de petite taille (< 1 mm) et l'apparition d'une micro-tumeur. Le caractère malin d'une tumeur ne s'acquiert qu'à partir de l'étape de la progression. Cette étape se traduit par des changements qui augmentent le caractère envahissant d'une cellule déjà transformée. Son aboutissement est généralement l'envahissement par la création des métastases. Bien que la progression entraîne régulièrement un caractère de plus en plus malin, certaines tumeurs arrêtent de croître et même se résorbent complètement pendant l'étape de la progression. Mentionnons que cette troisième étape de progression ne

s'applique pas à toutes les tumeurs ; plusieurs cellules transformées demeurent bénignes (Go, Wong et Butrum, 2001).

1.1.2 L'angiogenèse

L'angiogenèse est essentielle dans la vie pré- et post-natale pour la croissance et l'homéostasie. Au cours de l'embryogenèse, aussi bien que chez l'adulte, des nouveaux vaisseaux prennent naissance initialement comme de simples tubes de cellules endothéliales. Certains deviennent ensuite des capillaires après différenciation et apposition de péricytes ; d'autres se transforment en vaisseaux de plus grand calibre (artères, veines) après la mise en place d'une paroi constituée de plusieurs couches de cellules musculaires lisses disposées de manière concentrique ou longitudinale, selon les besoins fonctionnels (Folkman, 1995). La vascularisation de certains organes (par exemple, les poumons) est également effectuée par vasculogenèse, tandis que d'autres (par exemple, le système nerveux central) sont vascularisés par un processus d'angiogenèse, c'est-à-dire la formation de nouveaux vaisseaux à partir de cellules endothéliales préexistantes. Au cours de la vie adulte, la néovascularisation est principalement effectuée par angiogenèse. Chez l'adulte, la croissance de nouveaux vaisseaux sanguins s'observe physiologiquement lors du remodelage tissulaire cyclique dans le système génital féminin (dans l'ovaire avant l'ovulation et pendant la formation du corps jaune; dans le placenta et la glande mammaire pendant la gestation) (Suh, 2000), ou au cours de l'inflammation (aiguë et chronique) et lors des processus de réparation tissulaire. L'angiogenèse est également induite lors de l'ischémie tissulaire (cœur, membres, cerveau) et peut être observée dans la rétinopathie diabétique, l'arthrite rhumatoïde, l'hémangiome juvénile et, en particulier, au cours de la croissance tumorale (Folkman et Hanahan, 1991; Folkman, 1995). L'intérêt scientifique et médiatique suscité par l'angiogenèse est dû en grande partie à la relation entre croissance tumorale et néovascularisation.

La conversion des cellules endothéliales à un état actif implique quatre grandes étapes moléculaires (figure 1.1) :

1.1.2.1 La sécrétion des facteurs proangiogéniques

Les cellules endothéliales sont parmi les plus stables de l'organisme ; leur temps de renouvellement peut excéder 1 000 jours, mais cette durée peut être réduite à seulement cinq jours lors de l'angiogenèse (Denekamp, 1993). Cette conversion des cellules endothéliales à un état actif implique plusieurs processus distincts mais interdépendants. Leur stimulation s'effectue par différents facteurs angiogéniques; le bFGF (*basic fibroblast growth factor*) et le VEGF (*vascular endothelial growth factor*) étant les plus couramment observés. Ces facteurs sont sécrétés, soit directement par les cellules tumorales en réponse à des conditions d'hypoxie ou à la suite d'une activation par certains oncogènes, soit indirectement par la stimulation de cellules inflammatoires (Haroon *et al.*, 1999). Une fois sécrétés, les facteurs de croissance se lient spécifiquement à leurs récepteurs localisés au niveau des membranes plasmiques des cellules endothéliales du vaisseau et activent une cascade de signalisation intracellulaire. À cette étape le processus de différenciation est commencé. Il y a altération du complexe de jonctions adhérentes formées par les cadhérines, conduisant à une augmentation de la perméabilité péricellulaire ainsi qu'au détachement des cellules endothéliales les unes des autres (Arenberg et Strieter, 1999).

1.1.2.2 La dégradation de la membrane basale.

La pénétration de la membrane basale de la matrice extracellulaire séparant les cellules endothéliales du tissu sous-jacent par la sécrétion d'enzymes protéolytiques tels l'activateur tissulaire du plasminogène et les métalloprotéinases de la matrice extracellulaire (MMP), permettant la dégradation des divers composants de la membrane basale entourant le vaisseau (Bogenrieder et Herlyn, 2003).

1.1.2.3 Migration et prolifération

La migration et prolifération des cellules endothéliales vers la tumeur sont des mécanismes cruciaux dans le développement d'une tumeur, permettant à celle-ci d'envahir son environnement périphérique et d'y croître. Les cellules tumorales devront cependant, dégrader les composantes de la membrane extracellulaire (collagène, laminine, vitronectine, fibronectine, fibrine) par la sécrétion des MMP et l'activation du système plasminolytique, créant ainsi un espace vacant dans lequel les cellules tumorales migreront (Bogenrieder et Herlyn, 2003). La motilité (migration) des cellules tumorales est primordiale aux mécanismes d'invasion, il s'agit d'un élément clé dans la propagation tumorale (Sanderson et Smith, 1999). Quoique primordiale au développement tumoral, plusieurs interrogations persistent sur la dynamique impliquée dans les mécanismes de migration et d'adhérence (Sanderson et Smith, 1999). La migration débute par l'ancrage de la cellule au point de migration, suivi d'une réorganisation du cytosquelette d'actine (contraction) et finalement, par le décrochage de celle-ci (Bogenrieder et Herlyn, 2003). Il y a aussi concentration de certains récepteurs au facteur de croissance et d'adhérence au point de migration (Sanderson et Smith, 1999). La cellule va ensuite s'étirer et s'ancrer à la membrane extracellulaire, sous la supervision des intégrines. Ensuite, l'ancrage des intégrines à la membrane extracellulaire, envoie des signaux intracellulaires qui provoqueront la contraction du cytosquelette d'actine, en plus du déplacement des organelles vers le point de migration (Sanderson et Smith, 1995). Le mécanisme de décrochage est la moins connue des étapes impliquées dans la migration cellulaire (Hanahan et Weinberg, 2000). Il impliquerait une inhibition des cadhérines, impliquées dans les relations cellules-cellules, et de la voie d'activation du plasminogène/intégrines (Christofori et Semb, 1999 ; Czekay *et al.*, 2003).

2 La formation d'un nouveau capillaire.

Les cellules se différencient ensuite en structure de type capillaire pour former un réseau vasculaire nécessaire au développement des tissus. Ce réseau capillaire est maintenu sous l'influence de facteurs angiogéniques tels que le VEGF ou le FGF, et stabilisé grâce au recrutement des péricytes et des cellules accessoires sous l'influence du PDGF (*platelet-derived growth factor*) et de l'angiopoïétine-1 (Ang-1) (Yancopoulos *et al.*, 2000).

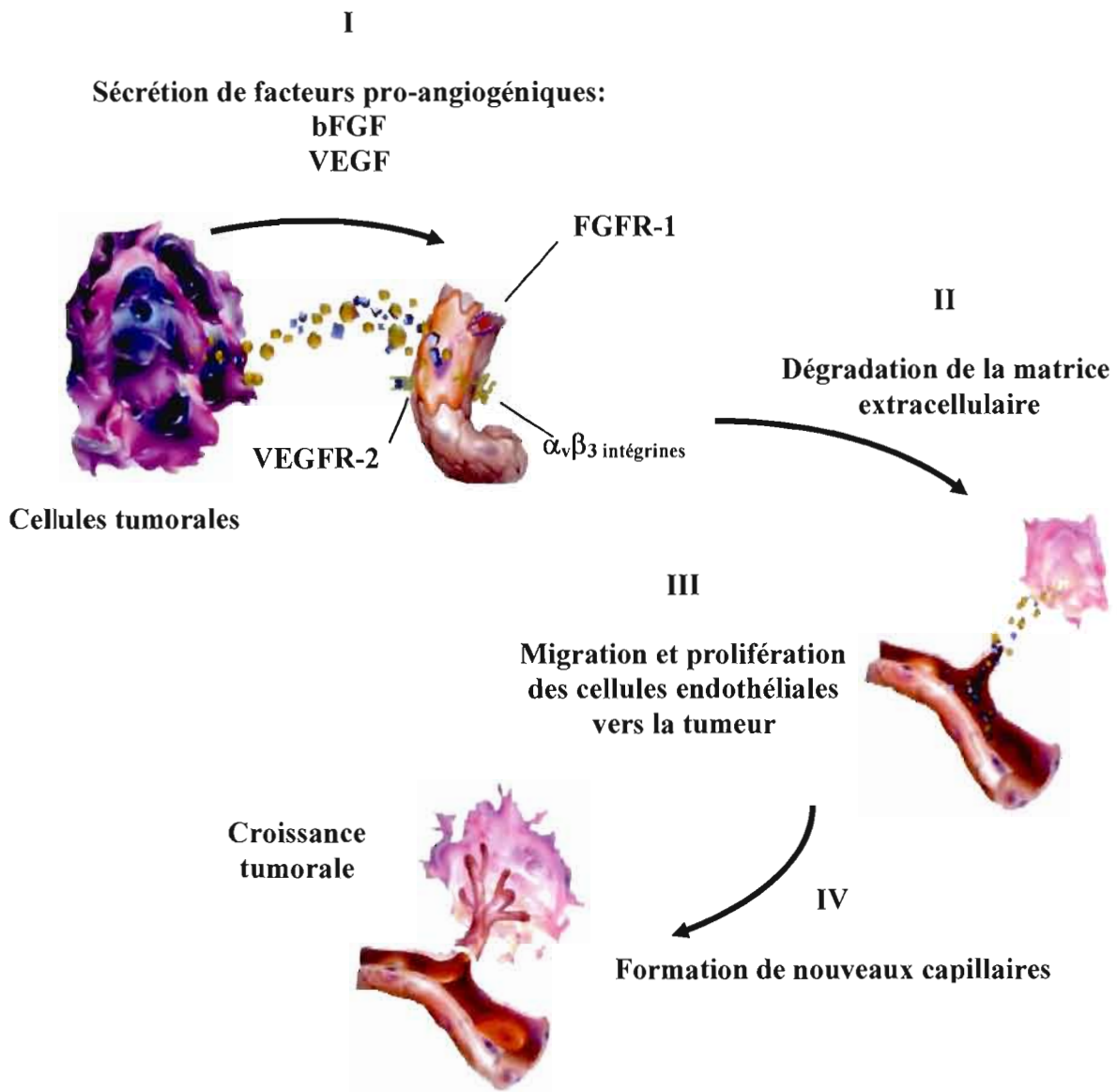


Figure 1.1 Étapes moléculaires de l'angiogenèse tumorale.

Illustration modifiée tirée du site : www.pharmaciaoncology.com

1.1.3 Les métalloprotéinases (MMP)

Les MMP, aussi appelées matrixines, font partie de la famille des endopeptidases contenant du zinc, capables de dégrader plusieurs composants de la matrice extracellulaire. Elles sont toutes produites sous une forme latente, pro-enzyme, qui doit être clivée pour être activée. Les MMP ont été divisées en au moins cinq groupes basés sur leur structure (figure 1.2) et / ou spécificité de substrat (tableau 1.1) (Forget, Desrosiers et Béliveau, 1999).

La sous-classe des MMP ayant la structure la plus simple est celle qui représente les matrilysines (MMP-7 et -26). Elle est appelée ainsi en raison de sa capacité à cliver la quasi-totalité des composants de la matrice extracellulaire. Sa structure consiste en un peptide signal, le domaine propeptide et le domaine catalytique contenant le site de liaison au zinc (Forget, Desrosiers et Béliveau, 1999; Rundhaug, 2005).

Les collagénases (MMP-1, 8 et 14) contiennent en plus un domaine analogue d'hémopexine (PEX) qui est connecté au domaine catalytique via une région riche en proline. Les collagénases dégradent l'hélice native de type I, II, III et d'autres collagènes fibrillaires (Rundhaug, 2005 ; Egeblad et Werb, 2002).

Les stromélysines (stromélysine 1 (MMP-3), 2 (MMP-10) et 3 (MMP-11)), ont des domaines structuraux similaires aux collagénases, mais comme les matrilysines ont une spécificité de substrat variée et dégradent les protéines de la matrice extracellulaire incluant les proteoglycanes, la fibronectine et la laminine. La MMP-10 est aussi appelée enamélysine et est spécialisée dans la protéolyse et la migration médiée par les macrophages (Rundhaug, 2005).

Les gélatinases (MMP-2 et -9) contiennent une région additionnelle de trois fibronectines de type II répétitives dans leur domaine catalytique et ont une préférence pour le collagène dénaturé (gélatine) et dégradent aussi le collagène natif de type IV, V, VII et X (Rundhaug, 2005 ; Egeblad et Werb, 2002).

Le cinquième sous-groupe majeur des MMP comprend les MMP de type membranaire (MT-MMP). Les MT-MMP sont divisées en trois groupes : les MT-

MMP de type I (MT1-3 et MT5-MMP), le type ancre glycosyl-phosphatidylinositol (MT4-MMP et MT6-MMP) et les MT-MMP de type II (CA-MMP). Ces MMP dégradent la gélatine, la fibronectine ainsi que d'autres composants de la matrice extracellulaire. La métalloelastase (MMP-12) est une métalloprotéine qui dégrade les proteoglycanes, la laminine, l'élastine, la fibronectine et le collagène de type IV (Rundhaug, 2005 ; Nabeshima *et al.*, 2002; Egeblad et Werb, 2002).

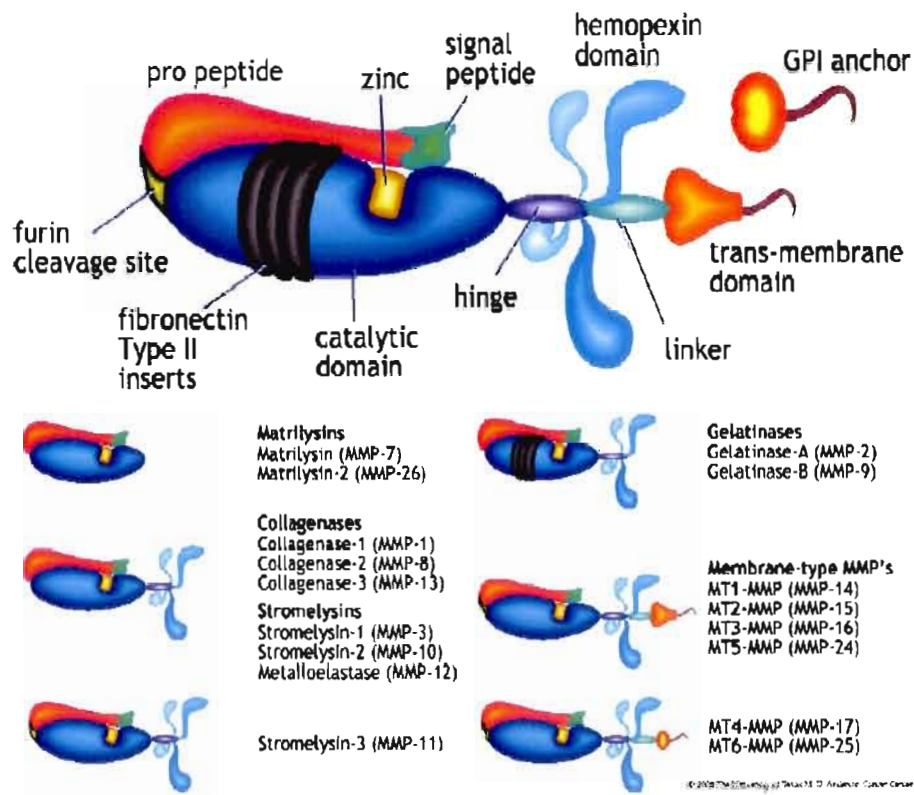


Figure 1.2 Domaines structuraux des MMP (Image tirée de Rundhaug, 2005)

Le pro-domaine de toutes les MMP contient une cystéine conservée appelée “*cysteine switch*”, dont le groupe sulfudryl est coordonné avec l’ion de zinc du domaine catalytique afin de maintenir la latence. La perturbation de cette liaison (cystéine-zinc) par des agents physiques ou chimiques est la première étape de l’activation des MMP (Rundhaug, 2005). En plus de dégrader les composants la matrice extracellulaire et d’activer d’autres MMP, l’activité des MMP est responsable de la disponibilité de facteurs de croissance actifs et de cytokines (Rundhaug, 2005).

Les MMP sont généralement sécrétées sous leurs formes zymogènes et doivent être activées dans l’espace extracellulaire par clivage de leur domaine propeptide dans leur partie N-terminale. La plasmine, générée du plasminogène peut initier la cascade d’activation des MMP, en activant la proMMP-1 et la proMMP-3. La MMP-3 peut, à son tour, activer la proMMP-1 et la proMMP-9. Les MT-MMP activent la proMMP-2 et la proMMP-13 à la surface cellulaire. Les MMP-2 et -13 actives peuvent, à leur tour, activer la proMMP-9 (Rundhaug, 2005 ; Nabeshima *et al.*, 2002; Egeblad et Werb, 2002; Seiki et Yana, 2003).

L’activité des MMP est aussi régulée par des inhibiteurs endogènes, les inhibiteurs tissulaires des métalloprotéinases (TIMP). Il existe quatre TIMP, les TIMP-1 à 4, chacun consiste en un domaine N-terminal responsable de leur effet inhibiteur sur les MMP. Bien que tous les TIMP se lient à la majorité des MMP, ils ont des activités inhibitrices différentes contre différentes MMP (Nabeshima *et al.*, 2002 et Jones *et al.*, 1999). Par exemple, TIMP-2 et TIMP-3 mais pas la TIMP-1, sont des inhibiteurs efficaces des MT-MMP. TIMP-2 a aussi un rôle spécifique dans l’activation de la proMMP-2 par la MT-MMP. Le domaine N-terminal de la TIMP-2 forme un complexe inhibiteur avec le site actif de la MT1-MMP, alors que son domaine C-terminal interagit avec le domaine PEX de la MMP-2. Un second TIMP-2 libre de MT1-MMP est recruté au complexe et clive le pro-domaine de la MMP-2. Les TIMP peuvent former d’autres complexes non-inhibiteurs via leur domaine C-

terminal : TIMP-1 peut former un complexe avec le domaine PEX de la MMP-9, alors que TIMP-3 forme des complexes avec MMP-2 et -9 et peut se lier à la matrice extracellulaire. Les TIMP ont aussi des activités biologiques indépendantes de l'activité inhibitrice des MMP. D'un point de vue de l'angiogenèse, TIMP-2 peut inhiber la prolifération des cellules endothéliales induites par le bFGF. Dans les cellules vasculaires du muscle lisse, la surexpression de TIMP-2 inhibe la prolifération, alors que celle de la TIMP-3 induit l'apoptose (Rundhaug, 2005 ; Nabeshima *et al.*, 2002; Egeblad et Werb, 2002).

L'expression de la plupart des MMP est basse dans les tissus normaux mais est fortement régulée à la hausse quand le remodelage de la matrice extracellulaire se fait nécessaire. L'expression des MMP peut être induite par les cytokines, facteurs de croissances, agents chimiques (promoteur tumoraux), stress physique, des oncogènes actifs et des interactions avec la matrice extracellulaire (Rundhaug, 2005 ; Seiki et Yana, 2003).

Tableau 1.1
 Catégories de MMP, noms triviaux et substrats.
 (D'après Rundhaug, 2005)

MMP	Noms triviaux	Substrats
MMP-1	Collagénase (interstitielle)	Collagènes (I, II, III, VII, VIII, and X); gélatine; aggrecan; L-selectine; IL-1beta; proteoglycans; entactine; ovostatine; MMP-2; MMP-9
MMP-3	Stromelysine-1, Proteoglycanase	Collagènes (III, IV, V, and IX); gélatine; aggrecan; perlecan; decorine; laminine; élastine; caséine; osteonectine; ovostatine; entactine; plasminogène; MBP; IL-1beta; MMP-2/TIMP-2; MMP-7; MMP-8; MMP-9; MMP-13
MMP-8	Collagénase de neutrophile	Collagène (I, II, III, V, VII, VIII, and X); gélatine; aggrecane; fibronectine
MMP-10	Stromelysine-2	Collagènes (III-V); gélatine; caséine; aggrecan; elastine; MMP-1; MMP-8
MMP-12	Meétalloelastase de macrophage	Collagène IV; gélatine; élastine; caséine; fibronectine; vitronectine; laminine; entactine; MBP; fibrinogène; fibrine; plasminogène
MMP-13	Collagénase-3	Collagènes (I, II, III, IV, IX, X, and XIV); gélatine; plasminogen;aggrecan; perlecan; fibronectin; osteonectin; MMP-9
MMP-18	Collagenase-4 (Xenopus)	Type I collagen
MMP-19	Stromélysine 4	Type I collagen
MMP-20	Enamelysine	Amelogenin; aggrecan, and cartilage oligomeric matrix protein (COMP)
MMP-22	MMP de poulet (C-MMP)	Unknown
MMP-27	MT4-MMP	Unknown
MMP-28	Epilyisine	Unknown
MMP-2	Gélatinase A	Collagène IV, V, VII, X, fibronectine, gélatinees, élastine (Collagénase de Type IV)
MMP-7	Matrilysine; PUMP	Collagène (IV and X); gélatine; aggrecan; decorine; fibronectine; laminine; entactine; élastine; caséine; transferrine; plasminogène; MBP; Beta4-intergrine; MMP-1; MMP-2; MMP-9; MMP-9/TIMP-1
MMP-26	Matrilysine-2; Endometase	Collagène IV, fibronectine, fibrinogène, gélatine, alpha (1)-proteinase inhibitor
MMP-9	Gélatinase B	Collagènes (IV, V, VII, X, and XIV); gélatine; entactine; aggrecane; élastine; fibronectine; osteonectin; plasminogène; MBP; IL-1beta
MMP-11	Stromelysine-3	Inconnu (caséine)
MMP-14	MT1-MMP	Collagènes (I-III); gélatine; caséine; fibronectin; laminine; vitronectine; entactine; proteoglycans; MMP-2; eMMP-13
MMP-15	MT2-MMP	Fibronectine; entactine; laminine; aggrecane; perlecan; MMP-2
MMP-16	MT3-MMP	Collagène III; gélatine; caséine ; fibronectine; MMP-2
MMP-24	MT5-MMP	Fibronectine
MMP-17	MT4-MMP	Inconnu
MMP-25	MT6-MMP	Pro-gélatinase A
MMP-21	MMP Xenopus (X-MMP)	Inconnu
MMP-23	(CA-MMP)	Inconnu

1.2 Le Système plasminolytique

Parmi les étapes menant à la formation de nouveaux capillaires, la croissance tumorale, la migration cellulaire, l'invasion et la fibrinolyse sont celles qui nécessitent la participation des activateurs du plasminogène. Plusieurs études établissent que la plasmine stimule la migration cellulaire et l'angiogenèse, lorsqu'elle est formée à la surface cellulaire. Le système plasminolytique joue un rôle crucial dans l'activation des MMP, dans la dégradation de la matrice extracellulaire ainsi que dans la fibrinolyse (Irigoyen *et al.*, 1999 ; Bernstein *et al.*, 2004 ; Gellert *et al.*, 2004).

1.2.1 Le plasminogène et la plasmine

Le plasminogène est une protéine ubiquitaire, sécrétée sous forme de pro-enzyme, produite principalement par le foie et qui est présente dans le plasma et dans les fluides extracellulaires (Mustjoki, 2001). Le plasminogène sous sa forme native est une chaîne polypeptidique simple de 92 kDa, capable de se lier à l'uPA, mais aussi à plusieurs composantes de la matrice extracellulaire (la laminine, la fibronectine et la fibrine) (Irigoyen *et al.*, 1999). De plus, certains types cellulaires expriment des récepteurs au plasminogène. Sa liaison à ceux-ci accélère la conversion du plasminogène en plasmine en plus de la protéger de ses inhibiteurs (Irigoyen *et al.*, 1999). La plasmine, la forme active du plasminogène, est une sérine protéase, de type trypsine, avec une grande diversité de substrat et ayant une activité catalytique 10^4 à 10^6 fois supérieure à celle du plasminogène (Andreasen *et al.*, 2000). Elle est principalement connue pour sa capacité de dégrader la fibrine, mais elle catalyse aussi la dégradation de plusieurs éléments de la matrice extracellulaire soient : la fibronectine, la laminine et la vitronectine (VN) (Irigoyen *et al.*, 1999). De plus, la plasmine, en dégradant la matrice extracellulaire, libérerait et activerait certains

facteurs de croissance y étant emprisonnés en plus de permettre l'activation de certaines MMP provoquant indirectement la dégradation du collagène (Irigoyen *et al.*, 1999 ; Le *et al.*, 2003 ; Bernstein *et al.*, 2004).

1.2.2 Les activateurs du plasminogène

La conversion du plasminogène en plasmine est réalisée par l'action de deux types d'activateurs, soit celui de type urokinase (u-PA) et celui de type tissulaire (t-PA). Ces activateurs produits par deux gènes différents sont sécrétés par divers types cellulaires tels que les cellules musculaires lisses, les fibroblastes et les cellules tumorales. Toutefois, bien que tout deux possèdent en commun le plasminogène comme substrat et qu'ils lient les mêmes inhibiteurs, chacun d'eux possède des propriétés uniques.

1.2.2.1 L'activateur de type urokinase (u-PA)

L'u-PA est une sérine protéase d'environ 55 KDa formée d'une chaîne peptidique comportant deux ponts disulfures. Lorsque l'u-PA est sous sa forme inactive (pro), la chaîne peptidique reste intacte, elle est clivée entre les Lys¹⁵⁸ et Ile¹⁵⁹ pour donner la forme active. Cette dernière possède une activité 250 fois supérieure à celle de son précurseur. Mais pour accroître son activité catalytique, l'u-PA doit se lier à son récepteur : l'u-PAR (Irigoyen *et al.*, 1999). Celui-ci est lié à la membrane par un ancrage glycosyl-phosphatidylinositol (GPI) et ne possède aucune portion intracellulaire. De plus, l'u-PAR est une protéine hautement glycosylée possédant trois domaines homologues 1, 2, 3 (D1, D2, D3) responsables de sa liaison avec l'u-PA (D1) et la VN (D2-D3). La fonction première d'u-PAR est de localiser l'action plasminolytique d'u-PA et du système activateur du plasminogène dans des régions

spécifiques de la surface cellulaire. L'u-PAR possède la même affinité pour les formes actives et inactives de l'uPA, en plus de pouvoir lier la forme complexée uPA/PAI-1. L'u-PA renferme un domaine protéolytique responsable de la conversion du plasminogène en plasmine, mais peut aussi activer certains facteurs de croissance et les MMP (Appella *et al.*, 1987). Le rôle de l'u-PA consiste en la dégradation et le remodelage de l'environnement extracellulaire.

