



HAL
open science

Etudes pharmacologiques d'un modèle cellulaire 2D/3D dans le cancer hépato-pancréatique

Sarah Hassan

► **To cite this version:**

Sarah Hassan. Etudes pharmacologiques d'un modèle cellulaire 2D/3D dans le cancer hépato-pancréatique. Cancer. Université de Strasbourg, 2018. Français. NNT: 2018STRAJ037. tel-02918206

HAL Id: tel-02918206

<https://theses.hal.science/tel-02918206>

Submitted on 20 Aug 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA
SANTÉ**

INSERM UMR 1260: Nanomédecine Régénérative

THÈSE présentée par :

Sarah HASSAN

Soutenu le: **05 Juillet 2018**

Pour obtenir le grade de: **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité: **Pharmacologie**

*Études pharmacologiques d'un modèle cellulaire
2D/3D dans le cancer hépato-pancréatique*

THÈSE dirigée par:

Pr. Geneviève UBEAUD-SEQUIER PU-PH, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS:

Pr. Jean-Yves JOUZEAU Professeur, Université de Lorraine

Dr. Fabienne THOMAS Docteur, Université de Toulouse

AUTRES MEMBRES DU JURY:

Pr. Jean-Marc JELTSCH Professeur, Université de Strasbourg

INVITE:

Dr. Jean PELUSO Docteur, Université de Strasbourg

Remerciements

Mes premiers remerciements s'adressent à l'ensemble des personnes qui ont participé de près ou de loin à ces 3 années de travail représenté par ce manuscrit.

Je tiens à remercier ma directrice de thèse, le Pr. Geneviève Ubeaud-Sequier : merci pour vos conseils, votre compréhension, votre grande gentillesse et pour la confiance que vous m'avez témoigné tout au long de cette étude. Malgré vos importantes obligations, vous avez toujours été présente pour recadrer mes recherches dans la bonne direction et ceci a été fondamental pour la bonne réalisation de cette thèse.

Je remercie très sincèrement mon encadrant, le Dr. Jean Peluso : merci pour ta contribution à la réalisation de ce travail de thèse; merci pour ton aide scientifique et technique et pour ta gentillesse au quotidien.

Je tiens particulièrement à remercier les membres du jury, Pr. Jean-Marc Jeltsh, Pr. Jean-Yves Jouzeau et Dr. Fabienne Thomas, d'avoir accepté de juger ce travail et de participer au jury de cette thèse.

Mes sincères remerciements s'adressent plus spécialement au Dr. Guy Fuhrmann, pour son aide précieuse, ses compétences scientifiques et ses conseils.

Je tiens à remercier Dr. Natacha Rochel de m'avoir accueillie dans son Laboratoire à l'IGBMC pour la réalisation de mes manipulations de protéomique. Je remercie également Carole Peluso pour son aide technique, sa disponibilité et sa gentillesse.

Je remercie également Dr Eric Jeandidier pour son aide et sa collaboration pour la finalisation des dernières manipulations de génétique à la fin de ma thèse.

Un grand merci à mes amis et à tous ceux qui m'ont soutenue en rendant agréable les moments passés ensemble grâce à leur disponibilité et à leur bonne humeur pendant les trois années de ma thèse.

Enfin, je dédie ce modeste travail à mes très chers parents et frères: sans vous, je n'aurais pas pu être ce que je suis, en reconnaissance de vos efforts, votre amour et vos encouragements durant toutes mes études et mes recherches.

Table des matières

Remerciements	2
Liste des figures	7
Liste des tableaux	11
Liste des abréviations	12
Résumé de la thèse	17
Introduction générale	26
Première partie : partie bibliographique	29
Chapitre 1 : pancréas et foie : anatomie, physiologie et fonction	30
I. Le pancréas	30
I.1. Anatomie	30
I.2. Physiologie	31
I.2.1. Pancréas endocrine	31
I.2.2. Pancréas exocrine	32
II. Le foie	33
II.1. Structure et organisation fonctionnelle	33
II.2. Zonation et fonction métabolique	35
II.3. Les types cellulaires du foie	36
II.3.1. Les hépatocytes	36
II.3.2. Les cellules endothéliales sinusoidales	37
II.3.3. Les cholangiocytes	38
II.3.4. Les cellules de Kuppfer	38
II.3.5. Les cellules stellaires	39
II.4 Détoxification des xénobiotiques par l'organisme	40
II.4.1. L'absorption	41
II.4.1.1. Diffusion simple ou diffusion passive	42
II.4.1.2. Diffusion facilitée	42
II.4.1.3. Transport actif	42
II.4.1.4. L'endocytose	43
II.4.2. La distribution	44
II.4.3. Le métabolisme	44
II.4.3.1. Les enzymes de phase I	45

II.4.3.2. Les enzymes de phase II.....	49
II.4.4. L'élimination et excrétion	50
II.5. Rôle des transporteurs dans le métabolisme et l'élimination.....	51
II.5.1. Les transporteurs d'influx (SLC)	52
II.5.2. Les transporteurs d'efflux (ABC)	54
II.6. Méthodes d'études de métabolisme et de toxicité hépatique : évolution vers les modèles cellulaires.....	56
II.6.1. Les modèles <i>in vivo</i>	57
II.6.2. Les modèles cellulaires <i>in vitro</i>	58
II.6.2.1. Les cellules primaires humaines	58
II.6.2.2. Les lignées cellulaires immortalisées	59
II.6.3. Méthodes de caractérisation de la mort cellulaire <i>in vitro</i>	56
III. Liens entre le foie et le pancréas	63
III.1. Liens embryologiques	63
III.2. Liens histologiques	65
III.3. Liens anatomiques	66
III.4. Liens métaboliques	67
III.4.1. Influence de l'insuline et du glucagon sur le foie	67
III.4.2. Effet hépatique sur la clairance de l'insuline	69
III.4.2. Effet des acides biliaires sur les cellules endocrines	69
III.5. Reprogrammation cellulaire	70
III.5.1. Différenciation des hépatocytes en cellules pancréatiques	70
III.5.2. Différenciation des cellules pancréatiques en hépatocytes	70
Chapitre 2: Cancer foie-pancréas	70
I. Le cancer du pancréas	70
I.1. Généralités	71
I.2. Symptômes	73
I.3. Diagnostic	73
I.4. Les traitements.	74
I.4.1. La chirurgie	75

I.4.2. La radiothérapie	75
I.4.3. La chimiothérapie	76
II. Le cancer du foie	80
II.1. Généralités.....	80
II.2. Origine de l'hépatocarcinome	81
II.3. Diagnostic de l'hépatocarcinome	82
II.4. Les traitements de l'hépatocarcinome.....	83
II .4.1. La chirurgie.....	84
II.4.2. La transplantation	84
II.4.3. L'ablation locale	85
II.4.4. La chimioembolisation	85
II.4.5. La thérapie ciblée.....	87
II.4.6. La chimiothérapie.....	87
III. La recherche de modèles cellulaires prédictifs en cancérologie	88
III.1 Les modèles cellulaires existants	88
III.2. Défi dans la recherche de nouveaux traitements anti-cancéreux	91
IV. Microenvironnement de la tumeur	92
IV.1. Matrice extracellulaire	94
IV.2. Vascularisation de la tumeur	94
IV.3. Hypoxie	95
Chapitre 3 : Les polyphénols végétaux	99
I.1. Généralités	99
I.2. Biosynthèse des polyphénols.....	100
I.3. Classification des polyphénols.....	101
I.3.1. Les polyphénols simples.....	101
I.3.1.1. Les acides phénoliques.....	101
I.3.1.2. Les flavonoïdes	102
I.3.1.3. Les alcools phénoliques.....	105
I.3.2. Les polyphénols complexes	106
I.4. Biodisponibilité des polyphénols.....	106
I.5. Effets bénéfiques des polyphénols végétaux sur la santé	108
I.6. Polyphénols et cancers	109
I.6.1. Potentiel antiprolifératif.....	110
I.6.2. Régulation de l'apoptose.....	110
I.6.3. Inhibition de l'activité des protéines kinases.....	110

I.6.4. Inhibition de la migration, l'angiogenèse et des	
métastases	111
Partie expérimentale	113
Contexte et objectifs de la thèse.....	114
Résultats.....	115
I. Développer et caractérisation d'un modèle cellulaire hépatique	
innovant	116
I.1. Draft de l'article 1	118
I.2. Résultats complémentaires.....	142
II. Evaluer l'effet des traitements médicamenteux sur différents	
modèles cellulaires en 2D et 3D	156
II.1. Optimisation de l'effet de la gemcitabine sur les cellules du	
pancréas	156
II.1.1. Contenu de l'article 2	158
II.1.2. Contenu de l'article 3	164
II.2. Optimisation de l'effet de la doxorubicine sur les cellules	
hépatiques	174
II.3. Comparaison entre les différences de réponse pharmacologique	
observée dans des modèles de culture 2D versus 3D	180
II.4. Draft de l'article 4.....	188
Discussion générale.....	211
Conclusion et perspectives	226
Bibliographie	229
Communications et publications	251

Liste des Figures

Figure 1 Anatomie du pancréas	30
Figure 2 Aspect histologique du pancréas	31
Figure 3 L'acinus du pancréas exocrine	32
Figure 4 Anatomie du foie	33
Figure 5 Coupe histologique d'un lobule du foie	34
Figure 6 Représentation schématique de l'organisation d'un lobule	35
Figure 7 Structuration d'un lobule du foie	36
Figure 8 Schéma représentant la biotransformation des xénobiotiques dans un hépatocyte.	40
Figure 9 Différents mécanismes de transport cellulaire	42
Figure 10 Transport actif par les transporteurs d'efflux	43
Figure 11 Répartition des CYP en pourcentage de métabolisme des médicaments dans le foie	47
Figure 12 Voie de regulation des transporteurs et des cytochromes par les récepteurs nucléaires	49
Figure 13 Métabolisme des xénobiotiques par les enzymes de phase II	50
Figure 14 Illustration des différents transporteurs au niveau des hépatocytes.....	52
Figure 15 Facteurs de transcription contrôlant la différenciation des cellules hépatiques et pancréatiques.	64
Figure 16 Progéniteurs des cellules hépatiques et pancréatiques	65
Figure 17 Expression de SOX9 dans les structures canalaire hépatiques et pancréatiques	65
Figure 18 Liens anatomiques entre le foie et le pancréas	66

Figure 19 Régulation du métabolisme du glycogène hépatique par le glucagon	68
Figure 20 Régulation du métabolisme de glucose hépatique par l'insuline	69
Figure 21 Arbre décisionnel dans le traitement du cancer du pancréas .	74
Figure 22 Induction du cancer hépatique par le VHB	82
Figure 23 Les différents traitements du cancer du foie	83
Figure 24 Traitement du cancer du foie par chimioembolisation.....	86
Figure 25 Caractéristiques d'un sphéroïde	90
Figure 26 Importance des cultures 3D dans la sélection des médicaments pendant leur développement	92
Figure 27 Microenvironnement de la tumeur	93
Figure 28 Les effets de l'hypoxie sur les cellules tumorales.....	97
Figure 29 Voie de synthèse des polyphénols	100
Figure 30 Structure chimique de l'acide hydroxycinnamique.....	102
Figure 31 Structure chimique de l'acide hydrobenzoïque.....	102
Figure 32 Structure chimique des polyphénols	103
Figure 33 Structure chimique des flavonols	103
Figure 34 Structure chimique des flavon3-ols.....	104
Figure 35 Structure chimique des flavonones	104
Figure 36 Structure chimique des anthocyanes	105
Figure 37 Structure de l'hydroxytyrosol (a) et du tyrosol (b)	105
Figure 38 Structure chimique (a) d'un tanin condensé et (b) d'un Gallotanin.....	106
Figure 39 Schéma descriptif de l'absorption des polyphénols	107
Figure 40 Sites potentiels de conjugaison des polyphénols	108
Figure 41 Effet apoptotique des molécules étudiées sur les HepaPSU à J1 et sur les HepG2	145
Figure 42 Effet apoptotique des molécules étudiées sur les HepaPSU à J1 et après traitement avec la rifampicine durant 48h	146

Figure 43 Photographies des HepaPSU (a) cultivées pendant un jour et (b) pendant 7 jours sous microscopie à contraste de phase (40X)	147
Figure 44 Effet apoptotique des molécules étudiées sur les cellules HepaPSU à J1 et J7	148
Figure 45 Effet apoptotique des molécules étudiées sur les HepG2 à J1 et à, J7	149
Figure 46 Effet apoptotique des molécules étudiées sur les HepaPSU J7 et HepG2 J7	149
Figure 47 Photos des sphéroïdes HepaPSU (a) non marquées et (b) marquées avec l'Hoechst par microscopie confocale.....	150
Figure 48 Effet apoptotique des molécules étudiées sur les HepaPSU à J1 et en culture 3D	151
Figure 49 Expression des enzymes et des transporteurs par western blot 1: HepG2 J1, 2: HepG2 J7, 3: HepaPSU J1, 4: HepaPSU + RIF, 5: HepaPSU J7, 6: HepaPSU 3D	152
Figure 50 Différents polyphénols utilisés dans la deuxième partie.....	157
Figure 51 Effet apoptotique des polyphénols sur les cellules HepaPSU	176
Figure 52 Effet apoptotique de la doxocubicine sur les cellules HepaPSU coincubées avec les polyphénols et la doxorubicine pendant 24 heures	177
Figure 53 Effet apoptotique de la doxocubicine sur les cellules HepaPSU cultivées pendant 7 jours puis coincubées avec les polyphénols et la doxorubicine pendant 24 heures	178
Figure 54 Mécanisme proposé de la potentialisation des activités des médicaments anticancéreux par les polyphénols	179
Figure 55 Effet apoptotique des polyphénols sur les cellules AsPC-1 cultivées en 3D.....	181
Figure 56 Effet apoptotique de la gemcitabine combinée à différents polyphénols sur les AsPC-1 cultivées en 3D.....	182
Figure 57 Effet apoptotique des polyphénols sur les cellules HepaPSU cultivées en 3D.....	183
Figure 58 Effet apoptotique de la doxorubicine combinée avec les polyphénols sur les cellules HepaPSU cultivées en 3D	184

Figure 59 Comparaison des réponses apoptotiques de la gemcitabine associée à différents polyphénols entre les cellules AsPC-1 cultivées en 2D et en 3D	185
Figure 60 Comparaison des réponses apoptotiques de la doxorubicine associée ou non à des polyphénols entre les cellules HepaPSU cultivées en 2D et en 3D	186
Figure 61 Mécanisme proposé de la potentialisation des activités des médicaments anticancéreux par la quercétine sur les cellules cultivées en 3D	224

Liste des Tableaux

Tableau 1 Fonctions métaboliques des enzymes du Cytochrome P450	46
Tableau 2 Les principaux transporteurs d'influx au niveau des hépatocytes	54
Tableau 3 Les principaux transporteurs d'efflux au niveau des hépatocytes	56
Tableau 4 Les différents types de cancer pancréatique endocrine	71
Tableau 5 Les différents types de cancer pancréatique exocrine	72
Tableau 6 Différentes classes des polyphénols	101
Tableau 7 Différentes molécules utilisées pour les études d'évaluation d'hépatotoxicité.....	143

Liste des Abréviations

ABC ATP Binding Cassette

ADME Absorption, Distribution, Metabolism and Excretion

ADRs Adverse Drug Reactions

AhR aryl hydrocarbon Receptor

ANOVA analysis of variance

AP Alkaline Phosphatase

APAP acetaminophen

APC Antigen Presenting Cell

APS Ammonium Persulfate

ATP Adenosine Triphosphate

AU Arbitrary Units

BA Bile Acids

Bcl-2 B-cell lymphoma 2

Bcl-xL B-cell lymphoma-extra large

BCRP Breast Cancer Resistance Protein

BCLC Barccelona Cinical Liver Cancer

BEE Basolateral Early Endosome

BSA Bovine Serum Albumin

BSEP Bile Salt Export Pump

BSP Bromosulfophthalein

Ca²⁺ Calcium

cAMP cyclic Adenosine MonoPhosphate

CAR Constitutive Androstane Receptor

CCK cholecystokinin

CCl2 Chemokine (C-C motif) ligand 2

CDF 5,6-carboxy-2',7' dichlorofluorescein

CDFDA 5,6-carboxy- 2',7' dichlorofluorescein diacetate

CHC Carcinome hepatocellulaire

COX Cyclooxygenase

CYP450 cytochrome P450

DBD DNA-binding domain

DDT Dichlorodiphenyltrichloroethane

DHE dihydroethidium

DMEM Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO Dimethyl Sulfoxide

DNA Deoxyribonucleic Acid

ECM Extracellular Matrix

EGFR Epidermal Growth Factor Receptor

FasL Fas ligand

FGF Fibroblast growth factor

FXR Farnesoid X Receptor

GA Golgi apparatus

GHRMSA Groupe Hospitalier de la région de Mulhouse et Sud Alsace

GISTs Gastro-intestinal stromal tumors

GIT gastrointestinal tract

GSH reduced glutathione

GST Glutathione S-transferases

H₂O₂ hydrogen peroxide

HBSS hanks' balanced salts solution

HIF Hypoxia Inducible Factor

HMG-CoA 5-hydroxy-3-methylglutaryl- coenzyme A

HNF1 Hepatic Nuclear Factor 1 alpha

HSC Hepatic Stellate Cells

HSC Hepatic Stem Cells

IF immunofluorescence

iNOS Nitric oxide synthases

IRM imagerie par résonance magnétique

IRS Insulin receptor substrates

JAK Janus kinase

KC Kupffer cells

LBD Ligand-binding domain

LDH Lactate Dehydrogenase

MAPK Mitogen-Activated Protein Kinases

MATE multidrug and toxin extrusion protein

MDR multidrug resistance protein

MEM minimum essential medium

MMP matrix metalloproteinase

MPT mitochondrial permeability transition

mRNA messenger ribonucleic acid

MRP multidrug resistance-associated protein

Na⁺ sodium

NADPH nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase

NF- κ B nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

O₂ oxygen gas

OA organic anions

OAT organic anion transporter

OATP organic anion transporting polypeptide

OCT organic cation transporter

PAGE polyacrylamid gel electrophoresis

PBS phosphate buffered saline

PC parenchymal cells

PDAC pancreatic ductal adenocarcinoma

PDX1 pancreatic and duodenal homeobox 1

P-gp P-glycoprotein

PI propidium iodide

PKA protein kinase A

PPAR peroxisome proliferator-activated receptor

PSC Pluripotent stem cells

PVDF polyvinylidene difluoride

PXE pseudoxanthoma elasticum

PXR pregnane X receptor

RER rough endoplasmic reticulum

RIP-1 receptor interacting protein1

RIPA radioimmunoprecipitation assay

RNA ribonucleic acid

RNS reactive nitrogen species

ROS reactive oxygen species

RPM rounds per minutes

RT room temperature

RXR retinoid X receptor

SDS sodium dodecyl sulfate

SER smooth endoplasmic reticulum

Shc src homology containing protein

Shh sonic hedgenog

SLC Solute carrier

TBS tris buffered saline

TEMED tetramethylethylenediamine tetraacetic acid

TNF- tumor necrosis factor

TRAIL TNF-related apoptosis-inducing ligand

UGT uridine diphosphate glucuronosyltransferase

UDPGT UDP-glucuronosyltransferas

VHB virus de l'hépatite B

VHC virus de l'hépatite C

VHD virus de l'hépatite D

Résumé de la thèse

1. Contexte de la recherche :

Les cancers du foie et du pancréas sont classés parmi les cancers les plus fréquents et agressifs à travers le monde. Le cancer est une maladie restant souvent silencieuse pendant une longue période, son diagnostic étant souvent effectué lorsque la tumeur s'est propagée à d'autres organes. Vu les liens physiologiques et anatomiques entre le foie et le pancréas, les cellules tumorales pancréatiques possèdent la capacité de quitter le pancréas en passant dans la circulation sanguine pour former des métastases au niveau hépatique. La gemcitabine seule est une chimiothérapie standard pour les patients atteints d'un cancer du pancréas métastatique. La doxorubicine est un des anticancéreux standards dans le traitement du cancer hépatique avancé pour son action anti-tumorale. Cependant, ces molécules ont montré une efficacité insuffisante (Fan L. et al, 2010). De nombreuses combinaisons de gemcitabine ou doxorubicine avec d'autres médicaments ont déjà été testées; jusqu'à présent, aucune n'a montré des avantages évidents, quant à l'allongement de l'espérance de vie des patients. La communauté scientifique mondiale affirme que l'efficacité des médicaments anticancéreux est affectée par les activités des enzymes métaboliques, en particulier le cytochrome P450 et les transporteurs membranaires type SLC et ABC, et par l'environnement tumoral (Zanger et al, 2013). Les enzymes qui métabolisent les médicaments et les transporteurs membranaires jouent un rôle clé dans l'activation et la désactivation des médicaments et la détoxification de l'organisme. L'élucidation des influences du métabolisme de ces médicaments qui se produit dans le foie, semble être une étape extrêmement importante dans le développement de nouveaux médicaments anticancéreux (Sumantran V. et al, 2016). Compte tenu du besoin continu de rechercher des chimiothérapies sûres et efficaces avec une moindre toxicité, les études sur le métabolisme des nouveaux médicaments puissants sont indispensables à mettre en œuvre très tôt dans le développement des médicaments. Le modèle hépatique cellulaire standard est les hépatocytes primaires humains issus de résections chirurgicales. Cependant ce modèle a des limites (durée de vie des cellules en culture de 48-72h maximum, grandes variabilités interindividuelles (1 lot par individu)), influence des traitements et de l'environnement tumoral sur l'isolement des cellules et difficulté de récupération de morceaux de foie humain de malades avec les problèmes éthiques. Devant cette difficulté, des lignées cellulaires ont été testées

comme les cellules HepG2. Mais ces cellules ne présentent pas toutes les enzymes nécessaires comme les CYP450 en quantité et leur activité n'est pas suffisante pour des études de métabolisme médicamenteux. Une équipe de recherche a développé plus récemment une lignée cellulaire hépatique humaine HepaRG qui présente des caractéristiques métaboliques du foie mais présente des limites essentiellement par la présence de DMSO en quantité importante dans les milieux de culture nécessaires à l'étape de différenciation et limitant l'utilisation de ces cellules en culture à deux passages (Muller D. et al, 2014). Aussi, il est nécessaire de mettre au point un nouveau modèle cellulaire hépatique humain présentant à la fois les caractéristiques de métabolisme essentielles du foie et une réelle stabilité de lignée cellulaire.

Par ailleurs, les cellules cancéreuses sont caractérisées par une perte de polarité et le détachement de la membrane basale naturelle, permettant aux cellules de former une structure tridimensionnelle (3D) par interactions les unes avec les autres et avec leur microenvironnement. Dans la littérature, les études *in vitro* menées dans le cadre du cancer utilisent des cellules cultivées en mode classique 2D. Or cette condition ne reflète pas les caractéristiques essentielles des tissus tumoraux parce que les communications et les interactions cellule-cellule qui se produisent au cours des métastases cancéreuses sont manquantes. Souvent, les résultats obtenus avec les cellules cultivées en 2D ne sont pas prédictifs des résultats *in vivo* (Goodman et al, 2008). En effet, les cellules cultivées en 2D sont exposées à un environnement uniforme suffisant en oxygène et nutriments, alors que les cellules des tumeurs solides sont exposées à des variations de nutriments et de composés chimiques et/ou biologiques (Moreau et al, 2012). Ces modifications du microenvironnement, ainsi que le manque de profondeur spatiale et de connectivité cellulaire, limitent l'application des cultures 2D pour tester des composés pharmacologiquement actifs. Ainsi, afin de maintenir les caractéristiques du microenvironnement de la tumeur native et les intercommunications, différents modèles cellulaires de tumeurs 3D sont développés afin d'être plus prédictifs et proches de la situation *in vivo*. Les cellules tumorales cancéreuses sont généralement résistantes aux chimiothérapies, même après une première dose de médicaments cytotoxiques. Cette résistance a été attribuée à la surexpression de protéines multi résistantes type ABC (phénotype MDR) par les cellules tumorales (Sanchez et al, 2009; Wartenberg et coll., 1990; Zhu et al, 2012). Dans un tissu tumoral, les cellules sont en hypoxie (Milane et al, 2011), et exposées à un faible apport nutritif (Zhu et al, 2012)

expliquant l'augmentation de l'expression des MDR à l'origine de la résistance des cellules cancéreuses à la chimiothérapie.

Notre projet étant ciblé sur le développement de modèles cellulaires appliqués au cancer hépatopancréatique, nous allons dans un premier temps, mettre en place et caractériser un nouveau modèle cellulaire hépatique humain présentant des propriétés spécifiques du foie et capables de métaboliser les médicaments afin d'être plus représentatif de la situation *in vivo*. Pour les études sur le cancer pancréatique, nous utiliserons les cellules AsPC1 qui sont connue, pour être un bon modèle cellulaire utilisé pour des études d'optimisation de l'activité des médicaments anticancéreux pancréatiques *in vitro*.

De plus, afin de tenir compte de l'environnement tumoral et de la structure spatiale, nous allons dans un second temps, mettre en place ces modèles cellulaires en 3D et comparer leur comportement par rapport aux cellules cultivées en 2D.

Enfin, dans une troisième partie, nous allons tester des molécules bioactives seules et en combinaison afin de proposer des pistes qui pourraient permettre d'optimiser l'activité des traitements anticancéreux pancréatiques et hépatiques dans un environnement 3D comparé au 2D.

2. Hypothèse

Dans ce projet, nous faisons l'hypothèse que l'efficacité des traitements du cancer (pancréatique et hépatique) est dépendante des médicaments anticancéreux à métabolisme hépatique essentiel et du microenvironnement de la tumeur.

3. Objectifs

Dans ce contexte, les objectifs de notre travail sont ciblés en 2 parties:

- i) Développer un modèle cellulaire hépatique et caractériser les mécanismes sous-jacents de la modulation de l'expression et de la fonctionnalité des transporteurs membranaires et des enzymes clés qui régissent le métabolisme des médicaments, ainsi que les mécanismes de dérégulation de l'apoptose ou de son contrôle sur des cellules en culture 2D et 3D.
- ii) Evaluer l'effet des traitements médicamenteux (gemcitabine et doxorubicine) dans ces processus en vue d'optimiser l'efficacité et la tolérance à ces traitements et d'évaluer la capacité de

certaines substances naturelles bioactives à réguler les transporteurs membranaires, les enzymes ou les protéines régulatrices de l'apoptose susceptibles d'être altérés au cours des traitements anticancéreux, dans le cadre d'une stratégie thérapeutique adjuvante ou préventive sur les différents modèles cellulaires (foie et pancréas) en 2D et 3D. Ainsi, nous allons étudier *in vitro* l'effet de nouvelles stratégies par combinaison des médicaments anticancéreux associés à des polyphénols qui sont connues pour avoir des effets bénéfiques sur plusieurs domaines de la santé.

4. Résultats :

a. Modèle hépatique:

Les cellules HepG2 sont inappropriées pour étudier le métabolisme des médicaments comparées aux hépatocytes primaires car les quantités d'enzymes exprimées sont trop faibles voire inexistantes dans ces cellules HepG2 (Choi et al, 2015). Aussi, la première partie de notre travail a consisté à caractériser une nouvelle lignée hépatique développée au laboratoire, dérivée de la lignée HepG2, appelée « HepaPSU » (enveloppe Soleau INPI 488678) et à l'optimiser. Afin de pouvoir étudier le métabolisme hépatique des médicaments, nous avons étudié l'activité enzymatique de notre nouvelle lignée cellulaire et ses capacités à métaboliser les médicaments anticancéreux. Nous avons optimisé notre nouvelle lignée en modifiant les conditions d'incubation. La caractérisation de notre lignée a consisté à comparer notre lignée dans diverses conditions d'incubation i) en établissant un bilan caryotypique (avec la collaboration du Groupe hospitalier régional Mulhouse Sud Alsace (GHRMSA)) ii) en comparant la morphologie des cellules hépatiques, iii) en établissant leurs activités fonctionnelles biochimiques comme leur capacité à synthétiser l'albumine, iv) en étudiant leurs capacités de détoxification (étude de l'expression et de l'activité de certaines isoformes du CYP450 (CYP3A4, CYP2D6 et CYP2C9) et de certains transporteurs ABC (MDR1 et MRP2) et SLC (OATP1B1), v) en étudiant l'expression des transporteurs nucléaires tels que PXR, vi) en évaluant leur capacité d'induction métabolique CYP450 dépendant. Nos résultats montrent que nous avons développé une nouvelle lignée cellulaire hépatique, sur un fond génétique commun à HepG2, avec des translocations sur les chromosomes 5, 17 et 20. Morphologiquement, dans des conditions spécifiques, nous observons des canalicules biliaires se formant avec le temps par opposition

aux HepG2. Nos cellules sont capables de synthétiser de l'albumine comme les HepG2. Nos cellules « HepaPSU » expriment fortement les CYP3A4, CYP2D6 et CYP2C9 (augmentation de 5 fois dans des conditions de culture spéciales et en culture 3D par rapport à HepG2) et l'activité CYP3A4 est maintenue. De la même manière, les cellules expriment fortement les transporteurs ABC par rapport aux cellules HepG2 (augmentation de 4 fois pour MRP2 et 2 fois pour MDR1 et OATP1B1 respectivement). Les récepteurs PXR sont fortement exprimés, ce qui est en accord avec la littérature et expliqué par le fait que le PXR régule l'expression et l'activité des CYP450 et des transporteurs ABC. Après incubation pendant 48h de nos cellules avec de la rifampicine (10 μ M), un inducteur connu des CYP, nos résultats montrent que l'activité CYP450 est inductible dans nos cellules.

Nous avons également étudié si nos cellules pouvaient être un bon modèle cellulaire en toxicologie en développant des tests spécifiques par cytométrie; pour cela, nous avons étudié si nos cellules étaient capables de prédire l'hépatotoxicité de diverses molécules par différents voies (cholestase, stéatose et par l'intermédiaire de métabolites toxiques). Nos résultats montrent que le modèle cellulaire « HepaPSU » est effectivement un bon modèle de prédiction d'hépatotoxicité par comparaison aux cellules HepG2, modèle de référence dans le domaine de la toxicité hépatique. Nous avons choisi des molécules de référence connues pour être hépatotoxiques avec des voies de toxicité différentes. i) l'amiodarone, toxique par elle-même, ii) le diclofenac, le paracétamol et l'aflatoxine B1, toxiques par formation des métabolites toxiques générés par les CYP450 iii) la chlorpromazine toxique par cholestase impliquant des transporteurs d'efflux ABC iv) l'acide valproïque molécule connue pour être hépatotoxique par stéatose. Nos résultats montrent que nos cellules sont capables de prédire l'hépatotoxicité de ces molécules de façon plus prédictive que les HepG2, en particulier lorsque ces cellules sont incubées dans des conditions de culture spécifiques (brevet en cours), en particulier pour prédire l'hépatotoxicité de molécules médiées par les métabolites toxiques formés par les CYP450. Ainsi, dans nos conditions expérimentales, un pourcentage d'apoptose important et significatif est observé: 72.9%, 75% et 68% d'apoptose avec respectivement, paracétamol, diclofenac et aflatoxine B1. Par comparaison, avec les cellules HepG2 incubées dans les mêmes conditions, aucun effet hépatotoxique n'est observé avec des pourcentages d'apoptose inférieur ou égal à 25 % (15 %, 18% et 25% respectivement pour les mêmes molécules).

Ce résultat confirme que les CYP450 sont fonctionnels dans nos cellules « HepaPSU ». Nos résultats confirment également que les CYP450 sont inductibles dans nos cellules. Ainsi, après incubation de nos cellules avec de la rifampicine pendant 48 heures, en présence de paracétamol ou de diclofenac ou d'aflatoxine B1, le pourcentage d'apoptose est augmenté (30% d'augmentation, 50% et 40 % respectivement) (Hassan et al. GMP, Paris 2017).