1.2.2.2 L'activateur de type tissulaire (t-PA)

Le t-PA est aussi une sérine protéase. De masse moléculaire d'environ 70kDa, elle est synthétisée sous forme d'une seule chaîne qui peut être clivée en deux par hydrolyse du lien peptidique entre l'Arg²⁷⁵ et l'Ile²⁷⁶ pour donner la forme active. Les deux fragments demeurent toutefois reliés par un pont dissulfure. L'activité plasminolytique du t-PA est de 10 à 50 fois plus élevée chez la forme active que chez le zymogène. Il est à noter que l'activité de cette protéase est stimulée considérablement par la fibrine. En effet, le t-PA doit d'abord être lié à la fibrine pour activer la plasmine de façon efficace. Cette protéase fonctionne presque exclusivement comme médiateur de la fibrinolyse intravasculaire et comme dissociateur de caillots (Eddy, 2002).

Certaines études permettent de croire que le t-PA, tout comme l'u-PA, aurait son propre récepteur. En effet, une protéine transmembranaire de type II a récemment été identifiée comme étant capable de lier le t-PA avec un K_d d'environ 25nM (Bass et Ellis, 2002). Cette observation a été faite chez des cellules vasculaires de muscle lisse et est corrélée par le fait que la présence de ce type de cellules augmente de plus de 100 fois l'activité du t-PA. Le récepteur, encore mal connu, servirait à la fois à augmenter l'activation du plasminogène et à diminuer l'inhibition du t-PA par le PAI-1 (Bass et Ellis, 2002).

1.2.3 Le PAI-1

Le PAI-1 (Plasminogen Activator Inhibitor 1) est une glycoprotéine de 50 kDa appartenant à la famille des serpins. Il possède une affinité égale pour le t-PA (mono ou bicaténaire) et l'u-PA (Kruithof, 1988 ; Declerck *et al.*, 1994). Dans le plasma, le PAI-1 est en excès molaire par rapport aux activateurs du plasminogène. Il est présent sous plusieurs formes : forme active complexée à la vitronectine, forme inactive, soit complexée aux activateurs du plasminogène, soit libre (dite latente). À côté du compartiment plasmatique, le PAI-1 est présent dans les granules α plaquettaires. Le PAI-1 plaquettaire représente 95% du PAI-1 circulant. Bien que majoritairement inactif, le PAI-1 plaquettaire, présent en très forte concentration au niveau du caillot, préviendrait une lyse prématurée. Le PAI-1 est présent au niveau des matrices extracellulaires et lié à la VN qui stabilise son activité. Il y joue un rôle dans les processus de remodelage tissulaire en coordination avec les activateurs du plasminogène. Le PAI-1 est produit par de nombreuses cellules : cellules endothéliales, monocytes, hépatocytes, fibroblastes, cellules cancéreuses, cellules en culture; sa production par ces dernières étant dépendante de l'état de prolifération des cellules. Sa synthèse est induite par des cytokines ($TNF\alpha$, $TGF\beta$, IL1), des hormones et facteurs de croissance (glucocorticoïdes, insuline, IGF1...). Elle est augmentée dans les zones inflammatoires et de remodelage tissulaire (ex.: paroi athéromateuse, placenta, tissu adipeux) (Declerck *et al.*, 1994 ; Lupu *et al.*, 1995; Alessi *et al.*, 1997).

1.3 La nutrition et le cancer

Étudiés dès le début du XXème siècle, les liens éventuels entre l'alimentation et les risques de cancers font l'objet de recherches plus approfondies depuis le milieu des années 70 (Key *et al.*, 2002). La multiplication des études épidémiologiques, sur des échantillons importants de personnes et dans toutes les régions du globe, a mis en

avant une répartition géographique hétérogène entre les différents cancers. Trois cancers non liés aux substances les plus étudiées à cette époque, et qui varient énormément d'un pays à l'autre, éveillent l'intérêt des chercheurs : ceux du côlon, du sein et de l'estomac. On recherche alors d'autres causes potentielles, parmi lesquelles les habitudes alimentaires (Poppel *et al.*, 1997). Mise à part les études épidémiologiques, des travaux en laboratoire démontrent la contribution de la diète et de l'alimentation à la prévention du cancer (DeMarini, 1998 ; Weisburger, 2000 ; Greenwald, Clifford et Milner, 2001)

Il est maintenant reconnu qu'une mauvaise alimentation est un puissant déterminant du risque de plusieurs maladies comme les maladies cardiovasculaires, l'arthrite rhumatoïde, le diabète, certaines maladies associées au vieillissement ainsi que le cancer (Weisburger, 2000). Selon le Centre international de recherche sur le cancer, entre le quart et le tiers des cancers du sein, du côlon, de l'œsophage, du rein et de l'utérus sont liés à l'excès de poids et à la sédentarité. Un certain nombre d'autres cancers sont liés à une mauvaise alimentation, notamment les cancers de la vessie, du poumon, de la cavité buccale, du pancréas, de la prostate et de l'estomac (Statistiques Canada 2005). L'Institut Américain de Recherche sur le cancer estime qu'entre 30 et 40 % des cas de cancer pourraient être prévenus avec le temps en conjuguant le respect des recommandations en matière d'alimentation, la pratique régulière de l'activité physique et le maintien d'un poids corporel adéquat. La consommation annuelle de fruits et de légumes a augmenté d'environ 40 % depuis les années 60, passant de 221 kg par personne en 1963 (137 kg de fruits, 84 kg de légumes) à 308 kg par personne en 2001 (183 kg de fruits, 125 kg de légumes). Ces changements ont probablement contribué à réduire le risque de certains cancers, en particulier ceux du tractus digestif (Statistiques Canada 2005).

Plusieurs composants de notre alimentation tels les gras animaux (viande rouge), les gras saturés, une consommation riche en sucre et en alcool sont tous des facteurs responsables de plusieurs maladies dont l'embonpoint et le cancer (Willett, 2000 ;

Key *et al.*, 2002 ; Tamimi *et al.*, 2002). À l'inverse, une alimentation d'au moins cinq portions de fruits et légumes par jour diminue de façon considérable les risques de développer un cancer (Surh, 2003). En effet, plusieurs études ont démontré les effets bénéfiques de la consommation de fruits et de légumes sur l'incidence de plusieurs types de cancer (sein, prostate, estomac, colon) (Greenwald, Clifford et Milner, 2001 ; Greenwald, 2002). Ceux-ci sont composés de plusieurs éléments dont on pense qu'ils peuvent réduire les risques de cancer tels que les fibres alimentaires, certains micronutriments (vitamines, sels minéraux) et plusieurs composés chimiques non-nutritifs (phytochimiques).

L'effet de ces micronutriments contre le stress oxydant, dû à la production de radicaux libres est déjà connu. Ces radicaux sont produits par la respiration cellulaire et également générés lors des réactions immunitaires et sous l'effet d'oxydants environnementaux, comme le tabac ou la pollution. Ces radicaux s'attaquent aux composés vitaux des cellules (lipides, protéines, ADN) provoquant un vieillissement prématuré. Pour s'en protéger, l'organisme dispose de moyens de défense d'origine endogène (enzymes) mais aussi d'origine exogène apportés par l'alimentation (vitamines et antioxydants) (Wincor, 1999 ; Arora *et al.*, 2000 ; Harborne et Williams, 2000). Il existe, normalement, un équilibre dynamique entre la production de radicaux libres et leur neutralisation par les systèmes de protection. Ce bel équilibre est parfois perturbé : insuffisance d'apports en antioxydants, déficience des enzymes protectrices, augmentation de la production de radicaux libres. L'organisme se trouve dans un état de stress ouvrant la porte à de nombreuses pathologies: infections, cancers, diabète, maladies auto-immunes. La consommation d'aliments riches en antioxydants, comme les fruits et les légumes, contribue à limiter ce stress en aidant à renforcer les défenses naturelles de l'organisme et à réduire le risque d'apparition de ces pathologies (Hardy, Hardy et Ball, 2003).

Mais leur action anticancéreuse a suscité l'intérêt de plusieurs chercheurs afin d'élucider le mécanisme antimorale de ces micronutriments. Une nouvelle approche s'est donc imposée d'elle-même, la nutraceutique. Unissant nutrition et pharmaceutique, celle-ci tente d'identifier parmi les éléments de notre alimentation les composants naturels bénéfiques pour prévenir et/ou traiter une ou plusieurs maladies (Gescher *et al.*, 1998; Tamimi *et al.*, 2002). Cette méthode, quoique déjà utilisée dans le traitement de plusieurs pathologies (maladies cardiovasculaires), est proposée comme une nouvelle approche dans le traitement du cancer depuis quelques années. En effet, le développement tumoral démontre quelques faiblesses qui peuvent être exploitées. En effet, la carcinogenèse est un mécanisme physiologique se réalisant en chaîne, dont chacune des étapes est critique au développement tumoral et pouvant donc être court-circuitée (Tamimi *et al.*, 2002). Comme il s'agit d'un mécanisme s'échelonnant sur plusieurs années, il y a donc place à l'intervention, sachant que certaines étapes de cette chaîne sont réversibles (Tamimi *et al.*, 2002). Quoique plusieurs études démontrent des effets bénéfiques des vitamines (C, E) et de certains minéraux (sélénium), l'intérêt vers les composés phytochimiques prend de plus en plus d'envergure (Surh, 2003). Plusieurs de ces composés nutraceutiques ont déjà été identifiés et proviennent de sources aussi variées que l'ail, les germes de soya, le thé vert, le gingembre, le brocoli, les raisins, la tomate et mêmes quelques épices (curcumin) (fig. 1.3). Ces composés sont divisés en deux classes distinctes : les agents bloqueurs ou les agents supprimeurs. La première catégorie agit en empêchant des agents carcinogènes de se rendre à leurs cibles en inhibant leurs activités métaboliques ou leurs liaisons avec certains composants macromoléculaires (ADN, protéines), tandis que les agents supprimeurs inhibent l'évolution d'une cellule initialisée à la phase de promotion ou de progression, en bloquant ou en inversant les étapes d'initiation ou de progression et/ou en arrêtant ou retardant la progression tumorale (Surh, 2003). Les polyphénols, principalement les flavonoïdes démontrent des propriétés chimio-préventives contre le cancer qui sont de plus en plus établies.

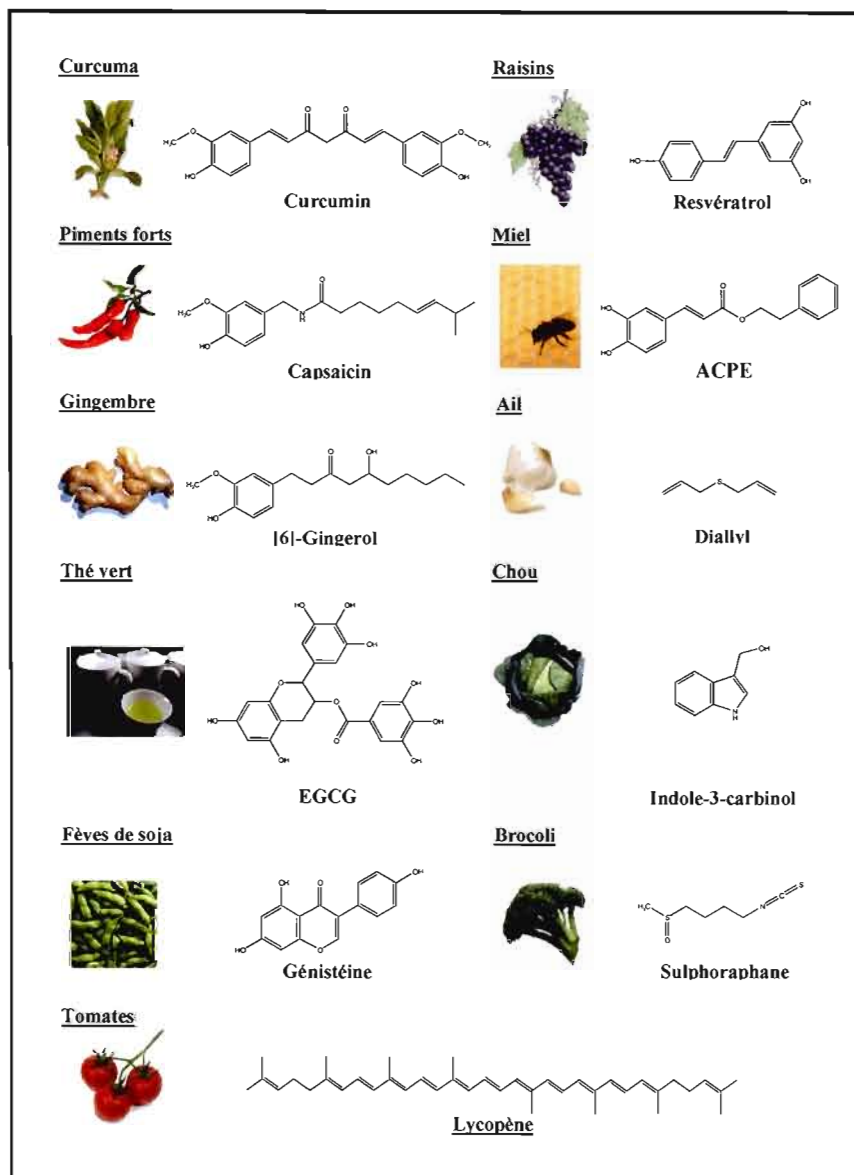


FIGURE 1.3 Structure d'agents phytochimiques aux propriétés chimio préventives et leurs sources alimentaires. Figure modifiée de Surh (2003)

1.3.1 Les polyphénols

Les polyphénols sont une vaste famille de composés qui, suivant leur structure, sont divisés en plusieurs classes allant des plus simples telles que les acides phénoliques à des composés plus complexes comme les lignanes, en passant par les flavonoïdes. Parmi ces classes, les composés les plus biologiquement actifs sont les flavonoïdes. Il existe plus de 8000 flavonoïdes dans la nature qu'on regroupe en quelques grandes classes: les flavones (apigénine, lutéoline), les flavonols (quercétine, kaempférol), les flavanones, les anthocyanines (delphinidine, malvidine) et les isoflavones (comme la génistéine) (Crozier *et al.*, 2000).

Les flavonoïdes ont été découverts dans les années trente par Albert Szent-Gyorgyi comme des composés possédant une activité antioxydante prononcée. Ce sont les plus abondants des polyphénols dans tous les végétaux. Les fruits, les légumes et le thé sont la source majeure des flavonoïdes alimentaires. L'ingestion moyenne des cinq flavonoïdes majoritaires (quercétine, kaempférol, myricétine, apigénine et lutéoline) est d'environ 23 mg par jour (Hertog *et al.*, 1995). Mais ils sont également présents dans la plupart des plantes médicinales, ce qui leur confère des propriétés pharmacologiques utilisées depuis les temps anciens jusqu'à aujourd'hui (DeMarini, 1998).

Les flavonoïdes ont une structure commune en C₆-C₃-C₆ (noyau flavone), dans laquelle deux cycles benzéniques (A et B) sont reliés par un élément en C₃ au niveau duquel s'établit la classification. Selon la position du cycle B, on différencie les isoflavonoïdes (B en position 3) et des flavonoïdes (B en 2) (Havsteen, 2002). Ces derniers peuvent être classés selon une double ou une simple liaison en C₂-C₃ et selon l'absence ou la présence d'un groupement hydroxyl en 3 (figure 1.4).

Les isoflavones sont essentiellement représentés par la génistéine et la diadzéine présentes dans toutes les légumineuses. L'une des sources principale est le soja qui contient environ 1 mg de génistéine et de diadzéine par gramme de grain sec. Cette famille est souvent référencée parmi les phyto-oestrogènes les plus actifs (Tapiero *et al.*, 2002).

Les flavanones sont principalement la naringénine, la taxifoline et l'hespérétine. Le citron et l'orange en sont les sources les plus importantes. Par exemple, l'orange contient 125-250 mg d'hespérétine par litre de jus. La lutéoline et l'apigénine sont des flavones ; ceux sont les flavonoïdes les moins courants. Ils ont été identifiés dans le poivron rouge, les câpres (pour la lutéoline), le céleri, le persil, le fenouil, la camomille ou encore la sauge (pour l'apigénine).

Les catéchines sont les principaux flavanols abondamment retrouvés dans le thé vert. Quant aux flavonols, ils sont représentés principalement par la quercétine, le kaempférol et la myricétine ; la quercétine est présente dans de nombreux fruits, légumes et boissons comme le jus de raisin. C'est le principal flavonol de notre alimentation et il est particulièrement abondant dans les oignons à raison de 0,3 mg/g de poids frais et dans le thé à 10-25 mg/l (Tapiero *et al.*, 2002)

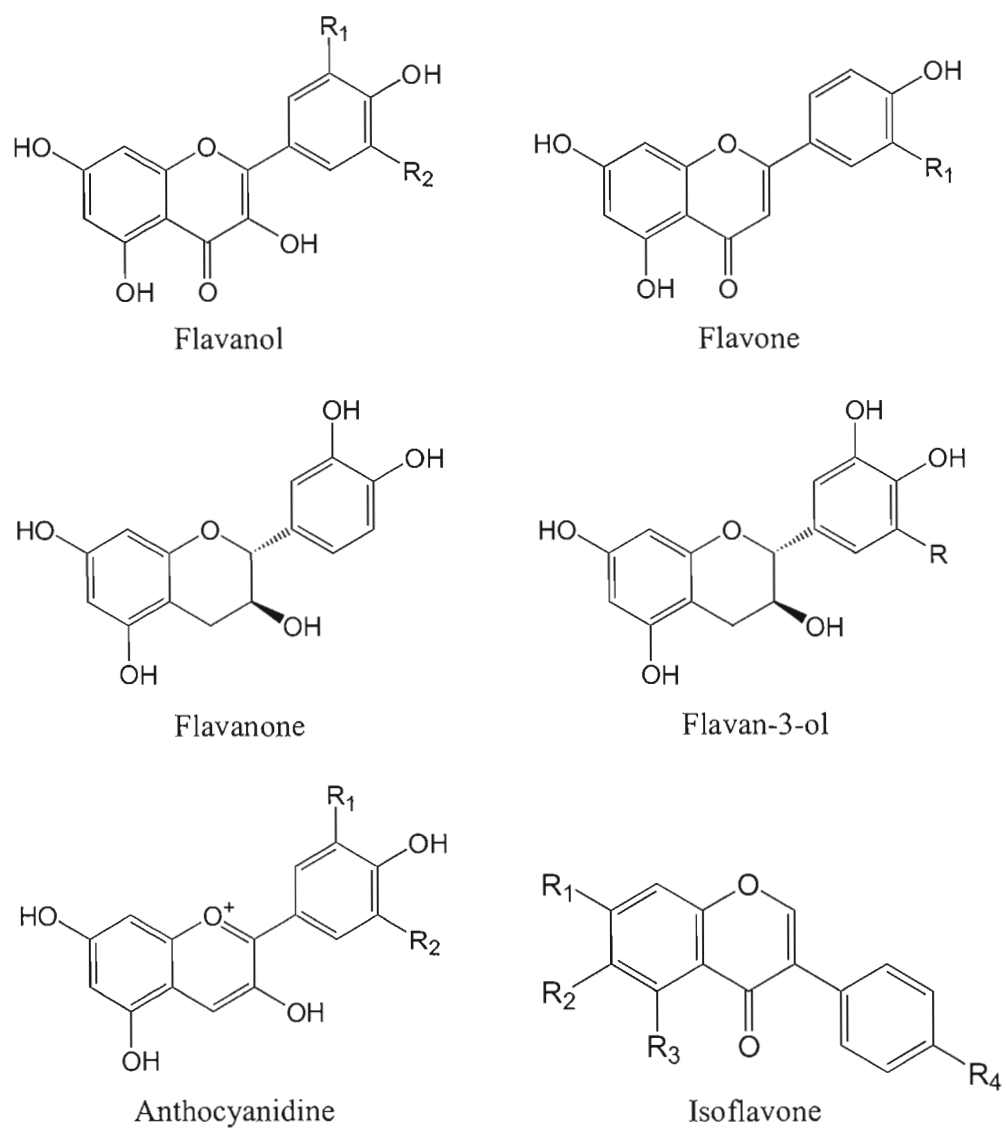


FIGURE 1.4 Structure moléculaire des six principales classes de flavonoïdes.

1.3.2 Les anthocyanidines

Les anthocyanes (du grec *anthos* = fleur et *kianos* = bleu) font partie de la famille des flavonoïdes et absorbent la lumière dans le visible. Leur présence dans les plantes est à l'origine de la couleur des fleurs, des fruits et des baies allant du rouge au bleu. Elles contribuent de façon prépondérante à la couleur des baies du raisin noir et sont localisées uniquement dans les vacuoles des cellules de l'épiderme de ces baies, sauf dans certains cépages dits "teinturiers" où elles sont également présentes dans la pulpe (Hou *et al.*, 2003).

Les anthocyanidines représentant la forme aglycone des anthocyanes (figure 1.5), sont des flavonoïdes au pouvoir antioxydant puissant, à qui on attribue la coloration vive de plusieurs fleurs et végétaux, démontrent des fonctions biologiques variées et d'intéressantes propriétés anticancéreuses ou chimio-préventives (Hou *et al.*, 2003). La consommation quotidienne de flavonoïdes fournit une grande quantité d'anthocyanidines. En effet, celle-ci est évaluée à près de 180-215 mg/jour ce qui surpasse largement la consommation des autres flavonoïdes évaluée à 23 mg/jour (Cao et Prior, 1999 ; Lazzè *et al.*, 2004). Plusieurs recherches ont déjà été entreprises pour identifier les propriétés nutraceutiques et chimio préventives de ces composés.

Les anthocyanidines sont déjà reconnues pour leur capacité d'affecter la prolifération des cellules endothéliales induite par le VEGF, altérant ainsi les mécanismes angiogéniques (Martin *et al.*, 2002 ; Kang *et al.*, 2003). De plus, ces composés induisent l'apoptose de certaines lignées endothéliales et tumorales par l'activation de signaux de transduction menant à l'activation des caspases, la dissipation du potentiel membranaire mitochondrial et le relargage de cytochrome *c* (Agarwal, Singh et Agarwal, 2002 ; Hou *et al.*, 2003; Katsube *et al.*, 2003). De plus, les anthocyanidines contribuent à l'inhibition de la tumorigenèse en bloquant l'activation des voies des MAPK (Hou *et al.*, 2004). Des études récentes révèlent que les anthocyanidines agissent directement sur les cyclooxygénases qui sont impliquées

dans l'inflammation (Seeram, Zhang et Nair, 2003). De plus, les anthocyanidines seraient des modulateurs de la réponse immunitaire par l'activation des macrophages (Wang et Mazza, 2002). La delphinidine affecte la migration des cellules endothéliales et leur prolifération (Favot *et al.*, 2003 ; Lazzè *et al.*, 2004). Cependant, peu d'études ont tenté d'évaluer la capacité de ces composants à moduler la migration et l'invasion des cellules tumorales.

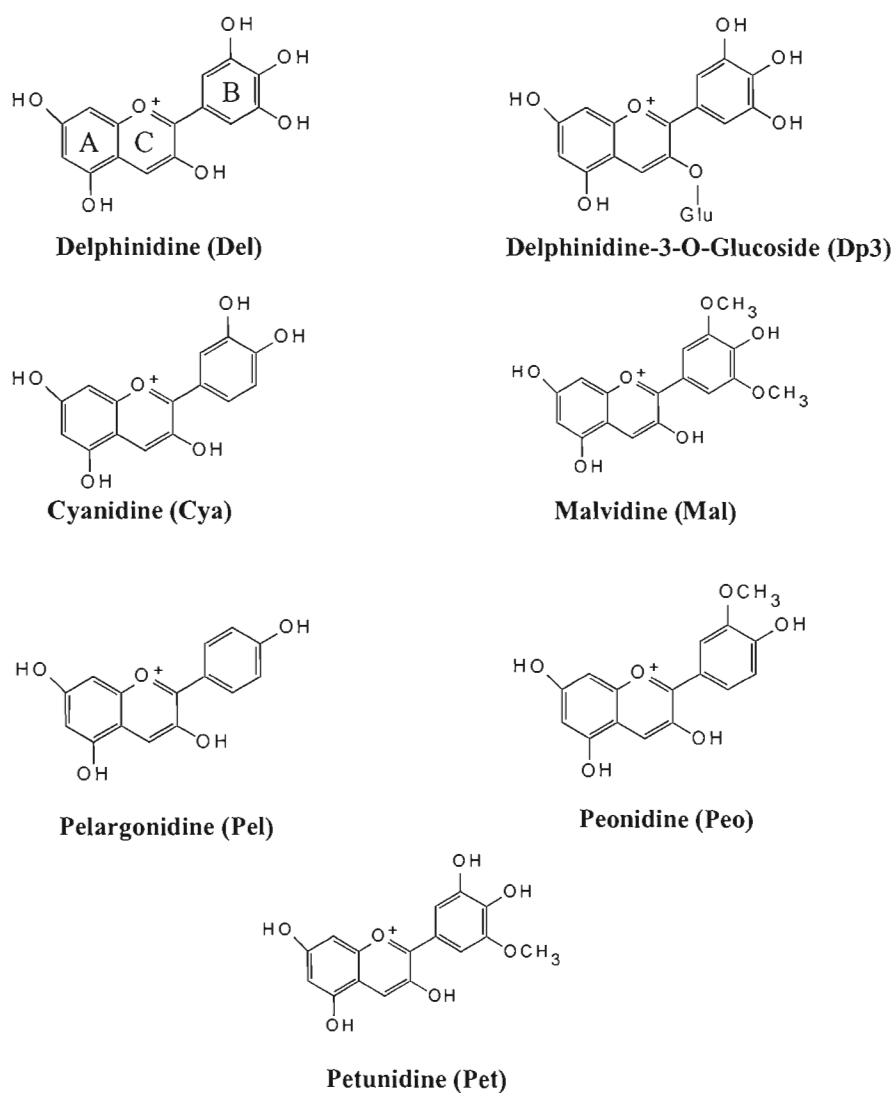


FIGURE 1.5 Structure moléculaire des anthocyanidines sélectionnées.

1.3.3 Le curcumin

Un autre composé très étudié est le curcumin (diféruoylméthane). Le curcumin est une épice de couleur jaune orangé qui provient du broyage des racines de la plante *Curcuma longa*, une plante de la famille du gingembre. La presque totalité de la production mondiale du curcumin est faite en Inde, où cette épice est très importante dans l'alimentation. 80% de la production mondiale est consommée en Inde (Boik, 2001). L'utilisation de cette épice date de plus de 4000 ans où elle était l'épice principale dans les mets. Elle était aussi utilisée en médecine et avait une signification religieuse. Le curcumin est un composé très sécuritaire pour la consommation et ne montre aucune toxicité jusqu'à 8000 mg/jour (Cheng *et al.*, 2001).

Le curcumin présente plusieurs effets biologiques bénéfiques : c'est un anti-oxydant puissant, supérieur à la vitamine E, protégeant ainsi les lipides de la peroxydation, il possède également un effet anti-inflammatoire, hypocholestérolémiant, anti-bactérien, anti-HIV et il active la sécrétion biliaire (Boik, 2001; Araujo et Leon, 2001). Des études ont démontré que le curcumin serait utile dans la prévention et le traitement de plusieurs types de cancers, dont celui de l'estomac, de l'intestin, de la peau et du foie, et ce tant au niveau de l'initiation que de la promotion du cancer (Boik, 2001; Cheng *et al.*, 2001; Huang, Newmark et Frenkel, 1997).

1.3.4 La biodisponibilité

Les flavonoïdes sont présents dans notre alimentation sous plusieurs formes, et cette particularité va leur conférer des métabolismes différents. C'est ainsi que les formes libres peuvent être directement absorbées au niveau de l'intestin grêle, tandis que les formes glycosylées doivent être hydrolysées par la flore intestinale au niveau du côlon, avant de pouvoir être absorbées. Cependant, les formes libres issues de

cette hydrolyse, peuvent aussi être dégradées par la microflore en acides phénoliques, eux mêmes absorbés ou éliminés via les fèces (Greenwald, Clifford et Milner, 2001). Dans le sang, les flavonoïdes ne sont pas présents sous leur forme native car ils sont transformés au niveau du foie par des enzymes dites de conjugaison. Ces métabolites ainsi formés vont atteindre leurs tissus cibles pour avoir un effet biologique ou bien être éliminés définitivement dans les urines. Toutefois, une fraction des flavonoïdes peut être déversée au niveau de l'intestin via la bile. Dans ce dernier cas, les métabolites peuvent être hydrolysés par les enzymes d'origine bactérienne, libérant de nouveau l'aglycone qui éventuellement pourra être réabsorbé, et qui constitue un recyclage entéro-hépatique des flavonoïdes (Greenwald, Clifford et Milner, 2001). Malgré toutes ces données, il restait encore des questions à résoudre dans la biodisponibilité des flavonoïdes, et notamment de déterminer les modalités d'absorption, le rôle respectif de l'intestin et du foie dans la conjugaison des flavonoïdes, ainsi que l'implication de la sécrétion biliaire. De même, il était nécessaire de statuer sur la nature des formes présentes dans le sang et le devenir de leurs propriétés biologiques de ces formes circulantes.

Les anthocyanidines se retrouvent principalement sous forme glycosylée dans les fruits et les légumes. Leur consommation a été évaluée à 200 mg quotidiennement. En effet, des sources aussi variées que les fruits et le vin peuvent fournir des doses variant de 75-200 mg (Bub *et al.*, 2001 ; Passamonti *et al.*, 2003 ; Nielsen *et al.*, 2003). Après la consommation de ces composés, leur absorption partielle (< 25%) est réalisée au niveau de l'estomac. Il a été démontré que 6 minutes suivant la consommation, des traces (quelques microgrammes) ont été retrouvées dans la circulation plasmatique (Passamonti *et al.*, 2003 ; Talavera *et al.*, 2003). Leur élimination s'effectue progressivement, en 4 à 6 heures, par le système rénal. Des études ont démontré que ces composés, comparativement à d'autres flavonoïdes, sont difficilement absorbés par l'organisme (Cao *et al.*, 2001). Toutefois, peu d'informations sont disponibles sur la biodisponibilité des formes aglycones des

anthocyanines. De plus, des études révèlent que des modifications *in vivo* par méthylation s'exercent et modifient la structure de ces composés (Wu, Cao et Prior, 2002). Pour expliquer l'apparition d'anthocyanidines au niveau plasmatique, l'hypothèse proposée est que les anthocyanines seraient transformées par hydrolyse au niveau de l'intestin par la flore bactérienne (Seeram, Zhang et Nair, 2003).

1.4 Buts de la recherche

Tel que souligné en introduction, durant l'âge adulte, l'angiogenèse est souvent associée à une pathologie. En effet, c'est un important facteur dans la croissance des tumeurs solides. On distingue quatre étapes essentielles : la dégradation de la membrane basale, la migration des cellules endothéliales, leur prolifération et la formation des structures tubulaires menant à la formation d'un nouveau vaisseau sanguin. Lors de la stimulation de l'angiogenèse par les facteurs proangiogéniques, tel le VEGF, il y a augmentation de la perméabilité des vaisseaux sanguins permettant ainsi au fibrinogène de se retrouver dans l'environnement pericellulaire et se transformer en fibrine par l'action protéolytique de la thrombine. Cette fibrine sert de matrice provisoire pour les cellules endothéliales en croissance et donc un support structural lors de la néovascularisation. Pénétrer cette matrice nécessite une activité protéolytique générée par le système plasminolytique qui comprend les activateurs du plasminogène (t-PA, u-PA) et la plasmine, mais aussi implique les MMP. Dans cette étude nous avons mimé l'environnement en 3D dans lequel les cellules endothéliales, entourées de fibrine, doivent dégrader cette dernière en réponse à des facteurs proangiogéniques.

Dans un premier temps, nous avons étudié la fibrinolyse des HUVEC dans la matrice de fibrine, marquée radioactivement afin de quantifier cette activité de façon

facile et sensible, et élucider les mécanismes impliqués dans la fibrinolyse induite par le VEGF.

Depuis une cinquantaine d'années, les habitudes alimentaires dans les pays industrialisés délaissent les produits équilibrés au profit d'aliments plus nourrissants. Un tel déséquilibre modifie le fonctionnement optimal de l'organisme et peut favoriser l'apparition de maladies dégénératives comme les maladies cardiovasculaires et des cancers. Dans ce cadre, de nombreuses études épidémiologiques font ressortir l'importance d'une consommation diverse et variée de fruits et de légumes dans la prévention de l'apparition de ces pathologies. Cependant, il est nécessaire de comprendre comment ces aliments vont intervenir dans cette prévention.

Dans cette optique, nous nous sommes intéressés, dans un deuxième temps, à l'implication des polyphénols dans l'inhibition de la fibrinolyse lors de l'angiogenèse tumorale. Puisque différentes études démontrent les effets antiangiogéniques des différents polyphénols *in vitro* et *in vivo*, l'étude de l'action des polyphénols sur la fibrinolyse des HUVEC induite par le VEGF est devenue incontournable, d'autant plus qu'il n'y a pas de recherche faite sur l'effet de ces polyphénols sur la fibrinolyse tumorale.

1.5 Modèle expérimental

Même si le modèle *in vitro* de lignée cellulaire est un artéfact nécessaire en science, il n'en demeure pas moins un modèle expérimental fiable, nécessaire et mimant à beaucoup d'égards l'*in vivo*. Pour un modèle de cellules endothéliales, les cellules HUVEC ont été sélectionnées car cette lignée est bien caractérisée, histologiquement bien connue, et reconnue comme étant une référence adéquate pour

l'étude des propriétés des cellules endothéliales humaines. Nous avons cultivé les HUVEC dans une matrice de fibrine en 3D qui représente bien le microenvironnement des cellules endothéliales nous permettant ainsi d'étudier *in vitro* la fibrinolyse des HUVEC induite par le VEGF.

CHAPITRE II

MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Matériel

Les cellules HUVEC proviennent de Clonetics (Walkersville, MD). Elles ont été cultivées dans un milieu de croissance pour cellules endothéliales (EBM-2) achetées chez Cambrex Bio Science (Walkersville, MD). Le milieu contient 2% sérum de veau fœtal (FBS), 0.04% d'hydrocortisone, 0.04% d'hFGF-B, 0.1% de VEGF, 0.1% de R3-IGF-1, 0.1% d'acide ascorbique, 0.1% d'hEGF, 0.1% de GA-1000 et 0.1% d'héparine. Ce milieu est supplémenté avec 100U/ml de pénicilline, 100µg/ml de streptomycine et 2 mM de L-glutamine provenant de Hyclone Laboratories (Logan, UT). Les cellules sont cultivées en incubateur dans un environnement régulé de 37 °C et contenant 5 % de CO₂. La trypsine-EDTA provient de chez Sigma (St-Louis, MO). La delphinidine, la delphinidine-3-O-Glucoside, la cyanidine, la malvidine, la pélagonidine, la péonidine et la pétunidine ont été achetées chez Polyphenol Laboratories (Hanavein, Norvège). Les catéchines du thé vert proviennent de chez MP Biomedicals (Irvine, CA) ; la quercétine, la lutéoline, le kaempférol, la myricétine, l'apigénine, l'hespérétine et la naringénine proviennent de Sigma (St-Louis, MO) et enfin le sylimarin, le curcumin, l'acide ellagique, l'acide caféique et l'acide gallique proviennent de LKT-Laboratoires (St. Paul, MN). Le Trizol et le kit SuperScript™ One-Step RT-PCR with Platinum® *Taq* sont obtenus de chez Invitrogen (Burlington, ON). Les amorces oligonucléotidiques pour l'analyse RT-

PCR pour u-PA (5'-GGCAGCAATGAAGTTCATAA-3') et (5'-TATCTCA-CAGTGTTCCCCTT-3'), t-PA (5'-CTG-CAGCTGAAATCGGATTC-3') et (5'-CTGATGATGCCACCAAAGT -3'), l'actine (5'CACCTTCTACAATGAGC-TGC-3') et (5'AGGCAAGCTCGTAGCTCTTCT-3'), MT1-MMP (5'-CAACA-CTGCCTACGAGAGGA-3') et (5'-GTTCTACCTTCAGCTTCTGG-3'), MT2-MMP (5'-GCATCCAGAACTACACGGAG-3') et (5'-TAACGTAGAGCTGCT-GGATG-3'), MT3-MMP (5'-TGT-ACCTGACCAGACAAGAG-3') et (5'-AGT-GTCCATGGCTCATCTGA-3') et de la MMP-3 (5'-CTCACAGACCTGACT-CGGTT-3') et (5'-CACGCCTGAAGGAAGAGATG-3') ont été achetées chez BioCorp Inc (Montréal, Qc., Canada). Le fibrinogène humain déplété en plasminogène, le PAI-1 recombinant humain ainsi que la plasmine ont été obtenus de Calbiochem (La Jolla, CA). Le fibrinogène marqué I¹²⁵ a été acheté de Amersham Biosciences (Baie d'Urfé, QC, Canada). La thrombine et le plasminogène ont été obtenus de Sigma Co. (St-Louis, MO). La sphingosine-1-phosphate (S1P) a été acquise de Roche (Laval, Qc, Canada). Les facteurs de croissance PDGF et HGF/SF sont obtenus de R&D Systems (Minneapolis, MN) tandis que l'EGF de BD Biosciences Discovery Labware (Bedford, MA). Le VEGF quant à lui nous a été produit et purifié selon le protocole spécifique (Labrecque, 2005); finalement le bFGF provient de Sigma (St-Louis, MO). L'inhibiteur du VEGFR-2, le PTK787/ZK222584 (PTK787), nous a été fourni par Novartis AG (Basel, Switzerland). TIMP-2 a été obtenu de chez Chemicon et l'aprotinine chez Roche (Laval, Qc, Canada). Le BB-94 provient de British Biotech, (UK) et la Cycloheximide chez Sigma Co. (St-Louis, MO). Les anticorps monoclonaux dirigés contre le t-PA et l'u-PA ont été achetés chez American Diagnostica (Stamford, CT). L'anticorps de souris IgG1 provient de Sigma (St-Louis, MO).

2.2 Méthodes

2.2.1 Préparation des polyphénols

Les échantillons, des anthocyanidines solides (10 mg), sont solubilisés dans 1 ml d'éthanol (EtOH) 100 % froid (-20 °C) et agités afin d'obtenir une solution ayant une concentration finale de 10 mg/ml. Des volumes égaux (100 μ l) ont été transférés dans des tubes ambrés (1.5 ml) (Eppendorf, Mississauga, Ont.) et puis lyophilisés pendant 30 minutes. Les échantillons (1 mg) sont conservés à -80 °C avant d'être ré solubilisés dans de l'EtOH 100 % froid à la concentration désirée. Une quantité de chaque catéchine (EGCG, C, EC, GCG, EGC, CG, ECG) a été solubilisée dans un volume d'éthanol (EtOH) 100% froid (-20°C) et agitée donnant ainsi la concentration final de 25mM. Des volumes égaux (25 μ l) ont été transférés dans des tubes ambrés et gardés à -80 °C pour être utilisés. L'acide ellagique est préparé de la même façon que les catéchines mais il est solubilisé dans le NaOH 1N. La quercétine, la lutéoline, le kaempférol, l'apigénine, le curcumin, la myricétine, le sylimarin, l'acide caféique, l'acide gallique, la naringénine et l'hespérétine sont aussi préparés de la même façon que les catéchines mais en utilisant le DMSO (Diméthyle sulfoxyde) comme solvant

2.2.2 Essais de fibrinolyse *in vitro*

Les HUVEC ont été cultivées dans une matrice de fibrine à une densité de 1.2×10^6 cellules/ml. Les cellules ont été d'abord centrifugées à 1000 rpm pour 3 minutes dans des tubes de 14ml et le culot de cellules a été resuspendu dans un mélange de fibrinogène exempt de plasminogène de 2.5 mg/ml contenant du fibrinogène humain marqué avec l' I^{125} (0.15 μ Ci/ml) (préparé dans du milieu sans sérum). La thrombine (0.5U/ml) a été ajoutée au mélange de fibrinogène, et rapidement pipetée dans les

puits de la plaque de 48 puits (130µl, couvrant l'entière surface du puits). Pour les études d'inhibition, les inhibiteurs PAI-1, BB-94, PTK-787, l'aprotinine, TIMP-2, la cycloheximide et les anticorps dirigés contre le t-PA, u-PA ou contre IgG1 ont été ajoutés dans le mélange de fibrinogène avant la polymérisation et ce pour une concentration finale de 200 ng/ml pour le PAI-1, 10 µM pour le BB-94, 200 µg/ml pour l'aprotinine 1 µM pour le PTK-787 et 100 ng/ml pour TIMP-2. On permet ensuite au fibrinogène de se polymériser en fibrine 30 minutes à 37 °C. Après avoir rincé les matrices de fibrine avec du milieu sans sérum, un milieu pour cellules endothéliales (EBM-2) contenant 1% FBS a été ajouté aux puits en présence des différents polyphénols à une concentration finale de 25µM. Les différents inhibiteurs ont aussi été ajoutés dans les surnageants aux mêmes concentrations que dans la matrice de fibrine. Les différents véhicules (EtOH, DMSO et NaOH) des molécules testées, sont aussi ajoutés quand cela est nécessaire. Les cellules sont ensuite prétraitées durant une heure à 37°C ; ensuite stimulées avec le VEGF à une concentration finale de 100ng/ml. Comme le VEGF n'est pas acheté mais plutôt fabriqué, un deuxième lot de VEGF a été obtenu durant la période d'étude, et ce dernier donnera une efficacité similaire au premier lot mais à une concentration de 200 ng/ml. Les matrices de fibrine sont ensuite incubées à 37°C et 5% CO₂ (v/v) durant 72 heures. Les produits de dégradation de fibrine marqués radioactivement présents dans les surnageants de la fibrinolyse sont quantifiés par le compteur à scintillation-γ.

2.2.3 Zymographie caséinolytique

L'essai de fibrinolyse est reproduit selon la section 2.2.2 mais sans ajouter la radioactivité et avec un temps de stimulation de 24h. Les surnageants de ces essais de fibrinolyse *in vitro* ainsi que des échantillon de t-PA et u-PA (témoins positifs) ont

été déposés sur gels dans un tampon d'échantillon non dénaturants (62,5 mM Tris-HCl pH 6,8, 10 % v/v glycérol, 2 % p/v SDS et 0,00625 % p/v bleu de bromophénol). Les gels de séparation (0,75 mm) étaient composés d'acrylamide 7,5 %, de caséine 1 mg/ml et de plasminogène (1540 U/gel). La migration a été réalisée à 4 °C sur des systèmes Mini-Protean II (Bio-Rad, Mississauga, ON). Suite à la migration, les gels ont été lavés à deux reprises, pendant 30 minutes, à 25 °C dans une solution de Triton X-100 v/v 2,5 % (Sigma, St-Louis, MO) puis rincés cinq fois à l'eau nanopure. Les gels ont été incubés durant trois heures à 37 °C dans du tampon de zymographie-caséine pH 8,5 (50 mM de Tris Base, 5 mM de CaCl₂, 0,02 % v/v de NaN₃). La réaction a été arrêtée en déposant les gels dans une solution de fixation (30 % v/v méthanol, 7,5 % v/v acide acétique, H₂O) puis colorés une heure dans une solution de coloration (0,4 % p/v de bleu de Coomassie, 40 % v/v méthanol, 10 % v/v d'acide acétique glacial, H₂O). Les gels ont ensuite été décolorés (~1-2 heures) dans la solution de fixation. Les endroits indiquant une activité fibrinolytique sont représentés par des bandes transparentes.

2.2.4 Zymographie sur fibrinogène

La génération de la plasmine dans le surnageant de la fibrinolyse a été détectée par la zymographie sur fibrinogène. Les différents surnageants de la fibrinolyse obtenus lors des essais de fibrinolyse *in vitro* sans radioactivité (voire section 2.2.3) et un échantillon de plasmine (témoin positif) ont été séparés dans des conditions non dénaturantes (tampon d'échantillon non dénaturant : 62,5 mM Tris-HCl pH 6,8, 10 % v/v glycérol, 2 % p/v SDS et 0,00625 % p/v bleu de bromophénol) sur un gel SDS-PAGE 7.5% contenant 1 mg/ml de fibrinogène humain déplété en plasminogène. La migration a été réalisée à la température ambiante sur des systèmes Mini-Protean II. Les gels sont ensuite rincés deux fois dans une solution de 2.5% Triton X-100 pendant 30 minutes à température pièce afin d'enlever le SDS, puis rincés cinq fois à

l'eau nanopure. Les gels sont ensuite incubés à 37°C durant 48 heures dans le tampon de zymographie-gélatine (Tris-HCL 50mM pH 7.6, 20 mM de NaCl, 5 mM de CaCl₂ et 0.02% de Brij-35). La réaction a été arrêtée en déposant les gels dans une solution de fixation (30 % v/v méthanol, 7,5 % v/v acide acétique, H₂O) puis colorés une heure dans une solution de coloration (0,4 % p/v de bleu de Coomassie, 40 % v/v méthanol, 10 % v/v d'acide acétique glacial, H₂O). Les gels ont ensuite été décolorés (~1-2 heures) dans la solution de fixation. Les endroits indiquant une activité fibrinolytique sont représentés par des bandes transparentes.

2.2.5 Analyse RT-PCR

Les HUVEC ont été cultivées dans une matrice de fibrine à une densité de 1.2×10^6 cellules/ml. Les cellules ont été d'abord centrifugées à 1000 rpm pour 3 minutes dans des tubes de 14ml et le culot de cellules a été resuspendu dans un mélange de fibrinogène exempt de plasminogène de 2.5 mg/ml (préparé dans du milieu sans sérum). La thrombine (0.5U/ml) a été ajoutée au mélange de fibrinogène, et rapidement pipetée dans les puits de la plaque de 12 puits (600 µl, couvrant l'entière surface du puit). Pour les études d'inhibition, les inhibiteurs PAI-1, BB-94 et le PTK-787 ont été ajoutés dans le mélange de fibrinogène avant la polymérisation et ce pour une concentration finale de 200 ng/ml pour le PAI-1, 10µM pour le BB-94, 1 µM pour le PTK-787. On permet ensuite au fibrinogène de se polymériser en fibrine durant 30 minutes à 37°C. Un milieu pour cellules endothéliales contenant 1% FBS (1 ml) a été ajouté aux puits en présence des différents polyphénols à une concentration finale de 25µM. Les différents inhibiteurs ont aussi été ajoutés dans les surnageants aux mêmes concentrations que dans la matrice de fibrine. Les différents véhicules (EtOH et DMSO) des molécules testées, sont également ajoutés là où c'est nécessaire. Après un prétraitement durant 18 heures à 37°C, on stimule avec le VEGF

avec une concentration finale de 200 ng/ml (lot #2). Les matrices de fibrines sont ensuite incubées à 37°C et 5% CO₂ (v/v) durant 4 heures. Après avoir enlevé les surnageants, la lyse et l'extraction des cellules ont été réalisées en utilisant le TriZOL (1 ml) (Invitrogen, Carlsbad, CA) directement dans les puits. Les extraits de TriZOL ont été transférés dans des tubes de 1,5 ml dans lesquels 200 µl de chloroforme ont été ajoutés. Les échantillons ont ensuite été centrifugés à 4 °C, pendant 15 minutes à 8050 g. Les phases supérieures ont été récoltées sans toucher à l'interphase ni à la couche inférieure. 500 µl d'isopropanol ont été ajoutés aux phases supérieures. Les échantillons sont laissés à la température ambiante pendant 10 minutes pour ensuite être centrifugés à 4 °C pendant 10 minutes à 8050 g. Les surnageants ont été délicatement retirés pour ne pas altérer l'intégrité des culots. Ceux-ci ont ensuite été lavés à l'EtOH 70 % v/v froid (-20°C) (1 ml) et centrifugés 10 minutes à 8050 g. Le surplus d'EtOH 70 % a été retiré et on a laissé évaporer les échantillons, afin d'éliminer toute trace d'EtOH, pour ensuite les resuspendre dans 25 µl d'eau sans ARNase (Sigma, St-Louis, MO). Le dosage en acide ribonucléique (ARN) a été effectué par spectrophotométrie par l'évaluation d'un ratio 280/260 nm, permettant ainsi de déterminer la pureté du matériel d'ARN (> 1,500).

Les RT-PCR ont été réalisées en utilisant les instructions du kit SuperScript™ One-Step RT-PCR with Platinum® *Taq* (Invitrogen, Carlsbad, CA). Les promoteurs proviennent tous de séquences humaines. Les conditions de PCR ont été optimisées pour être dans la zone linéaire pour l'amplification (voir tableau 2.1). Les produits de PCR ont été déposés sur gel d'agarose 1% p/v solubilisé dans du TAE (Tris Base 40 mM, acide acétique 0,8 mM, EDTA 0,02 mM) et contenant 0,1 µl/ml de bromure d'éthidium. Les échantillons ont migré sur un système Mini-sub® Cell GT (Bio-Rad, Mississauga, Ont.) puis ont été photographiés avec un appareil Kodak Image Station 440 CF (Kodak, Rochester, NY).

Tableau 2.1 Protocole d'optimisation pour l'analyse RT-PCR des ARN_m

Protéines	ARN (μ g)	Conditions							
t-PA	0.5	Temp. (°C)	50	94	94	60	72	72	4
		Temps (min.)	20	2	0.30	0.30	0.30	5	∞
			<i>40 cycles</i>						
u-PA	0.5	Temp. (°C)	50	94	94	60	72	72	4
		Temps (min.)	20	2	0.30	0.30	0.30	5	∞
			<i>40 cycles</i>						
MT1-MMP	0.5	Temp. (°C)	50	94	94	60	72	72	4
		Temps (min.)	20	2	0.30	0.30	0.30	5	∞
			<i>40 cycles</i>						
Actine	0.5	Temp. (°C)	50	94	94	50	72	72	4
		Temps (min.)	30	2	0.3	0.45	1	7	∞
			<i>40 cycles</i>						
MT2-MMP	0.5	Temp. (°C)	50	95	95	62	72	72	4
		Temps (min.)	30	2	1	1	1	10	∞
			<i>40 cycles</i>						
MT3-MMP	0.5	Temp. (°C)	50	95	95	52	72	72	4
		Temps (min.)	30	2	1	1	1	10	∞
			<i>40 cycles</i>						
MMP-3	0.5	Temp. (°C)	50	94	94	53.7	72	72	4
		Temps (min.)	30	2	1	1	1	10	∞
			<i>40 cycles</i>						

CHAPITRE III

RÉSULTATS

3.1 Le VEGF augmente l'activité fibrinolytique des cellules endothéliales dans une matrice de fibrine en trois dimensions.

Dans le but de caractériser la fibrinolyse des cellules endothéliales, nous avons utilisé un modèle de culture cellulaire en trois dimensions dans lequel les cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine (HUVEC) sont prises dans une matrice de fibrine contenant du fibrinogène marqué à l'iode radioactif (I^{125}). Ceci permet la quantification des produits de dégradation de la fibrine dans le milieu de culture. Nous avons utilisé des facteurs de croissance proangiogéniques pour induire cette fibrinolyse et étudier l'implication de la fibrinolyse par les cellules endothéliales lors de l'angiogénèse tumorale et plus précisément dans la phase de migration de ces mêmes cellules.

3.1.1 Les facteurs de croissance augmentent la fibrinolyse des cellules endothéliales dans la matrice de fibrine.

Il est reconnu que plusieurs facteurs de croissance sont impliqués à l'initiation de la réponse angiogénique tels le bFGF (basic fibroblast growth factor), le PDGF (platelet derived growth factor) et le VEGF (vascular endothelial growth factor). Ces

facteurs de croissances sont sécrétés directement par les cellules tumorales pour être reçus par les cellules endothéliales ; ce qui déclenche l'angiogénèse tumorale. Et parmi les étapes de cette angiogénèse, on retrouve la migration et la prolifération des cellules endothéliales vers la tumeur pénétrant la matrice extracellulaire constituée entre autres de fibrine (Arenberg et Strieter, 1999). Ainsi pour mieux caractériser la fibrinolyse des cellules endothéliales lors de l'angiogénèse tumorale, nous avons utilisé le modèle de fibrine en trois dimensions contenant les HUVEC que nous avons stimulées avec différents facteurs de croissances : VEGF (50 ng/ml), HGF/SF (40 ng/ml), bFGF (50ng/ml), EGF (50ng/ml), PDGF-BB (50ng/ml) et S1P (1 μ M). La figure 3.1 révèle que le VEGF a le plus grand potentiel à induire la fibrinolyse des cellules endothéliales. Le HGF/SF stimule aussi la fibrinolyse mais de façon moindre que le VEGF, soit 50% moins, suivi de l'EGF, le PDGF, le bFGF et le S1P qui n'induisent pas ou presque pas l'activité fibrinolytique.

3.1.2 L'effet du VEGF sur la fibrinolyse des HUVEC est dose dépendant.

À partir des données obtenues précédemment, nous avons caractérisé le facteur de croissance proangiogénique ayant le plus grand potentiel à stimuler la fibrinolyse, le VEGF. Des essais de fibrinolyse en trois dimensions ont été réalisés avec les HUVEC pour déterminer la concentration idéale du VEGF qui mènera la lyse totale de la matrice de fibrine. Comme le montre la figure 3.2, en utilisant des concentrations croissantes de VEGF, une activité fibrinolytique est observée à partir de 10 ng/ml de VEGF ajoutés au milieu de culture du modèle expérimental atteignant le 50% d'activité à 25 ng/ml et la saturation à partir de 50 ng/ml.

3.2 L'activité fibrinolytique des cellules endothéliales induite par le VEGF dépend de la sécrétion du t-PA, de la plasmine et implique aussi le système des métalloprotéines.

Le VEGF a été caractérisé comme un facteur de croissance angiogénique stimulateur de la prolifération, migration et différenciation des cellules endothéliales *in vitro* en activant une suite de cascades de signalisation cellulaire (Folkman et D'Amore, 1996). Nous avons procédé à des essais de fibrinolyse afin de pouvoir déterminer quelles protéines sont impliquées dans cette activité, si cela implique la synthèse de nouvelles protéines puis établir si le VEGF induit l'expression de gènes pouvant être impliqués dans la fibrinolyse.