Nous avons ensuite étudié si nos cellules « HepaPSU » selon le protocole optimisé étaient un bon modèle de prédiction d'hépatotoxicité idiosyncrasique dans un contexte inflammatoire. Pour cela, nous avons choisi des molécules de référence connues pour être hépatotoxiques selon un mode idiosyncrasique, le nimésulide et la néfazodone, et nous avons suivi le même protocole que celui établi lors du doctorat de Léa Saab (07/2013). Nos résultats montrent que, après inflammation par TNF alpha et LPS, le pourcentage d'apoptose des cellules « HepaPSU » par les deux molécules augmente de 40% jusqu'à 80%, ce qui n'est pas le cas pour les cellules HepG2.

D'après tous les résultats obtenus, nous avons fait l'hypothèse que les « HepaPSU » cultivées dans des conditions spéciales arrivent à un stade de différenciation suffisant permettant d'avoir des réponses d'hépatotoxicité et de métabolisme différentes de celles des HepG2. Pour cela, nous avons étudié l'expression du HNF-4 alpha qui est une protéine impliquée dans la différenciation des hépatocytes (Ritu R. et al, 2006). Nos résultats montrent que notre nouvelle lignée présente une expression relativement forte de HNF-4 alpha alors que cette expression est faible dans les mêmes conditions dans les cellules HepG2 (augmentation de 5 fois dans des conditions de culture spéciales et en culture 3D par rapport aux cellules HepG2). De plus, de façon cohérente, nos résultats montrent que notre nouvelle lignée cellulaire « HepaPSU » présente une expression relativement forte de PXR qui est un récepteur nucléaire impliqué dans la régulation des enzymes et transporteurs hépatiques (augmentation de 4 fois dans des conditions de culture spéciales et en culture 3D par rapport aux cellules HepG2). (Publication en cours de soumission).

Pour confirmer nos résultats et en collaboration avec les hôpitaux de Mulhouse (GHRMSA), nous avons effectué le caryotype de la nouvelle lignée en comparaison avec la lignée de référence HepG2. Clairement, le caryotype a pu montrer que la lignée « HepaPSU » est une nouvelle lignée hépatique stable dérivée des HepG2 en gardant les mêmes anomalies

présentes dans cette dernière. Par contre, nous avons observé des différences significatives pour les chromosomes 5, 17 et 20. D'après ces résultats, nous avons fait l'hypothèse que ces mutations ont contribué à donner certaines capacités métaboliques à la nouvelle lignée puisque la localisation cytogénétique du gène codant pour HNF-4 alpha, qui joue un rôle clé dans la différenciation hépatique, est située sur le chromosome 20 (20q13.12) (Genetics home reference, 2018).

b. Optimisation de l'activité des traitements anticancéreux in vitro :

Dans la deuxième partie du projet, nous avons testé si les polyphénols étaient capables de potentialiser l'effet apoptotique des médicaments anticancéreux (gemcitabine et doxorubicine). Nos résultats montrent que les cellules pancréatiques et hépatiques en 2D résistent respectivement à la gemcitabine et à la doxorubicine seule (taux d'apoptose des cellules cancéreuses inférieur à 20%), mais la combinaison de ces médicaments anticancéreux avec des polyphénols naturels montre une potentialisation significative de l'effet apoptotique de ces médicaments (augmentation du taux d'apoptose des cellules cancéreuses après combinaison avec la bergamottine, la catéchine, la quercétine ou l'acide gallique) (Hassan S. et al, J Pharmaceut Res, 2017). Nous avons pu montrer ainsi que les mécanismes mis en jeu impliquaient la modulation des transporteurs MDR1. Ces médicaments anticancéreux sont des substrats de MDR1 et certains polyphénols sont des puissants inhibiteurs de l'activité de MDR1 (bergamottine et quercétine inhibent près de 80% de l'activité de MDR1). De plus, nous avons pu montrer que la combinaison des anticancéreux avec la bergamottine (50 µM) augmente l'expression de p53 (un régulateur du cycle cellulaire) et de capase-3 clivée dans les cellules cancéreuses (Hassan S. et al, Biochem Pharmacol, 2017).

Les mêmes expériences ont été réalisées dans les cellules 3D (sphéroïdes), modèle plus représentatif de la situation *in vivo*. Cependant, dans ces conditions, les cellules pancréatiques et hépatiques résistent aux médicaments anticancéreux seuls et en combinaison avec les polyphénols, certainement dus à l'état d'hypoxie des cellules. Aussi, dans le but de diminuer la résistance acquise en culture 3D, nous avons recherché des molécules qui agissent en diminuant cette résistance, particulièrement des molécules qui possèdent le pouvoir de diminuer l'expression des effecteurs de l'hypoxie, tels que le HIF 1 alpha (*Hypoxia Inducible Factor 1 alpha*), dans les cellules cultivées en 3D (Cressida et al, 2017). Nos résultats ont montré que certains polyphénols comme la quercétine étaient capables

d'augmenter l'activité des anticancéreux même en culture 3D, en augmentant le taux des cellules mortes en apoptose jusqu'à 60 %. Afin d'étudier le mécanisme d'apoptose de la quercétine dans ces conditions, nous avons étudié l'effet de la quercétine sur l'expression de HIF-1 alpha. Nos résultats montrent une augmentation significative de l'expression de p53 (augmentation de 5 fois par rapport aux cellules nos traitées avec la quercétine), ainsi qu'une diminution significative du facteur HIF-1 alpha dans les cellules traitées par les anticancéreux combinés avec ce polyphénol (Publication en cours de rédaction). Nos résultats nous permettent de faire l'hypothèse que la quercétine est capable d'augmenter l'activité apoptotique de molécules anticancéreuses en culture 3D, grâce à son pouvoir inhibiteur de l'effecteur initial de l'hypoxie, HIF-1 alpha. Nos résultats sont en corrélation avec la littérature où il a été démontré que la quercétine pouvait inhiber l'expression de VEGF dans des tumeurs de colon et de sein et dans les cellules LNCaP, CX-1 et SkBr3 cultivées en 3D (Li F. et al, 2015).

5. Conclusions et perspectives:

En conclusion, nos résultats ont montré clairement que nous avons mis en place une nouvelle lignée hépatique humaine qui fait l'objet d'un très bon modèle de prédiction d'hépatotoxicité en exprimant suffisamment et significativement les enzymes et les transporteurs hépatiques trouvés dans les hépatocytes *in vivo*. Ce modèle pourrait être ainsi un outil de choix dans les études précliniques de métabolisme et d'hépto-toxicité. Nous avons pu voir que les cellules pancréatiques et hépatiques dans un environnement 3D sont plus prédictives d'une tumeur *in vivo* et pourrait être un modèle de choix pour des études pharmacologiques de criblage de nouveaux médicaments anticancéreux ou des stratégies de combinaisons de molécules. De plus, nos résultats ont montré que certains polyphénols permettaient aux médicaments anticancéreux d'être plus actifs en leur permettant d'atteindre leur cible, en entrant dans les cellules, en induisant leur apoptose et en diminuant la chimiorésistance par inhibition de l'activité des transporteurs d'efflux, ainsi que par diminution de l'expression de HIF-1 alpha au niveau des cellules cancéreuses cultivées dans des conditions 3D prédictives des tumeurs *in vivo*.

Une des perspectives principales de nos travaux est de tester les combinaisons des traitements anticancéreux efficaces en culture 3D dans un modèle intégré innovant foie-pancréas afin de se rapprocher de l'environnement des tumeurs pancréatiques ou hépatiques et de mieux

comprendre des interrelations de ces 2 organes dans la réponse aux traitements.

Introduction générale

Introduction générale

Le cancer

Le cancer se caractérise par la multiplication et la propagation anarchique des cellules anormales au sein d'un tissu normal de l'organisme en formant une ou des tumeurs (Hanahan and Weinberg 2000). Cette maladie peut être due à des facteurs externes (tabac, infections, etc.) ou internes (mutations hérédité, hormones, etc.).

Chaque année, 7,6 millions d'individus décèdent du cancer et plus de 12 millions de nouveaux cas sont diagnostiqués. Le taux de survie des individus diagnostiqués est variable selon le type et la localisation du cancer. Ainsi, le taux de survie du cancer du pancréas est de 9 % et celui du cancer du foie est de 13 % (Jacques Ferlay et al. 2010).

Il est important de détecter rapidement le cancer et de le traiter le plus tôt possible. Selon le type et le stade du cancer, les traitements peuvent être différents : la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie. Cependant, lors de la chimiothérapie, les cellules cancéreuses acquièrent souvent la capacité de contourner les mécanismes d'action des médicaments et résistent aux traitements, à l'origine d'échec thérapeutique. Cette résistance peut être due à différents facteurs comme l'altération du métabolisme ou des paramètres pharmacocinétiques, des défauts de pénétration ou d'accumulation de médicaments dans les cellules tumorales. La plupart des cellules tumorales présentent une forte expression des gènes de résistance de la famille ABC dont les gènes Multi Drug Resistance ou MDR (Loeb and Harris 2008).

Les cancers du foie et du pancréas sont classés parmi les cancers les plus fréquents et agressifs à travers le monde. Le cancer est une maladie restant souvent silencieuse pendant une longue période, son diagnostic étant souvent effectué lorsque la tumeur s'est propagée à d'autres organes. Vu les liens physiologiques et anatomiques entre le foie et le pancréas, les cellules tumorales pancréatiques possèdent la capacité de quitter le pancréas en passant dans la circulation sanguine pour former des métastases au niveau hépatique. La gemcitabine seule est une chimiothérapie standard pour les patients atteints d'un cancer du pancréas métastatique. La doxorubicine est un des anticancéreux standards dans le traitement du cancer hépatique avancé pour son action anti-tumorale. Cependant, ces molécules ont montré une efficacité insuffisante (Fan L. et al, 2010). De nombreuses combinaisons de gemcitabine ou de doxorubicine avec d'autres médicaments ont déjà été testées. Jusqu'à présent, aucune n'a montré d'avantages évidents, quant à l'allongement de

l'espérance de vie des patients. La communauté scientifique mondiale affirme que l'efficacité des médicaments anticancéreux est affectée par les activités des enzymes métaboliques, en particulier le cytochrome P450 et les transporteurs membranaires type SLC et ABC, et par l'environnement tumoral (Zanger et al, 2013). Les enzymes qui métabolisent les médicaments et les transporteurs membranaires jouent un rôle clé dans l'activation et la désactivation des médicaments et la détoxification de l'organisme (Sumantran V. et al, 2016). Dans notre projet, nous faisons l'hypothèse que l'efficacité des traitements du cancer (pancréatique et hépatique) est dépendante des médicaments anticancéreux à métabolisme hépatique essentiel et du microenvironnement de la tumeur. Notre projet étant ciblé sur le développement de modèles cellulaires appliqués au cancer hépatopancréatique, nous allons dans un premier temps, mettre en place et caractériser un nouveau modèle cellulaire hépatique humain présentant des propriétés spécifiques du foie *in vivo*.

De plus, afin de tenir compte de la structure spatiale de la tumeur et de l'environnement tumoral, nous allons dans un second temps, mettre en place les modèles cellulaires hépatique et pancréatique en 3D et comparer leur comportement par rapport aux cellules cultivées en 2D.

Enfin, dans une troisième partie, nous allons tester des molécules bioactives seules et en combinaison afin de proposer des pistes qui pourraient permettre d'optimiser l'activité des traitements anticancéreux pancréatiques et hépatiques dans un environnement 3D comparé au 2D.

I- Partie bibliographique

Chapitre 1: pancréas et foie: anatomie, physiologie et fonction

I. Le pancréas

I.1. Anatomie

Le pancréas est une glande digestive accessoire. Il est composé de trois parties distinctes : la tête qui correspond à la plus large partie, le corps, la partie horizontale qui s'étend en avant du rein gauche et la queue qui correspond à la partie terminale qui se prolonge jusqu'au bord de la rate (figure 1). Le pancréas présente une forme allongée qui mesure 15 cm pour une masse de 70 g (Beaugerie et al. 2014).

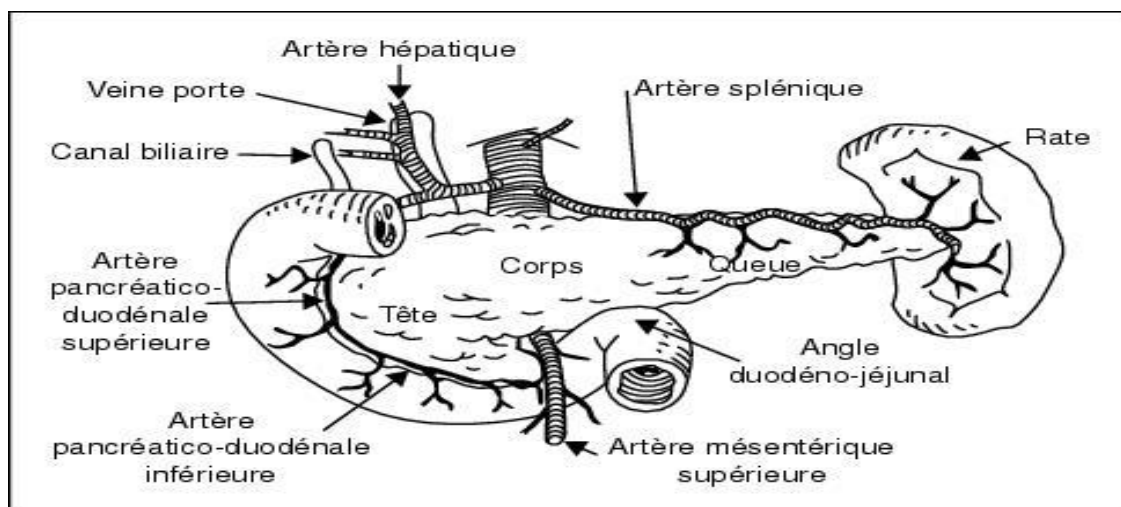


Figure 1 : Anatomie du pancréas (Beaugerie et al. 2014)

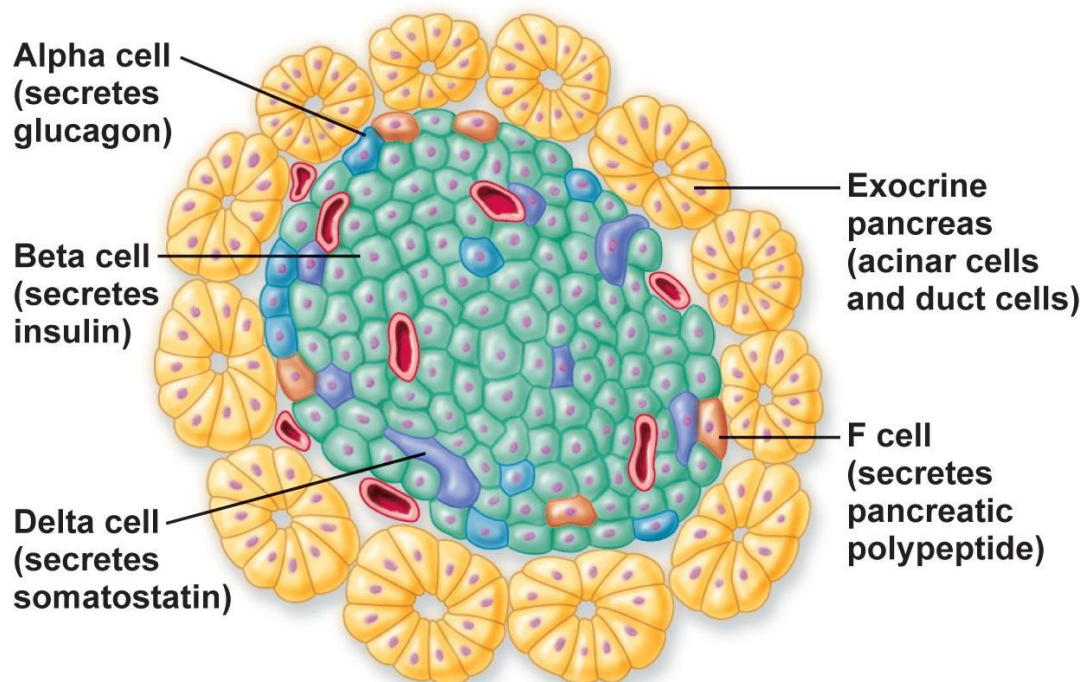
Le pancréas est une glande formée de deux parties : la première est exocrine; elle correspond à plus de 80 % de la masse du pancréas et joue un rôle important dans la digestion en libérant le suc pancréatique contenant des pro-enzymes et des électrolytes, en particulier, les bicarbonates. La deuxième partie est endocrine et contribue à la sécrétion systémique d'hormones qui jouent un rôle important dans le métabolisme cellulaire et surtout celui des glucides.

Le pancréas est traversé par le canal pancréatique principal : c'est le canal de Wirsung qui possède un diamètre de 1.5 à 2 mm. Ce canal joue un rôle dans le déversement des sucs pancréatiques dans le duodénum (Ludes and Jeltsch 2006).

I.2. Physiologie

I.2.1. Pancréas endocrine

Les îlots de Langerhans contenus dans le pancréas endocrine sont responsables de la sécrétion des hormones. Ce sont des amas cellulaires de 200 à 300 μm présentant une vascularisation très riche, ainsi qu'une forte innervation sympathique et parasympathique. Il existe quatre types cellulaires au sein des îlots : les cellules alpha qui sont localisées en périphérie des îlots et sécrètent le glucagon qui est responsable de l'hyperglycémie ; les cellules bêta formant 60 % à 70 % des îlots qui sont localisés dans le centre des îlots et sécrètent particulièrement l'insuline (responsable de la regulation du taux de glucose dans le sang); les cellules delta et les cellules F représentant 10 % des îlots et qui sécrètent respectivement la somostatine et le polypeptide pancréatique (figure 2) (Bardeesy and DePinho 2002).



(b)

© 2011 Pearson Education, Inc.

Figure 2: Aspect histologique du pancréas (Bardeesy and DePinho 2002)

1.2.1. Pancréas exocrine

Le pancréas exocrine est principalement composé des cellules acineuses. Ces cellules contribuent au processus de digestion des aliments par la sécrétion d'enzymes responsables de la dégradation des aliments en éléments simples. Ces enzymes sont sécrétées dans la lumière des acini, puis déversées dans des canaux excréteurs comme le canal de Wirsung qui se jette ensuite dans le duodénum.

Les cellules acineuses constituées de cellules centro-acineuses, de cellules stellaires et de cellules canalaire forment l'acinus, l'unité fonctionnelle du pancréas exocrine (figure 3). L'acinus regroupe ces cellules en grappe de raisin centrée autour du canalicule qui draine la sécrétion des hormones néo-synthétisées. Les cellules acineuses sont organisées et liées par des jonctions serrées qui assurent la communication entre les cellules.

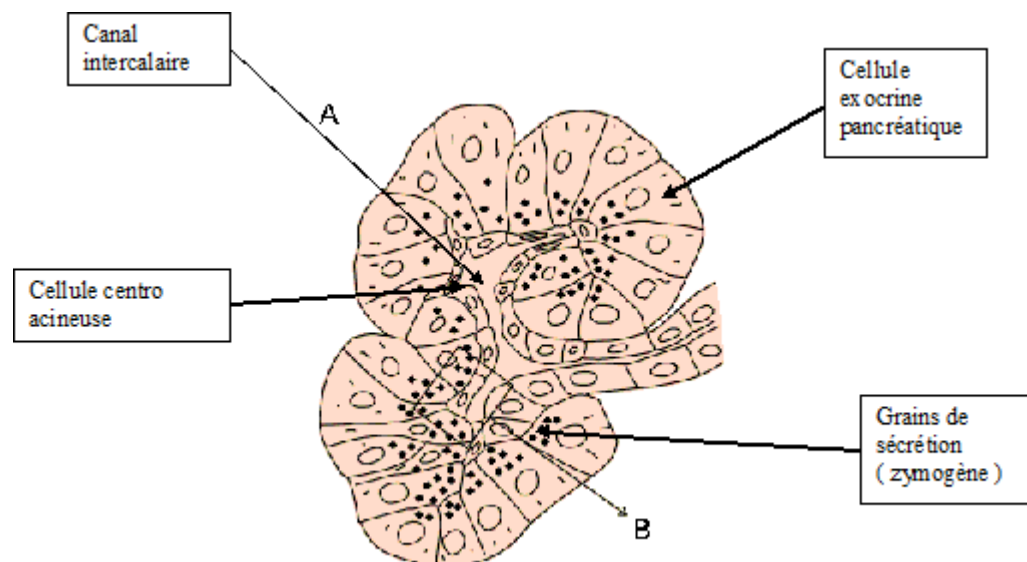


Figure 3: L'acinus du pancréas exocrine (Morisset 2008)

Le suc pancréatique joue un rôle essentiel dans la digestion puisqu'il est riche en enzymes activées dans le duodénum et en ions bicarbonates.

Ces enzymes contribuent à la dégradation des nutriments qui sont groupées en quatre grandes familles :

- Les protéases : trypsine, chymotrypsine, élastase, kalliciréine et carboxypeptidase
- Les enzymes glycolytiques : amylase et maltase
- Les enzymes lipolytiques : triglycérides lipase, carboxyl ester hydrolase et phospholipase A2
- Les nucléases : DNase et RNase.

La sécrétion de ces enzymes est stimulée par des hormones duodénales comme la sécrétine et la cholecystokinine. En plus, les hormones

pancréatiques endocrines jouent un rôle inhibiteur sur la sécrétion des enzymes pancréatiques (Morisset 2008).

II. Le foie

II.1. Structure et organisation fonctionnelle

Le foie est formé de deux parties séparées par le ligament falciforme, le lobe droit (2/3 du volume) et le lobe gauche (1/3 du volume) (figure 4). C'est un organe fortement vascularisé qui est alimenté par deux vaisseaux sanguins : l'artère et la veine porte hépatique qui se divisent en plusieurs branches pour alimenter toutes les parties du foie. La veine porte draine un sang pauvre en oxygène et riche en nutriments provenant de l'œsophage. Le sang sera évacué par la veine qui se retrouve dans la veine cave inférieure pour retourner au cœur.

Le foie contribue à une variété de fonctions dans l'organisme comme la digestion, la sécrétion de la bile et des composants du plasma, le stockage des vitamines et du sucre ainsi que la détoxification du sang. Le foie est un organe volumineux polyvalent qui joue un rôle important dans le métabolisme des protéines, des acides gras et des stéroïdes (LeCluyse et al. 2012).

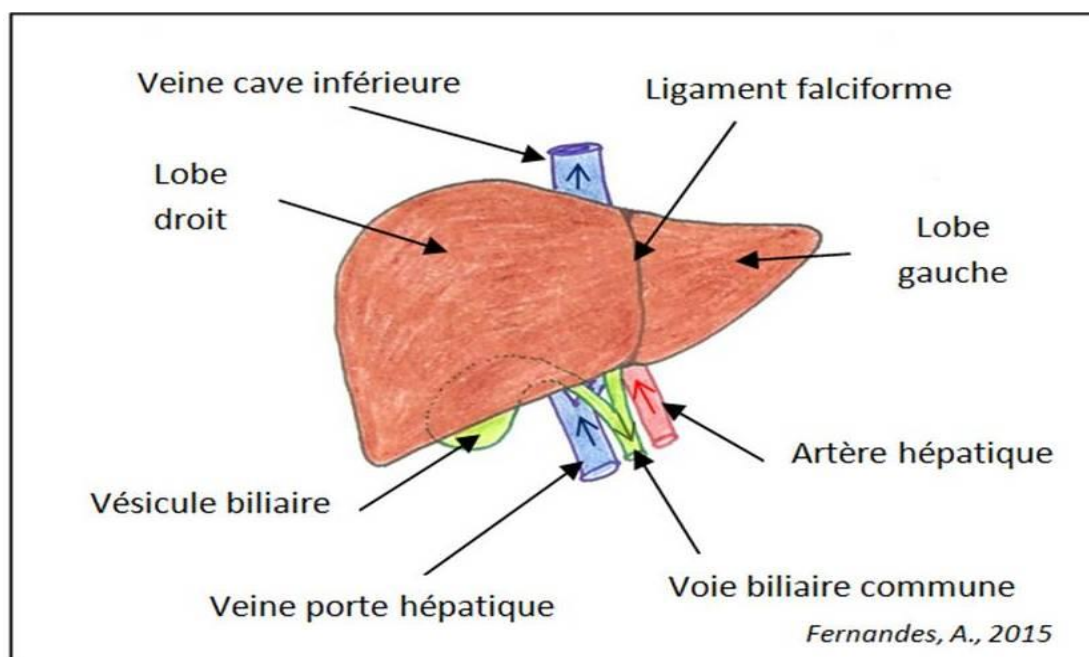


Figure 4 : Anatomie du foie (LeCluyse et al. 2012)

L'unité fonctionnelle du foie est appelée lobule hépatique qui est large de 1 à 2 millimètres. Chaque lobule est constitué de cellules hépatiques qui s'organisent suivant le trajet des voies biliaires, de la veine porte et de l'artère hépatique. Généralement, chaque lobule a la forme d'un hexagone

délimité par des triades portales (figure 5). Les cellules hépatiques s'organisent autour de la veine centrale qui est la structure centrale du lobule. Les lobules sont généralement séparés les uns des autres par les sinusoides hépatiques ou capillaires du foie qui se retrouvent enchâssés entre les cellules hépatiques afin de recueillir la bile sécrétée par les cellules (To and Id 2012). L'organisation d'un lobule hépatique est représentée dans la figure 6

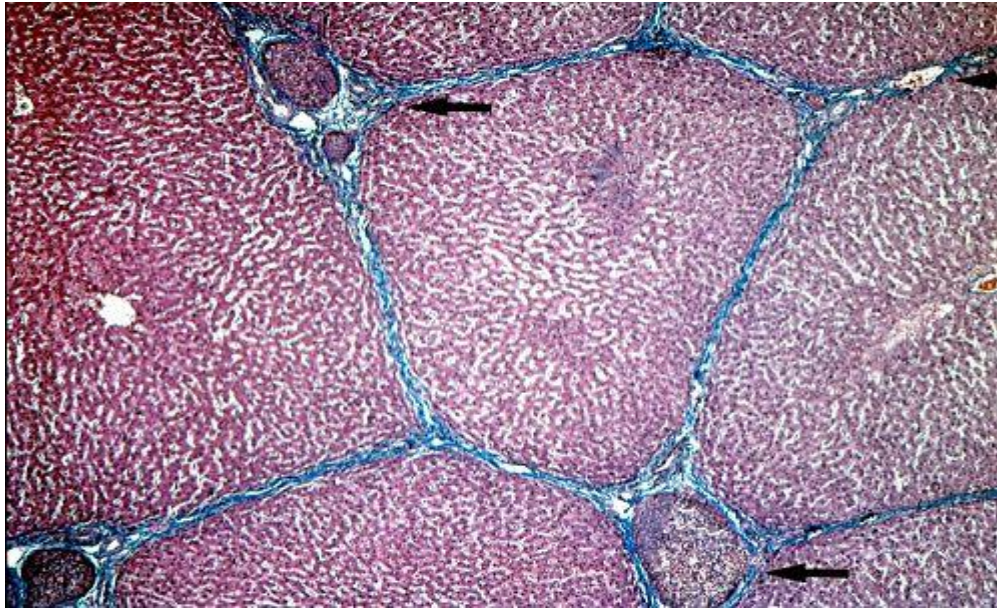


Figure 5 : *Coupe histologique d'un lobule du foie* (LeCluyse et al. 2012)

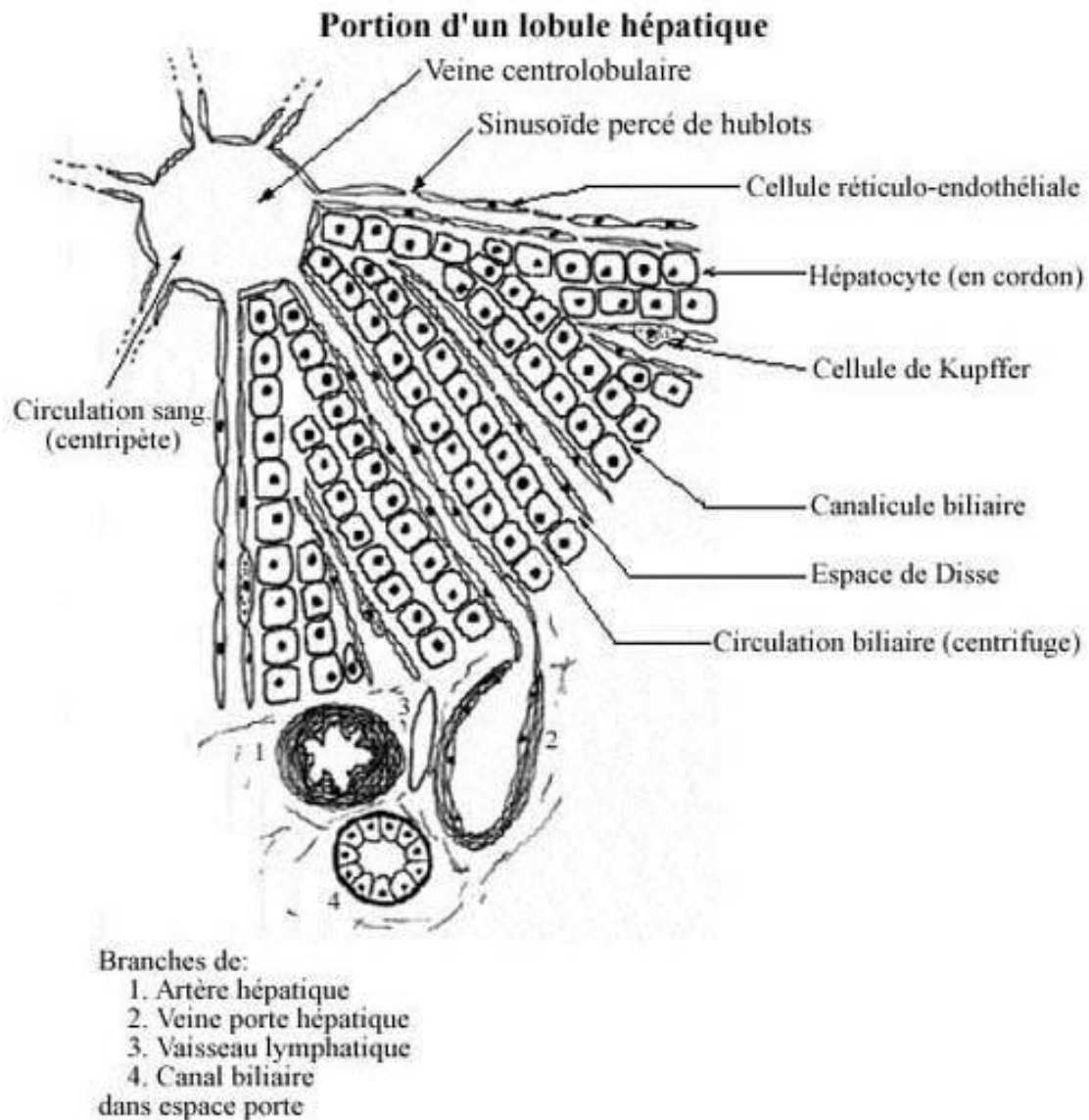


Figure 6 : Représentation schématique de l'organisation d'un lobule hépatique (To and Id 2012)

II.2. Zonation et fonction métabolique (Figure 7):

Au sein de chaque lobule, les cellules hépatiques présentent une zonation, chaque zonation ayant des expressions géniques et des fonctions métaboliques spécifiques. Pour répondre aux besoins métaboliques immédiats, l'expression des gènes peut varier au sein d'un lobule puisque cette zonation s'adapte à l'état nutritionnel de l'organisme. On distingue 3 zones dans chaque lobule de foie :

- Zone 1 : la région péri-portale qui joue un rôle dans le métabolisme oxydatif, la néoglucogenèse et l'uréogénèse.
- Zone 2 : la région médio-lobulaire qui est un mélange entre la zone 1 et 3
- Zone 3 : la région péricentrale qui présente une forte expression d'enzymes de la famille des cytochromes P450 (CYP450) comme le CYP3A4 qui joue un rôle important dans la glycolyse, la lipogenèse et le métabolisme des xénobiotiques (Benhamouche et al. 2006).

Par contre, les fonctions métaboliques hépatiques ne sont pas toutes zonées. Une grande partie des protéines sériques comme l'albumine et la transferrine est synthétisée dans tout le lobule hépatique.

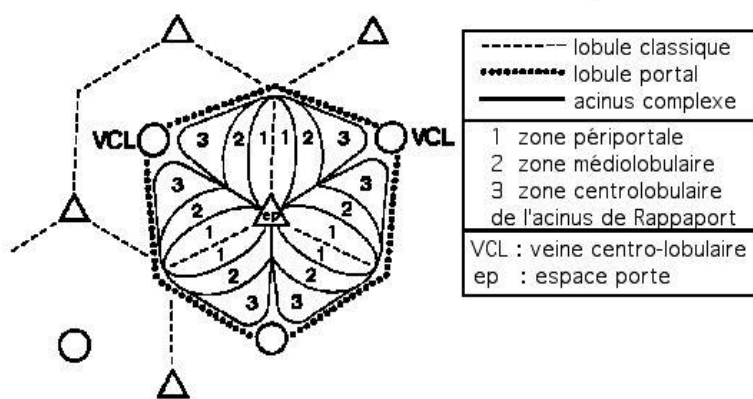


Figure 7 : Structuration d'un lobule du foie (Pastor and Suter 1999)

II.3. Les types cellulaires du foie

II.3.1. Les hépatocytes

Les hépatocytes représentent la majeure partie des cellules du foie (80% du volume du foie et 60% des cellules hépatiques) qui assurent la majeure partie des fonctions hépatiques. Ce sont des cellules épithéliales parenchymateuses, de forme polygonale de 20 à 30 μm de côté, organisées en travée et polarisées. La partie basale de ces cellules fait face aux sinusoides et la partie apicale participe à la formation des canalicules biliaires.

Ces cellules sont impliquées dans la plupart des fonctions métaboliques comme la biotransformation et l'élimination de la plupart des molécules endogènes et exogènes du sang vers les canalicules biliaires (Blouin and

Weibel 1977). De plus, les hépatocytes contribuent à la production et le transport de la bile qui est un flux osmotique d'eau dépendant essentiellement de la sécrétion des acides biliaires. Les hépatocytes présentent une hétérogénéité dans leur morphologie, leur fonction et leur biochimie, due à leur localisation au niveau des différentes zones hépatiques (Pastor and Suter 1999).

Les hépatocytes fonctionnels sont riches en organites cellulaires qui leur confèrent un grand pouvoir métabolique et fonctionnel. Ainsi, chaque cellule contient de nombreuses mitochondries (1000 à 2000/cellule) responsables de la production d'énergie via le cycle de Krebs. De plus, la présence extensive de réticulum endoplasmique rugueux ou granuleux (REG) et de réticulum endoplasmique lisse (REL) dans le cytoplasme hépatique leur donne plusieurs fonctions importantes au niveau de la synthèse des protéines, de la néoglucogénèse et du métabolisme de substances endogènes et exogènes (via des enzymes de phase 1 comme les CYP450 ou des enzymes de phase secondaire comme les transférases type UDPGT). Le cytoplasme d'un hépatocyte contient également une grande quantité de lysosomes, de peroxysomes et d'appareils de Golgi, ces derniers étant situés près des canalicules biliaires.

Ainsi, l'hépatocyte contribue au métabolisme du glycogène, à la synthèse de protéines et des lipoprotéines plasmatiques, à la synthèse et à la sécrétion de la bile, à la destruction de globules rouges et à la détoxification des déchets métaboliques et au métabolisme des médicaments.

II.3.2. Les cellules endothéliales sinusoidales

Les cellules endothéliales sinusoidales représentent 20% des cellules du foie. Ces cellules sont localisées sur la paroi des sinusoides hépatiques qui sont caractérisées par des pores de 50 à 200 nm permettant la diffusion de nombreuses molécules endogènes ou exogènes tout en améliorant leur transport passif entre le sang et la surface basolatérale des hépatocytes.

Les cellules endothéliales sinusoidales possèdent une faible activité métabolique par rapport aux hépatocytes qui présentent des enzymes de phase I et II. Ces cellules contribuent au métabolisme et à l'élimination de certaines substances endogènes et exogènes.

Les cellules endothéliales sinusoidales sont des cellules présentatrices d'antigènes, ce qui leur permet de jouer un rôle dans l'immunité hépatique extracellulaire (LeCluyse et al. 2012).

II.3.3. Les cholangiocytes

Les cholangiocytes ou cellules des canaux biliaires représentent 5 % des cellules du foie. Ce sont des cellules épithéliales qui couvrent les conduits biliaires. Les cholangiocytes présentent une hétérogénéité dans la morphologie, l'expression des gènes, la sécrétion et la réponse aux cytokines, aux peptides, aux hormones ou aux autres facteurs.

Les cellules des canaux biliaires jouent un rôle important dans la régulation de production de la bile par l'intermédiaire de la sécrétion des bicarbonates dans les canalicules et dans les voies biliaires, ainsi que dans l'absorption et la sécrétion de l'eau, des lipides, des électrolytes, des anions et des cations organiques. En plus, ces cellules sont impliquées dans la réabsorption de certains constituants biliaires comme le glucose.

Ces cellules jouent un rôle important dans la régulation des réponses immunitaires hépatiques par des cytokines et d'autres médiateurs. De plus, par l'expression de molécules d'adhésion à leur surface, les cholangiocytes peuvent interagir directement avec certaines cellules immunitaires (Glaser et al. 2009).

II.3.4. Les cellules de Kupffer

Les cellules de Kupffer sont des cellules endothéliales macrophagiques de forme étoilée, situées dans les parois des sinusoides hépatiques, et possédant des propriétés phagocytaires. Elles sont en général au contact des cellules endothéliales mais peuvent avoir de longues extensions cytoplasmiques qui atteignent les hépatocytes en passant entre les cellules endothéliales

Les cellules de Kupffer contribuent à l'élimination des débris cellulaires, des endotoxines bactériennes et de certains complexes macromoléculaires par certaines voies lysosomales. En plus, elles contribuent à l'activation des lymphocytes T en réponse à une inflammation ou une infection. Ces cellules sont impliquées dans le contrôle de la réponse immunitaire tout en supprimant la prolifération et l'activation des cellules immunitaires. De plus, les cellules de Kupffer sont impliquées dans la sécrétion de certains médiateurs de la signalisation cellulaire comme les ROS, TNF-alpha, prostaglandines ou autres.

L'activité métabolique des hépatocytes peut être modulée, via la sécrétion de diverses cytokines telles que les IL-1 et IL6, par les cellules de Kupffer (Sunman et al. 2004). Cette production de cytokines induit l'expression des protéines qui provoquent la suppression des gènes qui jouent un rôle dans

le métabolisme et l'élimination des xénobiotiques comme les Uridine Di-Phospho Glucuronyl Transférases (UDPGT) et des Cytochromes P450 (CYP450) (Wu et al. 2006) (S. Higuchi et al. 2007).

II.3.5. Les cellules stellaires

Les cellules stellaires ou cellules de Ito sont localisées dans l'espace perisinusoidal, entre des cellules endothéliales sinusoidales et la surface basolaterale des hépatocytes. Leurs très longs prolongements cytoplasmiques entourent complètement plusieurs capillaires sinusoides adjacents. Dans leur cytoplasme, se trouvent des globules lipidiques contenant de la vitamine A. Ces cellules contribuent ainsi au stockage de la vitamine A. Ces cellules peuvent occasionnellement avoir des contacts étroits avec les hépatocytes. Ces cellules secrètent des cytokines et des facteurs de croissance nécessaires pour la communication intercellulaire dans le foie. Par contre, ces facteurs sont différents selon si l'état du foie est sain ou malade. Les cellules de Ito synthétisent une protéine responsable du caractère contractile des cellules.

Les cellules stellaires contribuent aussi au contrôle et à la production de la matrice extracellulaire ; elles contribuent à la sécrétion et à la production de différents collagènes (collagène de type I en très grande quantité par rapport à la quantité de collagène de type II), ainsi qu'à la production de grandes quantités d'élastine et de protéoglycanes.

Ces cellules jouent un rôle dans l'inflammation hépatique par le recrutement des leucocytes au foie et par la sécrétion de certains médiateurs inflammatoires comme les IL8, IL6 et CCL2 (Friedman 2006).

II.4. Détoxification des xénobiotiques par l'organisme

Dans l'organisme, le cheminement d'un xénobiotique s'effectue en quatre étapes: l'absorption, la distribution, le métabolisme et l'excrétion (ADME). Le foie est le siège majeur du processus de biotransformation ou le métabolisme des xénobiotiques. Plus précisément, la biotransformation est effectuée par les hépatocytes en 4 phases transformant le xénobiotique lipophile en molécule plus hydrophile donc plus facilement éliminable par les émonctoires habituels que sont les urines (via les reins) et les selles via la bile et le foie) et l'air expiré (via les poumons). Le xénobiotique entre dans la cellule par diffusion passive ou via des transporteurs de type glycoprotéine P (P-gp) (et son entrée peut être limitée également par des transporteurs d'efflux (Figure 8). C'est la Phase 0. Puis la molécule, dans la cellule, et en particulier la cellule hépatique (riche en équipement enzymatique) va subir des réactions de phase I ou de fonctionnalisation. Il s'agit de réactions d'oxydation, de réduction et d'hydrolyse. Principalement, les réactions d'oxydation de phase I se réalisent par l'intermédiaire des CYP450. Ensuite, les xénobiotiques subissent des réactions de Phase II ou phase de conjugaison assurée par des enzymes appelées des transférases (les Glutathion-S-transférases ou GSTs, les UDP-glucuronyl-transférases UGTs, les acyl-CoA transférases, les méthyl transférases, les sulfotransférases ou SULT, les N-acétyl transférases ou NAT). Enfin, les xénobiotiques subissent une phase III qui correspond à l'excrétion de dérivés conjugués hors des cellules par l'intermédiaire de transporteurs membranaires comme les MRPs (Multi Resistance Associated proteins) (Thomas, Brown, and Beddington 1998).

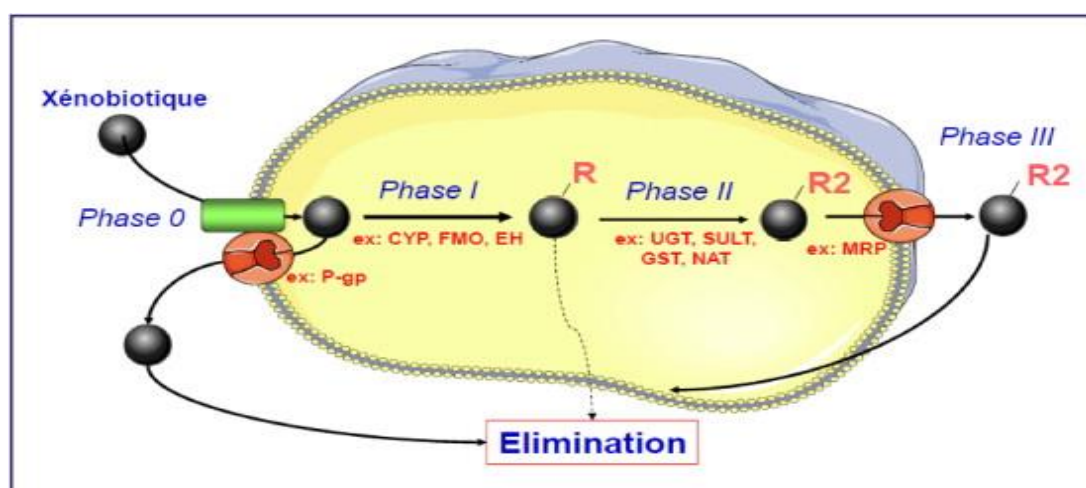


Figure 8: Schéma représentant la biotransformation des xénobiotiques dans un hépatocyte (Fardel 2014)

II.4.1. L'absorption

Le processus d'absorption consiste au passage d'une molécule dans la circulation du sang et au site d'action à partir de son site d'administration. Les voies principales d'absorption de ces molécules sont cutanées, pulmonaires ou digestives via le tractus gastro-intestinal. L'absorption extravasculaire nécessite le passage d'au moins deux barrières successives avec pénétration de la molécule du milieu extérieur vers le liquide interstitiel et la résorption du liquide interstitiel vers le liquide circulant. Après résorption et passage de la barrière gastro-intestinale, la molécule va se retrouver dans les entérocytes puis par la veine porte, dans le foie où elle pourra être métabolisée par les enzymes intestinales et hépatiques. Ce sont les effets de premier passage. La molécule atteindra ensuite le cœur et le poumon (où elle peut être aussi métabolisée) pour se retrouver dans la circulation artérielle à partir de laquelle elle atteindra les tissus cibles ou les organes excréteurs (foie ou reins) pour être éliminée. Les xénobiotiques traversent les barrières biologiques ou les membranes cellulaires grâce à différents types de transport pour pouvoir atteindre la circulation sanguine.

La membrane cellulaire qui protège les cellules, contribue au contrôle du passage des molécules vers le milieu interne des cellules. Au travers de cette membrane, on peut distinguer plusieurs modes de transport : i) la diffusion passive ne nécessitant pas d'énergie ; ii) la diffusion facilitée nécessitant seulement de l'énergie requise pour le maintien de la membrane et iii) le transport actif, primaire ou secondaire, nécessitant un apport d'énergie (Figure 9).

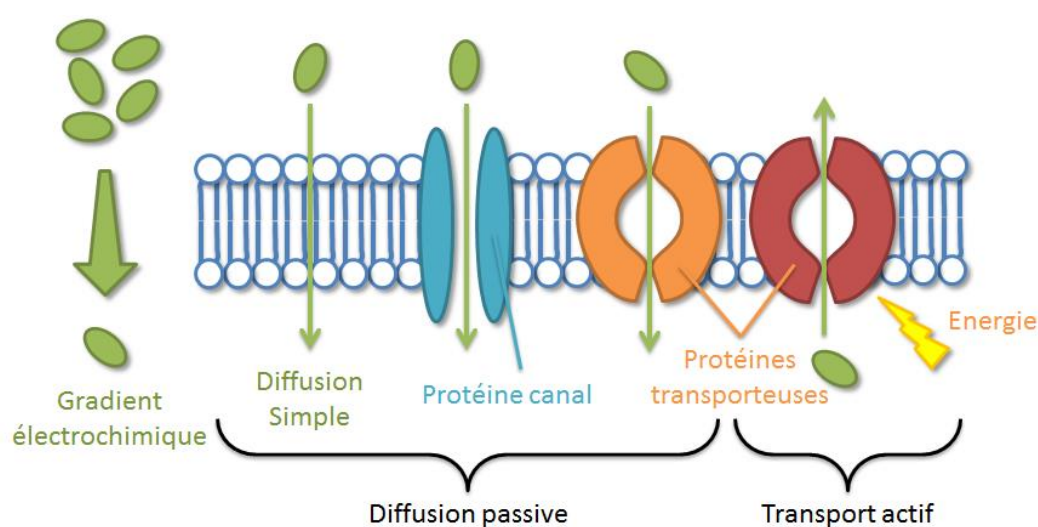


Figure 9: Différents mécanismes de transport cellulaire (Fardel 2014)

II.4.1.1. Diffusion simple ou diffusion passive

La diffusion simple et passive permet le passage des molécules dans le sens d'un gradient de concentrations et ne nécessite pas d'énergie ni de transporteur. La diffusion simple est possible si la molécule est hydrophobe et soluble dans la membrane phospholipidique pour pouvoir traverser la bicouche lipidique (J.Baertschi 2005). Ce mode de transport est utilisé généralement au niveau du tractus gastro-intestinal et de la peau. Ce mécanisme nécessitant la dissolution des molécules dans la couche phospholipidique pour traverser la membrane, est considéré comme lent par rapport à la diffusion facilitée (Viau 2002). Ce transport par diffusion passive au travers de la membrane intestinale est le mécanisme principal des médicaments administrés par voie orale.

II.4.1.2. Diffusion facilitée

La diffusion facilitée assure le passage d'une molécule au travers d'une membrane dans le sens d'un gradient de concentrations, par l'intermédiaire de transporteurs transmembranaires qui sont des canaux ioniques ou des protéines porteuses appelées perméases. Cette diffusion est spécifique pour certaines molécules ayant une analogie structurale, ce qui augmente la possibilité des interactions médicamenteuses (Silbernagl and Despopoulos 2013). Les perméases sont impliquées dans les mécanismes de co-transport qui sont des mécanismes actifs secondaires car ils sont associés à des transports actifs primaires comme les pompes à protons. Certaines perméases transportent 2 molécules en même temps et dans le même sens. Ce mécanisme est appelé co-transport unidirectionnel ou symport. D'autres perméases transportent simultanément 2 molécules dans le sens opposé. Ce mécanisme est appelé co-transport bidirectionnel ou antiport. Le fonctionnement de la perméase dépend ainsi d'une pompe à protons active ATP dépendant.

II.4.1.3. Transport actif

Le transport actif est le passage d'une molécule à travers une membrane cellulaire contre un gradient de concentration. Ce passage exige la présence d'énergie qui peut être assurée par l'hydrolyse d'un nucléotide triphosphate comme l'ATP (figure 10). Ce transport se fait par l'intermédiaire d'une protéine transporteuse appartenant à la famille des ATP Binding Cassette (ABC). En général, au niveau intestinal, les xénobiotiques utilisent ce mode de transport dans le sens de l'efflux pour

faire ressortir le médicament dans la lumière intestinale. Dans le foie, ces transporteurs sont situés au niveau du canalicule biliaire pour permettre à la molécule d'être sécrétée dans la bile. Parmi les transporteurs ABC impliqués dans l'efflux et le transport des médicaments chez l'homme, on retrouve la glycoprotéine P (P-gp) ou MDR1 (MultiDrug Resistance) ou ABCB1, les MRP (Multi Resistance associated Protein) ou ABCC et les BCRP (Breast cancer Protein) ou ABCG2. Ces transporteurs sont exprimés dans les tissus sains mais sont également très fortement exprimés dans les cellules cancéreuses, expliquant en partie les échecs et la résistance des cellules tumorales aux chimiothérapies. Les transporteurs ABC empêchent le médicament anticancéreux d'atteindre la tumeur en transportant les médicaments hors de la cellule (Kruh and Belinsky 2003) (Xia and Smith 2012).

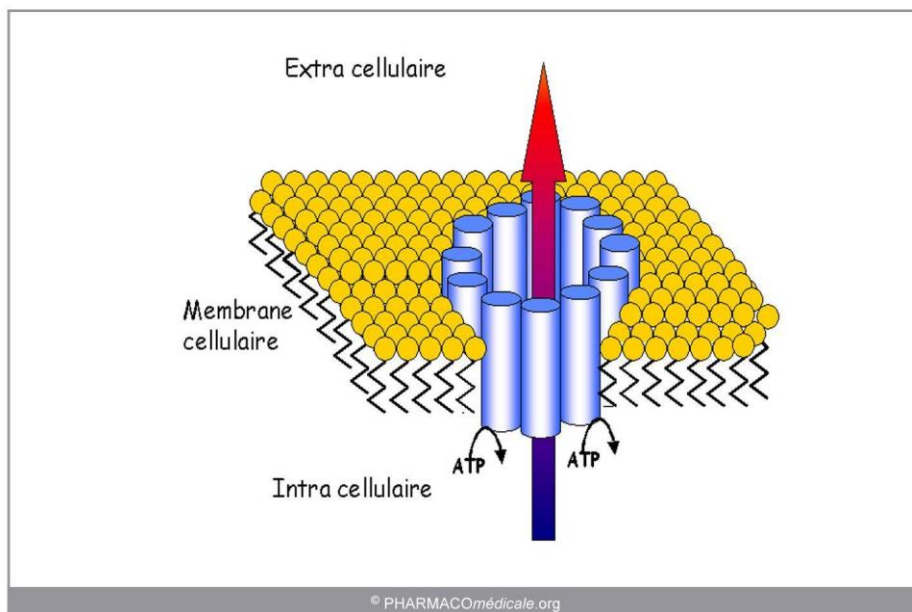


Figure 10 : Transport actif par les transporteurs d'efflux ATP dépendant (Fardel 2014)

II.4.1.4. L'endocytose

Les grosses molécules ou certaines particules insolubles comme quelques médicaments ayant une masse molaire élevée possèdent un type de transport cellulaire spécialisé, l'endocytose. Ce type de transport nécessite l'implication des processus d'invagination de la membrane cellulaire (Custodio and Benet 2008).

II.4.2. La distribution

Arrivées dans le sang, les molécules vont se lier aux érythrocytes (en se fixant à la membrane du globule rouge ou à ses constituants comme l'anhydrase carbonique) et aux différentes protéines plasmatiques comme l'albumine, l'alpha 1 glycoprotéine acide appelée aussi orosomucoïde, les globulines (alpha, beta, gamma) ou les lipoprotéines. Les liaisons sont réversibles. L'albumine plasmatique représente un site de stockage pour les médicaments qui ont la capacité à se fixer fortement à cette protéine.

Après passage dans la circulation sanguine, les xénobiotiques sous forme libre sont distribués dans les organes et les tissus soit pour exercer leurs effets, soit pour être éliminés. L'affinité des xénobiotiques pour les tissus ou les organes, leur capacité à diffuser vers les cellules des organes ou les tissus et le débit sanguin des organes sont des facteurs importants pour la distribution des xénobiotiques dans l'organisme. L'affinité des xénobiotiques pour les tissus dépend de la composition des tissus et de leurs caractéristiques physico-chimiques. Le passage de ces molécules vers les tissus dépend particulièrement de la capacité des membranes à agir comme des barrières biologiques permettant aux molécules lipophiles de passer les membranes. Les liaisons aux protéines plasmatiques réversibles contribuent à limiter la distribution de ces xénobiotiques en dehors du compartiment vasculaire. La distribution des xénobiotiques peut être dépendante d'autres facteurs comme l'âge, l'hydratation, l'état physiopathologique ou le rapport masse maigre / tissu adipeux (Shitara, Horie, and Sugiyama 2006).

II.4.3. Le métabolisme

Le métabolisme ou biotransformation est la modification chimique des xénobiotiques, réalisée par les enzymes, afin de les rendre plus hydrosolubles et plus facilement éliminables. Ces molécules biotransformées sont appelées des métabolites qui sont soit actifs, soit inactifs, soit toxiques. Le métabolisme se réalise généralement dans le foie mais peut avoir lieu dans d'autres tissus (intestin, poumons, reins, cerveau, sang, placenta). Lors de la biotransformation des xénobiotiques, on peut distinguer deux types de réactions enzymatiques : les réactions de phase I et les réactions de phase II (Figure 8)

II.4.3.1. Les réactions enzymatiques de phase I

La phase I ou phase de fonctionnalisation contribue à la formation de métabolites qui peuvent être éliminés selon leur degré d'hydro-solubilité ou qui peuvent poursuivre leur biotransformation par des enzymes de phase II pour être éliminés.

Les réactions de phase I sont des réactions de réduction, d'hydrolyse ou d'oxydation. Les réactions d'oxydation sont catalysées principalement par les cytochromes P450. Ces enzymes nécessitent de l'oxygène moléculaire et du NADPH (cofacteur) pour fonctionner.

Les cytochromes P450 (CYP450) sont des complexes moléculaires identifiés comme étant des hémoprotéines qui catalysent plus de 90% des réactions d'oxydation. Les CYP450 contribuent à la détoxification des cellules permettant d'éliminer de nombreuses molécules exogènes (médicaments ou xénobiotiques) par métabolisme et parfois participent à l'activation de certaines de ces molécules (si les métabolites sont actifs). Ces enzymes possèdent également un rôle essentiel dans le métabolisme l'élimination et la synthèse de molécules endogènes comme la vitamine D, les hormones stéroïdiennes et les acides biliaires (Tableau 1).

Les CYP450 catalysent plusieurs types de réactions d'oxydation : hydroxylation, N-et S-oxydation et N- et O-déalkylation.

Tableau 1: Fonctions métaboliques des familles de Cytochrome
(Guéguen et al. 2006)

Cytochrome P450	Fonctions métaboliques
CYP1	Métabolisme des xénobiotiques et des stéroïdes
CYP2	Métabolisme des xénobiotiques et des stéroïdes
CYP3	Métabolisme des xénobiotiques et des stéroïdes
CYP4	Métabolisme des acides gras, eicosanoïdes, acide arachidonique et médicaments
CYP5	Thromboxane A2 synthase
CYP7	Synthèse des acides biliaires
CYP8	Synthèse des acides biliaires, prostacycline synthase
CYP11	Stéroïdogénèse
CYP17	Stéroïde 17-alpha hydroxylase
CYP19	Aromatase (synthèse des œstrogènes)
CYP21	Stéroïdogénèse, stéroïde 21-hydroxylase
CYP24	Dégradation de la vitamine D, vitamine D-24 hydroxylase
CYP26	Hydroxylation de l'acide rétinoïque
CYP27	Synthèse des acides biliaires, hydroxylations de la vitamine D3
CYP39	7 α -hydroxylation du 24S-hydroxycholestérol
CYP46	Cholestérol 24S-hydroxylase
CYP51	Lanostérol 14-alpha déméthylase (biosynthèse du cholestérol)

a. Multiplicité des CYP450 :

Les cytochromes P450 désignés par les lettres CYP sont classés en familles, sous-familles et gènes. Les familles sont désignées par un chiffre (1, 2 etc.), les sous familles par une lettre (A, B, C, etc.) et les gènes par un autre chiffre (Marie 2013).. Le génome humain code 57 protéines CYP450 qui métabolisent beaucoup de médicaments mais aussi des substances endogènes. Il existe plus de 18 familles de CYP450 humains d'intérêt classées en fonction du degré d'homologie dans leur séquence d'acides aminés. Pour le métabolisme des xénobiotiques, seules quatre familles sont impliquées (1, 2,3 et 4).

Le CYP3A4 (50%), CYP2D6 (30%), CYP2C9 (10%), CYP2C19, CYP2E1, CYP2B6, CYP2J2, CYP1A2, CYP3A5 et à un moindre degré, les CYP4F2 et CYP4F3 sont impliqués dans la quasi-totalité du métabolisme des médicaments chez l'homme (Antolino-Lobo et al. 2011) (Soars et al. 2007) (figure 20). Sur l'ensemble de ces CYP, six d'entre eux sont impliqués dans 90% des médicaments chez l'homme : CYP3A4, CYP3A5, CYP2D6, CYP2C9, CYP2C19 et CYP1A2 et les CYP3A4 et CYP2D6 sont les plus fortement impliqués avec respectivement 50% et 30% du métabolisme des médicaments. La sous famille CYP4F a été plus récemment découverte. Elle comprend 5 membres : Les CYP4F2, CYP4F3, CYP4F8, CYP4F11 et CYP4F12. Cette sous famille CYP4F est impliqué dans le métabolisme des médicaments (pafuramide et fingolimod) mais également dans celui de substances endogènes (acide arachidonique, leucotriènes 4) et des vitamines (K1 et E).

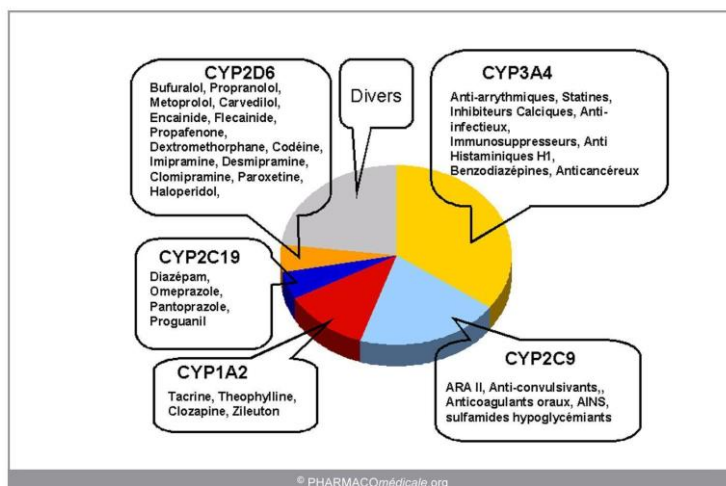


Figure 11: Répartition des CYP en pourcentage de métabolisme des médicaments dans le foie (Guéguen et al. 2006)

b. Localisation des CYP450

A l'exception des os, les globules rouges et les muscles, les CYP450 sont présents dans tous les tissus de l'organisme humain. Les CYP450 qui jouent un majeur rôle dans le métabolisme des xénobiotiques sont localisées principalement au niveau du foie, dans le réticulum endoplasmique (microsomes) des hépatocytes (Krishna and Klotz 1994). Les CYP450 sont également exprimés dans les entérocytes (intestin), dans les cellules Clara et les pneumocytes (poumons), dans les cellules tubulaires proximales des reins, dans le cerveau et dans la peau.

c. Régulation

Les xénobiotiques peuvent induire l'expression de la plupart des CYP450. L'induction des CYP450 est sous le contrôle de récepteurs nucléaires (Figure 12) (Tien and Negishi 2006)

- *L'AhR (Aryl hydrocarbon Receptor)* est un récepteur cytoplasmique qui se trouve sous forme d'un complexe constitué de plusieurs protéines HSP90, AIP et p23. L'activation de ce récepteur par certaines molécules comme la dioxine contribue à son déplacement dans le noyau pour s'hétéro-dimériser avec la protéine ARNT. La fixation de l'hétérodimère sur la séquence des promoteurs de certains gènes comme les CYP1A peut moduler l'activité de ces gènes (Y. A. Wang et al. 2010).
- *Les PPAR (Peroxisome Proliferator Activated Receptors)* sont des récepteurs nucléaires hormonaux dont certains d'entre eux peuvent être activés par des ligands exogènes comme le PPAR alpha (Michalik et al. 2006). Ce dernier contribue à la synthèse des cétones, stimule la gluconéogenèse et active le catabolisme des acides gras. Egalement, ce récepteur peut jouer un rôle dans le contrôle de la régulation post-transcriptionnelle des CYP450.
- *Le PXR (Pregnane X Receptor)* est un récepteur nucléaire exprimé principalement dans le foie, l'intestin et le colon. Ce récepteur peut être activé soit par des molécules endogènes (stéroïdes) soit par des molécules exogènes (la rifampicine, l'hyperforine, le phénobarbital). Après activation, le PXR s'hétérodimérise dans le noyau avec le récepteur des rétinoïdes (RXR). Cette activation contribue à l'induction principalement des CYP3A mais aussi d'autres gènes CYP450 comme les CYP2B6 et CYP2C9 et d'autres gènes tels que MDR1 (Wang et al. 2012).
- *Le CAR (Constitutive Androstane Receptor)* est un récepteur nucléaire qui peut être activé soit par des molécules endogènes, soit par des molécules exogènes (phénobarbital). Après activation, le CAR s'hétérodimérise dans le noyau avec le récepteur des rétinoïdes (RXR). Cette activation contribue à l'induction de certains CYP comme CYP2B6, CYP2C9 et CYP2C19 (Haines et al. 2018). Ces récepteurs nucléaires CAR et PXR sont des médiateurs de

l'activation transcriptionnelle des gènes codant pour les CYP450 sous l'effet de médicaments comme le phénobarbital. Le CAR et le PXR généralement possèdent des activités coordonnées ; ils peuvent aussi être la cause d'interactions médicamenteuses indésirables ou être à l'origine de certaines perturbations endocriniennes (Michalik et al. 2006).