3.2.1 L'effet du VEGF sur l'activité fibrinolytique des HUVEC est dépendant de la synthèse de nouvelles protéines.

Le VEGF induit la synthèse et l'expression d'un grand nombre de protéines impliquées dans l'angiogénèse tumorale (Senger et *al.*, 1996 ; Gerber, Dixit et Ferrara, 1998). Dans cette optique, nous avons procédé à la fibrinolyse dans le modèle en 3 dimensions en introduisant le cycloheximide qui inhibe la synthèse de nouvelles protéines. On peut voir sur la figure 3.3 que la stimulation de la fibrinolyse induite par le VEGF est complètement inhibée par la cycloheximide.

3.2.2 L'activité fibrinolytique des HUVEC induite par le VEGF dépend de la sécrétion du t-PA.

On sait que le VEGF est également connu pour sa capacité à induire l'expression de l'activateur tissulaire du plasminogène, le t-PA dans les cellules endothéliales

(Unemori *et al.*, 1992), et que le t-PA fait partie du système fibrinolytique en étant l'activateur direct de la plasmine, nous voulions savoir l'implication du t-PA dans la fibrinolyse induite par le VEGF. Pour cela, nous avons utilisé des anticorps neutralisants dirigés contre le t-PA et pour témoin un anticorps dirigé contre l'immunoglobuline. Et comme on peut le voir sur la figure 3.4, seulement l'anticorps anti t-PA a un effet sur la fibrinolyse. L'effet de l'anticorps anti t-PA est dépendant de la dose, et une baisse significative de la fibrinolyse est observée à 7.5 µg/ml d'anticorps anti t-PA après 48 heures.

3.2.3 L'activité fibrinolytique des HUVEC induite par le VEGF est inhibée par le PAI-1, le BB-94, TIMP-2, l'aprotinine et le PTK-787.

Pour étudier l'implication des protéines protéolytiques lors de la fibrinolyse des cellules endothéliales, nous avons utilisé le PAI-1 (inhibiteur de l'activateur du plasminogène de type 1) qui est l'inhibiteur physiologique du t-PA et de l'u-PA, le BB-94 qui est un inhibiteur synthétique de toutes les métalloprotéinases (MMP), TIMP-2 qui inhibe les MMP mais aussi les MT-MMP (MMP de type membranaire) de façon très efficace, l'aprotinine qui inhibe la plasmine et le PTK-787 inhibiteur synthétique du récepteur au VEGF. La figure 3.5 démontre que le PAI-1, le PTK-787, TIMP-2, l'aprotinine et le BB-94 bloquent tous la fibrinolyse induite par le VEGF, ce qui confirme nos observations précédentes en ce qui concerne l'implication du t-PA, de la plasmine et de VEGFR. Mais aussi que les membres des MMP sont aussi impliqués dans la fibrinolyse des HUVEC.

3.2.4 L'activité fibrinolytique des HUVEC induite par le VEGF est dépendante de l'activité du t-PA et par conséquent de la plasmine qui est inhibée par le PAI-1, le BB-94 et le PTK-787.

Suite aux résultats obtenus dans la section précédente, nous avons procédé à une zymographie sur caséine plasminogène qui permet de voir l'activité enzymatique du t-PA et de l'u-PA, ainsi qu'une zymographie sur fibrinogène permettant de voir l'activité de la plasmine et par conséquent voir si la génération de la plasmine est responsable de l'activité fibrinolytique du VEGF chez les HUVEC. Après 24 heures de culture cellulaire en fibrine, la zymographie a été faite sur les surnageants de la fibrinolyse. La figure 3.6-A montre la présence de la plasmine dans le milieu cellulaire après 24h de stimulation de la fibrinolyse par le VEGF. La plasmine agit donc comme effecteur final de la fibrinolyse induite par le VEGF. De plus, lorsque la fibrinolyse induite par le VEGF est inhibée par le PAI-1, le BB-94 ainsi que les MMP, la génération de la plasmine est aussi inhibée.

Le t-PA étant l'enzyme qui transforme le plasminogène en plasmine active, une zymographie sur caséine plasminogène a été effectuée. La figure 3.6-B montre que la sécrétion du t-PA par les HUVEC est modulée par les différents inhibiteurs utilisés, ce qui permet de déduire à ce stade, que la fibrinolyse dépend du VEGF et de l'activité du VEGFR; elle dépend aussi de la sécrétion du t-PA qui à son tour active la plasmine.

3.2.5 Effet du PAI-1, BB-94 et du PTK sur l'expression génique des MT1-MMP, MT2-MMP, MT3-MMP, MMP-3, de l'u-PA, du t-PA, et d'actine lors de l'activité fibrinolytique des HUVEC induite par le VEGF.

Nous avons ensuite envisagé que les modifications des niveaux de protéines observées précédemment pouvaient provenir d'une régulation de la synthèse génique de ces mêmes protéines. Tout d'abord, l'expression génique de MT1-MMP et de l'u-PA ne semble pas être affectée ni par le VEGF ni par les différents inhibiteurs utilisés (Figure 3.7). L'ARNm de MT3-MMP semble augmenter légèrement suite à l'ajout du VEGF mais n'est pas affectée par les inhibiteurs. Il semble y avoir une régulation à la baisse des MMP-3, MT2-MMP et du t-PA par les inhibiteurs, et à la hausse par le VEGF (Figure 3.7).

3.3 Effet de certains flavonoïdes sur la fibrinolyse chez les HUVEC induite par le VEGF.

Après avoir élucidé l'implication du t-PA et des MMP dans la fibrinolyse par les cellules endothéliales induite par le VEGF, l'intérêt était d'identifier, parmi plusieurs composés phytochimiques présents dans notre alimentation, des agents de chimioprévention. Plusieurs classes de flavonoïdes ont été testées sur les HUVEC en utilisant ce même modèle de fibrinolyse en 3 dimensions.

3.3.1 Effet des anthocyanidines sur la fibrinolyse chez les HUVEC induite par le VEGF.

Dans un premier temps nous avons voulu étudier l'effet des anthocyanidines sur la fibrinolyse des HUVEC. Dans cette optique, six anthocyanidines et une anthocyanine ont été testées dans un essai de fibrinolyse à une concentration unique

de 25 μM . La figure 3.8 révèle que parmi les anthocyanidines testées, la delphinidine inhibe significativement le potentiel de fibrinolyse des HUVEC, de près de 80 %. Suivent dans l'ordre, la péonidine (75 %), la malvidine (65 %), la cyanidine (60 %) et la pétunidine (50%). L'anthocyanine (la delphinidine glycosylée) quant à elle n'induit que 20% d'inhibition alors que la pélargonidine ne démontre aucune inhibition et semble induire une fibrinolyse plus forte que le témoin EtOH.

3.3.2 Effet de différentes concentrations de delphinidine sur la fibrinolyse des HUVEC induite par le VEGF.

À partir des données obtenues précédemment, nous avons caractérisé l'anthocyanidine démontrant le plus grand potentiel d'inhibition, la delphinidine. Des essais de fibrinolyse, avec des concentrations croissantes de delphinidine, ont été réalisés pour déterminer l'efficacité de celle-ci sur les propriétés fibrinolytiques des HUVEC. La figure 3.9 montre que la delphinidine a une IC_{50} de 10 μM et que l'inhibition est quasi complète à 25 μM .

3.3.3 Effet des catéchines sur la fibrinolyse chez les HUVEC induite par le VEGF.

Les vertus du thé vert en ce qui concerne l'angiogenèse sont bien connues ce qui nous a amené à tester les catéchines présentes dans le thé vert sur la fibrinolyse des HUVEC induite par le VEGF. Sept catéchines ont été testées à une concentration unique de 25 μM . La figure 3.10 révèle que parmi les catéchines testées, l'épigallocatechine-3-gallate (ECGC) inhibe significativement le potentiel de fibrinolyse des HUVEC, de près de 85 %. Suivent dans l'ordre le GCG (Gallocatechine-3-gallate) à 77%, l'ECG (Epicatechine-3-gallate) à 70%, le CG

(Catéchine gallate) à 53%, l' EGC (Epigallocatechine) à 42%, l' EC (Epicatechine) à 30% et la C (Catéchine) à 25%.

3.3.4 Effet de différents polyphénols sur la fibrinolyse chez les HUVEC induite par le VEGF.

Afin d'identifier d'autres molécules présentes dans l'alimentation pouvant inhiber la fibrinolyse des HUVEC induite par le VEGF, nous avons procédé à des essais de fibrinolyse en présence de différents polyphénols d'origine alimentaire à une concentration unique de 25 μ M. Comme le révèle la figure 3.11, certains flavonoïdes de différentes classes dont les flavanols ont été testés. Nous avons obtenu un pouvoir d'inhibition de 80% pour le kaempférol, 40% pour la quercétine et 50% pour la myricétine. Pour les flavones 95% d'inhibition a été obtenue pour l'apigénine et 90% pour la lutéoline. Aucune inhibition n'est obtenue en ce qui concerne les flavanones: la naringénine et l' hespérétine.

Pour ce qui est des acides phénoliques, 15% d'inhibition pour l'acide caféique et 20% pour l'acide gallique ont été observés. Dans le même ordre, le sylimarin inhibe la fibrinolyse des HUVEC à 15%. L'épice curcumin a aussi été testée et une inhibition de 70% a été obtenue, même chose pour l'acide ellagique.

3.3.5 L'effet inhibiteur des polyphénols sur l'activité fibrinolytique des HUVEC induite par le VEGF est dépendant du t-PA.

Suite aux résultats obtenus dans la section précédente, nous avons procédé à une zymographie sur caséine plasminogène. Cette expérience permet de voir l'effet des polyphénols ayant le plus grand pouvoir d'inhiber la fibrinolyse et l'activité enzymatique du t-PA et de l'u-PA. Après 24h de culture cellulaire en fibrine, la

zymographie a été faite sur les surnageants de la fibrinolyse. La figure 3.12 montre que les polyphénols testés diminuent la sécrétion du t-PA dans le milieu par les cellules endothéliales.

Dans le cas de quercétine et le curcumin il y a diminution de la sécrétion du t-PA mais aussi celle de l'u-PA (l'activateur de type urokinase du plasminogène).

3.3.6 L'effet inhibiteur des polyphénols sur l'activité fibrinolytique des HUVEC induite par le VEGF est dépendant de la plasmine.

Puisque la plasmine est l'effecteur final de la cascade plasminolytique, et qu'elle est activée soit par le t-PA ou par l'u-PA, nous avons procédé à une zymographie sur fibrinogène pour déterminer l'effet de certains polyphénols sur la sécrétion de la plasmine active par les HUVEC. Seulement l'effet de la delphinidine, l'EGCG, le kaempférol, l'apigénine et la lutéoline a été expérimenté considérant qu'ils ont le plus grand effet inhibiteur de la fibrinolyse. Comme le montre la figure 3.13, les cinq flavonoïdes testés à une concentration de 25 μ M empêchent complètement la sécrétion de la plasmine par les HUVEC.

3.3.7 Effet de la delphinidine, de l'EGCG et de l'apigénine sur l'expression génique de MT2-MMP, MT3-MMP, MMP-3 et d'actine lors de l'activité fibrinolytique des HUVEC induite par le VEGF

Étant donné que les polyphénols ont un effet sur la sécrétion du t-PA et de l'u-PA, il est intéressant de voir si ces mêmes polyphénols ont un effet sur l'expression génique de certaines protéines impliquées dans la cascade fibrinolytique. La figure 3.14 montre que l'apigénine a l'effet le plus marquant sur l'expression génique de MT2-MMP, MT3-MMP et de MMP-3, et ce en les régulant à la baisse. Par contre, la delphinidine et l'EGCG agissent sur l'ARNm de la MT2-MMP et MMP-3 seulement en les régulant à la baisse aussi.

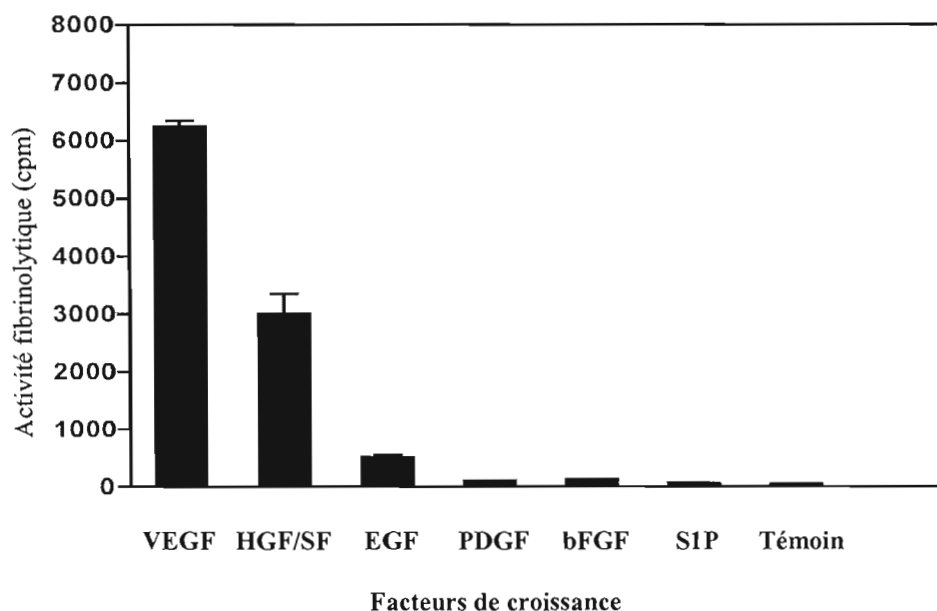


Figure 3.1 La fibrinolyse des cellules endothéliales dans la matrice de fibrine en présence de facteurs de croissance. Les HUVEC ont été ensemencées dans des plaques de 48 puits à une densité de 1.2×10^6 cellules/ml dans une matrice de fibrine marquée radioactivement à l'iode I^{125} dans le milieu EBM-2 contenant 1% FBS et stimulées avec différents facteurs de croissance : VEGF (50 ng/ml), HGF/SF (40 ng/ml), bFGF (50ng/ml), EGF (50ng/ml), PDGF-BB (50ng/ml) et S1P (1 μ M). Les cellules ont ensuite été conservées à 37 °C et 5 % CO_2 pendant 48 heures. Les produits de dégradation de la fibrine marquée au I^{125} présents dans le milieu ont été quantifiés par le compteur à scintillation- γ . Les données représentent la moyenne (\pm SEM) d'au moins trois expériences indépendantes. Après que le milieu eut été enlevé, la matrice de fibrine contenant les cellules a été fixée et colorée avec 0.1 % crystal violet/20% MeOH.

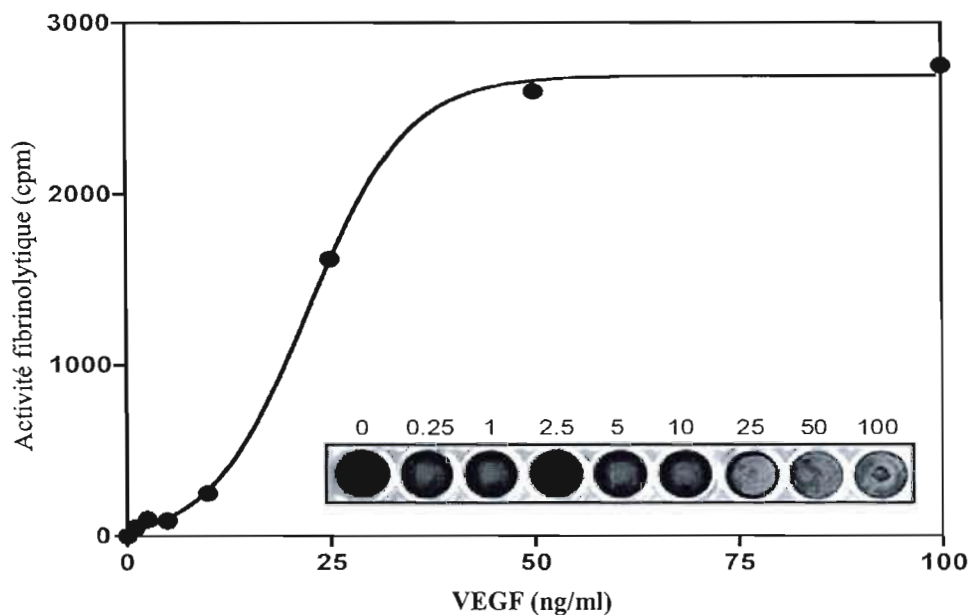


Figure 3.2 L'effet de différentes doses de VEGF sur la fibrinolyse des HUVEC. Les HUVEC ont été ensemencées dans une plaque de 48 puits à une densité de 1.2×10^6 cellules/ml dans une matrice de fibrine marquée radioactivement à l'iode I^{125} dans le milieu EBM-2 contenant 1% FBS et stimulées avec différentes concentrations du VEGF de 0 à 100 ng/ml. Les cellules ont ensuite été conservées à 37 °C et 5 % CO_2 pendant 48 heures. Les produits de dégradation de la fibrine marquée au I^{125} présents dans le milieu ont été quantifiés par le compteur à scintillation- γ . Après que le milieu eut été enlevé, la matrice de fibrine contenant les cellules a été fixée et colorée avec 0.1 % cristal violet/20% MeOH.

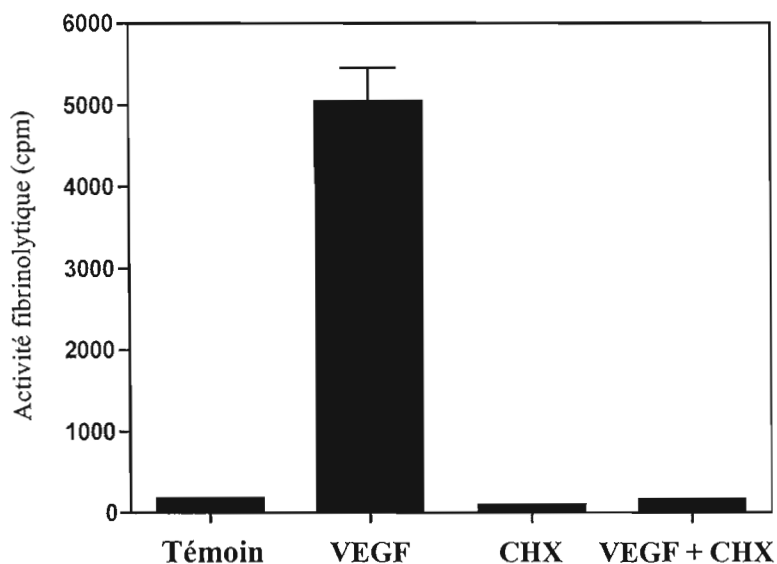


Figure 3.3 L'effet de la synthèse protéique sur la stimulation de l'activité fibrinolytique des HUVEC par le VEGF. Les puits d'une plaque de 48 puits ont été enduits avec de la fibrine marquée radioactivement à l'iode I^{125} contenant les HUVEC à une densité de 1.2×10^6 cellules /ml dans le milieu EBM-2 contenant 1% FBS et stimulées avec 100 ng/ml de VEGF avec ou sans la présence du cycloheximide (CHX, 10 μ M). Les cellules ont ensuite été conservées à 37 °C et 5 % CO_2 pendant 65 heures (Jusqu'à lyse complète de la matrice de fibrine). Les produits de dégradation de la fibrine marquée au I^{125} présents dans le milieu ont été quantifiés par le compteur à scintillation- γ . Les données représentent la moyenne (\pm SEM) d'au moins trois expériences indépendantes.

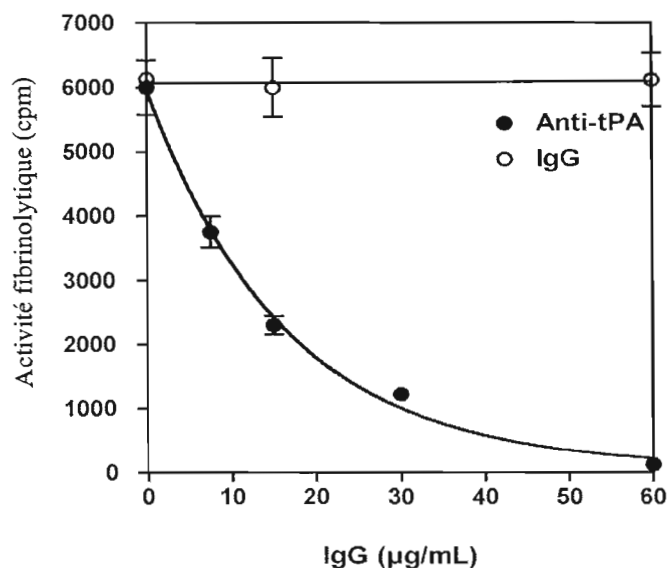


Figure 3.4 Le rôle du t-PA dans l'effet du VEGF sur l'activité fibrinolytique des HUVEC. Les puits d'une plaque de 48 puits ont été enduits avec de la fibrine marquée radioactivement à l'iode I^{125} contenant les HUVEC à une densité de 1.2×10^6 cellules/ml dans le milieu EBM-2 contenant 1% FBS. L'anticorps neutralisant dirigé contre l'activateur tissulaire du plasminogène (t-PA) et un autre dirigé contre l'hémoglobine de type IgG1 (Témoin) ont été ajoutés dans la matrice de fibrine ainsi que dans le milieu. Les cellules endothéliales ont ensuite été stimulées avec 100 ng/ml de VEGF. Les cellules ont ensuite été conservées à 37°C et 5 % CO_2 pendant 65 heures, jusqu'à lyse complète de la matrice de fibrine. Les produits de dégradation de la fibrine marquée au I^{125} présents dans le milieu ont été quantifiés par le compteur à scintillation- γ . Les données représentent la moyenne (\pm SEM) d'au moins trois expériences indépendantes.

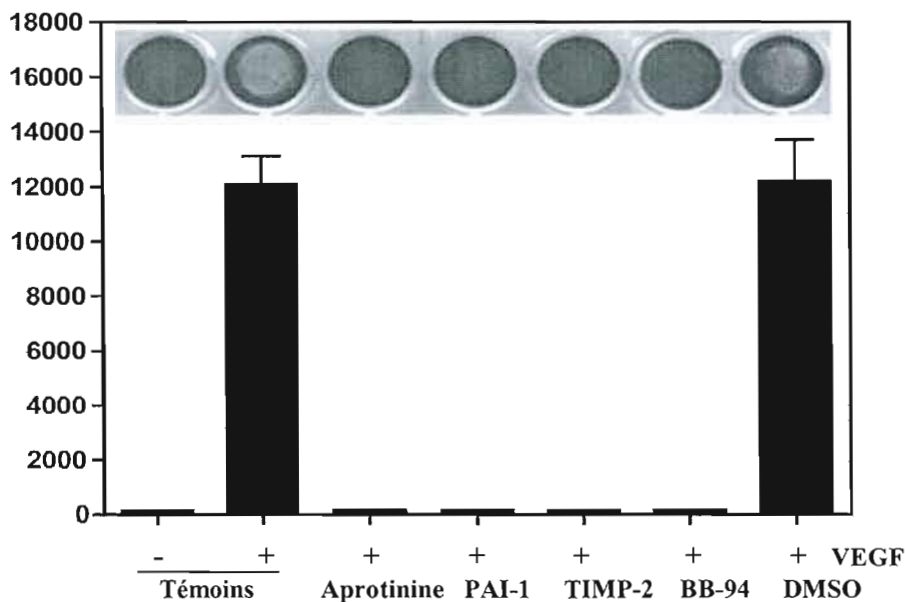


Figure 3.5 L'inhibition de l'activité fibrinolytique des HUVEC induite par le VEGF par le PAI-1, le BB-94 et le PTK-787. Les puits d'une plaque de 48 puits ont été enduits avec de la fibrine marquée radioactivement à l'iode I^{125} contenant les HUVEC à une densité de 1.2×10^6 cellules/ml dans le milieu EBM-2 en présence de 1% FBS. Les inhibiteurs des métalloprotéinases matricielles soient les BB-94 ($10 \mu\text{M}$) et TIMP-2 (100 ng/ml), l'inhibiteur de l'activateur tissulaire du plasminogène, le PAI-1 (200 nM), l'inhibiteur des protéases à sérine l'aprotinine ($200 \mu\text{g/ml}$) et l'inhibiteur du récepteur du VEGF le PTK-787 ($1 \mu\text{M}$) ont été ajoutés dans la matrice de fibrine ainsi que dans le milieu. L'effet du DMSO, véhicule du PTK-787 et du BB-94 a aussi été testé. Les cellules endothéliales ont ensuite été stimulées avec 200 ng/ml de VEGF. Les cellules ont ensuite été conservées à 37°C et $5\% \text{ CO}_2$ pendant 72 heures, jusqu'à lyse complète de la matrice de fibrine. Les produits de dégradation de la fibrine marquée au I^{125} présent dans le milieu ont été quantifiés par le compteur à scintillation- γ . Après que le milieu eut été enlevé, la matrice de fibrine contenant les cellules a été fixée et colorée avec $0.1\% \text{ cristal violet}/20\% \text{ MeOH}$.

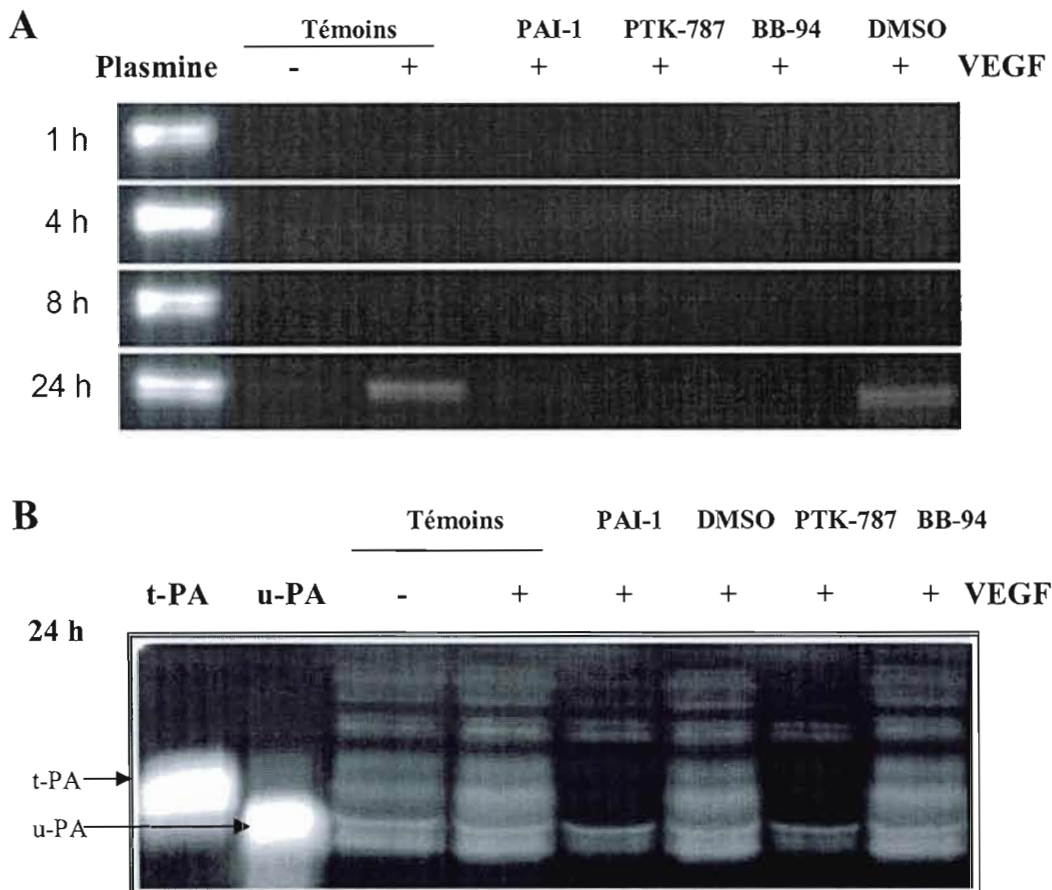


Figure 3.6 Rôle du t-PA et de la plasmine dans l'activité fibrinolytique des HUVEC induite par le VEGF. Les HUVEC ont été ensemencées dans des plaques de 48 puits à une densité de 1.2×10^6 cellules/ml dans une matrice de fibrine en présence du milieu EBM-2 contenant 1% FBS. L'inhibiteur des métalloprotéinases matricielles soit le BB-94 ($10 \mu\text{M}$), l'inhibiteur de l'activateur tissulaire du plasminogène, le PAI-1 (200 nM) et l'inhibiteur du récepteur du VEGF le PTK-787 ($1 \mu\text{M}$) ont été ajoutés dans la matrice de fibrine ainsi que dans le milieu. L'effet du DMSO, véhicule du PTK-787 et du BB-94 a aussi été testé. Les cellules endothéliales ont ensuite été stimulées avec 200 ng/ml de VEGF. Les cellules ont ensuite été conservées à 37°C et $5\% \text{ CO}_2$ pendant 1h, 4h, 8h et 24 heures. (A) Une zymographie sur fibrinogène a été réalisée afin de déterminer l'effet des différents inhibiteurs sur la génération de la plasmine. (B) Une zymographie sur caséine plasminogène a été effectuée sur les surnageants cellulaires de la fibrinolyse après 24h de stimulation avec le VEGF afin d'analyser les effets des différents inhibiteurs ajoutés sur la génération du t-PA.