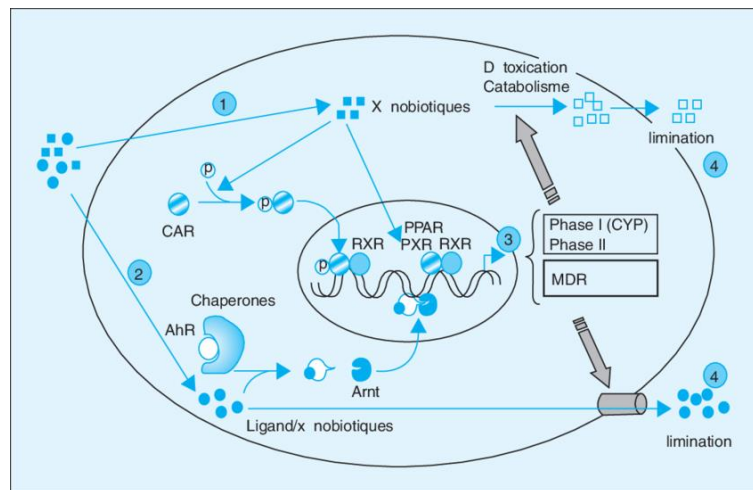


Figure 12: Voie de régulation des transporteurs et des cytochromes par les récepteurs nucléaires (Guéguen et al. 2006)

II.4.3.2. Les enzymes de phase II

Les réactions de phase II sont généralement des réactions de conjugaison ayant pour but d'augmenter l'hydrosolubilité des xénobiotiques. Ces réactions sont plus rapides que celles de phase I. Les xénobiotiques ou les métabolites de phase I sont les substrats des réactions de conjugaison (figure 13). Pour être fonctionnelles, les enzymes (transférases) ont besoin de cofacteurs. On peut distinguer plusieurs types de réactions de conjugaison :

- Glucuroconjugaisons : Transférase : UDP-glycosyltransférases et cofacteur : UDPGA (acide UDP glucuronique)
- Sulfoconjugaisons : transférase et cofacteur : PAPS (3'-phosphoadénosine 5'-phosphosulfate)
- Conjugaisons avec le glutation (glutathion S-transférases)
- Conjugaisons avec des acides aminés qui peuvent être des glycines, taurines, acides glutamiques (acyltransférases) et cofacteur : S-acyl-CoA
- Acétylations (N-acétyltransférases) et cofacteur : Acétyl CoA
- Alcoylations (N ou O-méthyltransférases) et cofacteur : S adenosyl

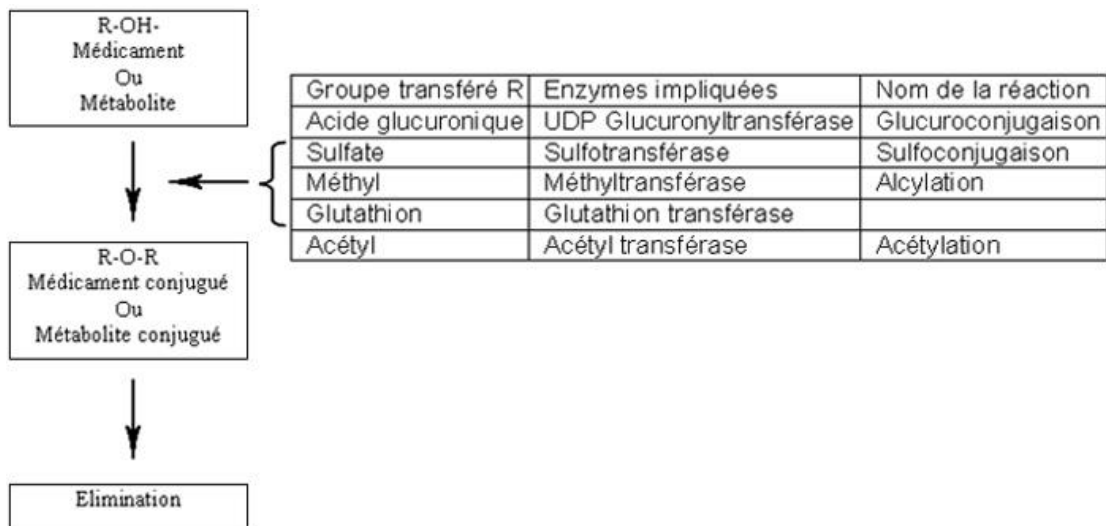


Figure 13: Métabolisme des xénobiotiques par les enzymes de la phase II (Guéguen et al. 2006)

Généralement, la biotransformation des xénobiotiques peut être modifiée par certains phénomènes comme l'induction ou l'inhibition enzymatique. Certains médicaments ou xénobiotiques possèdent la capacité de moduler le métabolisme d'autres substances métabolisées par les mêmes enzymes (ex : hétéroinhibition par compétition enzymatique sur un même CYP450 ou hétéroinduction) ou de moduler leur propre métabolisme (on parle d'auto-inhibition ou d'auto-induction) (Westerink and Schoonen 2007).

II.4.4. L'élimination et l'excrétion

Les xénobiotiques et leurs métabolites s'éliminent essentiellement dans les urines (élimination rénale) et via le foie, dans la bile avec passage dans l'intestin et élimination dans les selles ou recirculation dans l'organisme par le biais du cycle entéro-hépatique. Il existe également, une élimination pulmonaire qui concerne les produits volatiles, une élimination salivaire (qui peut être non négligeable pour certaines molécules), lacrymale, sudorale et dans le lait maternel.

L'élimination rénale a lieu au niveau du glomérule (filtration glomérulaire) et au niveau tubulaire (sécrétion et réabsorption tubulaires). Le glomérule se comporte comme un filtre non sélectif de nature semi-perméable, qui laisse passer toutes les substances dont le poids moléculaire est inférieur à 65000 daltons. L'albumine dont le poids est supérieur n'est donc pas filtrée et donc seules les molécules sous forme non liée aux

protéines plasmatiques seront filtrées. La filtration glomérulaire est un mécanisme de diffusion passive dans le sens du gradient de concentration. Les xénobiotiques et leurs métabolites hydrosolubles sont éliminés par cette voie. La réabsorption tubulaire concerne en général, les molécules non ionisées au pH de l'urine (qui est normalement acidifiée) : elle se fait dans le sens du gradient de concentration. La sécrétion tubulaire au niveau du tube contourné proximal contribue à l'élimination des molécules hydrosolubles ionisées au niveau des tubules rénaux. Cette sécrétion tubulaire implique un transport spécifique actif. Pour ce phénomène, plusieurs transporteurs peuvent être impliqués comme les MDR1 et les MRPs.

Les molécules peuvent également être éliminées par voie biliaire. Généralement, ce phénomène concerne les métabolites à haut poids moléculaire et hydrophiles (avec des groupements polaires), surtout les conjugués glucuronidés.

Les métaux lourds comme le mercure peuvent être excrétés par la salive ou même par les cheveux.

Les molécules volatiles peuvent être éliminées par l'air exhalé des poumons dans le cas où leurs concentrations tissulaires est en équilibre avec leurs concentrations sanguines.

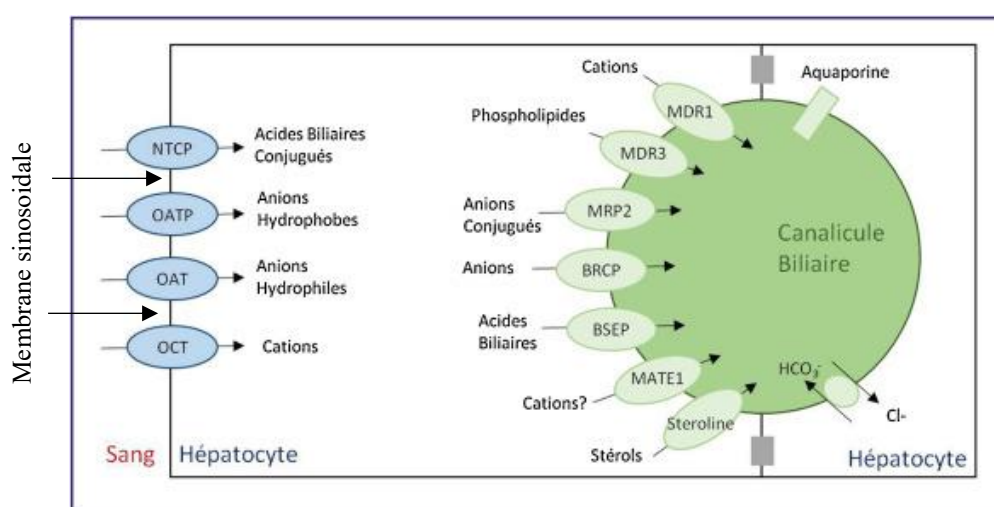
Certains produits liposolubles comme le DDT (Dichlorodiphényltrichloroéthane) et certains médicaments comme l'aspirine peuvent être détectés également dans le lait maternel (Shitara, Horie, and Sugiyama 2006).

Lors des études pharmacocinétiques et toxicologiques de nouveaux médicaments, les chercheurs essaient de connaître leur devenir dans l'organisme et leur impact sur certains tissus précis (organes cibles). Généralement, pour une grande partie des médicaments, les organes cibles étudiés sont surtout le foie, l'intestin et les reins. Particulièrement, comme le foie est l'organe majeur du métabolisme de la majorité des médicaments et des xénobiotiques, cet organe fait l'objet de très nombreuses études (Viau 2002) (Williams and Iatropoulos 2002).

II.5. Rôle des transporteurs dans le métabolisme et l'élimination des xénobiotiques

Les transporteurs membranaires jouent un rôle important dans les différentes phases ADME (Absorption, Distribution, Métabolisme, Elimination) de la pharmacocinétique des médicaments dans le passage des

membranes biologiques. Dans le foie, les transporteurs membranaires jouent un rôle vital dans le passage des médicaments à l'intérieur de l'hépatocyte via la membrane sinusoidale, et lors des étapes de métabolisme et également dans leur excrétion biliaire via les canalicules biliaires (figure 14) (Shitara, Sato, and Sugiyama 2005). Dans le but de comprendre mieux l'activité thérapeutique et toxicologique d'un nouveau médicament, il est donc nécessaire de comprendre l'implication des transporteurs hépatiques dans le transport des médicaments et de leurs métabolites (Jigorel et al. 2006). Il existe deux grandes familles de transporteurs : les transporteurs SLC (Solute Carrier Transporter) et les transporteurs ABC (ATP Binding Cassette Transporter) (Benz 2011).



Figures 14 : Illustration des différents transporteurs au niveau des hépatocytes (Benz 2011)

II.5.1. Les transporteurs d'influx (SLC)

Après arrivée dans la circulation portale, le xénobiotique sera en contact avec la membrane basolatérale hépatique des capillaires hépatiques appelés sinusoides (Mottino 2008). A partir du capillaire sinusoidale, le xénobiotique peut diffuser passivement ou par l'intermédiaire de transporteurs SLC pour atteindre le cytoplasme de l'hépatocyte. Les transporteurs SLC localisés au niveau de la membrane sinusoidale de l'hépatocyte sont impliqués dans le passage d'une grande partie des xénobiotiques dans les hépatocytes (Fahrmayr, Fromm, and König 2010). Les principaux transporteurs présents à ce niveau sont les OATP1B et 2B, OCT1, OAT2 (König et al. 2000) (tableau 2). Les transporteurs SLC sont soit des protéines de transport assurant une diffusion facilitée soit des transporteurs actifs secondaires. Les transporteurs SLC constituent un groupe de protéines de

transport membranaire de plus de 300 membres organisés en 52 familles, capables de transporter des ions organiques ou inorganiques avec une sélectivité de substrat variable selon les familles. Les SLC sont des échangeurs fonctionnant selon 3 modes : uniport (un seul composé est transporté), antiport (le composé est transporté dans le sens inverse du gradient ionique) et le symport (transport simultané de deux composés). Le transport des SLC dépend d'un gradient électrochimique qui peut être maintenu grâce à des pompes ATPases, ce qui va permettre le transport de substances substrats dans le sens opposé à leur gradient de concentration (Li et al. 1998). Les SLC font donc partie des transporteurs dits « facilitateurs » ou « secondairement actifs ». Les transporteurs SLC sont considérés comme des transporteurs d'influx puisque les médicaments substrats utilisent ces protéines de transport dans le sens de l'entrée dans la cellule (Tirona et al. 2003) Parmi les nombreux transporteurs de cette famille, seules quelques-uns sont utilisés pour le transport des médicaments. Selon le type d'ion associé au transport d'un xénobiotique, les SLC sont classés en 2 catégories : les OATP (Organic Anion Transporter Polypeptide) et les OCT ou OAT (Organic cation Transporter ou Organic Anion Transporter respectivement). Ces transporteurs présentent plusieurs substrats médicamenteux. De plus, une nouvelle nomenclature a permis de renommer ces OATP, OCT et OAT (Li et al. 1998) (Briz et al. 2006).

Les transporteurs OATP (ou SLCO) sont impliqués dans le transport d'une grande partie de médicaments. Les OATP1B1 (ou SLCO1B1) et les OATP1B3 (ou SLC01B3) transportent des médicaments de structures diverses comme la rifampicine, les statines, le méthotrexate. Les OATP2B1 (ou SLCO2B1) sont impliqués dans le transport d'une variété plus limitée de médicaments parmi lesquels les statines et les benzylpenicillines (Schiffer et al. 2003). Les OCT1 (ou SLC22A1) sont impliqués dans le transport des cations organiques chargés positivement au pH physiologique tels que certains médicaments antiviraux , un antagoniste calcique comme le vérapamil et un hypoglycémiant comme la metformine (Elkiweri et al. 2009). Les OAT2 (ou SLC22A2) transportent les anions organiques comme un antiépileptique, l'acide valproïque ou un médicament anticancéreux, le méthotrexate (Karlgrén et al. 2012).

Tableau 2 : Les principaux transporteurs d'influx au niveau des hépatocytes (Benz I, 2011) (tableau non exhaustif)

Transporteur	Classe thérapeutique	Médicaments
OATP1B1	Antibiotiques Anticancéreux Hypoglycémisants oraux Antihistaminiques H1 Antihypertenseurs Fongicides Statines	Benzylpénicilline, rifampicine Méthotrexate, SN-38 Répaglinide, troglitazone métabolite Fexofénadine Bosentan, valsartan, olmésartan Caspofungine Atorvastatine (cérivastatine*), fluvastatine, lovastatine, pravastatine, rosuvastatine, simvastatine
OATP1B3	Antibiotiques Anticancéreux Antihistaminiques H1 Antihypertenseurs Cardiotoniques Statines	Rifampicine Docétaxel, méthotrexate, paclitaxel Fexofénadine Bosentan, olmésartan, valsartan Digoxine Fluvastatine, pravastatine, rosuvastatine
OATP2B1	Antibiotiques Antihistaminiques H1 Antihypertenseurs Antirécepteurs leucotriènes Statines	Benzylpénicilline Fexofénadine Bosentan Montélukast Atorvastatine, fluvastatine, rosuvastatine
OAT2	Anticancéreux Antiépileptiques	Méthotrexate Acide valproïque
OCT1	Antiarythmiques Anticancéreux Hypoglycémisants oraux Antihistaminiques H2 Antiviraux	Quinidine Cisplatine, imatinib, oxaliplatine Metformine Cimétidine, famotidine, ranitidine Aciclovir, ganciclovir, lamivudine, zalcitabine

II.5.2. Les transporteurs d'efflux (ABC)

Les hépatocytes sont reliés entre eux par des jonctions cellulaires. Les xénobiotiques vont être métabolisés au niveau intracellulaire par des enzymes de phase I et/ou II qui pourront interagir avec les transporteurs d'efflux type ABC (ATP Binding cassette) au niveau du pôle canaliculaire pour être excrétés dans la bile (ex MRP2) ou ceux du pôle basolatéral pour rejoindre la circulation sanguine puis la veine sus hépatique (ex MRP3).

Le transport actif primaire d'efflux s'effectue du milieu intracellulaire vers le milieu extracellulaire contre un gradient de concentration et nécessite l'hydrolyse de l'ATP (Terada and Inui 2008) La protéine P-glycoprotéine (P-gp) (MDR1) ou ABCB1 est impliquée dans le transport d'une grande variété des médicaments et de toxiques (Juliano and Ling 1976). Les transporteurs BSEP et MDR3 ou ABCB3 sont impliqués dans le transport de certains phospholipides, des sels biliaires et de certains médicaments (Brouwer et al. 2016). Les transporteurs BCRP ou ABCG2 jouent un rôle important dans l'excrétion biliaire de certains médicaments (tableau 3).

Les transporteurs MRP (Multidrug Resistance associated Protein) jouent un rôle important dans l'efflux de médicaments conjugués ou non à des

groupes sulfate ou glucuronate ou au glutathion et certaines molécules endogènes comme l'acide biliaire (Mohn et al. 2013). Les MRPs sont constituées de différentes isoformes localisées différemment sur les membranes hépatocytaires. Les MRP2 ou ABCC2, sont localisées au niveau apical jouant un rôle important dans l'excrétion biliaire de leurs substrats, tandis que les MRP3, 4, 5 et 6 sont localisés sur la membrane basolatérale contribuant au transport des substances depuis les hépatocytes vers le sang (Dankers et al. 2012).

Les transporteurs MATEs (Multidrug And Toxin Extrusion protein) fonctionnent sur un mode antiport H⁺/cation organique impliqués dans le transport des médicaments. Ils sont classés en deux sous familles MATE-1 et MATE-2 et appartiennent à la famille des SLC47. Dans le foie, seuls les transporteurs MATE-1 sont exprimés et sont situés au niveau du pôle canaliculaire des hépatocytes et sont classés comme transporteurs d'efflux permettant la sécrétion dans la bile de composés cationiques organiques et de zwitterions dont font partie les médicaments (Kuroda and Tsuchiya 2009). Les MATE-1 contribuent au transport de certains substrats endogènes comme les composés sulfoconjugués endogènes et d'autres composés exogènes tel que l'oxaliplatine et la metformine (Krah and Zachariae 2017).

De très nombreuses molécules ont été reconnues comme ayant également des propriétés inhibitrices ou modulatrices des transporteurs ABC. Plusieurs types de mécanismes de modulation ont été décrits telles que l'inhibition compétitive, la modulation allostérique, l'inhibition de l'activité ATPasique du transporteur. La modulation de l'activité des transporteurs ABC conduit à la diminution de l'efflux cellulaire du substrat à l'origine d'une augmentation de ses concentrations intracellulaires et donc, potentiellement, à la réversion de la chimiorésistance médiée par ce transporteur (tableau 3). Des modulateurs des transporteurs ABC ont été développés par l'industrie pharmaceutique afin de réverser le phénotype MDR des cellules cancéreuses surexprimant ces transporteurs. Les inhibiteurs de première génération comme le verapamil puis des inhibiteurs de deuxième génération (comme le valspodar, biricodar) puis de troisième génération (comme l'elacridar, tariquidar, zosuquidar) sont devenus de plus en plus puissants et de plus en plus sélectifs des transporteurs ABC. Plusieurs transporteurs ABC apparaissent surexprimés dans de nombreuses lignées cancéreuses humaines exposées à des cytotoxiques, à l'origine d'un phénotype de résistance multiple aux agents anticancéreux. L'apparition de la chimiorésistance est associée à l'augmentation d'expression du

transporteur, dans le but d'augmenter l'activité des médicaments anticancéreux. Il est ainsi nécessaire de trouver des agents qui inhibent la fonction du transporteur dans une cellule l'exprimant, sans autre mécanisme de résistance connu en diminuant l'activité de ce transporteur pour une amélioration de la survie des patients.

Tableau 3 : Les principaux transporteurs d'efflux au niveau des hépatocytes (Benz I, 2011) (tableau non exhaustif)

Transporteur	Substrats
Efflux apical	
ABCB1 (P-gp)	Digoxine, fexofénadine, indinavir, vincristine, colchicine, topotécan, paclitaxel
ABCC2 (MRP2)	Indinavir, cisplatine, ciprofloxacine, métabolites glucuroconjugués, sulfoconjugués ou glutathion conjugués
ABCB4 (MDR3)	Digoxine, paclitaxel, vinblastine
ABCG2 (BCRP)	Rosuvastatine, doxorubicine, sulfasalazine, topotécan
ABCB11 (BSEP)	Vinblastine
MATE	Metformine, cimétidine, ranitidine
Efflux basolatéral	
ABCC3 (MRP3)	Étoposide, méthotrexate, ténoposide
ABCC4 (MRP4)	Topotécan, céfazoline
ABCC5 (MRP5)	Méthotrexate, mercaptopurine
ABCC6 (MRP6)	Cisplatine, daunorubine

ABC : ATP-Binding Cassettes ; MATE : Multidrug And Toxin Extrusion.

II.6. Méthodes d'études de métabolisme et de toxicité hépatique : évolution vers les modèles cellulaires

Les études d'évaluation pharmacologique et pharmacocinétique préclinique et clinique d'un nouveau médicament nécessitent l'utilisation des différents modèles. Ces modèles sont classés en deux groupes : *in vivo* sur les animaux ou *in vitro* sur des cellules humaines (Lin et al. 2003). En recherche ou en développement préclinique, l'évaluation du métabolisme et de la toxicité hépatique d'un nouveau xénobiotique ou médicament débute en général par des études *in vitro* en utilisant soit des cultures cellulaires comme des hépatocytes soit des organes ou des tissus isolés.

Les animaux sont ensuite utilisés, en particulier en étudiant les xénobiotiques sur un rongeur et sur une deuxième espèce animale. Après cette étape de développement préclinique, l'évaluation est réalisée sur l'homme pendant la phase de recherche clinique (de la phase 1 chez le volontaire sain jusqu'aux malades (phases 2 et 3).

II.6.1. Les modèles *in vivo*

En 2008, la Commission Européenne relative à l'utilisation des animaux a alerté les scientifiques en publiant le nombre d'animaux utilisés pour les tests de toxicologie au delà du million. Les animaux ont été pendant longtemps un modèle indispensable pour la détermination du potentiel carcinogène, de la pharmacocinétique et des toxicités aiguë ou chronique d'un nouveau médicament. Cependant, ces études posent des problèmes financiers car elles sont très longues et coûteuses, ainsi que des problèmes éthiques. Aussi, des modèles alternatifs à l'expérimentation animale ont été recherchés tout en répondant à la règle des 3R de Russel and Brunch : Reduce-Refine-Replace (réduire, raffiner, remplacer) (Flecknell 2002). Le premier objectif est de diminuer le nombre d'animaux et le nombre d'expériences lors des tests toxicologiques (Tannenbaum and Bennett 2015). Le deuxième objectif est de raffiner la méthodologie impliquant la notion de points limites et de diminuer la douleur des animaux en optimisant les protocoles, que ce soit dans l'intérêt des animaux comme celui des résultats attendus. Troisièmement, le remplacement des animaux par des modèles *in vitro* cellulaires lorsque cela est possible, et en particulier d'origine humaine pour être plus prédictif de la situation chez l'homme en clinique. Les méthodes alternatives sont le plus souvent recommandées dans des approches intégratives combinant l'ensemble des outils alternatifs disponibles (*in vitro*, *ex vivo*, *in silico*) afin de n'utiliser les animaux qu'en dernier recours lorsque les autres méthodes d'évaluation n'ont pas permis d'apporter suffisamment d'informations.

Ces dernières années, les autorités s'intéressent de plus en plus au développement de modèles cellulaires humains comme une réelle voie de substitution à l'expérimentation animale (Stephens 2009). Le défi des méthodes alternatives est leur validation et leur robustesse, leur capacité prédictive des mécanismes d'action et de toxicité de médicaments, leur utilisation comme outil de criblage haut débit et pour la recherche de nouvelles cibles pharmacologiques ou de nouvelles stratégies médicamenteuses

II.6.2. Les modèles cellulaires *in vitro*

Les techniques de culture des tissus, d'organes ou de cellules dans des milieux nutritifs en dehors de l'organisme font partie des modèles *in vitro*

(Grosse-Siestrup et al. 2002). Ces cultures peuvent avoir des conditions environnementales spéciales proches de celles *in vivo* (C. C. Bell et al. 2018). On peut distinguer des cultures cellulaires classiques telles que les modèles 2D ou des cultures tridimensionnelle en 3D plus sophistiqués et présentant les caractéristiques des organes ou des tissus *in vivo* (Yu et al. 2017). On peut distinguer plusieurs types de cultures cellulaires hépatiques humaines *in vitro* : les cellules primaires et les lignées cellulaires

II.6.2.1. Les cellules primaires hépatiques humaines

Lors d'études du métabolisme des médicaments, les cellules hépatiques primaires représentent le modèle standard qui possède des réponses fonctionnelles très proches de celles du foie (Gural et al. 2018) (Broeders et al. 2015). Les hépatocytes primaires sont généralement isolés d'un tissu hépatique par digestion à la collagénase puis purifiés par centrifugation et cultivés dans des conditions précises (Cassim et al. 2017). Ces cellules expriment toutes les principales protéines hépatiques comme les enzymes et les transporteurs impliqués dans le métabolisme et le transport des médicaments (LeCluyse et al. 2012) (Thakkar, Slizgi, and Brouwer 2017). Une fois en culture, l'expression des gènes spécifiques du foie et les fonctions enzymatiques des cellules primaires diminuent au cours du temps. L'utilisation des matrices extracellulaires et la culture avec d'autres types cellulaires (co-culture), peuvent permettre de conserver plus longtemps les fonctions hépatiques des hépatocytes primaires (Novik et al. 2017).

Les hépatocytes primaires humaines sont des cellules adhérentes sur leur support. En 2D sur matrice de collagène les hépatocytes forment un tapis de cellules de structure polygonale et survivent au maximum 48h à 72h avec des enzymes et transporteurs hépatiques fonctionnels et se détachent de leur support en mourant. Selon les matrices, la survie des cellules et l'activité enzymatique varient. Cultivées sur double couche de collagène, la morphologie des cellules change ; elles deviennent arrondies et restent fonctionnelles durant 72h. La recherche actuelle se concentre sur la reconstruction de l'architecture *in vivo dans* des tissus en 3D- et co-culture des modèles pour surmonter les limites des monocultures 2D.

Cependant, la difficulté de l'obtention des hépatocytes primaires humains, la difficile conservation de leurs fonctions, et les variations interindividuelles des cellules provenant de plusieurs donneurs présentent des obstacles majeurs pour l'utilisation de ces cellules (S. M. L. Lee et al. 2013). Aussi, de nombreuses équipes de recherche tentent de trouver des

lignées cellulaires hépatiques exprimant les gènes et les fonctions hépatiques d'une manière similaire à ceux retrouvés dans un foie humain *in vivo*, avec un nombre illimité de passages en culture.

II.6.2.2. Les lignées cellulaires immortalisées

Les cellules issues d'une lignée cellulaire possèdent la capacité à proliférer d'une manière indéfinie dans des conditions et dans un milieu nutritif bien spécifiques (Guillouzo and Guguen-Guillouzo 2008). Certaines mutations, dans une ou plusieurs voies de contrôle de la croissance, contribuent à un nombre illimité de division, ce qui n'est pas le cas pour les cultures cellulaires primaires. Il existe plus de 25 lignées hépatiques immortalisées selon l'ATCC. Certaines lignées sont soit des cellules cancéreuses prélevées de patients, soit des cellules créées par mutation de certains gènes responsables de la régulation du cycle cellulaire, soit transfectées par un gène particulier. Généralement, malgré la facilité de leur utilisation, ces lignées ne contiennent pas toutes les familles d'enzymes présentes physiologiquement et les enzymes ne sont pas toutes fonctionnelles, ce qui explique leur incapacité à prédire la toxicité et le métabolisme des médicaments. Plusieurs lignées hépatiques ont été cependant évaluées pour remplacer les hépatocytes primaires.

a. Les cellules Fa2N-4

La lignée Fa2N-4 dérive d'hépatocytes primaires par transfection avec l'antigène T de SV40 (Hariparsad et al. 2008) (Mills et al. 2004). Ces cellules présentent une morphologie proche de celles des hépatocytes primaires, et expriment certains facteurs de transcription impliqués dans le métabolisme tel que le PXR (Vermeire et al. 2005) . Par contre, les Fa2N-4 présentent une déficience dans l'expression de certains récepteurs nucléaires (CAR) et de transporteurs hépatiques comme les OATPs (Hariparsad et al. 2008). Les enzymes du cytochrome P450 peuvent être inductibles après exposition à certains inducteurs (Ripp et al. 2006). En plus, il a été démontré que l'induction des CYP3A4 et 2B6 par le phénobarbital dans les cellules Fa2N-4 est très faible. De plus, ces cellules montrent une induction de l'expression des MDR en réponse à l'induction par la rifampicine. Cette lignée est considérée comme un modèle de prédiction limité pour les études toxicologiques.

b. Les cellules HepG2

Les cellules HepG2 sont des cellules immortalisées qui dérivent d'un hépatocarcinome humain d'un homme âgé de 15 ans, qui ne comporte pas de mutations du gène p53 (Donato, Tolosa, and Gomez-Lechon 2015). Ce modèle hépatique est le modèle le plus utilisé et caractérisé au cours des études de toxicologie. Les HepG2 présentent une sécrétion de protéines similaire à celle des hépatocytes normales tel que l'albumine, le fibrinogène et la transferrine (Nakamura et al. 2011). Par contre, lors des études de prédiction de la toxicité et du métabolisme des médicaments, ce modèle est considéré comme inadapté à cause de l'absence de certaines familles d'enzymes métaboliques de phase I et II (Westerink and Schoonen 2007). La faible expression et activité des CYP peut entraîner une sous-estimation de la toxicité des médicaments testés et ne permet pas d'utiliser ce modèle pour des études de métabolisme *in vitro*. Pour les études de métabolisme, les HepG2 et leurs cellules dérivées se trouvent incompetentes par rapport aux cellules hépatiques primaires. Dans le but d'améliorer l'expression des CYP et d'éviter la sous-estimation des résultats, il y a eu une mise en place de sous-clones qui dérivent des HepG2 telle que la lignée HepG2/C3A (Zhang et al. 2016).

La lignée HepG2/C3A ne présente pas de mutations au niveau du gène p53. Elles sécrètent les protéines plasmatiques comme l'albumine. Ces cellules présentent une expression faible de certains gènes codant pour les enzymes du métabolisme par rapport aux hépatocytes primaires, ce qui peut causer une sous-estimation de la toxicité des composés étudiés.

Des études récentes ont montré une meilleure expression de certains enzymes du métabolisme et de l'activité des CYP dans les cellules HepG2 cultivées en culture 3D par rapport à celle cultivées en 2D. Par contre, ces expressions restent faibles en comparaison aux cellules HepaRG.

c. Les cellules HepaRG

Les HepaRG sont des cellules isolées à partir d'un hépatocarcinome d'une patiente infectée par le virus l'hépatite C (Guillouzo et al. 2007). Récemment introduite dans les tests de toxicité, cette lignée représente un modèle plus pertinent que les HepG2 puisqu'elles présentent une expression stable des gènes caractéristiques des hépatocytes différenciés impliqués dans le métabolisme et le transport des xénobiotiques (Doktorova et al. 2014). Pour présenter une morphologie proche des hépatocytes primaires, les HepaRG confluentes requièrent une étape de

différenciation après un traitement au DMSO. Une fois différenciées, les cellules HepaRG présentent une forte expression des CYP (CYP 3A4, 2E1, 2B6, 1A2 et 2C9), des enzymes de phase II et des transporteurs membranaires présents dans les hépatocytes primaires par rapport aux autres lignées (Jennen et al. 2010).

De plus, les HepaRG cultivées en 3D avec des polymères fonctionnels ont montré une augmentation de la sécrétion d'albumine et une accélération de l'expression du CYP3A4. Ces sphéroïdes HepaRG ont montré des réponses métaboliques proches des hépatocytes primaires (Y. Higuchi et al. 2016).

Cependant, la différenciation de ces cellules nécessite leur traitement par du DMSO à une concentration élevée (2%). Or, l'utilisation de DMSO à 0.5% a été prouvée comme toxique pour les cellules (Hanslick et al. 2009) (Qi, Ding, and Salvi 2008). De plus, la limite de cette lignée est le nombre de passage terminé, d'où la nécessité de trouver des nouvelles lignées immortelles présentant des caractéristiques proches des HepaRG.

d. Cellules souches embryonnaires

En 1990, l'ECVAM (European centre for the validation of alternative methods) a mis au point l'EST (embryonic stem cell test). Ces cellules souches embryonnaires et leurs dérivés sont également envisagés aujourd'hui comme des modèles pertinents de la physiologie cellulaire avec une exploitation intense dans le domaine de la toxicologie prédictive.

II.6.1. Méthodes de caractérisation de la mort cellulaire *in vitro*

a. Mesure de l'activité du lactate déshydrogénase par méthode enzymatique colorimétrique

Cette technique permet d'évaluer l'intégrité membranaire. Les cellules dont la membrane a été perméabilisée ou lysée, libèrent leur contenu cytosolique, et notamment l'enzyme lactate déshydrogénase (LDH), dans le milieu extracellulaire. La quantité de LDH relarguée dans le milieu de culture est proportionnelle au nombre de cellules mortes (après évaluation du contenu en LDH d'une cellule viable). La mesure de l'activité LDH permet d'évaluer non seulement la mort cellulaire nécrotique (caractérisée par une rupture précoce de la membrane plasmique) mais aussi une partie de la mort cellulaire apoptotique : les cellules apoptotiques ne sont pas phagocytées (*in vitro*).

b. Viabilité cellulaire par méthode colorimétrique au Méthyl-ThiazolylTetrazolium (MTT)

Les mitochondries des cellules viables contiennent une enzyme réductase, la succinate deshydrogénase, permettant de réduire un sel de tetrazolium, le 3-[4,5-(dimethylthiazol-2-yl)] -2,5-diphenyltetrazolium bromide ou MTT (jaune) en formazan (bleu violet). L'intensité de la coloration violette est alors proportionnelle au nombre de cellules vivantes et à leur activité métabolique.

c. Analyse de la mort cellulaire par cytométrie en flux

La cytométrie en flux est une technique qui permet la mesure simultanée de plusieurs caractéristiques physiques et biologiques d'une cellule. Elle a été initialement développée pour le dénombrement des cellules en suspension et l'évaluation de leur taille mais elle est devenue une technique d'analyse et de quantification dans des domaines divers tels que la prolifération cellulaire, l'immunologie, la microbiologie ou le diagnostic de certaines maladies. Elle est la seule technique qui permet de faire une analyse cellule par cellule, quantitative à grande vitesse, avec une bonne sensibilité de détection.

d. Méthode "TUNEL"

L'une des caractéristiques de l'apoptose est la dégradation de l'ADN qui, aux premiers stades de l'apoptose, concerne des zones internucléosomales. Le clivage de l'ADN peut produire des coupures simples ou doubles. Les deux types de fractures peuvent être détectés en marquant les extrémités 3'-OH libres à l'aide de nucléotides modifiés (biotine-UTP, fluorescéine-dUTP) intervenant dans une réaction enzymatique (Tinto et al. 2002).

e. Méthode "DAPI"

Le DAPI (ou 4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochlorate) est un marqueur bleu fluorescent des acides nucléiques qui se lie aux régions AT de l'ADN. Il permet la mise en évidence de la fragmentation de l'ADN.

III. Liens entre le foie et le pancréas

Le foie et le pancréas sont liés dès l'embryogénèse. Ces deux organes présentent des liens anatomiques étroits grâce au système vasculaire portal et possèdent certains rôles communs au niveau de la physiologie. Le foie et le pancréas jouent un rôle important dans le métabolisme humain des glucides et des lipides. Les hépatocytes contribuent à la régulation de taux de glucose et des acides gras dans le sang sous un contrôle hormonal secrété par les cellules β du pancréas.

III.1. Liens embryologiques

Le processus de développement de ces deux organes possède des points communs car ils se déroulent en parallèle.

L'endoderme supérieur qui constitue l'intestin antérieur de l'embryon est à l'origine du développement du pancréas et du foie. Les progéniteurs hépatiques et pancréatiques se forment vers la troisième semaine de grossesse, grâce à l'expression du gène à homéodomaine Hhex dans l'endoderme (Thomas, Brown, and Beddington 1998). Selon les signaux cellulaires, les cellules pluripotentes communes des bourgeons ventraux pancréatiques et hépatiques donnent naissance à des hépatoblastes ou à des cellules souches pancréatiques (figure 15).

Le facteur de croissance FGF4 et les glycoprotéines Wnt sont des signaux mésodermiques qui régulent l'embryogenèse pancréatique et hépatique (McLin, Rankin, and Zorn 2007). Le développement du foie et la répression de l'embryogenèse pancréatique sont contrôlés par la production du FGF par les cellules mésenchymateuses du mésoderme cardiaque. Ce contrôle dépend de l'expression de Sonic Hedgehog (Shh) (Shh : une protéine jouant un rôle dans l'organogénèse des vertébrés) induite par FGF (Deutsch et al. 2001).

Lors de l'embryogenèse, le nombre des cellules progénitrices du pancréas est rapidement fixé. Par contre, les cellules hépatiques, même différenciées, gardent leur capacité progénitrice (Stanger, Tanaka, and Melton 2007).

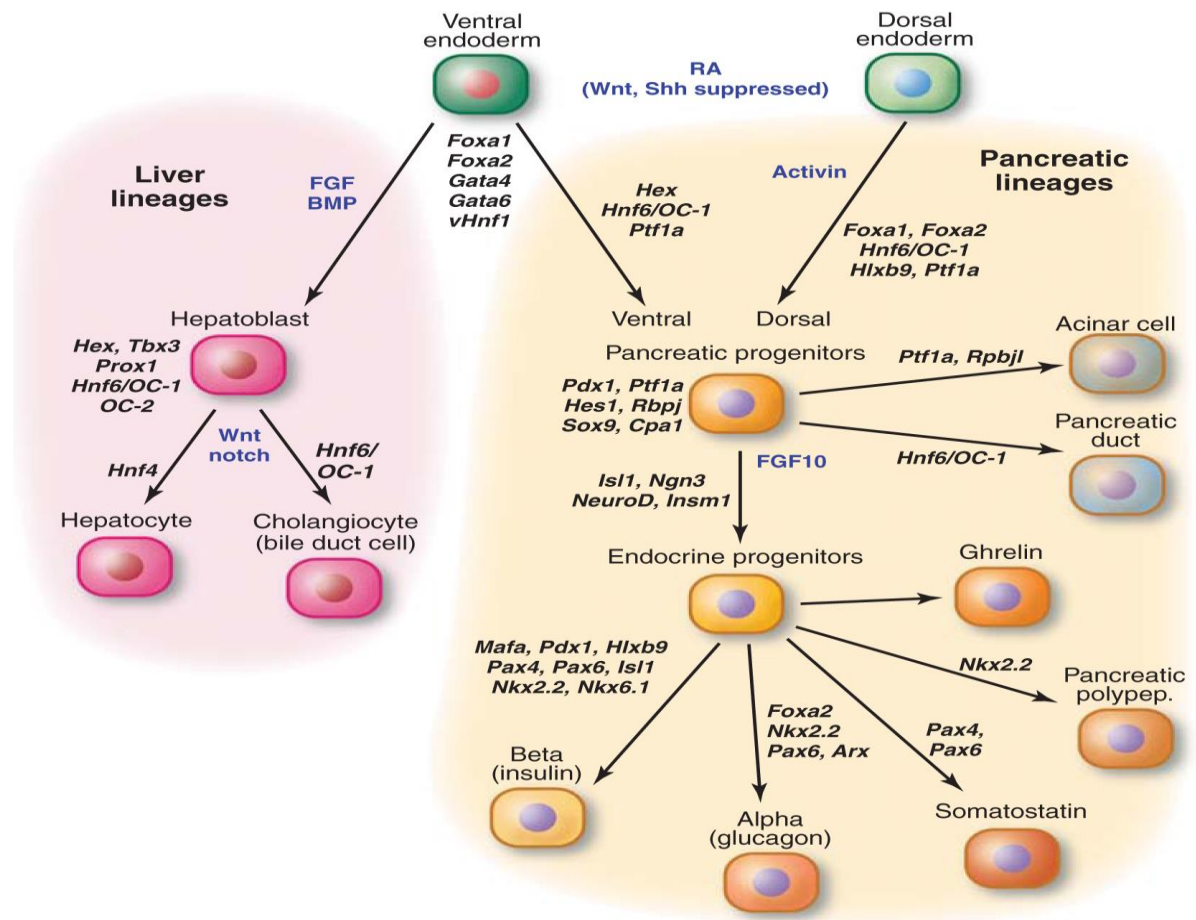


Figure 15 : Facteurs de transcription contrôlant la différenciation des cellules hépatiques et pancréatiques (Varilly and Chandler 2012).

La formation des hépatocytes et des cholangiocytes hépatiques, ainsi que les cellules exocrines et endocrines pancréatiques sont contrôlées par les voies de signalisation communes des récepteurs membranaires Notch (figure 16). La régulation du Notch dépend de l'expression de la neurogénine 3 qui est un facteur de transcription clé pour diriger les progéniteurs pancréatiques vers la différenciation des cellules endocrines du pancréas (Gradwohl et al. 2000).

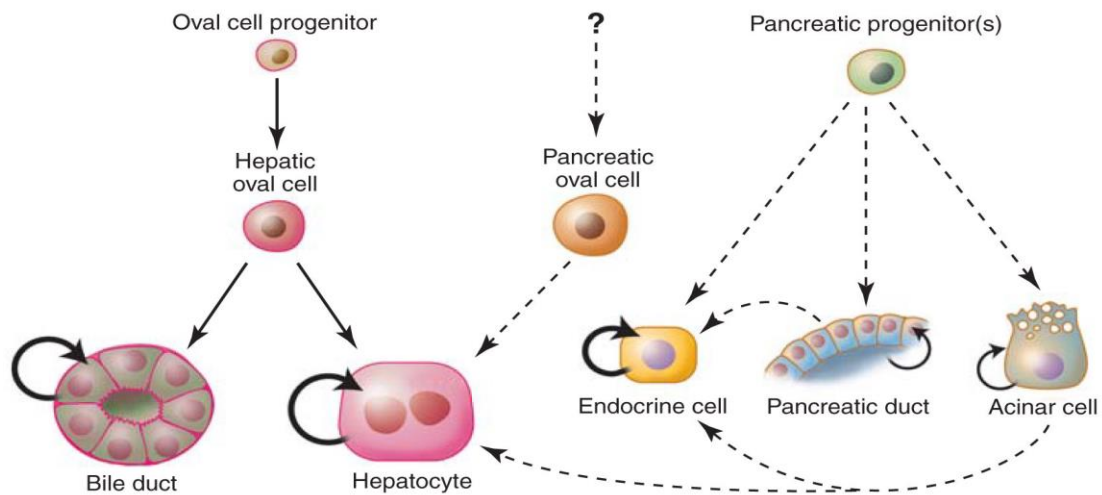


Figure 16 : Progéniteurs des cellules hépatiques et pancréatiques (Gradwohl et al. 2000).

III.2. Liens histologiques

L'architecture du foie est organisée en lobules qui s'établissent en structures canalaire. La partie exocrine du pancréas formé d'acini est organisé en canalicules. Respectivement, dans les cellules canalaire de ces deux organes, certains facteurs de transcription sont exprimés comme le SOX9 (figure 17). En effet, les cellules progénitrices des hépatocytes et les cellules acinaires pancréatiques expriment SOX9 (Furuyama et al. 2011). Par conséquent, le siège supposé des progéniteurs sont les structures canalaire pancréatique et hépatique.

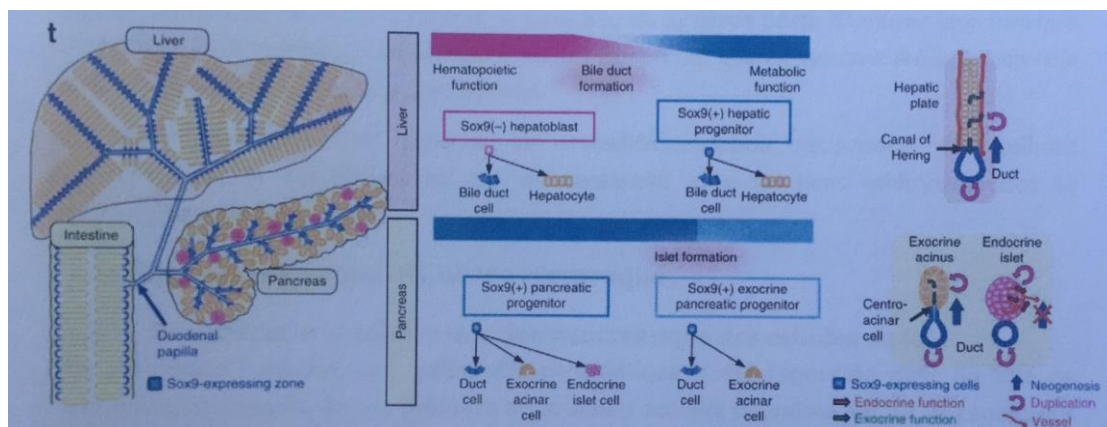


Figure 17: Expression de SOX9 dans les structures canalaire hépatique et pancréatique (Furuyama et al. 2011)

Le système vasculaire des îlots pancréatique est formé de cellules endothéliale fenêtrée qui contribuent à l'apport en nutriments et en oxygène pour les îlots. D'autre part, pour les hépatocyte, l'endothélium fenêtré des capillaire sinusoides permet le contact des cellule avec le sang

du système porte pour assurer leurs fonctions de détoxification et de métabolisme. Ces endothélium fenêtrés des deux organes reflètent leurs fonctions importantes de sécrétion, de métabolisme et de synthèse protéique (Zanone, Favaro, and Camussi 2008).

III.3. Liens anatomiques

Le foie occupe tout l'espace sous-phrénique droit de la région sus-mésocolique puisque le foie est l'organe le plus volumineux de l'organisme. Le pancréas se trouve accolé au duodénum constituant le bloc pancréatico-duodénal dans la région sus-mésocolique abdominale. Le foie recouvre la partie supérieure du bloc pancréatico-duodénal. Ainsi la partie inférieure du canal cholédoque hépatique se trouve accoler au canal excréteur principal du pancréas (figure 18).

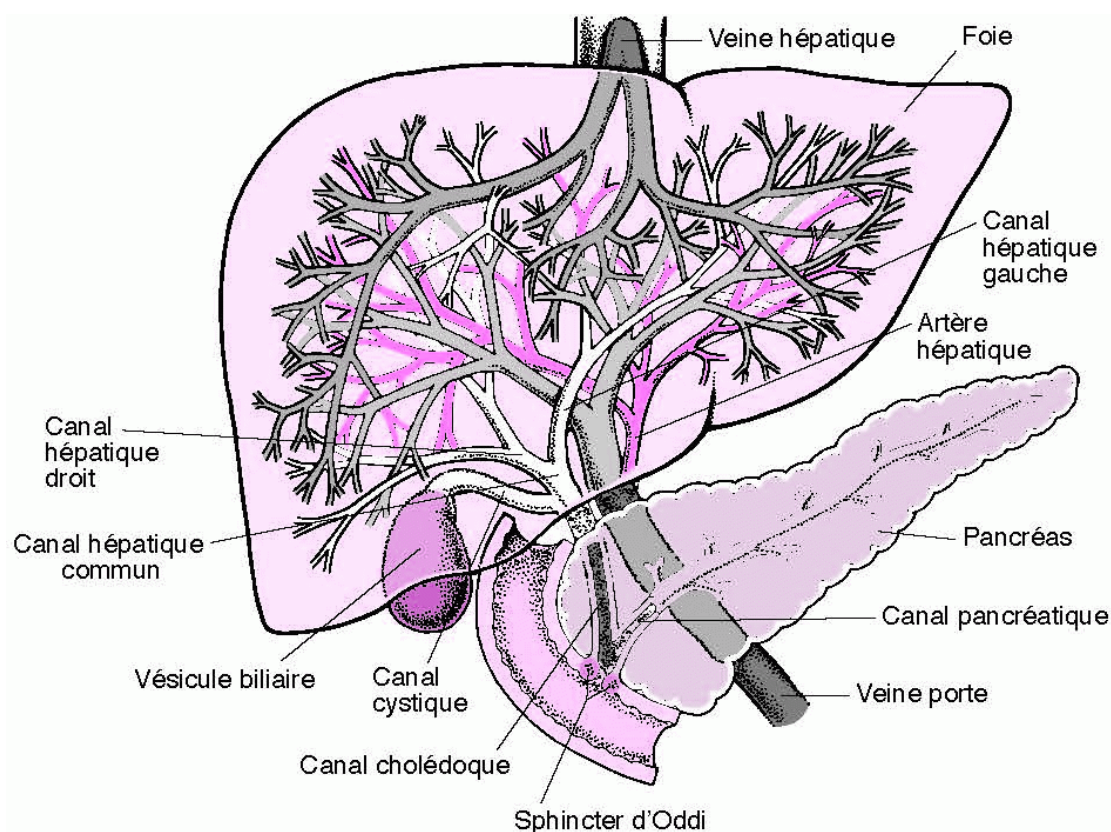


Figure 18 : Liens anatomiques entre le foie et le pancréas (Deutsch et al. 2001)

La vascularisation artérielle pancréatique comprend les arcades pancréatico-duodénales et l'artère pancréatique dorsale. Ainsi, le drainage des veines pancréatiques se fait dans le confluent veineux porte, ce drainage dépendant en partie des chaînes lymphatiques hépatiques.

La vascularisation du foie est double par l'artère et la veine porte hépatique. Cette vascularisation apporte au foie un sang riche en oxygène et en nutriments. Le confluent veineux porte formé reçoit, dans le petit épiploon, les veines pancréatico-duodénales. Le système porte draine vers le foie, le sang efférent au pancréas, à la rate et à l'intestin.

III.4. Liens métaboliques

III.4.1. Influence de l'insuline et du glucagon sur le foie

Le foie est le premier organe cible des hormones pancréatiques. L'insuline et le glucagon venant par la voie porte, contribuent à la régulation du stockage et de la production du glucose dans le foie. Le foie est responsable de plus de 75% de la production de glucose et possède une capacité de stockage significative de glucose sous forme de glycogène au sein des lobules hépatiques.

Le foie contribue à la maintenance de la normoglycémie tout en assurant l'équilibre entre la néoglucogenèse, la glycogénogenèse et la glycogénolyse (Henry, Rivers, and Payne 1988).

Le glucagon favorise la néoglucogenèse hépatique dans la région périportale tout en diminuant l'activité des fructokinases (PKF) (figure 19).

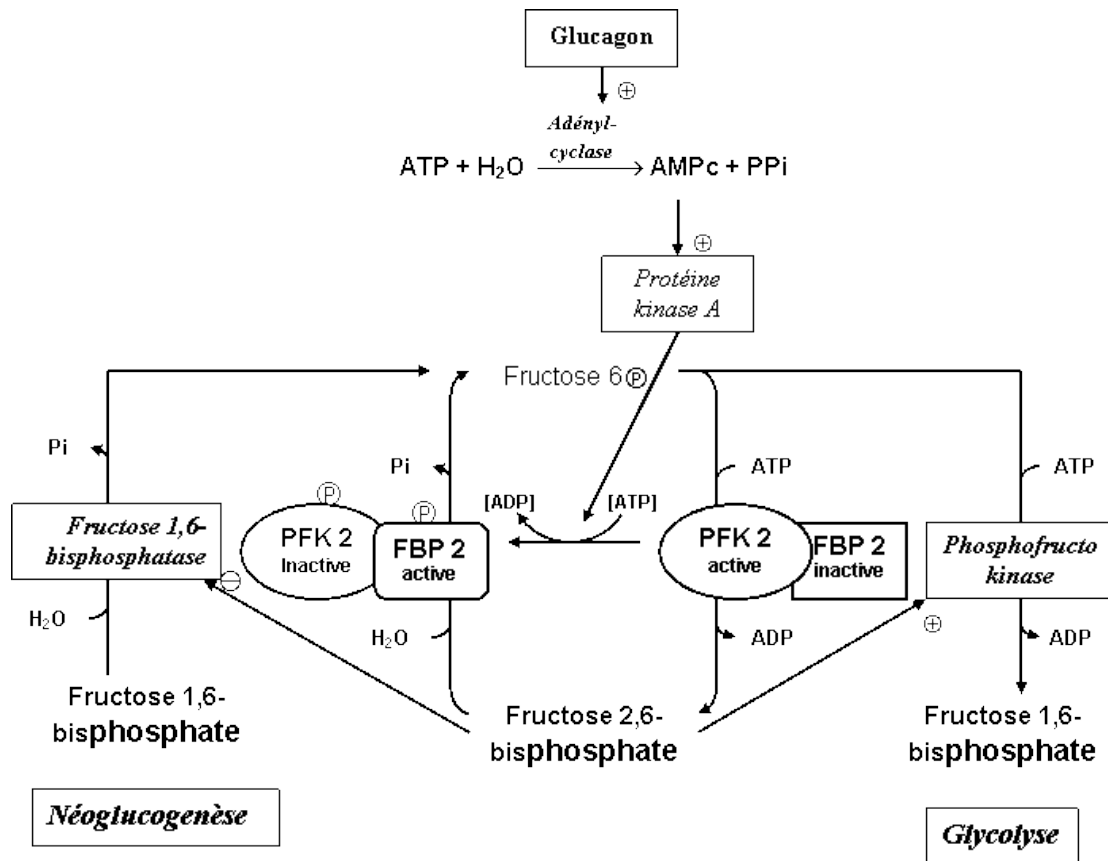


Figure 19 : Régulation du métabolisme du glycogène hépatique par le glucagon (Heppner et al. 2010)

L'insuline joue un rôle primordial dans la régulation de la glycémie. Les hépatocytes expriment, en grande quantité sur leurs surfaces, le récepteur d'insuline. La phosphorylation des deux grandes familles de protéines (IRS (insulin receptor substrat) et les Shc (Src homology containing protein)) est assurée par la fixation de l'insuline sur son récepteur hépatique. Cette fixation met en jeu par la suite la voie PI3 Kinase / AKT (Previs et al. 2000) (figure 20).

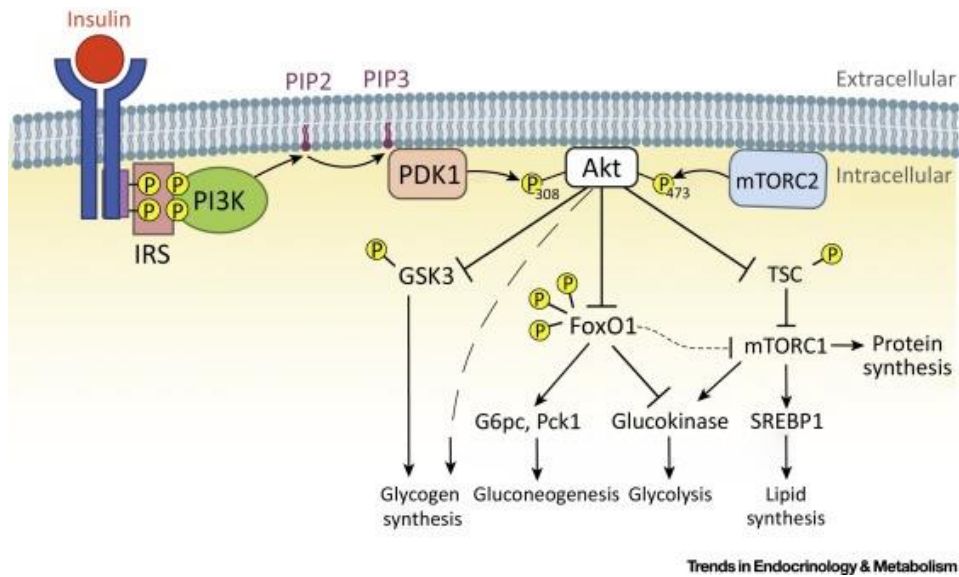


Figure 20 : Régulation du métabolisme de glucose hépatique par l'insuline (Collier and Scott 2004)

III.4.2. Effet hépatique sur la clairance de l'insuline

Le foie possède un rôle important dans l'homéostasie glucidique. Ce rôle hépatique est illustré par l'extraction hépatique de l'insuline et le rôle de l'insuline dans le métabolisme des glucides.

Le foie est responsable de l'extraction de plus de 50% de l'insuline arrivant par la voie porte. En effet, le contrôle de l'insulinémie périphérique est assuré par la clairance hépatique de l'insuline (Polonsky et al. 1988).

III.4.3. Effet des acides biliaires sur les cellules endocrines

La synthèse de l'acide biliaire correspond à l'étape finale du catabolisme du cholestérol. Les acides biliaires qui sont synthétisés au niveau du foie, seront libérés lors des repas, puis réabsorbés au niveau intestinal. Ensuite, 95% des acides biliaires excrétés retournent au foie après un cycle entéro-hépatique. Le récepteur nucléaire FXR (Le farnesoid X receptor) est activé par les acides biliaires (H. Wang et al. 1999). D'après des études récentes, cette activation peut induire une amélioration de l'équilibre glycémique. Le gène du FXR est exprimé dans les îlots humains. Le récepteur FXR fonctionnel au niveau des îlots, est accompagné par une augmentation de l'insulinosécrétion basale tout en protégeant les îlots des phénomènes de lipotoxicité (Cariou et al. 2006).

III.5. Reprogrammation cellulaire

III.5.1. Différenciation des hépatocytes en cellules pancréatiques

En pathologie humaine, dans un foie atteint de cirrhose, une métaplasie pancréatique a été observée avec une organisation des structures acinaires autour des canalicules biliaires (Wolf et al. 1990). La transfection hépatique par le PDX1 (Pancreatic And Duodenal Homeobox 1), NeuroD ou neurogénine (des facteurs de transcription jouant un rôle important au cours du développement du pancréas), les facteurs de différenciation des cellules pancréatiques endocrines, aboutit à l'apparition des cellules productrices de l'insuline dans le foie ou à la transdifférenciation des hépatocytes en îlots pancréatiques (Ferber et al. 2000). Les cellules hépatiques possèdent ainsi la capacité de se transdifférencier en cellules pancréatiques exocrines. Ce phénomène est dépendant de la fibrine matricielle aboutissant à un phénotype enzymatique équivalent à celui des cellules acinaires (S. Kim et al. 2007).

III.5.2. Différenciation des cellules pancréatiques en hépatocytes

En pathologie humaine, au sein des tumeurs pancréatiques, des métastases hépatiques ont été observées (Hughes, Kelty, and Martin 2004). L'induction de l'expression du KGF (Keratinocyte growth factor), membre de la famille de FGF, peut aboutir à la transdifférenciation des hépatocytes au niveau pancréatique (Krakowski et al. 1999).

Expérimentalement, les cellules hépatiques peuvent être obtenues à partir de la transdifférenciation de lignées cellulaires pancréatiques exocrines ou de cultures primaires de cellules acinaires. Cette différenciation, qui est facilitée par l'insuline, est liée directement à certains facteurs de transcription comme HNF4- alpha et RXR-alpha (Burke et al. 2006).

Chapitre 2: Cancer foie-pancréas

I. Le cancer du pancréas

I.1. Généralités

D'après l'institut national du cancer, le cancer du pancréas se place, en termes d'incidence au 4ème rang des cancers digestifs en France et représente 10% des cancers digestifs. Le taux de survie globale à 5 ans ne dépasse pas les 5 %. Les individus porteurs de cette maladie décèdent généralement dans les 6 mois suivant le diagnostic (Taucher and Haybaeck 2017).

Il existe deux types de cancers du pancréas : les tumeurs exocrines et les tumeurs endocrines qui représentent respectivement environ 90 % et 15% des cancers du pancréas (Asa 2011).

a. Les tumeurs endocrines :

Il existe deux types de tumeurs endocrines : les tumeurs non-fonctionnelles sans symptôme apparent et les tumeurs dites fonctionnelles avec des symptômes liés à des sécrétions hormonales tumorales comme les gastrinomes, les glucagonomes ou encore les insulinomes (tableau 4). Ces tumeurs sont généralement diagnostiquées à un stade avancé, une fois que ces tumeurs atteignent une taille causant la compression des organes adjacents, puisqu'elles sont asymptomatiques.

Tableau 4 : Les différents types de cancers pancréatiques endocrines (Asa 2011)

	Types de cancer	Peptide sécrété	Symptômes	Localisation des tumeurs	Potentiel tumorigène
E N D O C R I N E	Gastrinome	Hypersécrétion de gastrine	Ulcères, douleurs abdominales, diarrhées, perte de poids, vomissements	Tête du pancréas, duodénum	Très souvent malignes
	Glucagonome	Hypersécrétion de glucagon	Eruption cutanée, diabète, dépression, confusion	Corps, queue du pancréas	Variable
	Insulinome	Hypersécrétion d'insuline	Hypoglycémie, confusion, tremblements, céphalées	Ensemble du pancréas	Généralement bénignes
	Néoplasie Endocrinienne Multiple (NEM) ou syndrome de Wermer	Hypersécrétion d'un ou plusieurs peptides pancréatiques	Fatigue, faiblesse ou douleur musculaire, constipation, calculs rénaux, ostéoporose précoce	Ensemble du pancréas, Glandes parathyroïdes	Peuvent être malignes dans le pancréas
	Somatostatinoïde	Hypersécrétion de somatostatine	Diabète, douleurs abdominales, diarrhées, ballonnements, lithiase biliaire, perte de poids	Ensemble du pancréas, ampoule de Vater	Variable
	VIPome	Hypersécrétion de VIP	Diarrhée, perte de poids, hypokaliémie, vomissements, douleurs abdominales	Corps, queue du pancréas	Généralement malignes
	Tumeur endocrine non fonctionnelle	Hypersécrétion d'un ou plusieurs peptides pancréatiques	Douleurs abdominales, altération de l'état général	Ensemble du pancréas	Très souvent malignes et métastatiques

b. Les tumeurs exocrines :

Il existe différents types de cancers exocrines (Tableau 5). Parmi les tumeurs exocrines, l'adénocarcinome canalaire pancréatique (PDAC) est la forme la plus fréquente, caractérisée par son agressivité. Le diagnostic du PDAC est généralement tardif car il présente une expression clinique asymptomatique causant un envahissement tumoral régional du pancréas métastatique lors du diagnostic. La survie à 5 ans tout stade confondu est de 5% mais en cas de chirurgie suivie par une chimiothérapie, la survie à 5 ans est de l'ordre de 20% (Statistics Canada 2016).

Tableau 5 : Les différents types de cancers pancréatiques exocrines (Asa 2011)

	Types de cancer	Symptômes	Localisation des tumeurs	Potentiel tumorigène
E X O C R I N E	Adénocarcinome canalaire	Douleurs abdominales, ictère, anorexie, dépression, altération de l'état général	Ensemble du pancréas	Très souvent malignes et métastatiques
	Cystadénocarcinome mucineux ou séreux	Douleurs abdominales et dorsales, vomissements, diarrhées	Ensemble du pancréas	Très souvent malignes et métastatiques
	Tumeurs acinaires	Douleurs abdominales, jaunisse, perte de poids, anémie, diarrhées	Ensemble du pancréas	Variable
	Tumeurs pseudopapillaires et kystiques	Douleurs abdominales et dorsales, perte de poids	Ensemble du pancréas	Variable
	Tumeur intra-canalaire papillaire et mucineuse (TIPMP)	Douleurs abdominales, nausées, vomissements, perte de poids, jaunisse	Principalement dans la tête du pancréas	Variable
	Carcinome épidermoïde	Douleurs abdominales et dorsales, fatigue, douleurs abdominales, nausées, vomissements	Ensemble du pancréas	Variable
	Pancréatoblastome	Douleurs abdominales, nausées, vomissements	Principalement dans la tête du pancréas	Généralement bénignes

Le diabète de type 2, l'obésité, l'alcool et surtout le tabagisme sont les principaux facteurs de risque du cancer pancréatique. Dans certain cas, le cancer pancréatique peut être héréditaire (Huggett and Pereira 2011).

Il existe plusieurs origines de l'adénocarcinome canalaire pancréatique (Haugk 2010) (Delpu et al. 2011) :

- a. Les lésions néoplasiques intra-épithéliales non invasives (PanINs)
- b. Les néoplasies intra-calcaires papillaires et mucineux (IPMNs)
- c. Les cystadénomes mucineux (MCNs)

Dans notre travail, on s'intéressera à étudier l'adénocarcinome canalaire pancréatique (PDAC) en utilisant la lignée cellulaire AsPC-1 qui est connue pour être une des lignées les plus utilisées pour des études *in vitro*.