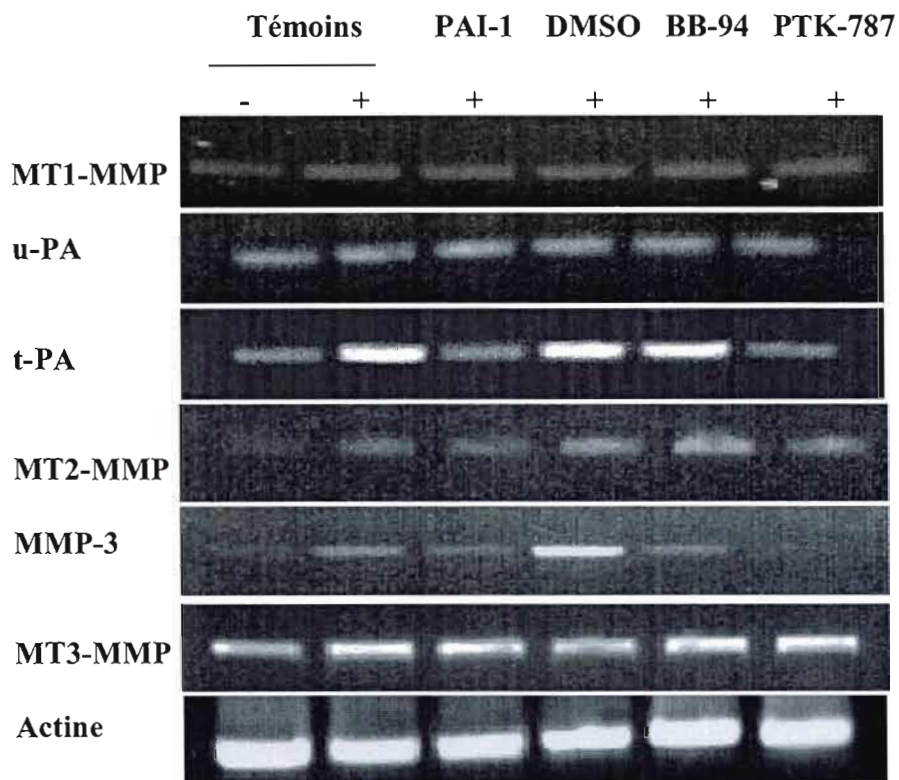


Figure 3.7 Effets du PAI-1, BB-94 et du PTK sur l'expression génique de MT1-MMP, de MT2-MMP, MT3-MMP, MMP-3, d'u-PA, du t-PA, et d'actine lors de l'activité fibrinolytique des HUVEC induite par le VEGF.

Les HUVEC ont étéensemencées dans des plaques de 12 puits à une densité de 1.2×10^6 cellules/ml dans une matrice de fibrine en présence du milieu EBM-2 contenant 1% FBS. L'inhibiteur des métalloprotéinases matricielles soit le BB-94 (10 μ M), l'inhibiteur de l'activateur tissulaire du plasminogène, le PAI-1 (200 nM) et l'inhibiteur du récepteur du VEGF le PTK-787 (1 μ M) ont été ajoutés dans la matrice de fibrine ainsi que dans le milieu. L'effet du DMSO, véhicule du PTK-787 et du BB-94 a aussi été testé. Les cellules ont été conservées à 37 °C et 5 % CO₂ pendant 18h et ensuite stimulées au VEGF pendant 4h. L'ARN total a été extrait des HUVEC. Les ARNm du MT1-MMP, MT2-MMP, u-PA, t-PA, MMP-3, MT3-MMP et actine (500 ng) ont été amplifiés par RT-PCR à l'aide d'amorces spécifiques. Les produits d'amplification ont été résolus sur gel d'agarose 1 % contenant 1 μ g/ml de bromure d'éthidium.

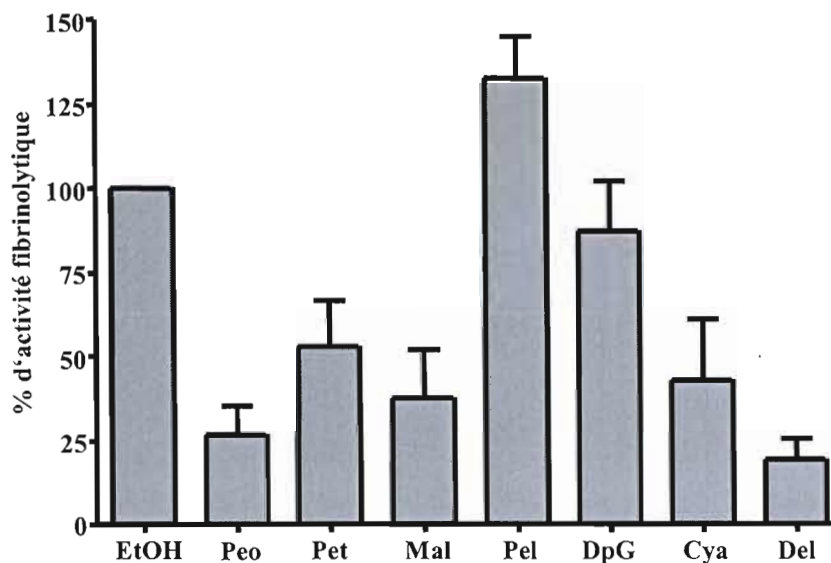


Figure 3.8 Effets des anthocyanidines sur la fibrinolyse chez les HUVEC induite par le VEGF. Les HUVEC ont été ensemencées dans des plaques de 48 puits à une densité de 1.2×10^6 cellules/ml dans une matrice de fibrine marquée à l'iode I^{125} en présence du milieu EBM-2 contenant 1% FBS. Un prétraitement d'une heure a été réalisé en présence de 25 μ M des différentes anthocyanidines à 37 °C et 5 % CO_2 . Les cellules endothéliales ont ensuite été stimulées avec 100 ng/ml de VEGF conservées à 37 °C et 5 % CO_2 pendant 72 heures (lyse complète de la matrice de fibrine). Les produits de dégradation de la fibrine marquée au I^{125} présents dans le milieu ont été quantifiés par le compteur à scintillation- γ . Les données représentent la moyenne (\pm SEM) du pourcentage de l'activité fibrinolytique des HUVEC par rapport au véhicule des anthocyanidines l'EtOH qui représente le 100% d'activité et ce pour au moins trois expériences indépendantes. Peo : Péonidine; Mal : Malvidine; DpG : Delphinidine-3-O-Glucoside; Pel : Pélargonidine; Pet : Pétunidine; Cya : Cyanidine; Del : Delphinidine.

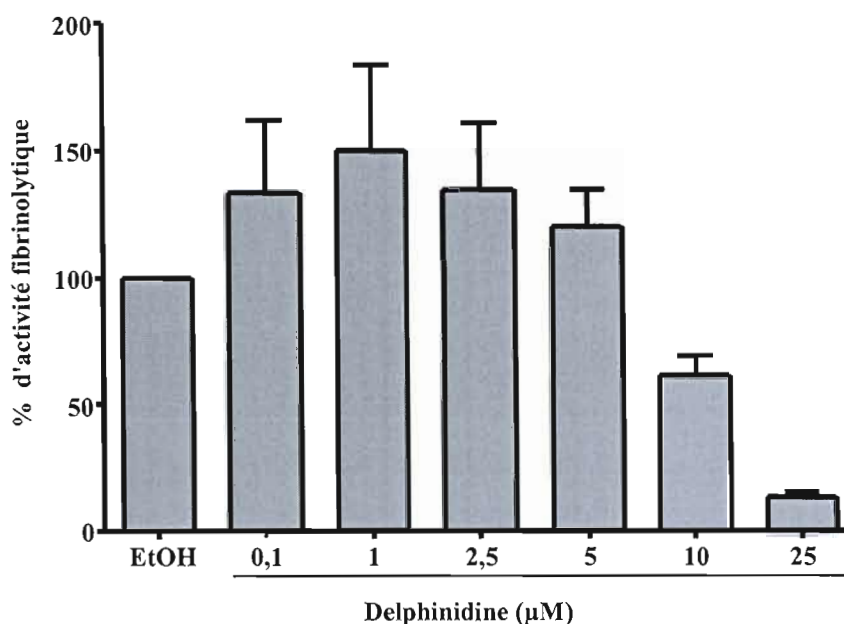


Figure 3.9 Effet de différentes concentrations de delphinidine sur la fibrinolyse des HUVEC induite par le VEGF. Les HUVEC ont été ensemencées dans des plaques de 48 puits à une densité de 1.2×10^6 cellules/ml dans une matrice de fibrine marquée à l'iode I^{125} en présence du milieu EBM-2 contenant 1% FBS. Un prétraitement d'une heure a été réalisé en présence de différentes concentrations de la delphinidine (0 à 25 μ M) à 37 °C et 5 % CO_2 . Les cellules endothéliales ont ensuite été stimulées avec 100 ng/ml de VEGF conservées à 37 °C et 5 % CO_2 pendant 72 heures, jusqu'à la lyse complète de la matrice de fibrine. Les produits de dégradation de la fibrine marquée au I^{125} présents dans le milieu ont été quantifiés par le compteur à scintillation- γ . Les données représentent la moyenne (\pm SEM) du pourcentage de l'activité fibrinolytique des HUVEC par rapport au véhicule des anthocyanidines l'EtOH qui représente le 100% d'activité et ce pour au moins trois expériences indépendantes.

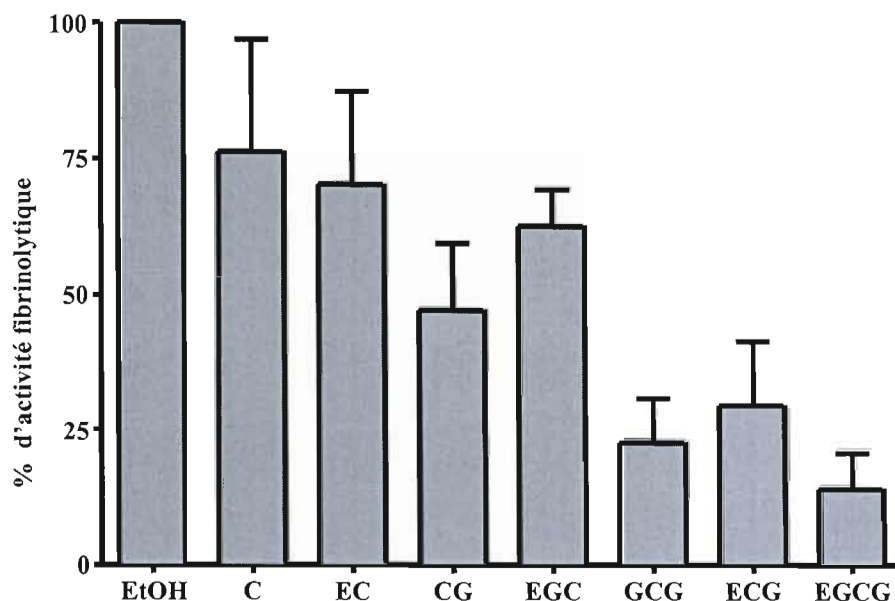


Figure 3.10 Effet des catéchines sur la fibrinolyse chez les HUVEC induite par le VEGF. Les HUVEC ont étéensemencées dans des plaques de 48 puits à une densité de 1.2×10^6 cellules/ml dans une matrice de fibrine marquée à l'iode I^{125} en présence du milieu EBM-2 contenant 1% FBS. Un prétraitement d'une heure a été réalisé en présence de 25 μ M des différents anthocyanidines à 37 °C et 5 % CO_2 . Les cellules endothéliales ont ensuite été stimulées avec 200 ng/ml de VEGF conservées à 37 °C et 5 % CO_2 pendant 72 heures, jusqu'à la lyse complète de la matrice de fibrine. Les produits de dégradation de la fibrine marquée au I^{125} présents dans le milieu ont été quantifiés par le compteur à scintillation- γ . Les données représentent la moyenne (\pm SEM) du pourcentage de l'activité fibrinolytique des HUVEC par rapport au véhicule des anthocyanidines l'EtOH qui représente le 100% d'activité et ce pour au moins trois expériences indépendantes. C: (-) Catéchine, EC: (-) Epicatéchine, CG: (-) Catéchine gallate, EGC: (-) Epigallocatechine, ECG: (-) Epicatéchine-3-gallate, GCG: (-) Gallocatechine-3-gallate, EGCG: (-) Epigallocatechine-3-gallate.

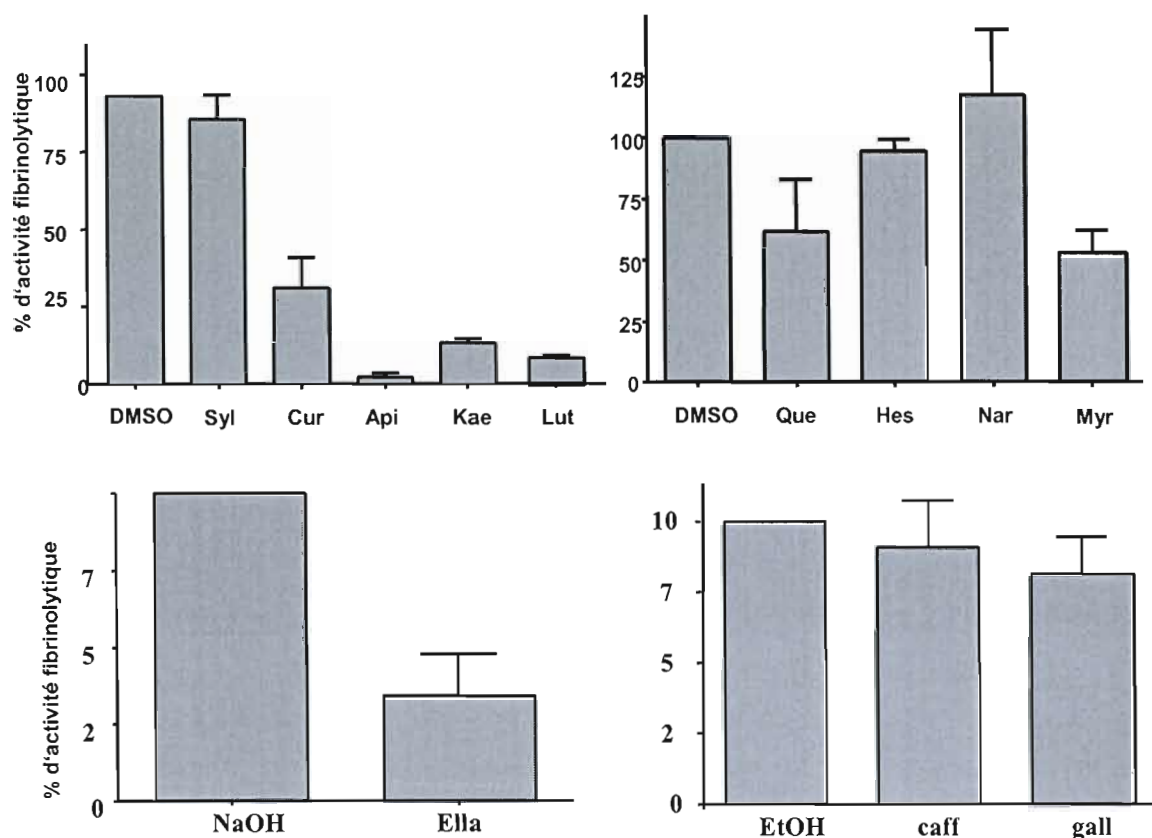


Figure 3.11 Effet de différents polyphénols sur la fibrinolyse chez les HUVEC induite par le VEGF. Les HUVEC ont été ensemencées dans des plaques de 48 puits à une densité de 1.2×10^6 cellules/ml dans une matrice de fibrine marquée à l'iode I^{125} en présence du milieu EBM-2 contenant 1% FBS. Un prétraitement d'une heure a été réalisé en présence de $25 \mu\text{M}$ des différents polyphénols à 37°C et 5 % CO_2 . Les cellules endothéliales ont ensuite été stimulées avec 100 ng/ml de VEGF conservées à 37°C et 5 % CO_2 pendant 72 heures, jusqu'à la lyse complète de la matrice de fibrine. Les produits de dégradation de la fibrine marquée au I^{125} présents dans le milieu ont été quantifiés par le compteur à scintillation- γ . Les données représentent la moyenne (\pm SEM) du pourcentage de l'activité fibrinolytique des HUVEC par rapport aux différents véhicules des flavonoïdes (DMSO, EtOH et NaOH) qui représentent le 100% d'activité et ce pour au moins deux expériences indépendantes. Syl : sylimarin, Cur : curcumin, Api : apigénine, Kae : kaempferol, Lut : lutéoline, Que : quercétine, Hes : hespérétine, Nar : naringénine, Myr : myrecitin, Ella : acide ellagique, caff : acide caféique, gall : acide gallique.

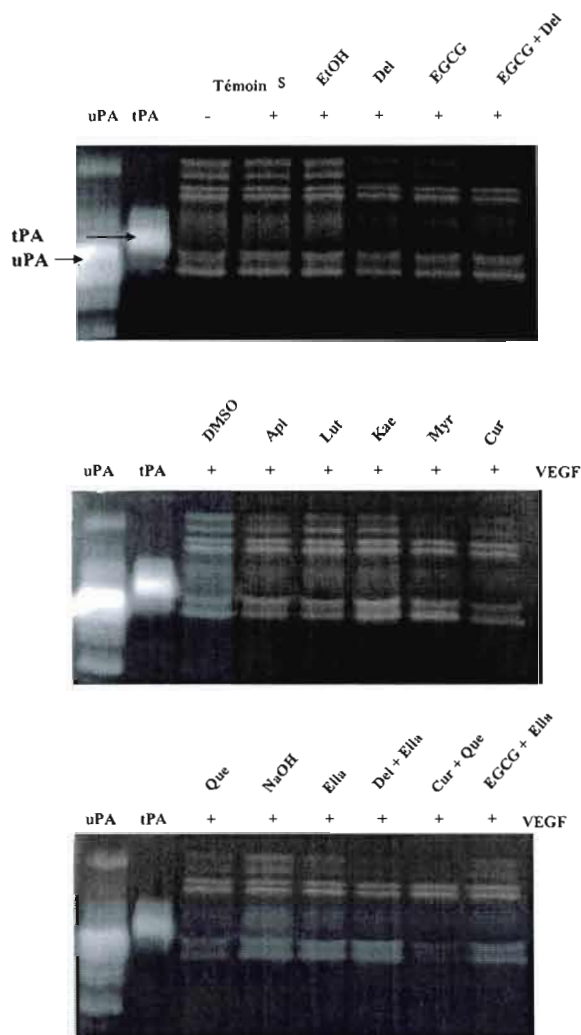


Figure 3.12 Le rôle du t-PA dans l'effet inhibiteur des polyphénols sur l'activité fibrinolytique des HUVEC induite par le VEGF. Les HUVEC ont été ensemencées dans des plaques de 48 puits à une densité de 1.2×10^6 cellules/ml dans une matrice de fibrine en présence du milieu EBM-2 contenant 1% FBS. Les différents flavonoides ont été ajoutés dans le milieu pour une concentration finale de $25 \mu\text{M}$. L'effets des différents véhicules des flavonoides (DMSO, EtOH et NaOH) a aussi été testé. Les cellules endothéliales ont ensuite été stimulées avec 200 ng/ml de VEGF. Les cellules ont ensuite été conservées à 37°C et 5 % CO_2 pendant 24 heures. Une zymographie sur caséine plasminogène a été effectuée sur les surnageants cellulaires de la fibrinolyse après 24h de stimulation au VEGF afin d'analyser la conséquence des différents polyphénols ajoutés sur la génération du t-PA. Api : apigénine, Lut : lutéoline, Kae : kaempferol, Myr : myrecitin, Ella : acide ellagique, Del : delphinidine, Cur : curcumin, Que : quercétine, EGCG : (-) Epigallocatechine-3-gallate.

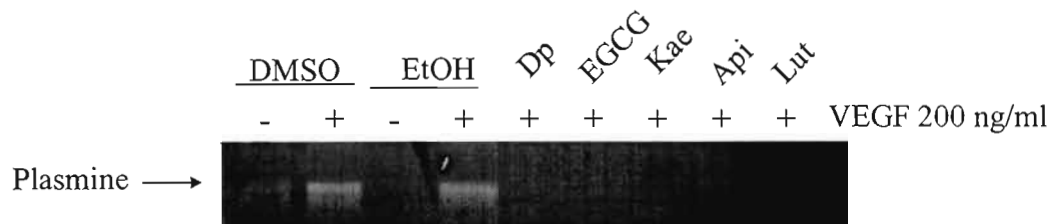


Figure 3.13 Le rôle de la plasmine dans l'effet inhibiteur des polyphénols sur l'activité fibrinolytique des HUVEC induite par le VEGF. Les HUVEC ont été ensemencées dans des plaques de 48 puits à une densité de 1.2×10^6 cellules/ml dans une matrice de fibrine en présence du milieu EBM-2 contenant 1% FBS. Les différents flavonoïdes ont été ajoutés dans le milieu pour une concentration finale de $25 \mu\text{M}$. L'effet des différents véhicules des flavonoïdes (DMSO et EtOH) a aussi été testé. Les cellules endothéliales ont ensuite été stimulées avec 200 ng/ml de VEGF. Les cellules ont été conservées à 37°C et 5 % CO_2 pendant 24 heures. Une zymographie sur fibrinogène a été réalisée pour déterminer l'effet des différents flavonoïdes ajoutés sur la génération de la plasmine. Dp : delphinidine, EGCG : (-) Epigallocatechine-3-gallate, Kae : kaempferol, Api : apigénine, Lut : lutéoline.

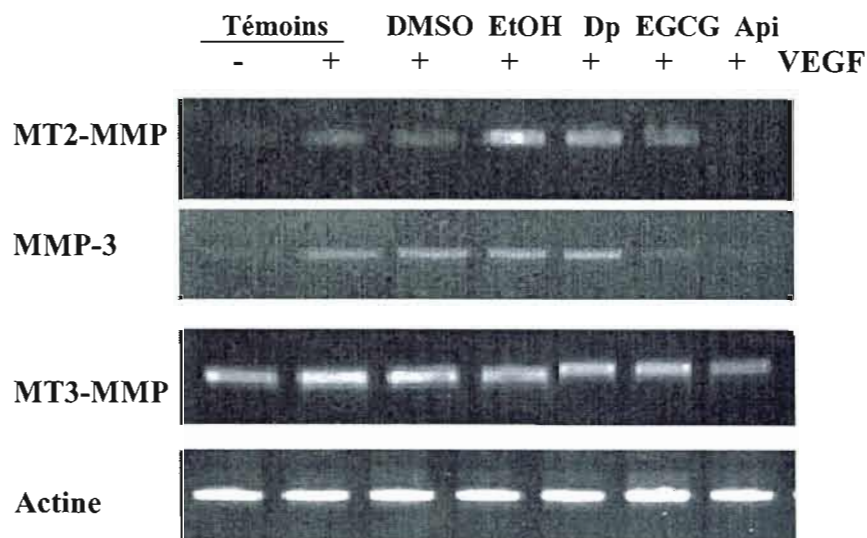


Figure 3.14 Effet de la delphinidine, de l'EGCG et de l'apigénine sur l'expression génique de MT2-MMP, MT3-MMP, MMP-3 et d'actine lors de l'activité fibrinolytique des HUVEC induite par le VEGF. Les HUVEC ont été ensemencées dans des plaques de 12 puits à une densité de 1.2×10^6 cellules/ml dans une matrice de fibrine en présence du milieu EBM-2 contenant 1% FBS. Les différents flavonoïdes ont été ajoutés dans le milieu pour une concentration finale de $25 \mu\text{M}$. L'effet des différents véhicules des flavonoïdes (DMSO et EtOH) a aussi été testé. Les cellules ont ensuite été conservées à 37°C et 5 % CO_2 pendant 18h et ensuite stimulées au VEGF pendant 4h. L'ARN total a été extrait des HUVEC. Les ARNm du MT2-MMP, MMP-3, MT3-MMP et d'actine (500 ng) ont été amplifiés par RT-PCR à l'aide d'amorces spécifiques. Les produits d'amplification ont été résolus sur gel d'agarose 1 % contenant $1 \mu\text{g/ml}$ de bromure d'éthidium.

CHAPITRE IV

DISCUSSION

Au début des années 1970 a été mise au point la première culture des cellules endothéliales en 2 dimensions (2D); depuis, des progrès dans la compréhension de la fonction des cellules endothéliales et de leurs réponses aux différents facteurs ont été réalisés (Lafleur *et al.*, 2002). Le désavantage majeur dans ce type d'études *in vitro* est que l'environnement des cellules endothéliales était très simple car, en réalité, les cellules endothéliales résident dans un environnement en 3 dimensions (3D). Par conséquent, l'attention a été portée sur la culture des cellules endothéliales ou des tissus (contenant des vaisseaux sanguins intacts) dans différents type de matrices en 3D telles que le collagène de type I, le Matrigel et la fibrine dans le but de mieux mimer le microenvironnement des cellules endothéliales *in vivo* (Lafleur *et al.*, 2002).

Le besoin de comprendre le mécanisme moléculaire qui contrôle l'angiogenèse a nécessité le développement d'un modèle de culture cellulaire en 3D qui reproduit le processus de la néovascularisation. La culture des cellules endothéliales dans une matrice de fibrine en 3D est un modèle souhaitable pour l'étude de l'angiogenèse étant donné que la fibrine est une composante commune de la matrice extracellulaire au site d'une blessure, d'une inflammation ou du stroma tumoral (Lafleur *et al.*, 2002). Le VEGF sécrété par les cellules tumorales induit une augmentation de la perméabilité vasculaire; suite à cela les protéines du plasma, telles que le

fibrinogène, se retrouvent dans l'environnement périvasculaire, qui ensuite se polymérisent en fibrine par l'action protéolytique de la thrombine pour offrir une matrice provisoire pour la migration des nouveaux vaisseaux (Lafleur *et al.*, 2002). Dans notre recherche nous avons développé un système de culture cellulaire dans une matrice de fibrine en 3D contenant du fibrinogène radioactivement marqué à l'iode ^{125}I permettant ainsi de quantifier l'activité fibrinolytique des cellules endothéliales.

Dans notre étude nous avons stimulé les HUVEC cultivées dans la matrice de fibrine en 3D avec différents facteurs de croissance afin d'identifier celui qui joue le rôle majeur dans la stimulation de la fibrinolyse lors de l'angiogenèse. Nous avons identifié le HGF/SF et le VEGF comme stimulateurs de la fibrinolyse des HUVEC. Le VEGF a montré avoir le plus grand effet de stimulation de la fibrinolyse, soit deux fois plus que l'HGF/SF. Nous avons démontré aussi que le VEGF stimule la fibrinolyse des HUVEC d'une façon dose dépendante. Lafleur et son équipe (2002) ont suivi la formation de tubules par les HUVEC, une étape importante dans l'angiogenèse, dans une matrice de fibrine en 3D. Ils ont démontré que les HUVEC pouvaient procéder à la tubulogenèse dans la matrice de fibrine sans stimulation, et la formation des tubes a été augmentée de façon significative en ajoutant les facteurs proangiogéniques, tels que le VEGF, le FGF-2 et le HGF/SF. Un effet additif a été aussi observé en co-stimulant avec le VEGF et le FGF-2. Il est à noter que dans notre modèle de fibrinolyse en 3D, une fibrinolyse entière de la matrice de fibrine est complétée après 72 heures de stimulation au VEGF, et qu'avant cela, soit 24 heures suivant la stimulation au VEGF un réseau de tubules est observé. Donc, suite à la stimulation au VEGF, les HUVEC s'organisent d'abord en un réseau de tubules et il s'ensuit une fibrinolyse.

En utilisant l'inhibiteur de la synthèse des protéines, le cycloheximide, dans notre modèle, l'activité fibrinolytique des HUVEC est inhibée.

L'activité fibrinolytique des HUVEC cultivées dans la matrice de fibrine en 3D nécessite donc la synthèse de nouvelles protéines qui est induite par le VEGF.

Lors de l'angiogenèse, où la perméabilité vasculaire joue un rôle, le VEGF a été identifié comme étant le facteur majeur de croissance stimulant. Le VEGF est un facteur angiogénique agissant par la stimulation directe de ses récepteurs (VEGFR) sur les cellules vasculaires, résultant en une augmentation de la perméabilité cellulaire et la néovascularisation *in vivo* (Folkman et D'Amore, 1996). De plus le VEGF stimule le processus clé de l'angiogenèse, telles que l'activation des cellules endothéliales, la dégradation de la matrice extracellulaire, la migration et la prolifération cellulaire. En culture cellulaire, le VEGF induit l'expression de plusieurs molécules impliquées dans plusieurs étapes de l'angiogenèse, telles que l'u-PA, le t-PA, l'u-PAR ainsi que les intégrines $\alpha_v\beta_3$ et $\alpha_v\beta_5$ (Witmer *et al.*, 2004).

Cherchant à démontrer l'implication du t-PA dans la fibrinolyse en 3D des HUVEC, nous avons constaté que l'utilisation des anticorps neutralisants dirigés contre le t-PA a bloqué complètement la fibrinolyse suggérant ainsi que le t-PA joue un rôle majeur dans la cascade de la fibrinolyse induite par le VEGF dans notre modèle cellulaire. On a aussi procédé au test de la fibrinolyse en présence des anticorps neutralisants dirigés contre l'u-PA, mais la présence de ces derniers ne permet pas aux HUVEC d'adhérer dans la matrice de fibrine ce qui démontre que l'u-PA est aussi impliqué, cependant, puisque l'anti-t-PA inhibe complètement la fibrinolyse, il est possible que la très grande majorité, sinon la totalité, du phénomène est due au t-PA.

Le système fibrinolytique contient une pro-enzyme, le plasminogène, qui est converti en sa forme active, la plasmine, par l'activateur tissulaire du plasminogène (t-PA) ou l'activateur de type urokinase du plasminogène (u-PA). L'activation de la plasmine médiée par le t-PA est principalement responsable de la dissolution de la

fibrine au site de la blessure vasculaire. L'u-PA quand à lui, doit se lier à son récepteur cellulaire spécifique l'u-PAR ce qui induit l'activation de la liaison cellulaire du plasminogène. La fibrinolyse physiologique est régulée par des interactions moléculaires spécifiques entre ses composants majeurs et par la synthèse contrôlée, souvent par les cellules endothéliales, des activateurs de plasminogène et de ses inhibiteurs. L'inhibition du système fibrinolytique peut se produire au niveau des activateurs du plasminogène, t-PA ou u-PA, par des inhibiteurs spécifiques, PAI-1 et PAI-2, ou au niveau de la plasmine, généralement par l' α_2 -antiplasmine (Irigoyen *et al.*, 1999 ; Le *et al.*, 2003 ; Bernstein *et al.*, 2004).

Des études *in vivo* montrent que l'activité du t-PA n'est pas impliquée dans la migration des cellules endothéliales, et que en contrepartie, l'u-PA est impliqué (Witmer *et al.*, 2004). Plaisier et son équipe (2004) avancent que durant les différents processus qui régulent l'angiogenèse, la génération de l'activité protéolytique est probablement due à la régulation de la migration cellulaire et la formation des tubules et que les régulateurs de la protéolyse péricellulaire et de la formation des tubules par les cellules endothéliales sont les activateurs de type urokinases (u-PA), la plasmine ainsi que les MMP.

Le rôle principal de l'u-PA apparaît être dans l'induction péricellulaire de la protéolyse via la dégradation des composants de la matrice ou via l'activation des protéinases latentes ou des facteurs de croissance (Irigoyen *et al.*, 1999). Mais le rôle du t-PA et son récepteur annexine-II dans la migration des cellules endothéliales et dans l'angiogenèse, souvent négligé, doit être réévalué. L'annexine-II, en plus du plasminogène et de la plasmine, lie le t-PA avec grande affinité [constante de dissociation (K_d) = 25 nM] et augmente l'activité catalytique du t-PA de 60 fois (Lijnen, 2002; Ling *et al.*, 2004). Des recherches (Sato, Shimada et Takaki, 1991) ont prouvé que le t-PA est indispensable à la formation des capillaires par les cellules endothéliales microvasculaires. Ces auteurs ont démontré que des anticorps neutralisant dirigés contre le t-PA et l'inhibiteur des protéases à serine, l'aprotinine,

bloquaient complètement la formation de tubules induite par l'EGF chez les cellules endothéliales humaines.

Dans une étude impliquant des souris dépourvues de PAI-1, les résultats démontrent un potentiel angiogénique énorme, qui est partiellement inhibé en ajoutant le PAI-1 au milieu de culture. Les vaisseaux déficients en t-PA démontraient un échec d'angiogenèse complet, tandis que la déficience en u-PA a démontré une diminution de bourgeonnement de vaisseaux (Lijnen *et al.*, 1998). Le même échec est observé dans les vaisseaux déficients en plasminogène. Ce qui suggère dans cette étude d'angiogenèse en *ex-vivo* dans une matrice en 3D de collagène I et Matrigel, que le plasminogène et le t-PA sont indispensables pour l'angiogenèse *ex vivo*. L'activité de la plasmine est indispensable aux cellules endothéliales pour l'invasion de la matrice extracellulaire et pour l'angiogenèse. Une chose surprenante, les vaisseaux dépourvus de plasminogène, ont retrouvé leur capacité d'angiogenèse lorsqu' on leur rajoute du t-PA et de l'u-PA. (Lijnen *et al.*, 1998)

Ces observations sur des souris avec inactivation des gènes des principaux composants du système fibrinolytique ont confirmé l'implication du système plasminolytique dans ce processus, mais suggèrent aussi l'implication d'autres systèmes, notamment celui des MMP (Lijnen, 2002). Par conséquent, nous avons procédé à des études d'inhibiteurs dans le but de comprendre le phénomène moléculaire responsable de l'activité fibrinolytique des HUVEC dans la matrice de fibrine. Nous avons procédé à l'essai de la fibrinolyse en présence de différents inhibiteurs des molécules susceptibles à être impliquées dans la fibrinolyse. Tout d'abord le PAI-1, inhibiteur naturel du t-PA et de l'u-PA, a été ajouté à notre modèle et comme attendu, la fibrinolyse est inhibée lorsque le t-PA ou l'u-PA sont inhibés. En ajoutant un inhibiteur synthétique du récepteur du VEGF, le PTK-787, la fibrinolyse est complètement bloquée. Ce résultat démontre que la l'activation du t-PA et du plasminogène dépend de l'effet stimulateur du VEGF et que leur liaison à la

surface cellulaire ne suffit pas à leur activation. En effet, une proche analogie entre le rôle de la surface cellulaire et celle de la fibrine dans l'activation du plasminogène a été reconnue. Plusieurs types cellulaires lient les activateurs du plasminogène et le plasminogène, résultant dans l'activation du plasminogène et la protection de l'inhibition de la plasmine liée par l' α_2 -antiplasmine. La liaison du plasminogène aux HUVEC a été reportée avec une constante de dissociation de 310 nM avec approximativement 10^6 sites de liaison par cellules. La liaison du t-PA aux HUVEC a été démontrée étant spécifique, saturable et réversible. Et cette liaison protège le t-PA de son inactivation par le PAI-1 (Lijnen, 2002).

L'aprotinine qui bloque l'activité de la plasmine a, comme prévu, inhibé la fibrinolyse. Afin de savoir si l'interaction des MMP peut affecter la fibrinolyse cellulaire, nous avons étudié l'effet de BB-94, un inhibiteur synthétique de toutes les MMP et de TIMP-2 qui est un inhibiteur physiologique des MMP et des métalloprotéinases de type membranaires (MT-MMP), une inhibition totale de la fibrinolyse est obtenue. L'activité des MMP et des MT-MMP est régulée par l'activation des pro-enzymes et par leurs inhibiteurs spécifiques, les TIMP et les α -macroglobulines. La famille des TIMP est constituée de 4 membres, qui diffèrent par leur profil d'expression, de régulation et de leur habilité d'interagir spécifiquement avec les pro-MMP (Woessner, 2001). Sachant que le TIMP-2, contrairement au TIMP-1, est un excellent inhibiteur des MT-MMP et aussi des MMP-2 et -9, et que la fibrinolyse est inhibée en ajoutant du TIMP-2, cela suggère que certaines MT-MMP sont aussi impliquées dans la fibrinolyse. Il a été suggéré que MT-MMP pourrait jouer un rôle dans l'angiogenèse, en addition aux gélatinases MMP-2 et -9 (Galvez et al., 2001; Lafleur et al., 2002; Collen et al., 2003). La MT1-MMP contribue à l'angiogenèse par sa capacité de dégrader la matrice extracellulaire, donc en augmentant la migration cellulaire, l'invasion et possiblement la biodisponibilité des facteurs de croissance. De plus, la MT1-MMP active la pro-MMP-2 (via TIMP-2), la

pro-MMP-13, et les intégrines $\alpha v \beta_3$, des intégrines importantes dans l'angiogénèse. (Deryugina *et al.*, 2000; Sounni *et al.*, 2002; Zhou *et al.*, 2000 ; Galvez *et al.*, 2001).

La fibrinolyse des HUVEC induite par le VEGF implique donc le système plasminolytique et le système des MMP qui comportent aussi des métalloprotéinases matricielles de type membranaire. Il a été rapporté que les cellules endothéliales ont besoin de protéases actives pour l'hydrolyse de la matrice extracellulaire. Les protéases qui sont activées dans les cellules endothéliales *in vitro* par le VEGF incluent les membres du système plasminolytique, et plusieurs métalloprotéinases matricielles (Witmer *et al.*, 2004)

Nous avons ensuite procédé à des études de zymographie sur caséine-plasminogène nous permettant d'observer l'activité catalytique du t-PA et de l'uPA, et de zymographie sur fibrinogène qui permet de voir l'activité de la plasmine. Nos résultats démontrent que l'effecteur final de la fibrinolyse est la plasmine dont la sécrétion par les HUVEC dépend du VEGF. La sécrétion du t-PA dépend aussi du VEGF contrairement à l'u-PA qui semble être moins affecté par l'effet du VEGF. Le PAI-1, le BB-94 et le PTK-787 inhibent la sécrétion de la plasmine induite par le VEGF. Le PTK inhibe donc le VEGFR, bloquant ainsi toutes cascades de signalisation induites par le VEGF et bloque de ce fait les protéines impliquées dans la fibrinolyse, le t-PA et la plasmine. Le PAI-1 inhibe complètement la sécrétion du t-PA et, par conséquent, celle de la plasmine. Il inhibe aussi la sécrétion de l'u-PA mais de façon moindre que celle du t-PA. Le BB-94 qui bloque l'activité fibrinolytique des HUVEC n'a pas d'effet sur le t-PA ni sur l'u-PA mais comme mentionné précédemment, il bloque la sécrétion ou l'activation de la plasmine.

Les MMP sont classés selon leur spécificité de substrat. Les MMP sont généralement secrétées sous leur forme zymogène qui sont activés extracellulairement par plusieurs protéinases. *In vitro*, la plasmine active directement la proMMP-1, proMMP-3, proMMP-9, proMMP10 et la proMMP-13. La proMMP-2

peut être hydrolysée par l'u-PA (Lijnen, 2002; Baramova *et al.*, 1997). Donc, la plasmine joue un rôle important *in vivo* dans l'activation des pro-MMP, ce qui peut expliquer les résultats obtenus dans notre recherche qui suggère effectivement que la plasmine une fois activée peut activer des MMP qui participeront à leur tour à la fibrinolyse puisque celle-ci est bloquée si les MMP sont inhibées. Par contre, on aurait du observer une fibrinolyse même en présence de BB-94 ou de TIMP-2, car ces deux derniers n'agissent ni sur le t-PA ni sur l'u-PA. Mais le BB-94 bloque la sécrétion de la plasmine ce qui implique les MMP dans le mécanisme de l'activation ou de la sécrétion de la plasmine. Il a été rapporté que les deux mécanismes peuvent coexister *in vivo*, et la composition locale de la matrice extracellulaire, combiné avec le profil d'expression des activateurs du plasminogène et ceux des MMP détermineraient quel mécanisme serait dominant (Lijnen, 2002). Brodsky et son équipe (2001) démontrent une différence dans le mécanisme moléculaire angiogénique lors de la réparation des vaisseaux (modèle avec matrice de fibrine) et celui au site de déposition du collagène interstitiel (modèle avec matrice au collagène et Matrigel).

Pour approfondir nos conclusions nous avons procédé à l'étude de l'expression des gènes du système plasminolytique et de celui des métalloprotéinases. Tout d'abord l'expression du gène du t-PA par les HUVEC est VEGF dépendant, tandis que le VEGF n'affecte pas l'expression du gène de l'u-PA. L'expression des gènes de la MT2-MMP et de MMP-3 est induite par le VEGF et de façon moindre celle de la MT3-MMP, tandis que l'expression de la MT1-MMP ne semble pas être affectée par le VEGF. Les inhibiteurs utilisés, le PTK-787, BB-94 et le PAI-1 ne semblent pas affecter l'expression de MT1-MMP, MT2-MMP, MT3-MMP et de l'uPA. Par contre le PTK-787 et le PAI-1 ramènent le niveau d'expression du t-PA par les HUVEC à son niveau basal. Le BB-94 n'agit pas sur l'expression génique du t-PA. En ce qui concerne l'expression génique de la MMP-3, celle-ci est bloquée complètement par le PTK-787 et diminuée par le BB-94 le PAI-1. Des études démontrent que la MMP-3 a

un rôle potentiel dans la régulation de la fibrinolyse cellulaire en affectant la liaison et l'activation du plasminogène, et que la MMP-3 interagit avec les inhibiteurs du système fibrinolytique en hydrolysant l' α_2 -antiplasmine et le PAI-1. L'effet de la MMP-3, MMP-7, la MMP-9 ou la MMP-12 sur l'activité fibrinolytique cellulaire a aussi été étudié dans les cellules musculaires lisses et les fibroblastes dérivés des cellules de souris spécifiquement inactivées pour ces gènes (Lijnen, 2002).

Il est à noter que d'autres études d'expression des gènes dans ce modèle de fibrinolyse sont nécessaires notamment celles de plusieurs MMP, mentionnées plus haut, qui sont connues pour être impliquées dans la fibrinolyse par les cellules endothéliales ou simplement impliquées dans le remodelage des vaisseaux sanguins lors de l'angiogenèse induite par le VEGF. L'étude de Plaisier et son équipe (2004) démontre que l'u-PA et les MMP contribuent à l'invasion cellulaire et à la formation des tubules par les cellules endothéliales dans une matrice 3D de fibrine-collagène. Ces dernières expriment MMP-1, MMP-2, MT1-MMP, MT3-MMP et MT4-MMP. Les données suggèrent que la MT3-MMP est impliquée dans la régulation de la formation des tubules dans la matrice de fibrine-collagène en 3D par ces cellules car elle est inhibée par des anticorps anti-MT3-MMP *in vitro*. (Plaisier *et al.*, 2004). Une étude similaire montre que le BB-94 inhibait la formation de ces tubes de 70%-80%. Simultanément, l'inhibition de la plasmine et des MMP par l'aprotinine et le BB-94 a causé une inhibition presque complète de la formation des tubules (Collen *et al.*, 2003).

Dans l'étude de Prager et son équipe (2004), il a été aussi montré que l'activation des pro-u-PA est inhibée par l'inhibiteur des MMP-2 et 9, le ((2R)-2-[(4-biphenylsulfonyl)amino]-3-phenylpropionic acid). Ni l'inhibiteur de la plasmine, l'aprotinine, ni l'inhibiteur des urokinases, le benzamidine, ont eu un effet sur l'activation du pro-uPA, indiquant que le VEGF induit l'activation de pro-uPA d'une façon dépendante de MMP-2 et 9. Aussi il a été montré que l'inhibiteur des MMP-2 et 9 inhibe non seulement l'activation de pro-uPA induite par le VEGF mais aussi la

fibrinolyse. Par des études d'immunobuvardage et zymographie sur gélatine, il a été prouvé que la MMP-2 est responsable de l'activation des pro-uPA induites par le VEGF dans les cellules endothéliales (Prager *et al.*, 2004). Ceci démontre un lien existant entre le système plasminolytique et les MMP où certaines MMP induisent une activation d'une protéine du système plasminolytique, ce qui peut expliquer l'inhibition complète de la fibrinolyse lorsque les MMP sont inhibées. Suite à nos résultats on peut proposer un modèle où les MMP avec le système plasminogène/plasmine, seraient impliquées dans la dégradation extracellulaire des composants de la matrice extracellulaire nécessaire à la migration cellulaire et au remodelage tissulaire, qui jouent des rôles importants dans les processus physiologiques et pathologiques (Figure 4.1)

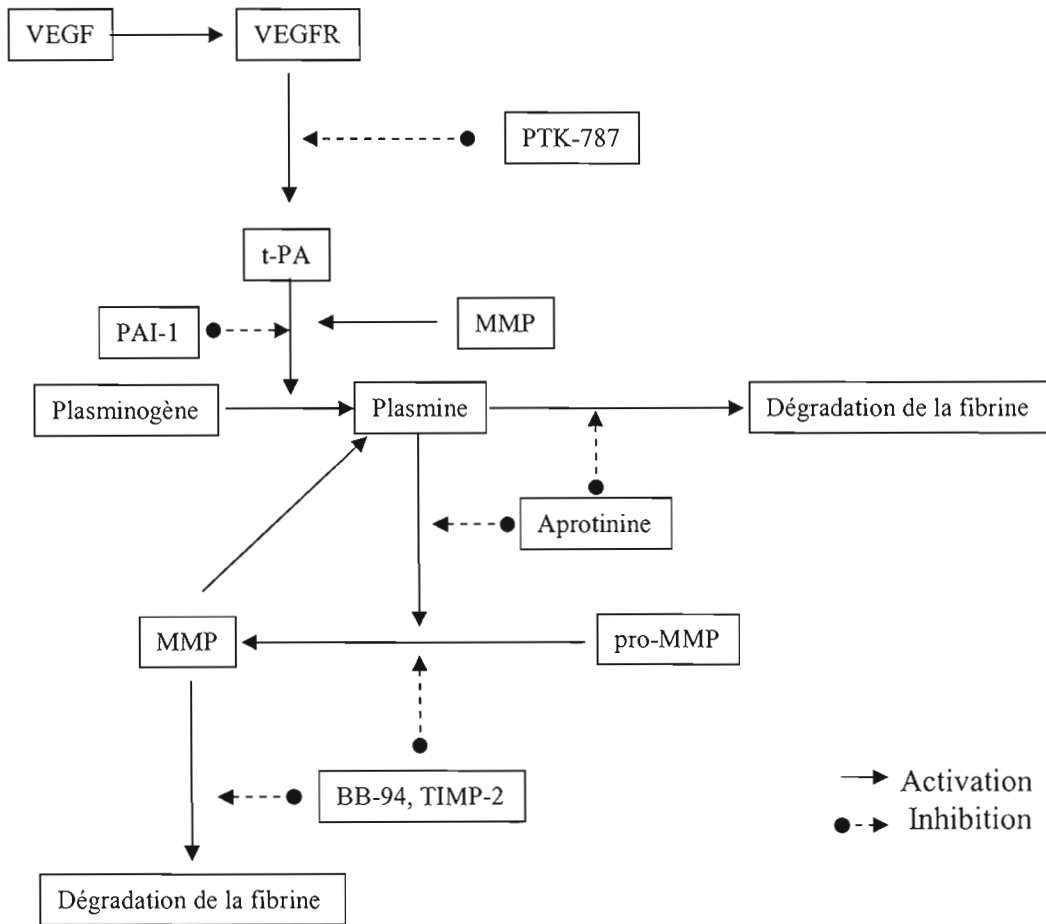


Figure 4.1 Représentation de l'interaction potentielle entre le système fibrinolytique (plasminogène/plasmine) et le système des MMP

Il est confirmé que la consommation de fruits et de légumes procure un effet protecteur et bénéfique sur l'incidence du cancer. En effet, la consommation d'au moins cinq portions de fruits et de légumes par jour réduirait de 50 % les risques de développer un cancer (Bogenrieder et Herlyn, 2003). Cet effet protecteur est attribué en partie aux agents antioxydants présents dans ces aliments et principalement aux vitamines. Toutefois, la composition des aliments est bien plus complexe et renferme des milliers d'éléments phytochimiques qui agissent directement sur des protéines impliquées dans la carcinogenèse. Il est maintenant reconnu que plusieurs de ces composés présentent des propriétés chimiopréventives (Surh, 2003). Des résultats publiés démontrent l'efficacité de ces composés dans la modulation du développement tumoral. En effet, il a été démontré que l'EGCG, une catéchine du thé vert, bloque l'angiogenèse en inhibant les récepteurs au VEGF, ainsi que la formation des structures de type capillaire par les cellules endothéliales (Lamy, Gingras et Béliveau, 2002). Il inhibe aussi la sécrétion de pro-MMP-2, l'activité de MMP-2 et -9, tout en agissant sur la MT1-MMP (Demeule *et al.*, 2000 ; Annabi *et al.*, 2002). De plus, l'EGCG modifie les propriétés d'adhérence des médulloblastomes sur le collagène, inhibant ainsi la migration cellulaire (Pilorget *et al.*, 2003). L'EGCG est aussi relié aux mécanismes de résistance multidrogue induite par la P-gp (Jodoin, Demeule et Béliveau, 2002). Des études sur d'autres composés, tels que ceux extraits du brocoli (sulforaphane) démontrent la capacité de ceux-ci à induire spécifiquement l'apoptose des médulloblastomes (Gingras *et al.*, 2004). De plus, l'acide ellagique, un composé phénolique présent dans la framboise, inhibe la phosphorylation du VEGFR-2 et de PDGFR (*Platelet Derived Growth Factor Receptor*) induite respectivement par leur ligand (Labrecque *et al.*, 2005).

Parmi la grande famille des composés phénoliques, nos recherches nous ont dirigé tout d'abord vers les formes aglycones des anthocyanines, les anthocyanidines. Ces flavonoïdes sont des composés phytochimiques bioactifs largement répandus dans notre alimentation. Ils furent étudiés principalement pour leur effet protecteur sur le

système vasculaire (Abou-Agag *et al.*, 2001). Toutefois, des études ont rapporté que ces composés possèdent des propriétés chimiopréventives, en inhibant l'angiogenèse, la migration des cellules endothéliales, la prolifération et en induisant l'apoptose des cellules tumorales (Agarwal, Singh et Agarwal, 2002 ; Martin *et al.*, 2002 ; Favot *et al.*, 2003 ; Hou *et al.*, 2004). Par contre, il n'existe pas d'étude sur la capacité de ces composés à inhiber la fibrinolyse induite par le VEGF sur les cellules endothéliales dans une matrice de fibrine en 3D.

Nos résultats ont démontré l'efficacité des anthocyanidines à réduire la fibrinolyse des HUVEC et cela, sans aucune toxicité. Comme c'est le cas dans plusieurs études antérieures (Nagase *et al.*, 1998 ; Hou *et al.*, 2004), la delphinidine est aussi l'anthocyanidine la plus active. Ce qui est fort intéressant, c'est que l'action inhibitrice des anthocyanidines semble être fonction de leur structure, nécessitant la présence des groupements OH, en orientation *ortho*, sur l'anneau-B phénolique des anthocyanidines (voir fig. 4.2).

Des études antérieures ont démontré que cette relation structure-fonction est importante dans l'induction de l'apoptose et dans l'inhibition des mécanismes de transformation cellulaire. En effet, ces études révèlent que la delphinidine est aussi l'agent le plus actif, suivie dans l'ordre par la cyanidine, la petunidine et la pelargonidine (Hou *et al.*, 2003 ; Hou *et al.*, 2004). Toutefois, l'explication permettant de comprendre le mécanisme régissant cette relation reste peu connue. De plus, des études sur l'activité des cyclooxygénases démontrent que cette relation structure-fonction n'est pas appliquée et qu'elle n'est donc pas universelle (Seeram, Zhang et Nair, 2003).