I.2. Symptômes

Le cancer du pancréas (endocrine ou exocrine) est appelé ‘maladie silencieuse’ puisque son diagnostic est toujours difficile, en absence des symptômes spécifiques. Souvent les patients manifestent des symptômes qui ressemblent à des désordres digestifs comme une pancréatite, une hépatite, des calculs biliaires, des maux de ventre, des perturbations au niveau du taux de sucre, des troubles de l’assimilation des graisses et un diabète. Le symptôme commun des cancers pancréatiques reste la douleur qui augmente graduellement mais qui ne siège pas au niveau du bas ventre (Lal et al. 2000). La majorité des patients présente une perte de poids même si les patients conservent leur appétit en mangeant normalement.

I.3. Diagnostic

Lors de la progression de la maladie, les symptômes atypiques et la douleur s’accroissent comme la perte significative de poids et les douleurs abdominales. Dans ce cas, il existe deux méthodes du diagnostic du cancer du pancréas : les tests sanguins et les techniques d’imagerie.

Les tests sanguins contribuent à la recherche de substances libérées dans le sang par les cellules tumorales telles que des biomarqueurs spécifiques détectables par des méthodes analytiques. Dans le cancer du pancréas, il existe peu de marqueurs sanguins spécifiques. Parmi les marqueurs recherchés, on peut citer l’antigène carbohydre CA19-9 qui est détecté physiologiquement dans les cellules de la voie biliaire et qui a été détecté pour la première fois chez un patient atteint de cancer pancréatique en 1981 (Koprowski et al. 1981). En effet, le CA19-9 est le biomarqueur du cancer du pancréas le plus spécifique pour le diagnostic des patients puisqu’il est détecté chez plus de 80% des patients. Il est aussi utilisé comme marqueur pronostic en contribuant à la surveillance de la maladie (Y. C. Kim et al. 2009). Il existe d’autres biomarqueurs comme l’antigène carcino-embryonnaire ou ACE qui se retrouve en quantité élevée dans le cancer pancréatique (augmentation du taux d’ACE jusqu’à 50%) et qui possède un intérêt dans la surveillance de la progression de la maladie.

Il existe plusieurs techniques d’imagerie pour le diagnostic du cancer pancréatique :

- La tomographie assistée par ordinateur (TC-scan) ou scanner aux rayons X : lors de la détection d’un cancer pancréatique, le scanner aux rayons X est le premier test à réaliser, ce qui permet d’acquérir des images 2D de l’organe (Shrikhande and D’Souza 2008).

- Les ultrasons abdominaux : cette technique ne permet pas le diagnostic précoce du cancer du pancréas puisqu'elle ne peut pas détecter les tumeurs de moins de 3 cm. Cette technique est considérée comme très peu sensible (Maitra et al. 2003).
- Les ultrasons endoscopiques : cette technique permet la détection des tumeurs de taille inférieure à 3 cm. En plus, les ultrasons endoscopiques permettent la réalisation de biopsies pancréatiques, en guidant une aiguille fine jusqu'aux tumeurs afin de les caractériser pour choisir les traitements nécessaires.

Une fois le diagnostic établi, les individus malades sont traités en fonction de plusieurs critères comme la taille de la tumeur, l'altération de l'environnement de la tumeur ou la présence des métastases.

I.4. Les traitements du cancer pancréatique

Après identification du cancer du pancréas, selon l'évaluation du stade de la tumeur, sa localisation, sa taille, la présence des métastases et l'étendue de la tumeur vers d'autres organes, les médecins font le choix du traitement nécessaire pour les patients (figure 21).

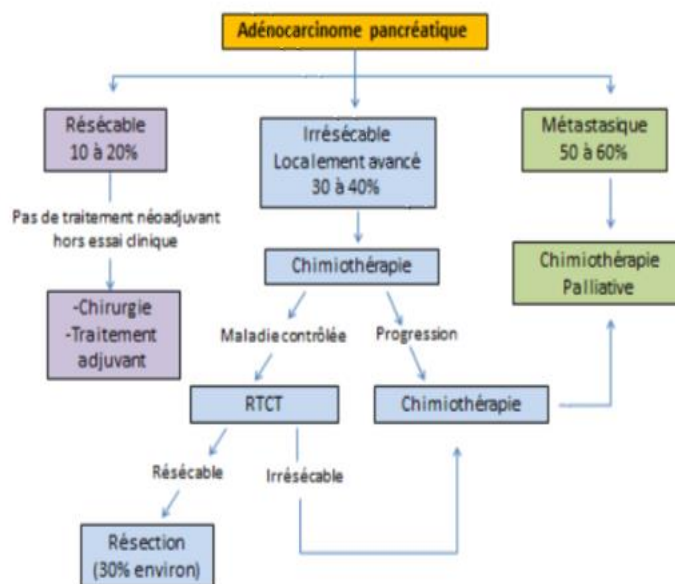


Figure 21 : Arbre décisionnel dans le traitement du cancer du pancréas (Mich et al 2013) (Samain, 2014)

I.4.1. La chirurgie

La chirurgie a pour objectif d'enlever la totalité de la tumeur pancréatique. Il existe plusieurs types de chirurgie dont la duodéno pancréatectomie céphalique (DPC) ou opération de Whipple qui est connue pour être la technique de référence pour les tumeurs de la tête du pancréas (Alexakis et al. 2004). Cette technique présente l'avantage de préserver des tissus dans la queue du pancréas nécessaire à la production des enzymes et des hormones. Cependant, la majorité des patients (environ 40% à 50%) subit un autre type de chirurgie, consistant en une résection macroscopique. Ces opérations de résection macroscopique risquent de laisser des cellules tumorales au niveau du pancréas. Dans certains cas, après opération, la tumeur peut toujours persister en imagerie dans le cas des résections incomplètes (Buchler et al. 2003). Par conséquent, des complications post-opérationnelles peuvent apparaître chez ces patients, comme une gastroparésie, des infections, des fistules ou des hémorragies, expliquant que la mortalité post-opérationnelle est plus élevée que pendant l'opération elle-même.

Les PDAC sont diagnostiqués généralement à des stades avancés, diminuant les chances de survie des patients à moins de 20%. Dans la plupart des cas diagnostiqués, la tumeur pancréatique n'est pas limitée au pancréas. C'est pourquoi, la chirurgie est généralement accompagnée de traitements adjuvants comme la chimiothérapie ou la radiothérapie (Alexakis et al. 2004). L'état de santé des patients est un des critères déterminants pour que la chirurgie du pancréas puisse être effectuée. La chirurgie est contre-indiquée en présence de problèmes de santé important. Ainsi, si la tumeur est présente près des gros vaisseaux sanguins à proximité du pancréas, la chirurgie est contre-indiquée car en essayant de retirer la totalité de la tumeur, le risque d'endommager un vaisseau et de provoquer une hémorragie est trop important. Lorsque la chirurgie n'est pas envisageable, la radiothérapie ou la chimiothérapie seront les thérapies indiquées pour les patients (Choix et al. 2012).

I.4.2. La radiothérapie

La radiothérapie consiste à utiliser des rayons gamma ou rayons X dans le but de tuer les cellules cancéreuses en altérant l'ADN ou l'ARN des cellules tumorales et des cellules voisines. Les rayons gamma sont délivrés par des sources radioactives. Les rayons X sont des rayons de haute énergie émis par des accélérateurs linéaires à particules. Puisque le pancréas possède une localisation profonde, l'irradiation à forte dose pose une problématique à cause du risque d'altérer des tissus ou des organes voisins sains (Brunner and Scott-Brown 2010). La radiothérapie possède l'avantage de diminuer les douleurs abdominales qui sont persistants chez les patients (Burris HA 1977).

La radiothérapie peut être utilisée comme traitement adjuvant post-opérationnel de la chirurgie pour détruire les cellules tumorales restantes dans la zone opérée (Evans et al. 2008). Pour augmenter l'efficacité de ce traitement, la radiothérapie est toujours associée à une chimiothérapie à faible dose comme le 5-FluoroUracile ou la capécitabine (xeloda*) pour une dose définie de radiations selon l'accessibilité aux cellules tumorales (10% de survie à 1 an après la radiothérapie seule versus 40% de survie après la radiothérapie associée au 5-FU). Généralement, pour le cancer du pancréas, la dose est de l'ordre de 50 à 60 Gy pendant 6 semaines accompagnée d'une chimiothérapie (le 5-FluoroUracile ou la capécitabine) à faible dose (Vincent et al. 2011).

I.4.3. La chimiothérapie :

Le cancer du pancréas présente une résistance à la chimiothérapie. Elle est utilisée surtout chez les patients présentant des tumeurs à un stade avancé où la tumeur ne peut pas être enlevée complètement par la chirurgie. Actuellement, plusieurs études ont montré l'augmentation significative de l'efficacité des médicaments anticancéreux en association par comparaison à la mono-chimiothérapie.

a. 5-FluoroUracile

Avant 1995, le 5-FluoroUracile (5-FU) a été l'agent chimiothérapique standard dans le cancer du pancréas avec un taux de réponse qui ne dépassait pas les 20%. Le 5-FU est un inhibiteur de la thymidylate synthase qui agit principalement sur la synthèse d'ADN. Il appartient à la famille des carbamates de la fluoropyrimidine et est administré par voie intraveineuse. Dans le but d'augmenter l'efficacité du 5-FU, en 1985 cet agent chimiothérapique a été testé en association avec d'autres molécules anticancéreuses comme la doxorubicine (Cullinan et al. 1985). Une autre association du 5-FU a été testée avec le cisplatine dans un essai clinique de phase III incluant 207 patients et a montré un certain bénéfice en termes d'efficacité (Strimpakos et al. 2008).

Pour éviter une toxicité très importante de 5-FU, il ne doit pas être indiqué chez les patients présentant un déficit en dihydropyrimidine déshydrogénase.

Afin d'être administrée par voie orale, une prodrug du 5-FU a été synthétisée, la capécitabine (Xéloda*). Cette molécule sera convertie en 5-FU par l'enzyme thymidine phosphorylase (Miwa et al. 1998). Cette

enzyme est surexprimée dans les tumeurs, dont le cancer du pancréas, ce qui donne plus de spécificité à la prodrug par rapport au 5-FU.

Des essais cliniques plus récents ont étudié la combinaison de la capécitabine avec la gemcitabine. Les résultats ont montré un bénéfice relatif par rapport à la gemcitabine seule, avec un taux de survie à 6 mois avec la gemcitabine seule et à 7,4 mois en combinaison avec la capécitabine avec une médiane de survie à 1 an allant de 19 à 26% (Cunningham et al. 2009).

b. Gemcitabine :

En 1996, un essai clinique randomisé de phase III a comparé le traitement des patients par le 5-FU ou la gemcitabine. Cet essai a montré des bénéfices de la gemcitabine par rapport au 5-FU i) avec une augmentation de la médiane de survie globale passant de 4.2 mois pour le 5-FU à 5.7 mois pour la gemcitabine, ii) avec un taux de survie à 1 an de 2% avec le 5-FU contre 18% avec la gemcitabine et iii) une réponse clinique de 4.8% pour le 5-FU contre 22% pour la gemcitabine (Burris HA 1997). C'est pourquoi la Food and Drug administration (FDA) a approuvé la gemcitabine comme agent anticancéreux utilisé en première intention dans le cancer du pancréas. La gemcitabine est un analogue de la désoxycytidine. Elle est métabolisée en dérivés actifs diphosphatés et triphosphatés. La forme triphosphatée s'incorpore entre les 2 brins d'ADN au cours de l'élongation par compétition avec les nucléosides désoxycytidine triphosphates, ce qui permet d'inhiber la synthèse de l'ADN dans les cellules. La forme diphosphorylée inhibe la ribonucléotide réductase qui est une enzyme clé de la synthèse des nucléotides.

En monochimiothérapie, la gemcitabine est administrée en perfusion intraveineuse de 30 minutes pour une dose recommandée de 1000 mg/m². La gemcitabine est métabolisée par la cytidine-désaminase dans le foie, l'intestin et le sang. Ce métabolisme aboutit à la formation des métabolites mono, di et tri phosphates (dFdCMP, dFdCDP et dFdCTP) dont les di et tri phosphates sont actifs.

L'association de la gemcitabine avec d'autres médicaments anti-cancéreux a été étudiée pour déterminer si cette combinaison pourrait apporter des bénéfices aux patients (Cascinu et al. 1999). Chez les malades ayant subi une résection chirurgicale macroscopiquement complète, l'association gemcitabine + capecitabine a montré une survie globale médiane de 28,0 mois pour les malades ayant reçu l'association gemcitabine + capécitabine et 25,5 mois pour des malades ayant reçu de la gemcitabine seule. Les taux de survie globale à 5 ans de la combinaison gemcitabine + capecitabine et gemcitabine seule sont estimés respectivement à 28,8% et 16,3%, (Colucci et al. 2002). En plus de l'association gemcitabine + capécitabine, considérée comme association standard dans le traitement de cancer du

pancréas, d'autres associations ont été encourageantes comme l'association gemcitabine + oxaliplatine. Les résultats de cette association sont meilleurs que la monothérapie avec la gemcitabine seule, avec un taux de réponse de 26.8% versus 17.3% respectivement, une médiane de survie de 5.8 mois versus 3.7 mois et un bénéfice clinique de 38.2% versus 26.9%. Cette combinaison est utilisée généralement chez les patients qui présentent une résistance à la gemcitabine seule (Demols et al. 2006). C'est pourquoi, des études sont menées afin d'augmenter l'activité de la gemcitabine en l'associant avec des molécules naturelles non toxiques, contribuant ainsi à améliorer les effets du médicament anticancéreux, tout en diminuant leurs effets indésirables et toxiques.

c. Autres traitements dans des essais cliniques :

Dans le traitement du cancer pancréatique, la gemcitabine reste la molécule de référence. Cependant, devant sa faible efficacité d'autres protocoles, dans des essais cliniques en cours, testent l'association de traitements anticancéreux. Des essais cliniques ont montré une augmentation de la survie de patients traités par la chimiothérapie ou la radiothérapie en combinaison avec la daltéparine qui est une héparine de bas poids moléculaire. Cet effet est dû à l'inhibition de la progression tumorale par la daltéparine (Maraveyas et al. 2012). Des molécules cytotoxiques, comme le pemetrexed et le docétaxel, qui inhibent la dépolymérisation des microtubules, contribuent au blocage des cellules en mitose (Palmerini et al. 2016). Ainsi, l'activité de la gemcitabine est potentialisée par sa combinaison avec des nanoparticules de paclitaxel (nab-paclitaxel) (Inman et al. 2018). Par ailleurs, dans le but de potentialiser l'activité des chimiothérapies, de nouvelles thérapies ciblées sont étudiées telles que l'association de la gemcitabine soit avec l'immunothérapie en utilisant des anticorps monoclonaux (AC) soit avec des molécules inhibitrices de la tyrosine kinases (TKI) (Iyengar et al. 2017). Ces AC et ces TKI ciblent directement deux voies principales : celle du VEGF (vasculoendothelial growth factor) ou celle de l'EGF (epidermal growth factor).

Récemment, la folfirinox, une association de 4 médicaments: oxaliplatine, irinotécan, 5 fluorouracile et acide folinique, a montré une amélioration significative la survie des patients du pancréas métastatique, comparativement à la gemcitabine. Ce protocole semble efficace avec un profil de toxicité faible et ces résultats sont prometteurs avec une survie globale de 77% à un an (Nitche et al. 2015).

II. Le cancer du foie

II.1. Généralités

Parmi les tumeurs malignes du foie, les plus fréquentes sont les métastases de tumeurs digestives dont le cancer pancréatique (Yamada et al. 2006).

En termes d'histologie, ces tumeurs sont classées en 4 catégories :

- i) les tumeurs malignes épithéliales (les plus fréquentes) comme le carcinome hépatocellulaire (CHC), le cholangiocarcinome intrahépatique, le cystadénocarcinome biliaire, l'hépatocholangiocarcinome, l'hépatoblastome et le carcinome indifférenciés ;
- ii) les tumeurs malignes mésenchymateuses (très rares) comme l'angiosarcome, l'hémangioendothéliome épithélioïde, le sarcome de Kaposi, le sarcome indifférencié, le rhabdomyosarcome, le leiomyosarcome, le fibrosarcome, le liposarcome ou le lymphome ;
- iii) les tumeurs malignes mixtes comme le carcinosarcome et
- iv) les tumeurs diverses comme la tumeur du sac Vitelin ou la tumeur rhabdoïdien (Cancer stat, 2016).

Le carcinome hépatocellulaire (CHC) et le cholangiocarcinome sont les plus fréquents et représentent 95% des tumeurs malignes primitives.

Le carcinome hépatocellulaire est un cancer qui se développe à partir des hépatocytes alors que le cholangiocarcinome est un cancer qui se développe à partir des cellules biliaires appelées cholangiocytes. Les maladies chroniques du foie font partie des facteurs de risque d'apparition de ces cancers. Cependant, le cholangiocarcinome est fréquent sur un foie sain, à l'inverse du carcinome hépatocellulaire qui se développe habituellement sur une cirrhose (75 à 80% des cas), plus rarement sur une hépatopathie chronique non cirrhotique, exceptionnellement sur un foie sain.

Pour la suite du manuscrit, nous nous intéresserons particulièrement au carcinome hépatocellulaire. Le carcinome hépatocellulaire est le cinquième cancer en terme de fréquence dans le monde et représente la troisième cause de mortalité par cancer (520 000 cas/an et 7,9 % des cancers) (Statistics Canada 2016). L'incidence de ces cancers primitifs du foie augmente dans les pays développés (Chine et Europe de Sud : 20 cas pour 100 000 personnes) en raison de l'augmentation du nombre de cas de cirrhose qui peut être induite par la stéatose hépatique non alcoolique ou par l'alcool, ou par des infections induites par le virus de l'hépatite B (VHB) ou C (VHC) (El-Serag 2012).

II.2. Origines de l'hépatocarcinome ou carcinome hépatocellulaire (CHC)

Les carcinomes hépatocellulaires sont classés selon leur origine, virale ou non virale (Virlogeux, Zoulim, and Parent 2013) :

a. Les cancers hépatiques non-viro induits :

Ces cancers possèdent des origines diverses comme une hépatite auto-immune, une maladie de Wilson, des maladies alcooliques du foie ou des stéatoses hépatiques non-alcooliques (El-Serag 2011).

b. Les cancers hépatiques viro-induits :

Ces cancers sont liés aux infections par le VHB ou le VHC :

5% de la population mondiale (soit 250 millions) sont infectés chroniquement par le virus de l'hépatite B (VHB) (Virlogeux, Zoulim, and Parent 2013). Quinze à vingt ans après infection par le VHB, ces individus présentent un risque important de 5 à 100 fois de développer un cancer hépatique par rapport aux individus sains. Ces risques sont aggravés par certains facteurs environnementaux (tabac, exposition à des agents toxiques comme des stéroïdes anabolisants ou des aliments contaminés par de l'aflatoxine B1, (l'aflatoxine B1 étant une mycotoxine, produite par des moisissures proliférant dans des régions chaudes et humides ; elle peut se retrouver dans des graines provenant de cultures céréalières contaminées ou pénétrer dans la chaîne alimentaire par l'intermédiaire de produits d'origine animale comme le lait), des facteurs viraux (comme l'existence des co-infections VHB/VHC/VHD, la présence d'une cirrhose, la durée de l'infection) ou des facteurs démographiques (sexe (l'infection par le VHB est plus fréquente chez l'homme que chez la femme), âge, origine ethnique) (Virlogeux, Zoulim, and Parent 2013). Le VHB possède la capacité de s'intégrer d'une manière directe dans le génome de l'hôte, ce qui cause une instabilité de génome, des délétions et des transpositions (figure 22). Le VHB cause une réaction inflammatoire liée à la réponse immunitaire des individus infectés (Naugler and Schwartz 2008).

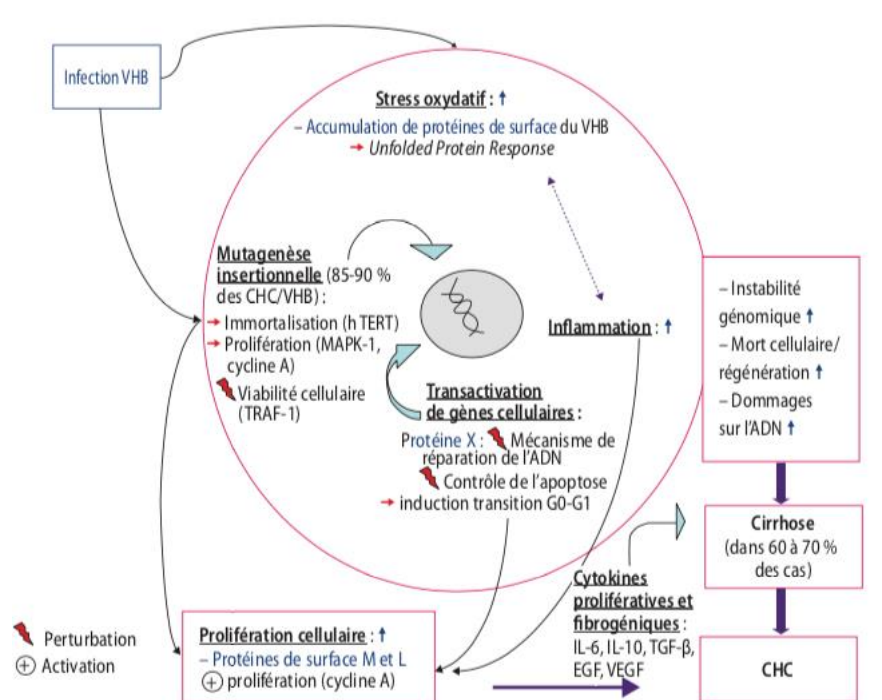


Figure 22 : mécanisme intracellulaire du cancer hépatique induit par le VHB (Virlogeux, Zoulim, and Parent 2013)

Le virus de l'hépatite C (VHC) est présent chez 180 millions de personnes. Sa présence augmente le risque du cancer hépatique de 15 à 20 fois. Le VHC ne possède pas le pouvoir de s'intégrer dans le génome de l'hôte. Par contre, il fait intervenir d'autres facteurs comme la capacité de certaines protéines virales à avoir des effets oncogéniques, tout en régulant la prolifération des cellules hôtes (Yurdaydin et al. 2010).

II.3. Diagnostic de l'hépatocarcinome

Après des symptômes douloureux abdominaux ou après une lésion focale nodulaire au niveau du foie détecté par échographie, le diagnostic d'hépatocarcinome sera mis en place. Il existe des diagnostics biologiques (dosage de l'alpha foeto-protéine sérique, des transaminases, de la bilirubine, des gamma-GT et du taux de prothrombine), histologiques (biopsie hépatique sous contrôle échographique) ou radiologiques (Tang, Chagnon, and Sirlin 2014.).

La majorité des moyens utilisés sont radiologiques comme l'IRM (Imagerie par Résonance Magnétique) et le scanner à triple acquisition portale, artérielle et parenchymateuse (Dimitri 2014). Au début, un nodule de 2 cm environ est observé, il peut être hypervasculaire

et détectable histologiquement ou hypovascularisé comme un nodule d'un tissu cirrhotique.

II.4. Les traitements de l'hépatocarcinome

Lors du diagnostic ou du suivi d'un hépatocarcinome chez un patient, la décision de la prise en charge thérapeutique et le choix de la stratégie thérapeutique se prennent après une réunion de concertation pluridisciplinaire (RCP) entre professionnels de santé comprenant des oncologues hépatologues, des radiologues et des chirurgiens. Cette RCP propose ainsi les traitements au patient. Les traitements du cancer du foie sont dépendants du stade du cancer, des caractéristiques de la tumeur et de l'état du patient, en particulier sa fonction hépatique déterminée par le score Child Pugh.

Le score de Child-Pugh aide à définir le pronostic pour les maladies chroniques du foie dont le cancer du foie.

Le système de détermination du stade intitulé « Barcelona Clinic Liver Cancer (BCLC) » est le système le plus utilisé par les spécialistes du cancer du foie afin de proposer les traitements les plus adaptés (figure 23). Le BCLC est basé sur la taille et le nombre de tumeurs hépatiques, sur l'invasion des vaisseaux sanguins par la tumeur, sur la propagation du cancer à l'extérieur du foie et sur le score de Child-Pugh. Son principal avantage est qu'il identifie les patients atteints de cancer précoce qui pourraient bénéficier d'un traitement curatif (stade 0 et stade A), ceux atteints d'un cancer à un stade intermédiaire (stade B) ou à un stade avancé (stade C) qui pourraient bénéficier de traitements qui prolongent la vie, et ceux dont l'espérance de vie est très limitée (stade D).

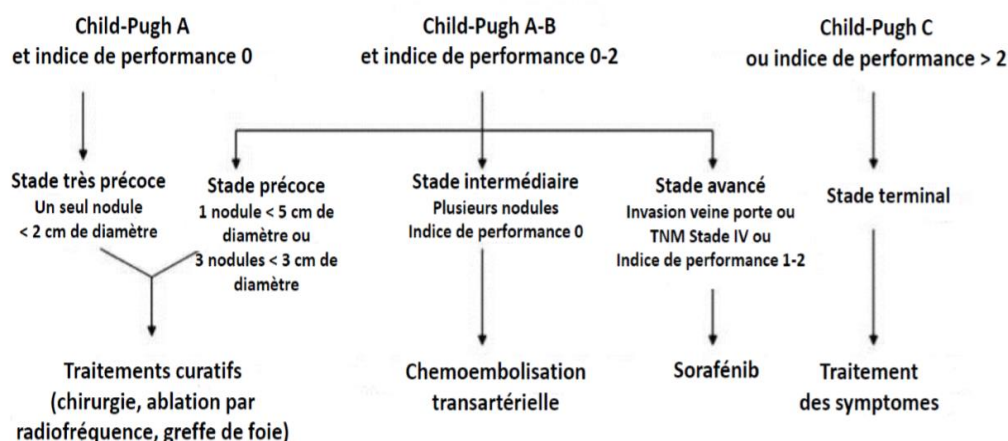


Figure 23 : Les différents traitements du cancer du foie (Virlogeux, Zoulim, and Parent 2013) en fonction du score Child Pugh et l'indice de performance) et du stade du cancer (évalué par le système BCLC)

II.4.1. La chirurgie

La chirurgie est le traitement de choix pour les patients au stade 0 ou A de la classification BCLC dont l'état de santé est suffisamment bon et dont la tumeur est unique et n'entraîne pas d'hypertension portale. Lors de la chirurgie hépatique, pour éviter les risques d'insuffisance hépatique post-opérationnelle, il faut garder au moins 30% de la masse hépatique pour assurer le fonctionnement du foie. L'échographie au cours de la résection hépatique contribue à localiser les lésions et à chercher d'autres lésions. On peut distinguer deux types de résections hépatiques : i) les résections qui enlèvent une partie du parenchyme sans limite ; ce sont les résections atypiques (Madoff, Abdalla, and Vauthey 2005) et ii) les résections qui enlèvent un ou des segments spécifiques, d'après les principes des segmentations hépatiques décrites par Couinaud qui consistent en deux types d'hépatectomies:

- a. Hépatectomie de type I droite ou gauche, avec une segmentectomie allant de 1 à 4
- b. Hépatectomie de type II, avec une segmentectomie de 5 segments et plus.

L'étendue de la résection dépend des rapports des pédicules vasculaires et biliaires avec la lésion. La mortalité à 3 mois de la chirurgie hépatique est de 5% (Bause, Les, and Esmo 2013).

II.4.2. La transplantation

En France, la transplantation hépatique pour le carcinome hépatocellulaire est la première indication de transplantation hépatique (Duvoux C, 2016). La transplantation hépatique est indiquée lorsque la chirurgie n'est pas possible et quand la tumeur mesure moins de 5 cm. Chez les individus cirrhotiques, ce traitement permet de traiter la tumeur et sa cause en même temps. Les taux de survie sont de l'ordre de 70% à 5 ans en comparaison aux transplantations pour cirrhose sans cancer hépatique (V Mazzaferro et al. 1996). Par contre, l'état physiologique, l'âge et l'intoxication alcoolique peuvent être des contre-indications.

Après transplantation, pour éviter les réactions du système immunitaire et le rejet de greffe, les patients doivent prendre des médicaments immunosuppresseurs. Le protocole standard après transplantation

hépatique repose sur l'association d'anticalcineurines (tacrolimus ou ciclosporine), mycophenolate mofetil et corticoïdes (prednisolone). En général, les corticoïdes sont arrêtés 6 à 12 mois après transplantation hépatique. Les anticalcineurines et le mycophenolate mofetil font l'objet d'une adaptation de posologie après dosage sanguin de ces 2 médicaments. Dans le cas de transplantation hépatique pour le traitement du cancer, les inhibiteurs de m TOR (sirolimus et everolimus) sont privilégiés mettant à profit leurs effets antiprolifératifs malgré de nombreux effets indésirables (Calmus Y 2009). La récurrence de cancer après transplantation est la cause principale de mortalité après transplantation hépatique et est un événement catastrophique compte tenu de la rareté des organes. La majorité des récurrences surviennent dans les 2 premières années post-greffe. Les facteurs permettant de limiter la récurrence sont l'identification des facteurs de mauvais pronostic avant la greffe hépatique, l'analyse de l'explant hépatique (mauvaise différenciation, microinvasion vasculaire, nodules satellites, contingent de cholangiocarcinomes) et l'immunosuppression postopératoire (forte exposition aux anticalcineurines). Ainsi, après transplantation, le taux de récurrence doit être réévalué à partir de données histopathologiques de l'explant hépatique et un ajustement du traitement immunosuppresseur peut être proposé.

II.4.3. L'ablation locale

L'ablation locale a pour objectif de détruire les cellules cancéreuses par des procédés chimiques ou physiques. La destruction chimique consiste en l'injection percutanée d'éthanol pour brûler la tumeur d'un diamètre supérieure à 2 cm et la destruction physique se fait par radiofréquence en utilisant une fine sonde en forme d'aiguille insérée à travers la peau dans la tumeur qui ne dépasse pas 5 cm de diamètre. Ces procédures sont présentées comme alternatives à la chirurgie. Ces techniques sont recommandées chez les patients atteints de cancer de stade BCLC 0, qui ne peuvent pas subir de résection chirurgicale ou de greffe de foie (Guan and Liu 2006). Selon la localisation et la taille de la tumeur, cette destruction est utilisée tout en essayant de détruire les cellules hépatiques tumorales sans endommager les cellules hépatiques voisines (Vincenzo Mazzaferro et al. 2004).

II.4.4. La chimioembolisation

La chimioembolisation est un traitement utilisé dans le cas d'un cancer de stade BCLC B ou chez des patients en attente d'une transplantation dans un délai supérieur à 6 mois. Cette technique a comme objectif d'augmenter les doses de médicaments anticancéreux sans entraîner de toxicité chez les patients concernés (Raoul et al. 1997). Dans le but de s'approcher au centre

de la tumeur et pour éviter la propagation des médicaments anticancéreux dans la circulation systématique, ces traitements sont associés à un blocage du sang qui alimente la tumeur (embolisation) (figure 24). Cette technique contribue à la rechute de l'hypoxie dans la tumeur. En passant dans les vaisseaux sanguins, le médicament atteint les cellules cancéreuses et les cellules hépatiques normales, mais ces dernières dégradent le médicament avant qu'il n'atteigne le reste du corps. Les médicaments anticancéreux pouvant être utilisés sont la doxorubicine, le cisplatine ou la mitomycine (Louafi et al. 2007). Il existe la chimioembolisation transartérielle classique qui consiste à la mise en place d'un cathéter dans l'artère hépatique. Ce procédé se réalise sous radiologie pour s'assurer que le cathéter va bien dans le vaisseau qui alimente les cellules tumorales.