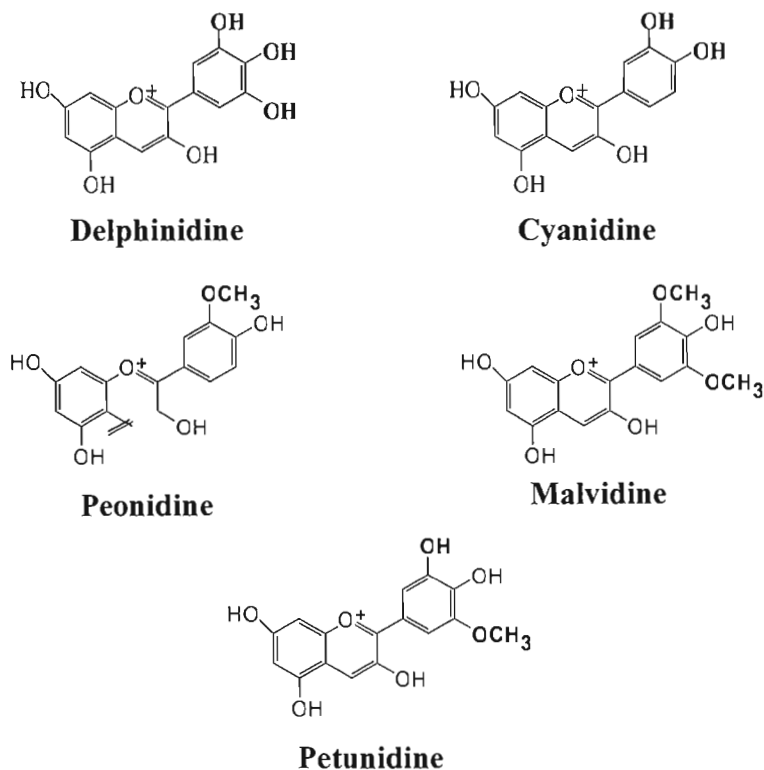


FIGURE 4.2 Structure moléculaire des anthocyanidines impliquées dans la relation structure-fonction.

Nos études ont démontré que la delphinidine réduit de moitié la fibrinolyse des HUVEC, à une concentration d'environ $10 \mu\text{M}$. Ces valeurs correspondent aux données obtenues pour les anthocyanidines dans diverses études où des effets étaient observés à des concentrations variant de $5 \mu\text{M}$ à $100 \mu\text{M}$ (Martin *et al.*, 2002 ; Hou *et al.*, 2003 ; Hou *et al.*, 2004). Dans les études sur les mécanismes de migration et d'invasion cellulaire, les concentrations nécessaires pour obtenir 50 % d'inhibition de l'invasion ont été évaluées à approximativement $10 \mu\text{M}$ sur la lignée cellulaire HT-

1080 (fibrosarcomes) (Nagase *et al.*, 1998). Lamy et ses collaborateurs (2005) ont aussi démontré que la delphinidine, à de basses concentrations, inhibe *in vitro* la phosphorylation du VEGFR-2 induite par le VEGF menant à l'inhibition de la cascade de signalisation induite par le VEGFR-2 chez les cellules endothéliales et la différenciation de ces cellules en un réseau de tubules capillaires sur des matrices de Matrigel et de fibrine.

Nos résultats démontrent, par les études de zymographie sur caséine-plasminogène que la delphinidine inhibe la sécrétion du t-PA et qu'elle n'a pas d'effet sur la sécrétion de l'u-PA indiquant que son effet inhibiteur se traduit principalement sur son effet sur le t-PA. Il en est ainsi pour tout les polyphénols testés et qui présentaient un effet inhibiteur de la fibrinolyse

Nous nous sommes ensuite intéressés aux catéchines du thé vert car le potentiel chimiopréventif du cancer par ces polyphénols a reçu une attention considérable au cours de ces dernières années. Ses propriétés anticancéreuses semblent être le résultat de plusieurs réponses biologiques dont l'inhibition de l'angiogenèse. Nos résultats montrent une inhibition de la fibrinolyse par toutes les catéchines testées, mais un effet plus marqué est observé par les catéchines ayant un groupement gallate : l'epicatéchine-3-gallate (ECG), gallocatéchine-3-gallate (GCG) et epigallocatéchine-3-gallate (EGCG), ce dernier ayant le plus fort potentiel d'inhibition. Des études antérieures montrent que l'EGCG supprime la production du collagène de type-I à 50µM par les cellules hépatiques de souris (HSC) d'une façon plus accrue que l'ECG à la même concentration. L'EGC quand à lui ne montre aucun effet sur la production du collagène de type I à 50 µM. L'effet de l'EGCG a aussi été testé sur des cellules de sarcome de Kaposi (KS) et sur les cellules endothéliales. Les résultats obtenus démontrent que l'EGCG inhibe la croissance des cellules KS et celle des cellules endothéliales. *In vivo*, l'EGCG inhibe chez les souris l'angiogenèse et arrête la croissance du sarcome de Kaposi (Fassina *et al.*, 2004).

L'effet des catéchines sur la fibrinolyse induite par le VEGF n'est pas encore documenté, ni l'implication de la structure dans l'effet inhibiteur de ces catéchines. Il est important de souligner que la liaison ester dans ces structures a été reportée comme étant cruciale pour leur action inhibitrice dans l'activité chymotrypsine des protéasomes (Lamy, Gingras et Béliveau, 2002). Il est reconnu que les catéchines qui comprennent un groupement gallate inhibent l'absorption intestinale du cholestérol, et que les catéchines ayant le groupement gallate montrent une plus grande activité que les catéchines sans groupement gallate notamment dans l'inhibition de la prolifération des cellules cancéreuses du poumon (Nam, Smith et Dou, 2001). En étudiant la relation entre la structure et l'inhibition de l'acide gras synthase (FAS) par les catéchines, l'équipe de Wang (2003) démontre que les catéchines sans groupement gallate ne montrent pas d'inhibition comparativement à celles ayant un groupement gallate. Par analyse de l'énergie de l'orbitale atomique, il a été suggéré que la distribution de la charge positive sur l'atome de carbone de la liaison ester du groupement gallate, le rend propice à une attaque nucléophile et donc augmente l'interaction entre les catéchines et leurs effecteurs (Wang *et al.*, 2003).

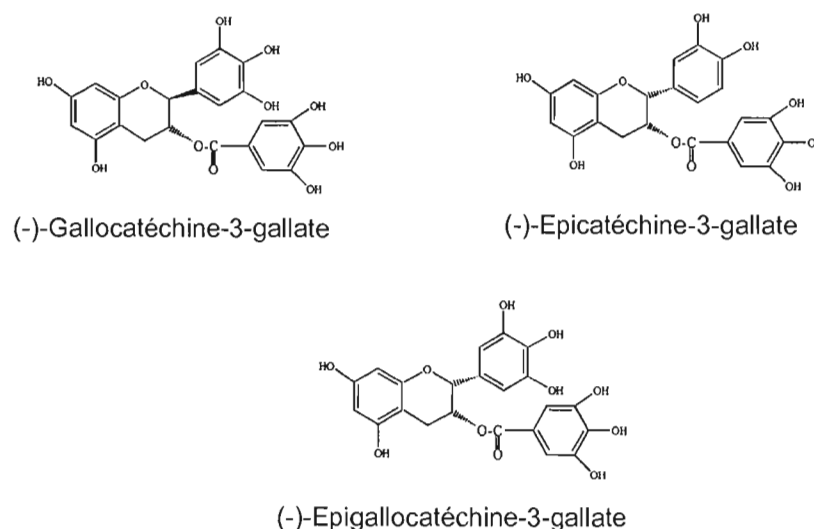


Figure 4.3 Structure moléculaire des catéchines impliquées dans la relation structure-fonction.

D'autres polyphénols ont attiré notre attention, parmi ceux testés, quelques uns ont un potentiel inhibiteur de la fibrinolyse. Nous avons testé certains flavonoïdes de différentes classes dont les flavanols pour lesquels un pouvoir d'inhibition de 80% pour le kaempférol, 40% pour la quercétine et 50% pour la myricétine a été obtenue. Pour les flavones, 95% d'inhibition pour l'apigénine et 90% pour la lutéoline a été obtenue. Aucune inhibition n'est obtenue en ce qui concerne les flavanones : la naringénine et l'hésperétine. L'effet antiangiogénique de ces molécules concorde bien avec les résultats trouvés par plusieurs études précédentes. Il a été reporté que l'apigénine et le kaempférol inhibent l'expression des gènes du TNF- α et de IL-1 β dans les macrophages (Kowalski *et al.*, 2005). Aussi la quercétine et le kaempférol ont été reconnues pour leur pouvoir de diminuer l'expression de la Pgp, une glycoprotéine membranaire du plasma qui est responsable de la résistance aux médicaments lors du traitement du cancer, et ce d'une façon dose-dépendante dans les cellules humaines du carcinome cérébrale (Limtrakul, Khantamal et Pintha, 2005).

L'apigénine inhibe l'angiogenèse lors d'un cancer du poumon en inhibant l'expression du HIF-1alpha (*hypoxia-inducible factor 1alpha*) et du VEGF (Fang *et al.*, 2005 ; Liu *et al.*, 2005). Aussi l'apigénine présente un effet inhibiteur sur l'invasion des cellules tumorales *in vitro* suggérant qu'elle peut exercer un effet anticancéreux *in vivo* via l'inhibition de la pénétration des cellules tumorales dans les tissus sains (Czyz *et al.*, 2005).

La lutéoline a été reportée pour induire l'apoptose des cellules cancéreuses en activant les caspases-8, -10, -9 et -3. Elle et la quercétine inhibent de façon significative la prolifération des cellules cancéreuses avec une IC₅₀ de 19 et 21 μ M respectivement (Horinaka *et al.*, 2005). La lutéoline et la quercétine diminuent le taux de phosphorylation des protéines cellulaires des cellules épithéliales du carcinome humain, les A431, incluant l'EGFR (Huang *et al.*, 1999).

L'effet inhibiteur de ces flavonoïdes semble aussi être en relation avec les groupements OH présents sur l'anneau C et B. Une analyse de la relation entre la structure chimique et l'effet inhibiteur de 8 flavonoïdes (Voire figure 4.4) révèle que la double liaison entre les C2 et C3 de l'anneau C et les groupements OH sur les C3' et C4' de l'anneau B sont critiques pour leurs activités biologiques (Huang *et al.*, 1999). Une étude sur le rapport structure fonction a été menée avec 4 flavonols : myricétine, quercétine, kaempférol et la galangine, tous ayant différents groupements OH, sur leur potentiel antiangiogénique chez les HUVEC. Ces flavonols inhibent la formation des structures capillaires des HUVEC induites par le VEGF de 47 % pour la myricétine, 37% pour la quercétine, 15% pour le kaempférol et 14 % pour la galangine. Cette inhibition n'est pas associé au nombre des OH (Kim *et al.*, 2005).

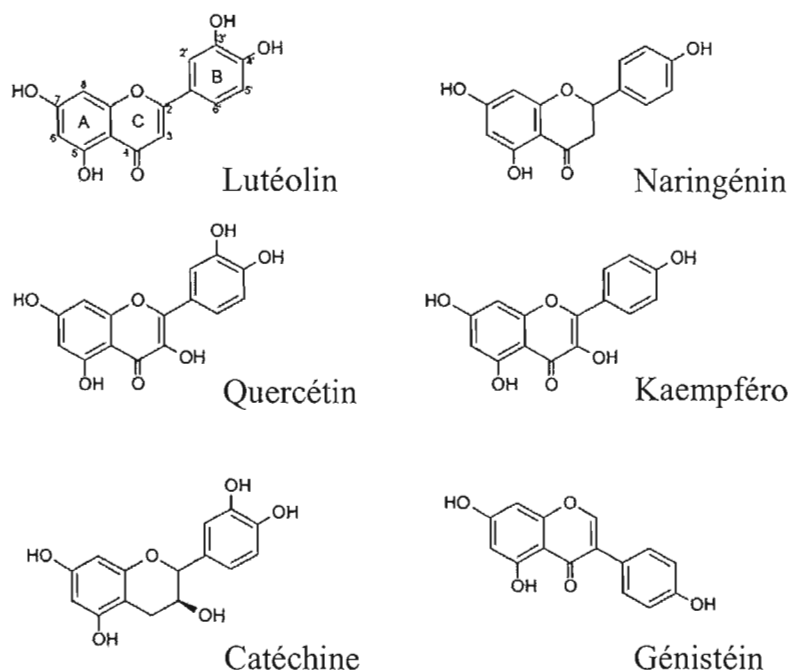


Figure 4.4 La structure chimique des flavonoïdes (Huang *et al.*, 1999)

Pour l'acide ellagique, nous avons obtenu une inhibition de 50% de la fibrinolyse en 3D des cellules endothéliales à une concentration de 25 μ M. Ses effets antiangiogéniques ont déjà été démontrés. En effet, l'acide ellagique inhibe, d'une manière dose dépendante, la formation des structures capillaires, la prolifération des HUVEC, et montre une forte activité antiproliférative contre les cellules du cancer du colon, du sein et de la prostate. L'acide ellagique induit aussi l'apoptose de plusieurs lignées de cellules cancéreuses sans avoir un effet toxique sur la viabilité des cellules humaines normales (Losso *et al.*, 2003).

La curcumine, présente dans le curcumin, est un agent anti-inflammatoire utilisé dans la médecine traditionnelle et a été reconnue pour supprimer la transformation cellulaire, la prolifération, l'invasion, l'angiogenèse et les métastases (Aggarwal *et al.*, 2005). Plusieurs gènes qui sont responsable de ces mécanismes sont régulés par le facteur nucléaire-kappaB (NF-kappaB). Il a été reconnu que la curcumine peut supprimer l'activation de NF-kappaB induite par une variété d'agents (Aggarwal *et al.*, 2005). Elle diminue aussi la croissance et induit l'apoptose des cellules pancréatiques humaines et démontre des propriétés antiangiogéniques *in vivo* (Li, Braiteh et Kurzrock, 2005). Dans notre étude, nous démontrons que le curcumin inhibe la fibrinolyse de 70% chez les HUVEC induite par le VEGF, effet inhibiteur qui peut s'ajouter aux propriétés énumérées ci-dessus. Le mécanisme de cet effet n'est pas encore élucidé mais peut se refléter par l'effet de la curcumine sur le NF-kappaB.

Dans l'étude de zymographie sur caséine une diminution de la sécrétion du t-PA de l'u-PA est observée lorsque les cellules sont traitées avec le curcumin et la quercétine. En contradiction avec nos résultats, une étude montre que les HUVEC traitées avec certains polyphénols : catéchines, epicatéchine et la quercétine augmentent la sécrétion du t-PA et de l'u-PA (2-3 fois) et l'expression de leur ARNm respectif (3-5 fois) concordant avec l'augmentation de l'activité fibrinolytique localisée en surface (Abou-Agag *et al.*, 2001). Une autre étude rapporte le même

phénomène concernant une augmentation de la sécrétion du t-PA par les HUVEC lorsque traitées avec la quercétine (Zhao *et al.*, 1999).

Il est évident que notre étude rapporte un effet inhibiteur de la fibrinolyse chez les HUVEC par certains flavonoïdes et ce, en agissant sur la sécrétion du t-PA principalement mais aussi sur celle de l'u-PA. Les contradictions entre notre étude et celles réalisées précédemment démontrent l'implication du modèle 3D et son importance à mimer la réalité de l'environnement microvasculaire. Aussi, l'effet des flavonoïdes sur les protéines du système plasminolytique n'a pas encore été étudié en utilisant un modèle tel que celui utilisé dans notre étude.

On a ensuite sélectionné certains flavonoïdes ayant un fort potentiel inhibiteur de la fibrinolyse chez les HUVEC pour faire l'étude de zymographie sur fibrinogène : delphinidine, apigénine, EGCG, kaempférol et lutéoline, et pour l'étude de l'expression génique : la delphinidine, l'EGCG et l'apigénine. Nos résultats illustrent que les flavonoïdes qui diminuent la sécrétion du t-PA bloquent complètement celle de la plasmine. En revanche, la delphinidine n'a aucun effet sur l'expression génique de MT2-MMP, MT3-MMP et MMP-3. L'EGCG qui inhibe complètement la fibrinolyse à 25 μ M induit une baisse du taux d'ARNm de MT2-MMP et de MMP-3. En ce qui concerne l'apigénine, nos résultats montrent qu'elle a le plus d'effet sur l'expression génique et ce, en réduisant considérablement le taux d'ARNm de la MT2-MMP, de la MT3-MMP et celle de la MMP-3, les ramenant à un niveau basal en contrant leur activation induite par le VEGF. Il est à noter que l'étude de l'expression génique des autres MMP, ainsi que celle du t-PA et de l'u-PA est nécessaire pour pouvoir compléter l'étude. En effet, plusieurs études rapportent l'effet de certains flavonoïdes sur différentes MMP. Il avait été suggéré que les anthocyanidines inhibaient l'activité de MMP-2 et MMP-9, des métalloprotéinases impliquées dans la dégradation matricielle (Nagase *et al.*, 1998). L'EGCG inhibe aussi l'activité des collagénases MMP-1 d'une façon dose-dépendante (Nakamuta *et*

al., 2005), il inhibe l'activité gélatinolytique de plusieurs MMP produites par les cellules endothéliales et la formation des tubules capillaires *in vitro* (Fassina *et al.*, 2004) L'apigénine qui montre le plus fort pouvoir d'inhiber la fibrinolyse dans notre modèle, a été reconnue pour avoir un effet sur les cellules tumorales du sein (MDA-MB231). Effectivement, l'étude montre que l'apigénine inhibe l'invasion des cellules tumorales sur le Matrigel, la migration cellulaire et la prolifération cellulaire. Aussi le traitement avec 22,8 μ M d'apigénine résulte en une baisse de l'expression de l'u-PA et la sécrétion de la MMP-9 (Lindenmeyer *et al.*, 2001).

L'analyse de l'effet des autres flavonoïdes sur l'expression génique n'a pas été effectuée mais des études antérieures ont déjà montré leur implication au niveau moléculaire et génique dans l'angiogenèse. La quercétine qui inhibe la fibrinolyse des HUVEC induite par le VEGF représente un agent antiangiogénique par son pouvoir de réduire l'expression et l'activité de la MMP-2 (Tan *et al.*, 2003). Aussi, la sécrétion des MMP-9 et -2 induite par l'EGF chez les cellules A431 est diminuée par l'ajout de la quercétine et de la lutéoline (Huang *et al.*, 1999). Il a été reconnu que l'induction de l'apoptose par l'acide ellagique s'accompagne par une diminution des taux des proMMP-2 et -9 (Losso *et al.*, 2003). Woo et son équipe (2005) montrent que le curcumin inhibe d'une façon significative l'activité enzymatique de la MMP-9 mais aussi réduit son expression génique via la diminution de l'activité de NF-kappaB. Donc, en plus de son action sur le t-PA et l'u-PA, le curcumin peut inhiber la fibrinolyse par son action sur les MMP.

À la lueur de toutes ces études, on peut déduire que plusieurs flavonoïdes ont un effet sur l'expression, la sécrétion ou l'activité des MMP. En se basant sur les résultats de notre étude et notre déduction sur l'implication des deux systèmes, plasminolytique et celui des MMP et le lien existant entre les deux dans la fibrinolyse induite par le VEGF, on peut suggérer que l'effet inhibiteur des flavonoïdes testés ici

peut se traduire par leurs effets sur certaines MMP (MT1-MMP, MT2-MMP, et MMP-3), et ce en plus de leur effet évident sur le t-PA, l'u-PA et la plasmine.

CHAPITRE V

CONCLUSIONS

Au cours de nos travaux, nous avons démontré que le VEGF induit la fibrinolyse chez les HUVEC cultivées dans une matrice de fibrine en 3D et ce, en stimulant la sécrétion de la plasmine, dernier effecteur de la cascade induite par le VEGF. La plasmine va dégrader la fibrine en produits de dégradation solubles. Comme les BB-94 et TIMP-2 bloquent la fibrinolyse, les MMP sont donc aussi impliquées.

Les résultats de la zymographie sur caséine-plasminogène démontrent une baisse de sécrétion du t-PA lorsqu'on ajoute le PAI-1 et le PTK-787 mais non lorsqu'on rajoute le BB-94, inhibiteur des MMP. Par contre le BB-94 bloque la sécrétion de la plasmine ce qui implique les MMP dans le mécanisme de l'activation ou de la sécrétion de la plasmine. Donc, la fibrinolyse est bloquée par des inhibiteurs du t-PA/u-PA mais aussi par les inhibiteurs des MMP. Le VEGF induit donc la fibrinolyse en activant la cascade impliquant le système plasminolytique et celui des MMP. L'activation se fait au niveau moléculaire et génique. Le VEGF induit l'expression des gènes du t-PA, de la MT2-MMP et de la MMP-3. L'induction de ces gènes, et plus particulièrement celle de la MMP-3, est bloquée en ajoutant certains inhibiteurs tels que le PAI-1, le BB-94 et le PTK-787.

Nous pouvons conclure que l'activation des MMP est aussi nécessaire pour l'activation du système plasminolytique. À la lueur de nos résultats, on peut déduire qu'il s'agit d'un concept à 2 voies qui semblent être interdépendantes, une contrôlée par les activateurs du plasminogène, et l'autre par les MMP. Ainsi les 2 classes de protéases modulent la fibrinolyse des cellules endothéliales par différents mécanismes.

On s'est ensuite intéressé aux polyphénols et leurs effets sur la fibrinolyse chez les HUVEC en utilisant notre modèle cellulaire. De façon générale, les flavonoïdes ont un effet inhibiteur sur la fibrinolyse par les HUVEC induite par le VEGF et cette inhibition est complète en ce qui concerne la delphinidine, l'EGCG, l'apigénine, la lutéoline, et le kaempférol. Cette inhibition se traduit par l'action sur la sécrétion du t-PA principalement, mais touche aussi la sécrétion de l'u-PA pour certains polyphénols. Due à l'implication des MMP dans la fibrinolyse des HUVEC, on peut aussi supposer que ces polyphénols peuvent agir sur les MMP. On peut aussi déduire qu'il y a une relation structure-fonction et ce d'après des études précédentes et selon la structure chimique de ces flavonoïdes.

CHAPITRE VI

PERSPECTIVES

Nous avons démontré que la synthèse génique et les niveaux protéiques du t-PA et de certaines MMP est augmentée par le VEGF et diminuée par les différents inhibiteurs du système plasminolytique et des MMP. Cette régulation négative et aussi observée en présence de l'apigénine, la delphinidine et l'EGCG. Toutefois, nous devons démontrer que cette baisse génique des MMP correspond aussi à une diminution de la sécrétion ou de l'activation de ces protéines.

De plus, pour compléter nos travaux, il est essentiel de faire une étude sur l'expression génique de plusieurs MMP et d'élucider celles qui sont induites et impliquées dans la fibrinolyse des HUVEC. Cette étude devra se faire afin d'éclaircir les effets inhibiteurs des différents flavonoïdes, et ce au niveau génique.

Nous envisageons aussi de tester conjointement ces polyphénols pour établir des synergies possibles, permettant par exemple, de réduire les doses lors des traitements de chimiothérapie, ce qui pourrait avoir un impact dans le traitement des tumeurs.

RÉFÉRENCES

- Abou-Agag, L.H., Aikens, M.L., Tabengwa, E.M., Benza, R.L., Shows, S.R., Grenett, H.E., and Booyse, F.M. 2001. « Polyphenolics increase t-PA and u-PA gene transcription in cultured human endothelial cells ». *Alcoholism: Clinical & Experimental Research*. vol. 25, p. 155-162.
- Agarwal, C., Singh, R., and Agarwal, R. 2002. « Grape seed extract induced apoptotic death of human prostate carcinoma DU145 cells via caspases activation accompanied by dissipation of mitochondrial membrane potential and cytochrome c release ». *Carcinogenesis*. vol. 23, p. 1869-1876.
- Aggarwal, S., Ichikawa, H., Takada, Y., Sandur, S.K., Shishodia, S. and Aggarwal, B.B. 2005. « Curcumin (Diferuloylmethane) Downregulates Expression of Cell Proliferation, Antiapoptotic and Metastatic Gene Products Through Suppression of I{kappa}B{alpha} Kinase and AKT Activation ». *Mol. Pharmacol.* vol. 69, p. 195-206.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Watson, J.D. 1994. *Molecular Biology of the cell*. Edition Garland.
- Alessi, M.C., Peiretti, F., Morange, P., Henry, M., Nalbone, G. and Juhan-Vague, I. 1997. « Production of plasminogen activator inhibitor 1 by human adipose tissue : possible link between visceral fat accumulation and vascular disease ». *Diabetes*. vol. 46, p. 860-867.
- Andreasen, P.A., Egulund, R., and Petersen, H.H. 2000. « The plasminogen activation system in tumor growth, invasion, and metastasis ». *Cellular and Molecular Life Sciences*. vol. 57, p. 25-40.
- Annabi, B., Lachambre, M.-P., Bousquet-Gagnon, N., Pagé, M., Gingras, D., and Béliveau, R. 2002. « Green tea polyphenol (-)-epigallocatechin 3-gallate inhibits MMP-2 secretion MT1-MMP-driven migration in glioblastoma cells ». *Biochimica et Biophysica Acta*. vol. 1542, p. 209-220.
- Appella, E., Robinson, E.A., Ullrich, S.J., Stoppeli, M.P., Corti, A., Cassani, G. and Blasi, F. 1987. « The receptor-binding sequence of urokinas. Abiological function for the growth-factor module of protease ». *J. Biol. Chem.*, vol. 262 p. 4437-4440.

- Araujo, C.C. and Leon, L.L. 2001. « Biological activities of *Curcuma longa* L ». *Mem. Inst. Oswalson. Cruz.* vol. 96, p. 723-728.
- Arenberg, D.A., and R.M. Strieter. 1999. « Angiogenesis ». Dans: *Inflammation basic principles and clinical correlates*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia. p. 851-864.
- Arora, A., Byrem, T.M., Nair, M.G., and Strasburg, G.M. 2000. « Modulation of liposomal membrane fluidity by flavonoids and isoflavonoids ». *Archives of Biochemistry and Biophysics*. vol. 373, p. 102-109.
- Baramova, E.N., Bajou, K., Remacle, A., L'Hoir, C., Krell, H.W., Weidle, U.H., Noel, A., and Foidart, J.M. 1997. « Involvement of PA/plasmin system in the processing of pro-MMP-9 and in the second step of pro-MMP-2 activation ». *FEBS Letters*. vol. 405, p. 157-162.
- Bass, R. and Ellis, V. 1997. « Cellular mechanism regulating non-haemostatic plasmin generation ». *Biochemical Society Transactions*. vol. 30, p. 189-194.
- Bernstein, A.M., Greenberg, R.S., Taliana, L., and Masur, S.K. 2004. « Urokinase anchors uPAR to the actin cytoskeleton ». *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. vol. 45, p. 2967-2977.
- Bogenrieder, T., and Herlyn, M. 2003. « Axis of evil : molecular mechanisms of cancer metastasis ». *Oncogene*. vol. 22, p. 6524-6536.
- Boik, J. 2001. « Natural compounds in cancer therapy ». Minnesota.
- Brodsky, S., Chen, J., Lee, A., Akassoglou, K., Norman, J. and Goligorsky, M.S. 2001 « Plasmin-dependent and -independent effects of plasminogen activators and inhibitor-1 on ex vivo angiogenesis ». *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* vol. 281, p. 1784-1792.
- Bub, A., Watzl, B., Heeb, D., Rechkemmer, G., and Briviba, K. 2001. « Malvidin-3-glucoside bioavailability in humans after ingestion of red wine, dealcoholized red wine and red grape juice ». *European Journal of Nutrition*. vol. 40, p. 113-120.
- Cao, G., and Prior, R.L. 1999. « Anthocyanins are detected in human plasma after oral administration of elderberry extract ». *Clinical Chemistry*. vol. 45, p. 574-576.

- Cao, G., Muccitelli, H.U., Sanchez-Moreno, C., and Prior, R.L. 2001. « Anthocyanins are absorbed in glycosylated forms in elderly women: a pharmacokinetic study ». *American Journal of Clinical Nutrition*. vol. 73, p. 920-926.
- Cheng, A.L., Hsu, C.H., Lin, J.K., Hsu, M.M., Ho, Y.F., Shen, T.S., Ko, J.Y., Lin, J.T., Lin, B.R., Ming-Shiang, W., Yu, H.S., Jee, S.H., Chen, G.S., Chen, T.M., Chen, C.A., Lai, M.K., Pu, Y.S., Pan, M.H., Wang, Y.J., Tsai, C.C. and Hsieh, C.Y. 2001. « Phase I clinical trial of curcumin, a chemopreventive agent, in patients with high-risk or pre-malignant lesions ». *Anticancer Res*. Vol. 21, p. 2895-2900.
- Christofori, G., and Semb, H. 1999. « The role of the cell-adhesion molecule E-cadherin as a tumour-suppressor gene ». *Trends in Biochemical Sciences*. vol. 24, p. 73-76.
- Collen, A., Hanemaaijer, R., Lupu, F., Quax, P.H., van Lent, N., Grimbergen, J., Peters, E., Koolwijk, P. and van Hinsbergh, V.W.M. 2003. « Membrane-type matrix metalloproteinase-mediated angiogenesis in a fibrin-collagen matrix ». *Blood*. vol. 101, p. 1810–1817.
- Crozier, A., Burns, J., Aziz, A.A., Stewart, A.J., Rabiasz, H.S., Jenkins, G.I., Edwards, C.A., and Lean M.E. 2000. « Antioxidant flavonols from fruits, vegetables and beverages: measurements and bioavailability ». *Biological Research*. vol. 33 (2), p. 79-88.
- Czekay, R.-P., Aertgeerts, K., Curriden, S. A., and Loskutoff, D.J. 2003. « Plasminogen activator inhibitor-1 detaches cells from extracellular matrices by inactivating integrins ». *The Journal of Cell Biology*. vol. 160, p. 781-791.
- Czyz, J., Madeja, Z., Irmer, U., Korohoda, W. and Hulser, D.F. 2005. « Flavonoid apigenin inhibits motility and invasiveness of carcinoma cells *in vitro* ». *Int. J. Cancer*. vol. 114, p. 12-8.
- Declerck, P.J., Juhan-Vague, I., Felez, J. and Wiman, B. 1994. « Pathophysiology of fibrinolysis ». *J Int Med*. vol. 236, p. 425-432.
- DeMarini, D..M. 1998. « Dietary interventions of human carcinogenesis ». *Mutat. Res*. vol. 400, p. 457-465.
- Demeule, M., Brossard, M., Page, M., Gingras, D. and Béliveau, R. 2000. « Matrix metalloproteinase inhibition by green tea catechins ». *Biochimica and Biophysica Acta*. vol. 1478, p. 51-60.

- Denekamp, J., 1993. « Angiogenesis, neovascular proliferation and vascular pathophysiology as targets for cancer therapy». *Br. J. Radiol.* vol. 66, p. 181-196.
- Deryugina, E.I., Bourdon, M.A., Jungwirth, K., Smith, J.W. and Strongin, A.Y. 2000. «Functional activation of integrin $\alpha V\beta 3$ in tumor cells expressing membrane-type 1 matrix metalloproteinase». *Int. J. Cancer.* vol. 86, p.15–23.
- Eddy, A.A. 2002. « Plasminogen activator inhibitor-1 and the kidney ». *American Journal of Physiological Renal Physiology.* vol. 283, p. 39882-39891
- Egeblad M. and Werb Z. 2002. « New functions for matrix metalloproteinases in cancer progression ». *Nature reviews.* vol. 2, p. F209-F220.
- Fang, J., Xia, C., Cao, Z., Zheng, J.Z., Reed, E. and Jiang, B.H. 2005. « Apigenin inhibits VEGF and HIF-1 expression via PI3K/AKT/p70S6K1 and HDM2/p53 pathways ». *FASEB J.* vol. 19, p. 342-353.
- Fassina, G., Vene, R., Morini, M., Minghelli, S., Benelli, R., Noonan, D.M. and Albini, A. 2004. « Mechanisms of inhibition of tumor angiogenesis and vascular tumor growth by epigallocatechin-3-gallate». *Clin. Cancer. Res.* vol. 15, p. 4865-4873.
- Favot, L., Martin, S., Keravis, T., Andriantsitohaina, R., and Lugnier, C. 2003. « Involvement of cyclin-dependent pathway in the inhibitory effect of delphinidin on angiogenesis ». *Cardiovascular Research.* vol. 59, p. 479-487.
- Folkman, J., 1995. « Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease ». *Nat Med.* vol. 1, p. 27-31.
- Folkman, J. and D'Amore, P.A. 1996. « Blood vessel formation: what is its molecular basis ? ». *Cel,* vol. 87, p. 1153-1155.
- Folkman, J. and Hanahan, D. 1991. « Switch to the angiogenic phenotype during tumorigenesis ». *Princess Takamatsu Symposia.* vol. 22, p. 339-347.
- Forget, M.A., Desrosiers, R.R., and Béliveau, R. 1999. « Physiological roles of matrix metalloproteinases : implication for tumor growth and metastasis ». *J. Physiol. Pharmacol.* Vol. 77, p. 465-480.

- Galvez, B.G., Matias-Roman, S., Albar, J.P., Sanchez-Madrid, F. and Arroyo, A.G. 2001. « Membrane type 1-matrix metalloproteinase is activated during migration of human endothelial cells and modulates endothelial motility and matrix remodelling ». *J. Biol. Chem.* vol. 276, p. 37491–37500.
- Gellert, G.C., Goldfarb, R.H., and Kitson, R.P. 2004. « Physical association of uPAR with α_v integrin on the surface of human NK cells ». *Biochemical and Biophysical Research Communications*. vol. 315, p. 1025-1032.
- Gerber, H.P., Dixit, V. and Ferrara, N. 1998. « Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells». *J. Biol. Chem.* vol. 273, p. 13313-13316.
- Gescher, A., Pastorino, U., Plummer, S.M., and Manson, M.M. 1998. « Suppression of tumour development by substances derived from the diet : mechanisms and clinical implications ». *British Journal of Clinical Pharmacology*. vol. 45, p. 1-12.
- Gingras, D., Gendron, M., Boivin, D., Moghrabi, A., Théoret, Y., and Béliveau, R. 2004. « Induction of medulloblastoma cell apoptosis by sulforaphane, a dietary anticarcinogen from Brassica vegetables ». *Cancer Letters*. vol. 203, p. 35-43.
- Go, V.L.W., Wong, D.A., and Butrum, R. 2001. « Diet, nutrition and cancer prevention : where are we going from here? ». *The Journal of Nutrition*. vol. 131, p. 3121S-3126S.
- Greenwald, P., Clifford, C.K., and Milner, J.A. 2001. « Diet and cancer prevention ». *European Journal of Cancer*. vol. 37, p. 948-965.
- Greenwald, P. 2002. « Cancer chemoprevention ». *British Medical Journal*. vol. 324, p. 714-718.
- Hanahan, D., and Weinberg, R. A. 2000. « The hallmarks of cancer ». *Cell*. vol. 100, p. 57-70.
- Harborne, J.B., and Williams, C.A. 2000. « Advances in flavonoide research since 1992 ». *Phytochemistry*. vol. 55, p. 481-504.
- Haroon, Z.A., K.G., Peters, C.S. Greenberg, et Dewhirst. 1999. « Angiogenesis and oxygen transport in solid tumor ». *Angiogenesis agents in cancer therapy*, Humana Press Inc., Totowa: New jersey.

- Hardy, G., Hardy, I., and Ball, P.A. 2003. « Nutraceuticals - a pharmaceuticals viewpoint : part II ». *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*. vol. 6, p. 661-671.
- Hertog, M.G., Kromhout, D., Aravanis, C., Blackburn, H., Buzina, R., Fidanza, F., Giampaoli, S., Jansen, A., Menotti, A., Nedeljkovic, S., et al. 1995. « Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study ». *Arch Intern Med*. vol. 27, p. 381-386.
- Horinaka, M., Yoshida, T., Shiraishi, T., Nakata, S., Wakada, M., Nakanishi, R., Nishino, H., Matsui, H. and Sakai, T. 2005. « Luteolin induces apoptosis via death receptor 5 upregulation in human malignant tumor cells ». *Oncogene*. vol. 24, p. 7180-7189.
- Hou, D.X., Ose, T., Lin, S., Harazoro, K., Imamura, I., Kubo, M., Uto, T., Terahara, N., Yoshimoto, M., and Fujii, M. 2003. « Anthocyanidins induce apoptosis in human promyelocytic leukemia cells: structure-activity relationship and mechanisms involved ». *International Journal of Oncology*. vol. 23, p. 705-712.
- Hou, D.-X., Kai, K., Li, J.-J., Lin, S., Terahara, N., Wakamatsu, M., Fujii, M., Young, M.R., and Colburn, N. 2004. « Anthocyanidins inhibit activator protein 1 activity and cell transformation: structure-activity relationship and molecular mechanisms ». *Carcinogenesis*. vol. 25, p. 29-36.
- Huang, M.T., Newmark, H.L. and Frenkel, K. 1997. « Inhibitory effects of curcumin on tumorigenesis in mice ». *J. Cell. Biochem. Suppl*. vol. 27, p. 26-34.
- Huang, Y.T., Hwang, J.J., Lee, P.P., Ke, F.C., Huang, J.H., Huang, C.J., Kandaswami, C., Middleton, E. Jr. and Lee, M.T. 1999. « Effects of luteolin and quercetin, inhibitors of tyrosine kinase, on cell growth and metastasis-associated properties in A431 cells overexpressing epidermal growth factor receptor ». *Br. J. Pharmacol*. vol. 128, p. 999-1010.
- Irigoyen, J.P., Muñoz-Cánoves, P., Montero, L., Koziczak, M., and Nagamine, Y. 1999. « The plasminogen activator system : biology and regulation ». *Cellular and Molecular Life Sciences*. vol. 56, p. 104-132.
- Jodoin, J., Demeule, M., and Béliveau, R. 2002. « Inhibition of the multidrug resistance P-glycoprotein activity by green tea polyphenols ». *Biochimica Biophysica Acta*. vol. 1542, p. 149-159.

- Jones L, Ghaneh P, Humphreys M, Neoptolemos JP. 1999. « The matrix metalloproteinases and their inhibitors in the treatment of pancreatic cancer». *Annals of the New York Academy of Sciences*. vol. 880, p. 288-307.
- Kang, S.-Y., Seeram, N.P., Nair, M.G., and Bourquin, L.D. 2003. « Tart cherry anthocyanins inhibit tumour development in Apc^{Min} mice and reduce proliferation of human colon cancer cells ». *Cancer Letters*. vol. 194, p. 13-19.
- Katsube, N., Iwashita, K., Tsushida, T., Yamaki, K., and Kobori, M. 2003. « Induction of apoptosis in cancer cells by bilberry (*Vaccinium myrtillus*) and the anthocyanins ». *Journal of Agricultural and Food chemistry*. vol. 51, p. 68-75.
- Kelloff, G.J., Crowell, J.A., Steele, V.E., Lubet, R.A., Malone, W.A., Boone, C.W., Kopelovich, L., Hawk, E.T., Lieberman, R., Lawrence, J.A., Ali, I., Sigman, V., and Sigman, C.C. 2000. « Progress in cancer chemoprevention : development of diet-derived chemopreventive agents ». *The journal of Nutrition*. vol. 130, p. 467S-471S.
- Key, T.J., Allen, N.E., Spencer, E.A., and Travis, R.C. 2002. « The effect of diet on risk of cancer ». *The Lancet*. vol. 360, p. 861-868.
- Kim, J.D., Liu, L., Guo, W. and Meydani, M. 2005. « Chemical structure of flavonols in relation to modulation of angiogenesis and immune-endothelial cell adhesion ». *J. Nutr. Biochem*.
- Kowalski, J., Samojedny, A., Paul, M., Pietsz, G. and Wilczok, T. 2005. « Effect of apigenin, kaempferol and resveratrol on the expression of interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha genes in J774.2 macrophages ». *Pharmacol. Rep.* vol. 57, p. 390-394.
- Kruithof, E.K. 1988. « Plasminogen activator inhibitors ». *Enzyme*. vol. 40, p. 113-121
- Labrecque, L., Lamy, S., Chapus, A., Mihoubi, S., Durocher, Y., Cass, B., Borjanovski, M., Gingras, D., and Béliveau, R. 2005. « Combined inhibition of PDGF and VEGF receptors by ellagic acid, a dietary-driven phenolic compound ». *Carcinogenesis*.
- Lafleur, M.A., Handsley, M.M., Knauper, V., Murphy, G. and Edwards, D.R. 2002. « Endothelial tubulogenesis within fibrin gels specifically requires the activity of membrane-type-matrix metalloproteinases (MT-MMPs) ». *J. Cell Sci.* vol. 115, p.3427-3438.

- Lamy, S., Gingras, D., and Béliveau, R. 2002. « Green tea catechins inhibit vascular endothelial growth factor receptor phosphorylation ». *Cancer Research*. vol. 15, p. 381-385.
- Lamy, S., Blanchette, M., Michaud-Levesque, J., Lafleur, R., Durocher, Y., Moghrabi, A., Barrette, S., Gingras, D. and Beliveau R. 2005. « Delphinidin, a dietary anthocyanidin, inhibits vascular endothelial growth factor receptor-2 phosphorylation ». *Carcinogenesis*.
- Lazzè, M.C., Savio, M., Pizzala, R., Cazzalini, O., Perucca, P., Scovassi, A.I., Stivala, L.A., and Bianchi, L. 2004. « Anthocyanins induce cell cycle perturbations and apoptosis in different human cell lines ». *Carcinogenesis*. vol. 25, p. 1427-1433.
- Le, D.M., Besson, A., Fogg, D.K., Choi, K.S., Waisman, D.M., Goodyer, C.G., Rewcastle, B., and Yong, V.W. 2003. « Exploitation of astrocytes by glioma cells to facilitate invasiveness: a mechanism involving matrix metalloproteinase-2 and the urokinase-type plasminogen activator-plasmin cascade ». *The Journal of Neuroscience*. vol. 15, p. 4034-4043.
- Li, L., Braitheh, F.S. and Kurzrock, R. 2005. « Liposome-encapsulated curcumin: in vitro and in vivo effects on proliferation, apoptosis, signaling, and angiogenesis ». *Cancer*. vol. 104, p. 1322-1331.
- Lijnen, H.R. 2002. « Matrix metalloproteinases and cellular fibrinolytic activity ». *Biochemistry*. vol. 67, p. 92-98.
- Lijnen, H.R., Van Hoef, B., Lupu, F., Moons, L., Carmeliet, P. and Collen, D. 1998. « Function of the plasminogen/plasmin and matrix metalloproteinase systems after vascular injury in mice with targeted inactivation of fibrinolytic system genes ». *Arterioscler Thromb. Vasc. Biol.* vol. 18, p. 1035-1045.
- Limtrakul, P., Khantamat, O. and Pintha K. 2005. « Inhibition of P-glycoprotein function and expression by kaempferol and quercetin ». *J. Chemother.* vol. 17, p. 86-95.
- Lindenmeyer, F., Li, H., Menashi, S., Soria, C. and Lu, H. 2001. « Apigenin acts on the tumor cell invasion process and regulates protease production ». *Nutr. Cancer*. vol. 39, p. 139-147.
- Ling, Q., Jacovina, A.T., Deora, A., Febbraio, M., Simantov, R., Silverstein, R.L., Hempstead, B., Mark, W.H. and Hajjar, K.A. 2004. « Annexin II regulates

- fibrin homeostasis and neoangiogenesis in vivo ». *J. Clin. Invest.* vol. 113, p. 38-48.
- Liu, L.Z., Fang, J., Zhou, Q., Hu, X., Shi, X. and Jiang, B.H. 2005. « Apigenin inhibits expression of vascular endothelial growth factor and angiogenesis in human lung cancer cells: implication of chemoprevention of lung cancer ». *Mol. Pharmacol.* vol. 68 ,p. 635-643.
- Losso, J.N., Bansode, R.R., Trappey, A. 2nd., Bawadi, H.A. and Truax, R. 2003. « In vitro anti-proliferative activities of ellagic acid ». *J. Nutr.* vol. 133 p. 2669-2674.
- Lupu, F., Heim, D.A., Bachmann, F., Humi, M., Kaddar, V.V., Kruitof, E.K. 1995 « Plasminogen activator expression in human atherosclerotic lesions ». *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* vol. 15, p. 1444-1455.
- Martin, S., Favot, L., Matz, R., Lugnier, C., and Andriantsitohaina, R. 2002. « Delphinidin inhibits endothelial cell proliferation and cell cycle progression through a transient activation of ERK-1/-2 ». *Biochemical Pharmacology.* vol. 65, p. 669-675.
- Mustjoki, S. 2001. « Urokinase, Urokinase Receptor, and ICAMs in Human Leukemia ». Academic Dissertation. University of Helsinki, Faculty of Medicine, Department of Virology, Haartman Institute.
- Nabeshima K., Inoue T., Shimo Y., Sameshima T. 2002. « Matrix metalloproteinases in tumor invasion: Role for cell migration ». *Pathol Int*, vol. 52, p. 255-264.
- Nagase, H., Sasaki, K., Kito, H., Haga, A., and Sato, T. 1998. « Inhibitory effect of delphinidin from *Solanum melongena* on human fibrosarcoma HT-1080 invasiveness *in vitro* ». *Planta Medica.* vol. 64, p. 216-219.
- Nakamuta, M., Higashi, N., Kohjima, M., Fukushima, M., Ohta, S., Kotoh, K., Kobayashi, N. and Enjoji, M. 2005. « Epigallocatechin-3-gallate, a polyphenol component of green tea, suppresses both collagen production and collagenase activity in hepatic stellate cells ». *Int. J. Mol. Med.* vol. 16, p. 677-681.
- Nam, S., Smith, D. M. and Dou, Q. P. 2001. « Ester bond-containing tea polyphenols potently inhibit proteasome activity *in vitro* and *in vivo* ». *J. Biol. Chem.* vol. 276, p. 13322-13330.
- Nielsen, I.L., Haren, G.R., Magnussen, E.L., Dragsted, L.O., and Rasmussen, S.E. 2003. « Quantification of anthocyanins in commercial black currant juices by

- simple high-performance liquid chromatography. Investigation of their pH stability and antioxidative potency ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. vol. 51, p. 5861-5866.
- Nosse, B. 2003. « Farnesyltransferase-Inhibitors - New drugs for cancer treatment ». *Asian Student Medical Journal*. vol. 2, p. 8.
- Passamonti, S., Vrhovsek, U., Vanzo, A., and Mattivi, F. 2003. « The stomach as a site for anthocyanins absorption from food ». *FEBS Letters*. vol. 544, p. 210-213.
- Pilorget, A., Berthet, V., Luis, J., Moghrabi, A., Annabi, B., and Béliveau, R. 2003. « Medulloblastoma cell invasion is inhibited by green tea (-) epigallocatechin-3-gallate ». *Journal of Cellular Biochemistry*. vol. 90, p. 745-755.
- Plaisier, M., Kapiteijn, K., Koolwijk, P., Fijten, C., Hanemaaijer, R., Grimbergen, J.M., Mulder-Stapel, A., Quax, P.H., Helmerhorst, F.M. and van Hinsbergh, V.W. 2004. « Involvement of membrane-type matrix metalloproteinases (MT-MMPs) in capillary tube formation by human endometrial microvascular endothelial cells: role of MT3-MMP ». *J. Clin. Endocrinol. Metab.* vol. 89, p. 5828-5836.
- Poppel, V.G., Aspert, V. A., Heynen, T., Vooys, G.P., Ockhuizen, T. 1997. « The effect of beta-carotene on sputum cytology in smokers: a preliminary study ». *Eur J Cancer Prev.* vol. 6, p. 294-299.
- Prager, G.W., Breuss, J.M., Steurer, S., Mihaly, J. and Binder, B.R. 2004. « Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces rapid prourokinase (pro-uPA) activation on the surface of endothelial cells ». *Blood*. vol. 103, p. 955-962.
- Rundhaug, J.E. 2005. « Matrix metalloproteinases and angiogenesis ». *J Cell Mol Med.* Vol. 9, p. 267-285.
- Sanderson, C.M., and Smith, G.L. 1999. « Cell motility and cell morphology: how some viruses take control ». *Expert Reviews in Molecular Medicine*. vol. 1, p. 1-16.
- Sato, Y., Shimada, T. and Takaki, R. 1991. « Autocrinological role of basic fibroblast growth factor on tube formation of vascular endothelial cells in vitro ». *Biochem. Biophys. Res. Commun.* vol. 180, p. 1098-1102.
- Seeram, N.P., Zhang, Y., and Nair, M.G. 2003. « Inhibition of proliferation of human cancer cells and cyclooxygenase enzymes by anthocyanidins and catechins ». *Nutrition and Cancer*. vol. 46, p. 101-106.

- Seiki M. and Yana I. 2003. « Role of pericellular proteolysis by membrane type-1 matrix metalloproteinase in cancer invasion and angiogenesis ». *Cancer Sci.* vol. 94, p. 569-574.
- Senger, D.R., Ledbetter, S.R., Claffey, K.P. Papadopoulos-Sergiou, A., Peruzzi, C.A. and Detmar, M. 1996. « Stimulation of endothelial cell migration by vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor through cooperative mechanisms involving the $\alpha_v\beta_3$ integrin, osteopontin and thrombin ». *Am. J. Pathol.* vol. 149, p. 293-305.
- Sounni, N.E., Devy, L., Hajitou, A., Frankenke, F., Munaut, C., Gilles, C., Deroanne, C., Thompson, E.W., Foidart, J.M. and Noel, A. 2002. « MT1-MMP expression promotes tumor growth and angiogenesis through an up-regulation of vascular endothelial growth factor expression ». *FASEB J.* vol. 16, p.555-564.
- Suh, H., 2000. « Tissue restoration, tissue engineering and regenerative medicine» *Yonsei Med J.* vol. 41, p. 681-684.
- Surh, Y.-J. 2003. « Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals ». *Nature Reviews Cancer.* vol. 3, p. 768-780.
- Talavera, S., Felgines, C., Texier, O., Besson, C., Lamaison, J.L., and Remesy, C. 2003. « Anthocyanins are efficiently absorbed from the stomach in anesthetized rats ». *The Journal of Nutrition.* vol. 133, p. 4178-4182.
- Tamimi, R.M., Lagiou, P., Adami, H.-O., and Trichopoulos, D. 2002. « Prospects for chemoprevention of cancer ». *Journal of Internal Medicine.* vol. 251, p. 286-300
- Tan, W.F., Lin, L.P., Li, M.H., Zhang, Y.X., Tong, Y.G., Xiao, D. and Ding, J. 2003. « Quercetin, a dietary-derived flavonoid, possesses antiangiogenic potential ». *Eur. J. Pharmacol.* vol. 459, p. 255-262.
- Tapiero, H., Tew, K.D., Ba, G.N. and Mathe, G. 2002. « Polyphenols: do they play a role in the prevention of human pathologies? ». *Biomed Pharmacother.* Vol. 56, p. 200-207.
- Tortora, G.J., and Grabowski, S.R. 1995. *Biologie humaine*, 1^e édition. Collégial et universitaire Montréal. p.91-95, 362-363.

- Unemori, E.N., Ferrara, N., Bauer, E.A. and Amento, E.P. 1992. « Vascular endothelial growth factor induces interstitial collagenase expression in human endothelial cells » *J. Cell physiol.*, vol. 153, p.557-562.
- Wang, J., and Mazza, G. 2002. « Effects of anthocyanins and other phenolic compounds on the production of tumour necrosis factor α in LPS/IFN- γ -activated RAW 264.7 macrophages ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. vol. 50, p. 4183-4189.
- Wang, X., Song, K.S., Guo, Q.X. and Tian, W.X. 2003. « The galloyl moiety of green tea catechins is the critical structural feature to inhibit fatty-acid synthase ». *Biochem. Pharmacol.* vol. 66, p. 2039-2047.
- Weisburger, J.H. 2000. « Eat to live, not live to eat ». *Nutrition*. Vol. 16, p. 767-773.
- Willett, W.C. 2000. « Diet and Cancer ». *The Oncologist*. vol. 5, p. 393-404.
- Wincor, M.Z. 1999. « Bioflavonoids ». *Natural Healing Track*. p. 1-8.
- Witmer, A.N., van Blijswijk, B.C., van Noorden, C.J., Vrensen, G.F. and Schlingemann, R.O. 2004. « In vivo angiogenic phenotype of endothelial cells and pericytes induced by vascular endothelial growth factor-A ». *J Histochem Cytochem*. vol.52, p. 39-52.
- Woessner, J.F.J. 2001. « That impish TIMP: the tissue inhibitor of metalloproteinases-3 ». *J Clin. Invest.* vol. 108, p.799-800.
- Woo, M.S., Jung, S.H., Kim, S.Y., Hyun, J.W., Ko, K.H., Kim, W.K. and Kim, H.S. 2005. «Curcumin suppresses phorbol ester-induced matrix metalloproteinase-9 expression by inhibiting the PKC to MAPK signaling pathways in human astrogloma cells ». *Biochem. Biophys. Res. Commun.* vol. 335, p. 1017-1025.
- Wu, X., Cao, G., and Prior, R.L. 2002. « Absorption and metabolism of anthocyanins in elderly women after consumption of elderberry or blueberry ». *The Journal of Nutrition*. vol. 132, p. 1865-1871.
- Yancopoulos, G.D., S. Davis, N.W. Gale, J.S. Rudge, S.J. Wiegand, and J. Holash. 2000 «Vascular-specific growth factors and blood vessel formation ». *Nature*. vol. 407, p. 242-248.
- Zhao, X., Gu, Z., Attele, A.S. and Yuan, C.S. 1999. « Effects of quercetin on the release of endothelin, prostacyclin and tissue plasminogen activator from human endothelial cells in culture ». *J. Ethnopharmacol.* vol. 67, p. 279-285.

Zhou, Z., Apte, S.S., Soininen, R., Cao, R., Baaklini, G.Y., Rauser, R.W., Wang, J., Cao, Y. and Tryggvason, K. 2000. « Impaired endochondral ossification and angiogenesis in mice deficient in membrane-type matrix metalloproteinase I ». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. vol. 97, p. 4052–4057.