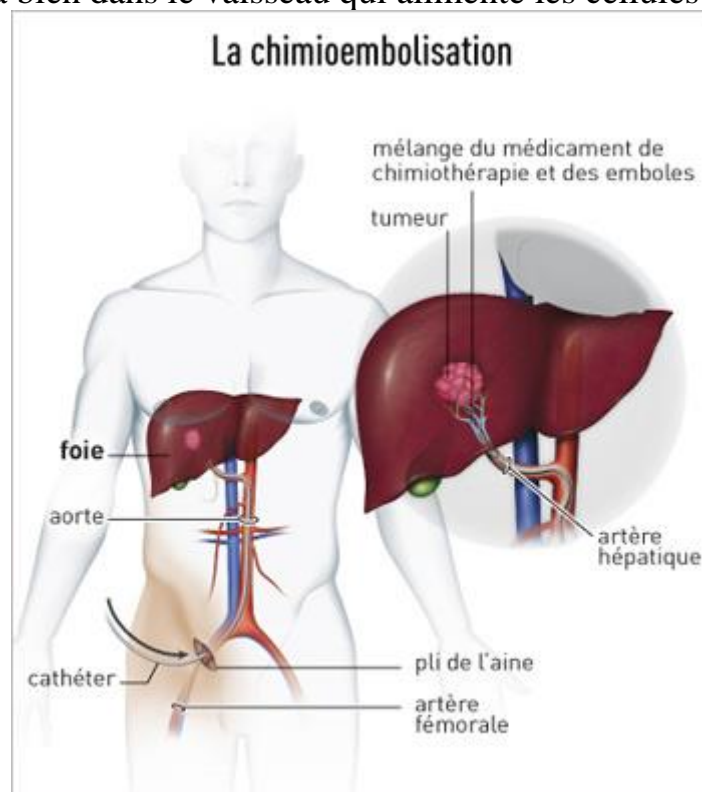


Figure 24 : Traitement du cancer du foie par mélange de la chimiothérapie avec des embolies (Madoff, Abdalla, and Vauthey 2005)

Il existe d'autres techniques transartérielles plus récentes

a. A la place de la classique chimioembolisation transartérielle, de petites billes chargées en doxorubicine visent à délivrer la doxorubicine directement dans la tumeur en même temps et à obstruer les vaisseaux alimentant la tumeur. Ces billes ont montré une moindre diffusion de la chimiothérapie à l'extérieur du foie, ce qui entraîne moins d'effets secondaires indésirables avec au moins une activité similaire à celle de la chimioembolisation transartérielle classique.

b. Le rayonnement interne à particules radioactives (Iode 131 ou Yttrium 90) vise à amener la radiothérapie proche de la tumeur et à obstruer les vaisseaux. Cette technique consiste à placer un tube dans l'artère hépatique puis à libérer des billes microscopiques à travers ce tube. Ces microsphères atteignent la tumeur à travers les vaisseaux sanguins du foie et contiennent l'iode 131 ou l'yttrium 90. Elles bloquent donc l'arrivée de sang destiné à la tumeur tout en émettant des rayonnements qui détruisent les cellules tumorales qui les entourent. En raison d'un ciblage très précis, cette technique consiste à délivrer une dose plus importante de rayonnements que la radiothérapie externe habituelle. Un avantage de ce traitement est qu'il permet aussi de traiter d'éventuelles tumeurs existantes mais non détectables et qu'il peut être utilisé indépendamment du nombre ou de la taille des nodules dans le foie.

II.4.5. La thérapie ciblée

La thérapie ciblée contribue au ralentissement de la progression du cancer en empêchant les vaisseaux sanguins alimentant la tumeur de se développer. Cette technique est indiquée si les autres traitements n'ont pas obtenu de bons résultats ou lorsque la tumeur n'est pas accessible aux autres traitements utilisés. Pour le cancer du foie, le seul médicament de la thérapie ciblée autorisée est le sorafenib (Welker and Trojan 2011). Ce traitement est un traitement systémique administré par voie orale (400 mg 2 fois par jour) ce qui lui donne la capacité d'atteindre les cellules cancéreuses quelle que soit leur localisation dans le corps. Le traitement par sorafenib a montré une augmentation de la survie moyenne de 2,8 mois chez les patients atteints de cancer hépatique de stade C avec un score de Child Plugh A dans un essai clinique (Welker and Trojan 2011). Le sorafenib est un traitement standard pour les cancers de stade C selon la classification BCLC.

II.4.6. La chimiothérapie

A un stade avancé, la chimiothérapie PO ou IV systémique en dehors d'une administration directe intraartérielle peut aussi être envisagée. Mais aucun médicament anticancéreux n'a montré une prolongation de l'espérance de vie du patient. La doxorubicine est utilisée dans le traitement du carcinome hépatocellulaire avancé. Certains protocoles de chimiothérapie tel que le protocole d'association d'oxaliplatine avec la capécitabine (Xelox) ou le protocole d'association d'oxaliplatine avec la gemcitabine (Gemox) ont montré un ralentissement la croissance de la tumeur chez certains patients (ESMO 2014).

III. La recherche de modèles cellulaires prédictifs en cancérologie

La recherche en cancérologie a beaucoup progressé durant ces dernières années. Elle porte sur la prévention, la détection, le diagnostic et le contrôle de la survie des patients et le développement de modèles cellulaires pour la recherche de nouveaux médicaments candidats et de nouveaux protocoles médicamenteux. Ces modèles cellulaires ont pour but de mieux comprendre le fonctionnement des cellules cancéreuses, de trouver des traitements efficaces et adaptés pour chaque tumeur en générant le moins d'effets indésirables possibles. Les nouveaux traitements qui ont montré des effets sur les modèles cellulaires standard de recherche seront ensuite testés dans des essais cliniques (Voskoglou-Nomikos, Pater, and Seymour 2003).

III.1. Les modèles cellulaires existants

L'Institut National du Cancer (NCI ou National Cancer Institute) a introduit dans l'évaluation de l'efficacité des nouveaux médicaments des modèles *in vitro* avant de commencer les essais cliniques (Shoemaker et al. 1988). Ces modèles *in vitro* sont utilisés pour donner des réponses prédictives de leurs activités en clinique (Bazou et al. 2016).

a. Les xénogreffes tumorales

Les xénogreffes consistent en la greffe directe des cellules tumorales chez l'animal (Risbridger, Toivanen, and Taylor 2018). Généralement, les tumeurs humaines conservent la majorité des caractéristiques histologiques, la morphologie et le caryotype des tumeurs primitives. Pratiquement, pour éviter les modifications majeures des caractéristiques des cellules tumorales transplantées, les xénogreffes sont réalisées chez les souris athymiques (Koya et al. 2016). Par contre, l'immunité n'est pas prise en compte parce que ces tumeurs se développent dans des conditions d'immunodéficiences. Malgré ces avantages, l'utilisation de ce modèle reste très coûteuse et limitée à certains processus biologiques. En 2001, le NCI a étudié si l'activité des molécules de chimiothérapie observée dans les modèles précliniques était corrélée à l'efficacité de ces molécules candidates dans les essais cliniques de phase II (Johnson et al. 2001). Ces résultats ont montré que la corrélation entre les résultats issus de la phase préclinique et ceux de la phase II n'était pas significative, soulignant la nécessité de trouver des modèles précliniques *in vitro* plus simples et plus prédictifs reflétant mieux les caractéristiques des tumeurs *in vivo*.

b. Les cultures 2D

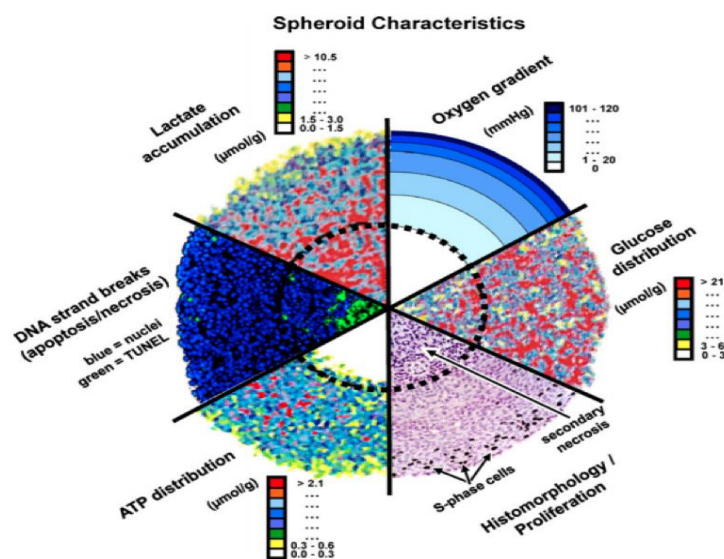
Le modèle cellulaire de culture 2D est le modèle le plus utilisé en recherche en cancérologie (Ellem, De-Juan-Pardo, and Risbridger 2014). Ces cultures cellulaires contribuent à l'évaluation préliminaire de l'activité des médicaments. Cependant, cette évaluation reste loin de la réalité biologique complexe des tumeurs et des études *in vivo* (Xu, Farach-Carson, and Jia 2014). Toutes les cellules cultivées en monocouche 2D ont accès à l'oxygène et aux nutriments, ce qui ne reflète pas la réalité et la complexité des tumeurs *in vivo*. Particulièrement, le manque d'oxygène ou l'hypoxie n'est pas prise en compte dans ces cultures classiques. Aussi, il est nécessaire de trouver des modèles cellulaires *in vitro* plus prédictifs, reflétant mieux la complexité et l'hétérogénéité de l'environnement des cellules tumorales *in vivo* (Rakic et al. 2017).

c. Les cultures 3D

Durant les dix dernières années, l'intérêt pour les cultures 3D a augmenté (Grego et al. 2017). Les modèles cellulaires en 3D consistent i) soit à cultiver les cellules dans des matrices spécifiques pour empêcher les cellules d'adhérer à un support plastique tout en favorisant la croissance tridimensionnelle des cellules, ii) soit à cultiver *in vitro* des biopsies de tissus tumoraux humains en 3D (Hoffman 2001). Ces cultures présentent un modèle complexe intermédiaire entre les cultures classiques 2D et les modèles *in vivo* les plus complexes. L'utilisation de ces modèles facilite et contribue à la compréhension des cellules tumorales dans un environnement imitant la situation *in vivo*, ainsi qu'au développement de nouvelles thérapies. Cette technique permet de conserver l'architecture, la morphologie et l'hétérogénéité des cellules tumorales (Maya-Mendoza et al. 2016). La culture 3D imite la réalité biologique des tumeurs telles que l'oxygénation, la nutrition et certaines interactions cellule-cellule ou cellule-matrice, ce qui est important pour étudier les mécanismes et la résistance à la chimiothérapie (Hirt et al. 2014).

Les sphéroïdes sont des cultures cellulaires tridimensionnelles 3D très utilisés en cancérologie aussi bien en recherche fondamentale que pour la mise au point de médicaments anticancéreux. Ils apportent un supplément à l'utilisation des cultures bidimensionnelles (2D) car ils reproduisent plus le microenvironnement tumoral donnant un meilleur reflet de la réponse physiologique *in situ*, d'où une estimation plus précise des effets des molécules testées. Les sphéroïdes sont utilisés comme un modèle de recherche des nouveaux agents médicamenteux (Jimenez Valencia et al. 2015). Ce modèle présente une architecture similaire de la tumeur *in vivo*

et en ce qui concerne la pénétration des médicaments de la périphérie au noyau de la tumeur (figure 25). Les régions hypoxiques, le manque de nutriments, l'accumulation des déchets et le faible pH sont des facteurs impliqués directement dans la formation d'un noyau nécrotique au niveau des sphéroïdes denses et volumineux (Zanoni et al. 2016). Les cellules cancéreuses cultivées dans ce modèle de culture, sont exposées à des gradients variables d'oxygène, de catabolites et de nutriments (H. S. Bell et al. 2001). En effet, les cellules situées à la périphérie miment les cellules proches des capillaires *in vivo*, alors que les cellules centrales s'adaptent métaboliquement dans ce modèle pour maintenir l'homéostasie intracellulaire. Finalement, ce modèle présente des caractéristiques prolifératives et fonctionnelles, des interactions intercellulaires et cellule-matrice et des mécanismes de pénétration des médicaments dans les cellules, similaires à celles trouvées au niveau des tumeurs *in vivo*. Aussi, l'intérêt et la nécessité d'utiliser ce modèle de sphéroïdes pour mimer les tumeurs lors de l'étude de nouveaux agents thérapeutiques est grand, afin d'obtenir des résultats et réponses comparables à celles trouvées dans les tumeurs *in vivo*.



Figures 25 : Caractéristiques d'un sphéroïde (Hirschhaeuser et al. 2010)

III.2. Défi dans la recherche de nouveaux traitements anti-cancéreux

Malgré les billions de dollars dépensés dans la recherche en cancérologie, le cancer persiste avec une faible amélioration dans l'obtention de résultats

en phase précoce du développement ou dans la prédictibilité ou dans la compréhension des mécanismes pour l'obtention de nouvelles cibles et de nouveaux traitements. Parmi les nouveaux médicaments anticancéreux ayant prouvé une efficacité dans les essais cliniques, environ 5% d'entre eux en moyenne ont montré un effet similaire en phase préclinique (Kola and Landis 2004). Généralement, la découverte des médicaments reste difficile, et plus particulièrement dans le domaine de l'oncologie à cause de mécanismes encore inconnus dans la formation et le maintien des cellules cancéreuses, qui restent un obstacle majeur à l'avancement des recherches. Les stratégies et les modèles précliniques utilisés pour évaluer de nouveaux agents de chimiothérapie qui ne sont pas optimaux peuvent justifier l'échec de ces agents dans les essais cliniques avancés (Hutchinson and Kirk 2011). Or, plus de 50% de l'investissement total de la recherche à de nouveaux agents sont dépensés pendant les essais cliniques, cette étape étant connue pour être la phase la plus coûteuse du développement des médicaments (Hutchinson and Kirk 2011) (Lacombe and Liu 2013). Pour passer en phase clinique, les nouvelles molécules doivent avoir une efficacité prouvée en phase préclinique. Comme déjà mentionné, les lignées de cellules tumorales humaines ou les xénogreffes de cellules humaines administrées par voie sous-cutanée chez des rongeurs sont des modèles standards utilisés en recherche en cancérologie. Une des plus grandes lacunes des lignées cellulaires est la perte de l'état original des cellules tumorales après être passées par nombreuses générations en culture. Les cellules cultivées en monocouche ne présentent pas la complexité architecturale de réelles tumeurs, telles que les cellules inflammatoires et la vascularisation (Hillen and Griffioen 2007). Pour les xénogreffes, les interactions intercellulaires sous-cutanées ne présentent pas les vraies interactions au niveau tumoral (Kamb 2005). La recherche de nouveaux médicaments requiert des modèles cellulaires précliniques mimant le fonctionnement des cellules tumorales *in vivo* pour mieux comprendre cette pathologie. Les modèles 3D présentent la capacité d'imiter l'architecture et l'hétérogénéité des cellules tumorales (Benien and Swami 2014). Ainsi, ces cultures peuvent aider à la sélection de nouvelles molécules candidats médicaments avant de passer aux essais cliniques contribuant ainsi à éviter les échecs cliniques et à réduire le temps de développement des médicaments (figure 26).

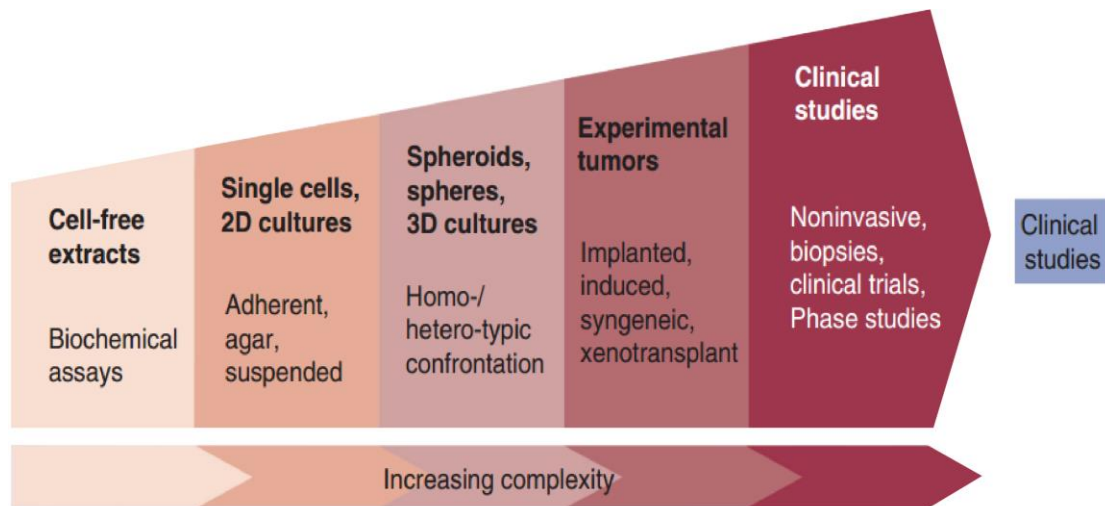


Figure 26 : Importance des cultures 3D dans la sélection des médicaments pendant leur développement (Benien and Swami 2014)

IV. Microenvironnement de la tumeur

En 1889, la théorie graine-sol a été suggérée par le chirurgien Stephen Paget, consistant à expliquer la dissémination des cellules cancéreuses en donnant un rôle important au microenvironnement (le sol) dans lequel prolifère une cellule tumorale (la graine). Le dysfonctionnement, la multiplication et la prolifération au niveau de certaines cellules d'une manière anarchique sans contrôle, cause la formation d'une tumeur (Whiteside 2008). Généralement, un tissu sain présente des caractéristiques différentes de celles d'un tissu tumoral (figure 27).

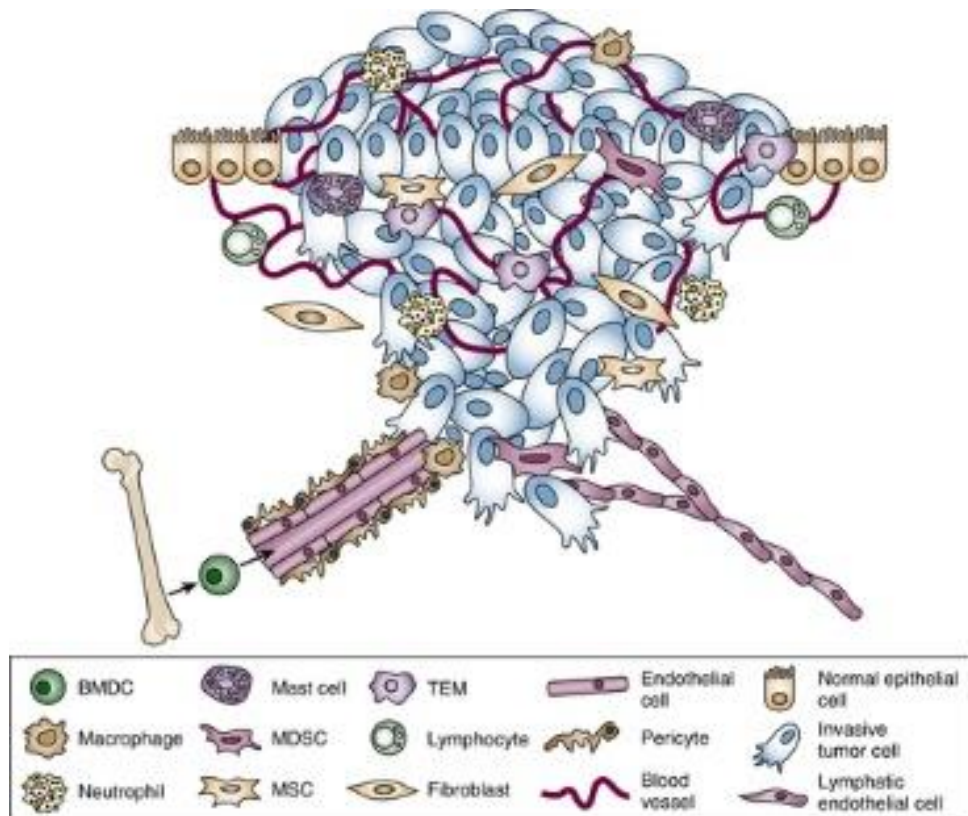


Figure 27 : Microenvironnement de la tumeur (Fukumura and Jain 2007)

Pour avoir une meilleure compréhension de la progression tumorale et du développement des nouveaux traitements dans le domaine de la cancérologie, le microenvironnement tumoral a pris de plus en plus d'importance (Nolan and Deangelis 2018). Ce microenvironnement est défini comme un environnement complexe autour des cellules cancéreuses, constitué par certains composants moléculaires et cellulaires qui interagissent avec les cellules tumorales et qui évoluent avec la progression tumorale.

Les cellules cancéreuses, immunitaires, vasculaires et fibroblastiques constituent la composante cellulaire du microenvironnement cancéreux (McLean and Mehta 2017). Le comportement anormal des cellules tumorales est impliqué directement dans le changement de la composition du milieu extracellulaire. Ce milieu est constitué de la matrice extracellulaire qui joue le rôle d'un réseau tridimensionnel, de certaines enzymes, de médiateurs de la communication cellulaire et d'autres macromolécules (Becker et al. 2016).

IV.1. Matrice extracellulaire

Comparée aux cellules normales, la matrice extracellulaire tumorale se trouve altérée à cause d'une augmentation non contrôlée de nombreuses cellules fibroblastiques (Aznavoorian et al. 1990). Ces cellules sont responsables de la synthèse de molécules d'adhésion et des facteurs de croissance. La composition et la quantité de la matrice extracellulaire varient selon le type de la tumeur (Bissell and Radisky 2001). La matrice extracellulaire est impliquée directement dans la réponse des cellules cancéreuses aux traitements ainsi que dans la prolifération et la capacité des tumeurs à devenir métastatiques.

L'organisation structurelle et la composition de la matrice tumorale contribuent à diminuer la pénétration des macromolécules tout en augmentant la pression du liquide interstitiel dans la tumeur (Netti et al. 2000). De plus, la sensibilité des cellules cancéreuses aux chimiothérapies et aux radiations est influencée par la structuration tridimensionnelle des cellules elles-mêmes (Imamura et al. 2015). L'architecture tumorale, la polarité, la matrice extracellulaire, l'expression des récepteurs et de certaines protéines présentent des grandes différences entre la réalité tumorale *in vivo* et les cultures classiques 2D (Breslin and O'Driscoll 2013). Par contre, les cultures cellulaires 3D ont montré des similitudes avec de nombreuses caractéristiques tumorales *in vivo* indispensables pour la division, la différenciation et les sécrétions cellulaires, telles que les interactions cellule-cellule ou cellule matrice, la morphologie et la polarisation des cellules cancéreuses (O'Brien, Zegers, and Mostov 2002).

IV.2. Vascularisation de la tumeur

Lors de l'angiogenèse, les cellules endothéliales qui forment les capillaires sanguins préexistants dans le microenvironnement tumoral, se multiplient et s'infiltrant pour former un réseau sanguin au niveau tumoral (Kugaevskaya, Timoshenko, and Solovyeva 2015). Ces cellules endothéliales se comportent phénotypiquement et fonctionnellement d'une manière différente de celle des cellules normales. Au niveau tumoral, les cellules endothéliales des capillaires sanguins présentent des altérations au niveau des interactions cellule-cellule et cellule-matrice, ainsi qu'au niveau de leur migration et de leur prolifération (Thompson and Maity 2014). Les cellules endothéliales tumorales secrètent des enzymes clés dans la progression des cellules tumorales telles que les enzymes de type

glycosidase (heparanase) et de type protéase (urokinase) (Irani and Dehghan 2017). Pour assurer leur propre multiplication, les cellules cancéreuses surexpriment certains facteurs de croissance, notamment le VEGF, ainsi que le récepteur du VEGF (VEGF-R) (Salvatore et al. 2015) et certaines protéines transmembranaires telles que les intégrines qui sont impliquées dans l'adhésion cellulaire.

Le microenvironnement tumoral présente également une augmentation de charges négatives à cause des composés phospholipidiques comme la phosphatidylserine (Sharma and Kanwar 2017). Contrairement aux cellules normales, les cellules tumorales exposent les phosphatidylserines de la membrane plasmique à l'extérieur, d'où la particularité phénotypique spécifique du microenvironnement tumoral menée par les cellules endothéliales (Desai et al. 2016).

IV.3. Hypoxie

L'hypoxie est définie comme le manque de quantité d'oxygène au niveau des cellules. Ce processus est un résultat du déséquilibre entre le taux d'oxygène apporté aux cellules et sa consommation (Cosse and Michiels 2008). Les tumeurs solides sont exposées à un gradient plus faible d'oxygène que celles des cellules normales à cause de l'hétérogénéité cellulaire au niveau tumoral et de l'incapacité du système vasculaire à fournir une quantité adéquate d'oxygène aux cellules tumorales (van den Brand et al. 2017). L'hypoxie peut être liée à plusieurs causes:

- *Hypoxie transitoire*

L'hypoxie transitoire est liée à l'arrêt temporaire du fonctionnement des vaisseaux sanguins, ce qui cause un flux sanguin inadéquat au niveau de la tumeur (H. Lu et al. 2016). Cela peut se produire en raison d'anomalies fonctionnelles dans le système vasculaire tumoral, telles qu'un réseau vasculaire désorganisé, une vasodilatation, une forme allongée et tortueuse, une muqueuse endothéliale incomplète et un manque de récepteurs physiologiques. Les régions hypoxiques sont exposées à des apports réduits de nutriments tels que le glucose et les acides aminés essentiels (Therade-Matharan et al. 2004). Pour survivre, proliférer et obtenir l'énergie nécessaire, les cellules tumorales utilisent souvent la glycolyse plutôt que le métabolisme oxydatif (Eales, Hollinshead, and Tennant 2016).

- *Hypoxie chronique*

L'hypoxie chronique est liée à l'expansion tumorale et à une augmentation des distances qui séparent le tissu tumoral et les capillaires sanguins (Rofstad et al. 2007). Cette expansion est impliquée dans la variation du gradient de diffusion de l'oxygène, des vaisseaux vers la zone de nécrose, responsable de l'apparition des apports réduits de l'oxygène aux cellules éloignées des vaisseaux sanguins, et à la détérioration de la géométrie de la diffusion, par exemple, une circulation sanguine simultanée ou à contre-courant dans le réseau de microvaisseaux tumoraux (Conotte et al. 2018). Les cellules cancéreuses des régions proches des vaisseaux sanguins peuvent migrer dans les zones hypoxiques et devenir nécrotiques, en raison du manque de nutriments. Une fois que les cellules tumorales proches des vaisseaux sanguins sont mortes, les nutriments apportés aux cellules hypoxiques permettent à ces cellules de survivre et de régénérer la tumeur (Muz et al. 2015).

- *Hypoxie anémique*

L'hypoxie transitoire est due soit à une faible capacité du sang à transporter l'oxygène soit à une anémie qui peut être induite par la thérapie (Mistry et al. 2018).

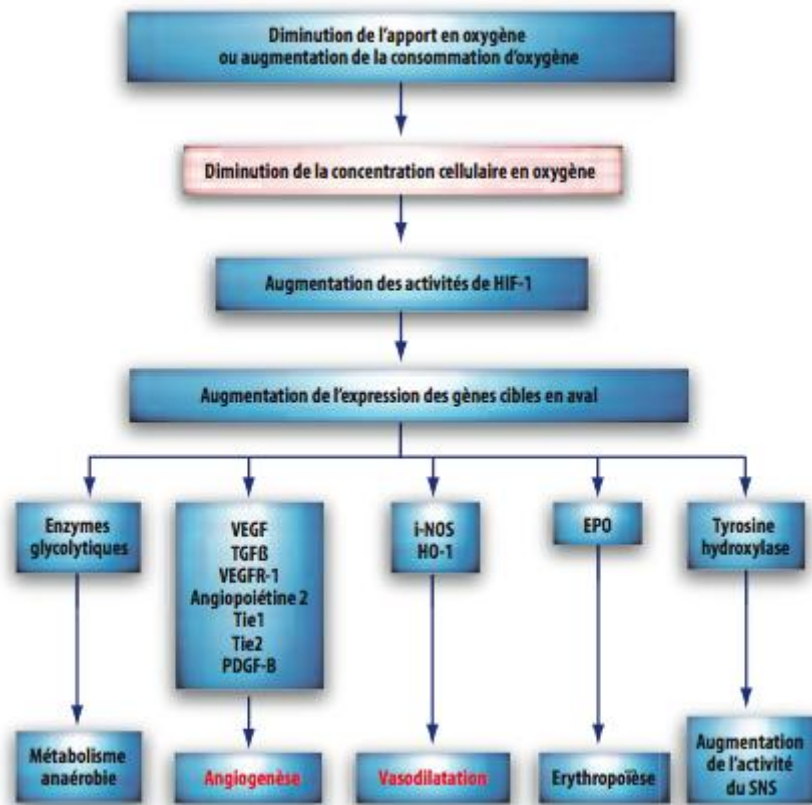


Figure 28: Les effets de l'hypoxie sur les cellules tumorales (Schito and Semenza 2016)

Au niveau du microenvironnement tumoral, en réponse à l'hypoxie, une principale voie de signalisation se met en place (Tredan et al. 2007). Cette réponse est liée à l'activation d'un facteur de transcription HIF-1 (hypoxia-inductible factor) et HIF-2 qui sont des hétérodimères composés de deux sous unités protéiques : la sous-unité HIF- α et la sous-unité HIF- β (Semenza 2012) (figure 28). HIF est impliqué dans l'activation de l'expression de certains gènes pour remédier à cette situation tels que les gènes impliqués dans la prolifération, la survie, la migration, le métabolisme et le pH des cellules tumorales (Schito and Semenza 2016). L'expression de HIF dans les conditions hypoxiques joue un rôle dans le changement du métabolisme aérobie vers des voies anaérobiques (D. Y. Kim et al. 2018).

Le défaut d'oxygénation au niveau des cellules cancéreuses stimule l'expression des facteurs pro-angiogéniques tels que VEGF, FGF et PDGF (Beck et al. 2011). Par contre, les vaisseaux sanguins tumoraux présentent

des hétérogénéités et des branchements irréguliers causant un flux sanguin irrégulier au niveau des tumeurs (Liao and Johnson 2007).

De plus, l'hypoxie est impliquée directement dans la dissémination métastatique, la progression tumorale et la résistance aux chimiothérapies et à la radiothérapie (Moeller, Richardson, and Dewhirst 2007) (Rohwer and Cramer 2011). La radiothérapie nécessite la présence d'oxygène pour induire l'irradiation des cellules par une production des radicaux libres. Cette irradiation induit des cassures au niveau des doubles brins d'ADN. Cependant, dans les régions hypoxiques, la pression en oxygène est faible, ce qui cause une diminution de la quantité de radicaux libres et donc une diminution des dommages au niveau de l'ADN (Horsman and Overgaard 2016). Ainsi, la vascularisation irrégulière, la diminution du flux sanguin et l'augmentation de la pression dans la tumeur, jouent un rôle dans la diminution de la diffusion des médicaments dans la tumeur. Egalement, la résistance aux agents chimiothérapeutiques est due à un arrêt du cycle cellulaire en phase G1/S des cellules cancéreuses (Ortmann, Druker, and Rocha 2014).

Chapitre 3: Les polyphénols végétaux

I. Les polyphénols végétaux

I.1. Généralités

Les polyphénols sont des composés chimiques aromatiques composés de plusieurs fonctions hydroxyle (-OH) présents dans toutes les parties des végétaux. La répartition de ces composés varie selon les tissus des légumes et des fruits (Tsao 2010). Ces composés phénoliques sont impliqués dans certaines réactions de défense contre différents stress telles que la lumière et la faible température, ainsi que contre d'autres stress comme les agents pathogènes (Bouchenak and Lamri-Senhadjji 2013). Il existe des molécules phénoliques simples comme les acides phénoliques, ainsi que des substances sous forme polymérisée comme les tanins (Cheynier 2005). Les composés phénoliques possèdent au moins un noyau benzénique lié directement à un groupe hydroxyle. Ce groupe hydroxyle peut être libre ou engagé dans une autre fonction telle qu'un éther ou un ester (Tarascou et al. 2010).

Les polyphénols représentent la base des principes actifs trouvés dans les végétaux. En effet, la qualité nutritionnelle des légumes et des fruits ainsi que leur impact sur la santé de l'homme sont liés directement à la présence de ces composés phénoliques.

I.2. Biosynthèse des polyphénols

Les polyphénols dérivent de deux voies métaboliques majeures: la voie de l'acide shikimique et la voie de l'acétate/malonate (figure 29).

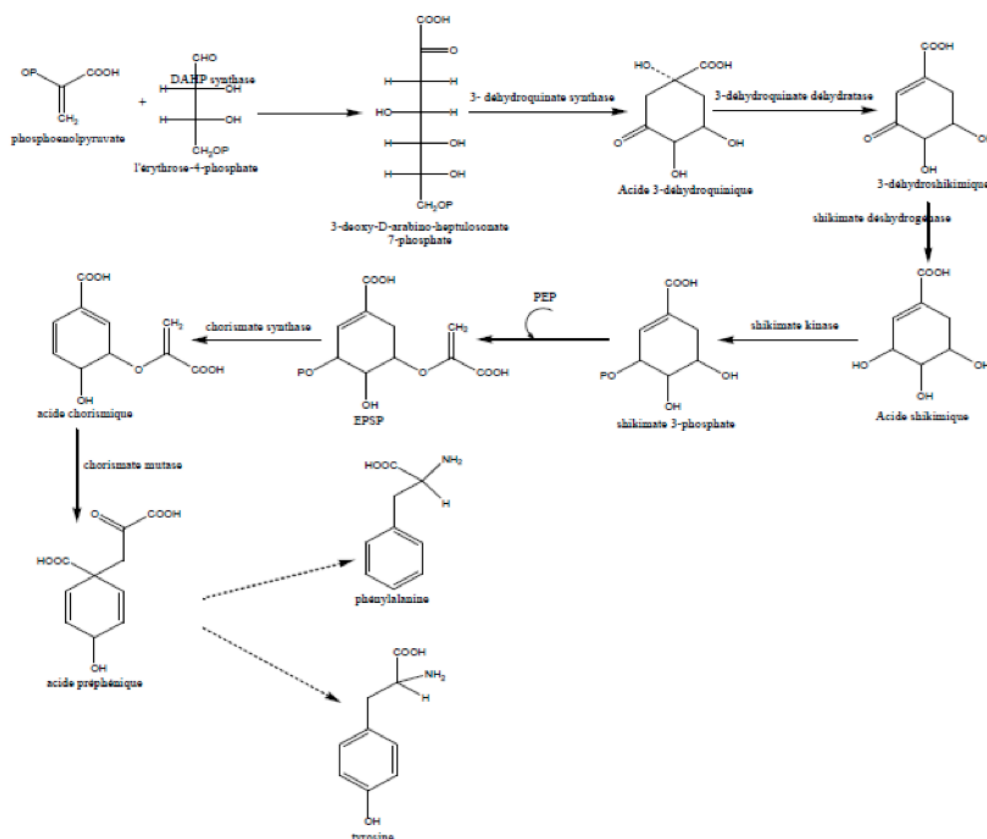


Figure 29 : voie de synthèse des polyphénols (Tsaio 2010)

Dans les plantes et les microorganismes, la voie de l'acide shikimique présente la voie la plus intéressante pour la synthèse des composés phénoliques. La biosynthèse des composés aromatiques tels que la phénylalanine, la tyrosine et le tryptophane, est impliquée directement dans la synthèse de certains produits naturels secondaires (Roy 2016). La phénylalanine, la tyrosine et le tryptophane contribuent à la formation des produits naturels comme les flavonoïdes, les alcaloïdes et les coumarines (Bilal et al. 2016).

Pour la voie de l'acétate/malonate, des réactions de glycolyse et d'oxydation sont mises en place pour former de l'acétyl CoA. Par carboxylation de l'acétyl CoA, une condensation répétée d'unités d'acétate aboutit à la cyclisation des chaînes polycétoniques (Simmons-Boyce et al. 2009).

I.3. Classification des polyphénols

Les polyphénols sont classés en deux catégories : les polyphénols simples et les polyphénols complexes. Cette classification est basée sur leurs structures chimiques, le nombre de noyaux aromatiques et les substituants liés aux noyaux (Tableau 6).

Tableau 6 : Différentes classes des polyphénols (Boubekri C, 2014)

Squelette carboné	Classe	Exemple	Origine (exemple)
C6	Phénols simple	Catéchol	
C6-C3	Acides hydroxybenzoïques	p-Hydroxybenzoïques	Epices, fraise
C6-C3	Acides hydroxycinnamique	Acide caféique, acide férulique	Pomme de terre, pomme
	Coumarines	Scopolétine, esculétine	Citrus
C6-C2-C6	Silènes	Resvératrol	Vigne
C6-C3-C6	Flavonoïdes		
	• Flavonols	Kamphérol, quercétine	Fruits, légumes, fleurs
	• Anthocyanes	Cyanidine, pélargonidine	Fleurs, fruits rouges
	• Flavanols	Catéchine, épicatechine	Pomme, raisin
	• Flavanones	Naringénine	Citrus
	• Isoflavonols	Daidzéine	Soja
(C6-C3) ₂	Lignanes	Pinorésinol	Pin
(C6-C3) _n	Lignines		Bois, noyau de fruits
(C15) _n	Tanins		Raisin rouge, kaki

I.3.1. Les polyphénols simples

I.3.1.1. Les acides phénoliques

Ces composés phénoliques présentent un groupement hydroxyle phénolique et au moins une fonction carboxylique. On peut distinguer deux sous-classes de ces acides phénoliques : les dérivés de l'acide hydroxycinnamique et les dérivés de l'acide hydrobenzoïque (Thompson and Mottola 1984).

- Les dérivés de l'acide hydroxycinnamique :

Ces dérivés présentent une large distribution. Ils se trouvent le plus souvent liés, soit à des sucres, soit à des amides, soit à des esters (Afanas'ev et al. 1989). Le composé principal de cette catégorie est l'acide caféique qui peut être présent soit dans les fruits, soit dans des légumes telles que les olives, les graines de café, les tomates ou les pommes (Murota et al. 2004) (figure 30).

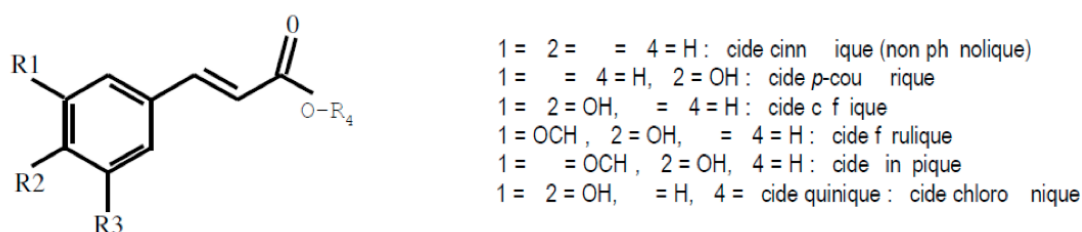


Figure 30 : Structure chimique de l'acide hydroxycinnamique (Panche 2016)

- Les dérivés de l'acide hydroxybenzoïque :

Ces composés sont souvent trouvés sous forme libre. Ils sont présents en grandes concentrations dans les épices, les fraises et les oignons (Murota et al. 2004) (figure 31).

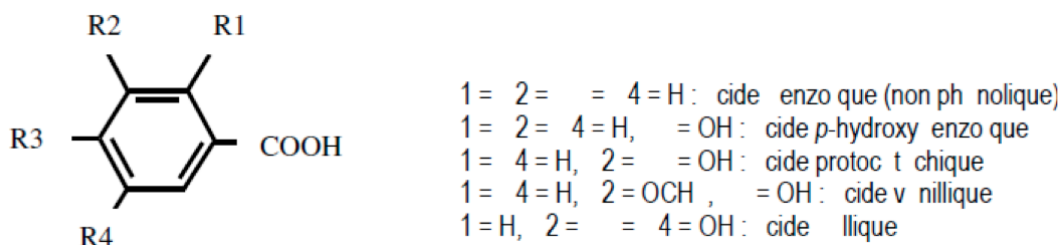


Figure 31 : Structure chimique de l'acide hydrobenzoïque (Panche 2016)

I.3.1.1. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont les composés les plus fréquents parmi tous les composés phénoliques. Ils sont présents dans une grande variété d'aliments comme les fruits, les légumes, les céréales et le thé. Les flavonoïdes sont constitués par un hétérocycle central de type pyrane, lié à deux noyaux aromatiques (de Souza and De Giovanni 2004) (figure 32). Après substitution de la structure de base des flavonoïdes, on peut distinguer

plusieurs classes de flavonoïdes : les flavones, les flavonols, les flavan3-ols, les isoflavones, les flavanones et les anthocyanes.

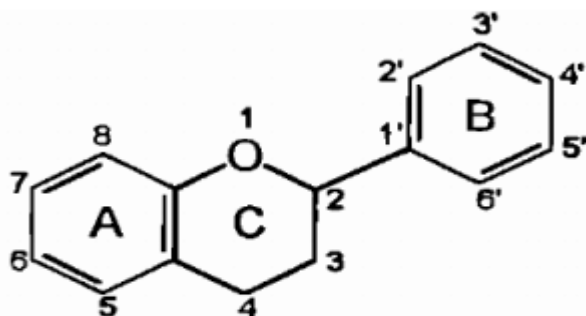


Figure 32: Structure chimique des polyphénols (Panche, Diwan, and Chandra 2016), Cycle A et B : deux noyaux aromatiques, Cycle C: hétérocycle central de type pyrane

- Les flavonols

Les flavonols présentent une double liaison en C2-C3 et un groupement - OH en position C3. Les principaux composés de cette classe sont la quercétine, le kaempférol et la rutine, qui peuvent être trouvés sous forme d'hétérosides ou d'aglycones(Simic et al. 2007).

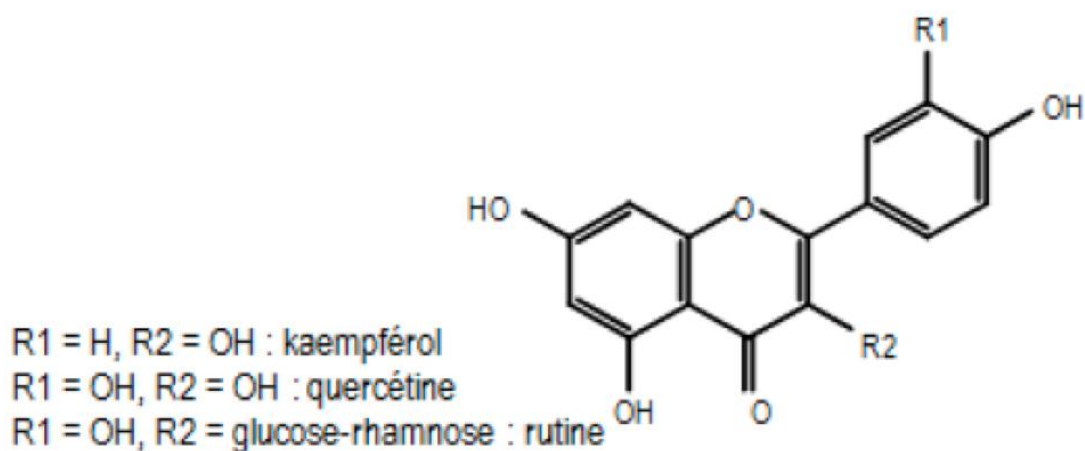


Figure 33: Structure chimique des flavonols (Panche, Diwan, and Chandra 2016)

- Les flavan3-ols

Les flavan3-ols présentent la catégorie la plus complexe de flavonoïdes (figure 34). On peut distinguer des simples monomères comme la catéchine (qui sont présents en grande quantité dans le chocolat et le thé. Les flavan3-

ols peuvent subir des hydroxylations pour former les gallocatéchines ou des estérifications par l'acide gallique (Kadoma and Fujisawa 2008).

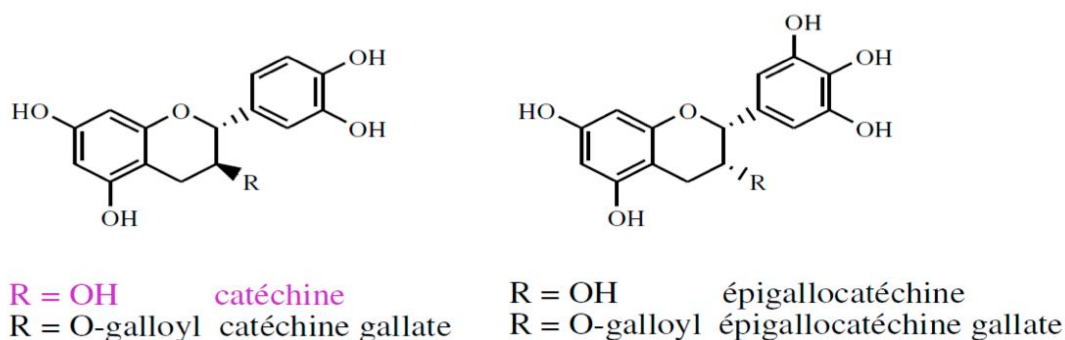


Figure 34: Structure chimique des flavan3-ols (Panche, Diwan, and Chandra 2016)

- Les flavanones

Les flavanones se distinguent par la présence d'un centre de chiralité en C2 et l'absence d'une double liaison entre C2-C3 (figure 35). Leur principale source est les agrumes comme la naringénine dans le pamplemousse et l'ériodictyol dans le citron (Hu et al. 2017).

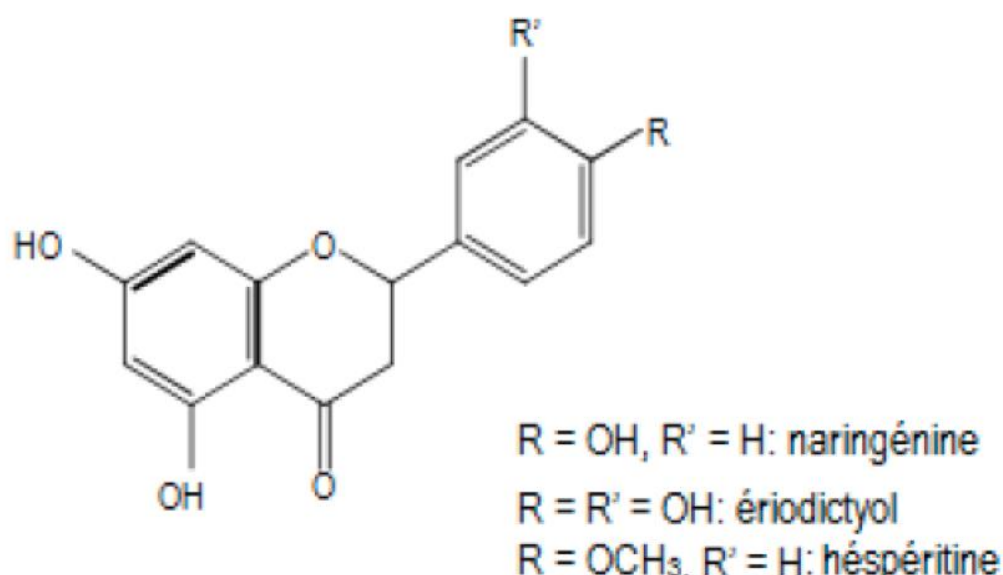


Figure 35: Structure chimique des flavanones (Panche, Diwan, and Chandra 2016)

- Les anthocyanes

Les anthocyanes sont des pigments hydrosolubles stables présents dans la plupart des plantes (figure 36). Ces pigments s'accumulent dans les vacuoles des cellules responsables des couleurs des fruits, des légumes et des fleurs. Ils jouent des rôles importants dans la physiologie végétale (Wouters et al. 2017).

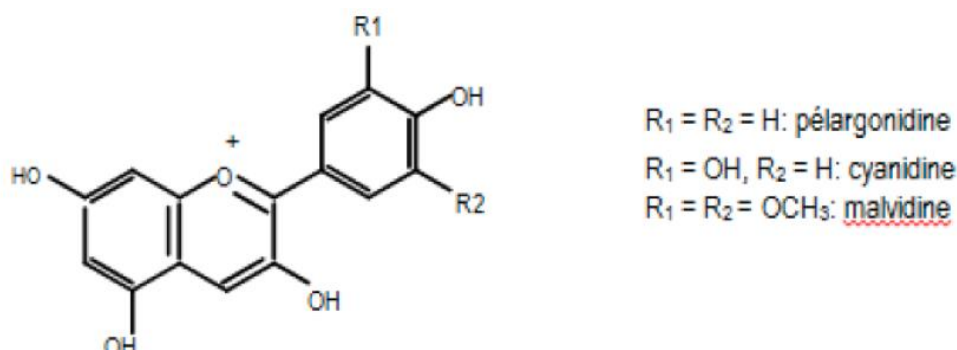


Figure 36: Structure chimique des anthocyanes (Panche, Diwan, and Chandra 2016)

I.3.1.3. Les alcools phénoliques

Les alcools phénoliques possèdent dans leur structure un groupement hydroxyl phénolique et au moins un alcool aliphatique. Ces molécules sont très présentes dans l'olive tel que l'oleuropeine. Les principaux composés de cette catégorie sont l'hydroxytyrosol et le tyrosol (Q. Lu, Ba, and Chen 2008).

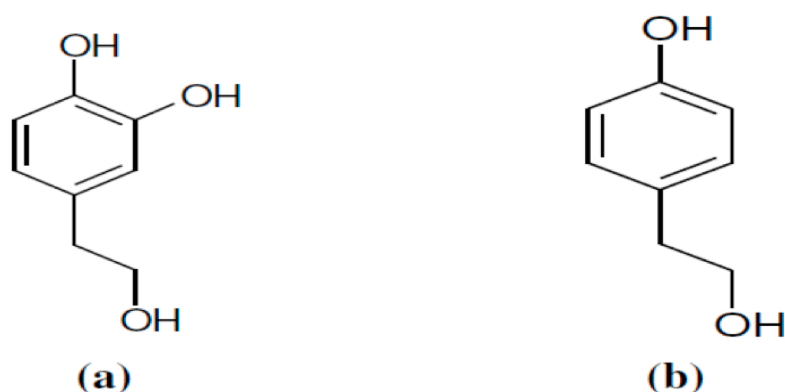


Figure 37 : Structures de l'hydroxytyrosol (a) et du tyrosol (b) (Panche 2016)

I.3.2. Les polyphénols complexes

Les polyphénols complexes ou tanins sont localisés dans les vacuoles (Karamac and Pegg 2009). Ils représentent une classe très importante caractérisée par leur capacité à combiner des protéines (Faggio et al. 2017). Cette catégorie de polyphénols est classée en deux groupes : les tanins condensés et les tanins hydrolysables.

- Les tanins condensés

Les proanthocyanidines ou tanins condensés présentent des unités flavane reliées par des liaisons entre les C4-C8 ou C4-C6 (figure 38). Ces substances sont responsables de l'astringence des fruits non mûres et de l'amertume du chocolat à cause de leur pouvoir de complexation avec les protéines salivaires (Bianchi et al. 2014).

- Les tanins hydrolysables

Les tanins hydrolysables sont des composés facilement hydrolysables par voie enzymatique ou chimique (figure 38). Généralement, ces composés sont des esters de l'acide gallique ou de ses dérivés et des esters du D-glucose (Hagerman 2010).

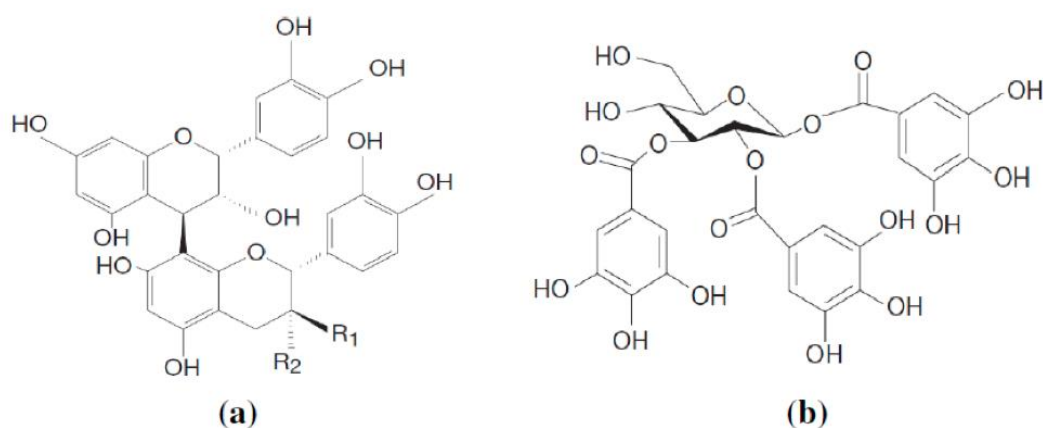


Figure 38 : Structure chimique (a) d'un tanin condensé et (b) d'un Gallotanin (D'Archivio et al. 2010)

I.4. Pharmacocinétique des polyphénols

Comme tout principe actif, avant d'évaluer l'efficacité d'un polyphénol végétal dans un organisme vivant, il est nécessaire de connaître les paramètres pharmacocinétiques de ces polyphénols et en particulier de connaître la quantité de polyphénols qui atteint la circulation générale et sous quelle forme elle parvient dans la circulation sanguine. Le paramètre quantifiant cette phase d'absorption s'appelle la biodisponibilité. En effet, la biodisponibilité d'un composé après ingestion se définit, en termes d'intensité, comme la quantité de substances qui atteint la circulation

systemique. Cette biodisponibilité est indispensable à connaître afin d'estimer la quantité de substances capable d'exercer son action biologique (D'Archivio et al. 2010). Pour pouvoir évaluer l'efficacité des polyphénols, il est donc indispensable d'étudier au préalable la biodisponibilité de ces composés pour connaître la quantité disponible dans l'organisme et sous quelle forme ils atteignent les tissus et les organes cibles avant d'exercer leurs effets biologiques (S. Yang et al. 2001). La biodisponibilité des polyphénols végétaux dépend de la structure chimique propre de chaque composé, de l'activité enzymatique et de la composition de la flore bactérienne intestinale des personnes qui les absorbent (figure 29) (Duda-Chodak et al. 2015).

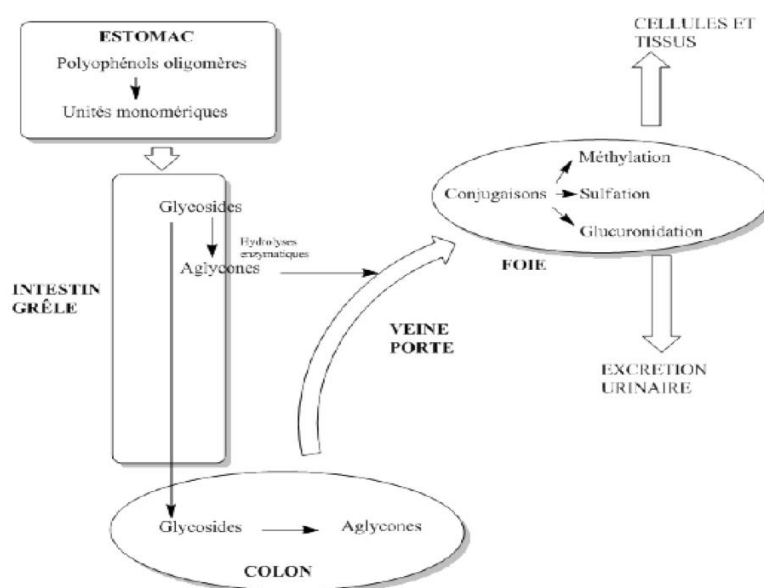


Figure 39: Schéma descriptif de l'absorption des polyphénols (Clifford, van der Hoof, and Crozier 2013)

La voie métabolique hépatique au moment de l'effet de premier passage lors de l'absorption subie par les polyphénols est identique à celle d'autres xénobiotiques. Les polyphénols généralement sont sous formes d'esters, de glycosides ou encore de polymères qui ne peuvent être absorbés tels quels. Les concentrations en composés phénoliques dans la circulation sanguine dépendent de leur phase d'absorption depuis le tractus gastrointestinal impliquant leur perméabilité et leurs effets de premier passage par métabolisme intestinal et hépatique. Certains polyphénols vont être absorbés dans l'intestin grêle suite à leur ingestion. A ce niveau, les formes glycosylés vont être hydrolysées par les enzymes présentes dans les cellules épithéliales de la bordure en brosse de l'intestin grêle. Les polyphénols non absorbés par l'intestin grêle atteignent le colon et vont subir des modifications structurales médiées par la flore microbienne

(hydrolysatation des glycosides et dégradation de l'aglycone en acides phénols simples).

Les polyphénols sous forme aglycone, comme d'autres xénobiotiques, subissent un métabolisme au niveau hépatique (Vetrani et al. 2016). Certains polyphénols subissent des modifications par le processus de conjugaison (glucuronidation, sulfation et méthylation) au niveau du foie (Clifford, van der Hooft, and Crozier 2013). Ces réactions jouent un rôle important dans la réduction des effets nocifs et dans l'augmentation de leur solubilité pour faciliter leur excrétion dans la bile ou l'urine (Aragonès et al. 2017).

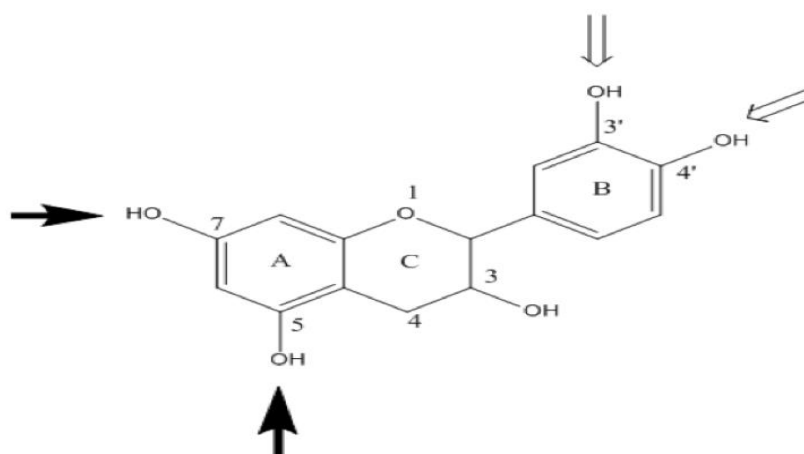


Figure 40 : Sites potentiels de conjugaison des polyphénols. Les flèches pleines représentent les sites potentiels de glucuroconjugaison et sulfation, les flèches creuses, les sites de méthylation (D'Archivio et al. 2010)

I.5. Effets bénéfiques des polyphénols végétaux sur la santé

Les polyphénols présentent des propriétés bénéfiques dans de nombreuses pathologies, en termes de prévention ou de protection. Leurs propriétés antioxydants et leur grande affinité pour une variété de protéines tels que certains enzymes, récepteurs et facteurs de transcription, sont impliquées directement dans le mode d'action de ces molécules naturelles (Soleti, Andriantsitohaina, and Martinez 2018). Expérimentalement, l'activité des polyphénols est étudiée souvent *in vitro*, sans prendre en compte les propriétés potentielles des métabolites des substances naturelles dans les tissus et le sang. Il est indispensable de progresser dans l'évaluation des effets biologiques des polyphénols *in vivo* (S. Li et al. 2018).

- Polyphénols et diabète

In vivo sur les animaux, les polyphénols semblent diminuer le taux de la glycémie (Dembinska-Kiec et al. 2008). L'administration de ces substances chez les rongeurs est impliquée dans plusieurs mécanismes

régulateurs de la glycémie telle que la diminution de l'absorption du glucose au niveau intestinal, la stimulation de la sécrétion de l'insuline par les cellules endocrines pancréatiques et l'inhibition de la gluconéogenèse (Obob et al. 2018).

Chez l'homme, des données épidémiologiques ont montré que la consommation des polyphénols présents dans le café (acide chlorogénique) était associée à une diminution du risque de diabète de type 2.

- Polyphénols et inflammation

L'inflammation est une réponse immunitaire de l'organisme contre une agression aux agents pro-inflammatoires. Des études menées chez l'homme ont montré que les polyphénols étaient capables de moduler des voies de signalisation de l'inflammation (Salas-Salvado et al. 2008). Le suivi d'un régime riche en légumes et fruits chez l'homme sain a été corrélé à une diminution du taux des cytokines comme IL-8, IL-13 et IFN, ainsi qu'à un faible taux de cassures au niveau des brins d'ADN (Cheng et al. 2014). De plus, des expériences *in vivo* ont montré l'effet des polyphénols sur la régulation de certaines activités des enzymes métaboliques telle que la lipogénèse. Ainsi, certains polyphénols comme les flavonoïdes (la lutéoléine et l'apigénine) inhibent le taux des cytokines IL-4, IL-5 et IL-13. De plus, des études *in vitro*, ont montré que la quercétine diminuait la sécrétion de TNF alpha (Kawaguchi, Matsumoto, and Kumazawa 2011).

- Polyphénols et maladies cardiovasculaires

Il a été montré, dans différentes études, que la consommation des polyphénols était associée à une diminution des risques de développement des maladies cardiovasculaires (Khurana et al. 2013). Plusieurs études ont montré que la consommation de quercétine diminuait les risques d'accidents cardiaques de type ischémie. De plus, une méta-analyse basée sur 7 études cas témoins et 10 études en cohortes suggère que la consommation de trois tasses de thé par jour diminue le risque d'infarctus du myocarde. Certaines études suggèrent une inhibition de l'oxydation des LDL, une inhibition de la formation de cellules spumeuses dans l'aorte et une inhibition de l'agrégation des plaquettes dans l'activité préventive des polyphénols pour ces pathologies (Hernaiz et al. 2015).

I.6. Polyphénols végétaux et cancers

Des nombreuses études *in vitro* et *in vivo* ont montré des activités anticancéreuses des polyphénols sur des cultures cellulaires ou des animaux (Kampa et al. 2007). Des études *in vitro* sur modèles cellulaires

ont montré que la genistéine présentait des effets protecteurs, antiprolifératifs, wtune induction de l'arrêt du cycle cellulaire (Zhou et al. 2016). De plus, *in vivo*, chez des rats ayant un cancer colique , une diminution de l'expression des enzymes iNOS et COX-2 et du facteur de transcription NF-kB a été observé après ingestion de polyphénols (Russo et al. 2017).

I.6.1.Potentiel antiprolifératif

La capacité antiproliférative des polyphénols a été mise en évidence dans de nombreuses lignées cellulaires cancéreuses (Tow et al. 2011). De plus, des résultats des études *in vitro* sur des cellules du colon et du sein ont montré une diminution significative de la croissance cellulaire. Par exemple, la quercétine (50 et 100 μM) a montré le pouvoir de diminuer le taux de p53 à un taux indétectable en provoquant un arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M (Apostolou et al. 2013). Ainsi, sur des lignées cellulaires de seins, la quercétine présente un effet inhibiteur de la tyrosine kinase, protéine impliquée dans l'oncogenèse. Il a également été mis en évidence que la quercétine avait le pouvoir d'inhiber les voies de signalisation régulées par l'EGFR significatives de la croissance des lignées cellulaires A431 (lignée cellulaire humaine de carcinome épidermoïde) et MiapaCa-2 (lignée cellulaire humaine pancréatique) par induction de l'apoptose.

I.6.2.Régulation de l'apoptose

Certains polyphénols ont montré leur capacité de déclencher l'apoptose médiée par la mitochondrie dans différentes cellules cancéreuses. Cette apoptose est due à l'activation de p53, facteur responsable de la répression des gènes anti-apoptotiques (Bcl-2) et de l'activation des gènes pro-apoptotiques (Bax)(Verma, Singh, and Mishra 2015). Ainsi, certains composés phénoliques peuvent induire l'apoptose en redistribuant les récepteurs de mort (FAS/CD95) tout en augmentant la sensibilisation de la cellule aux ligands des récepteurs de morts (Oz and Ebersole 2010). D'autre part, au niveau de certaines cellules cancéreuses humaines du colon de type LNCaP, les composés phénoliques comme le resvératrol, possèdent la capacité de diminuer la résistance aux médicaments anticancéreux par une suppression de NF-kB, augmentant l'apoptose associée à la voie Bax/caspase 3 (Karunaweera et al. 2015). De plus, la quercétine était capables de perturber l'activité des MDR1 (50 μM) dans des cellules cancéreuses humaines HepG2 (G. Wang et al. 2012).

I.6.3.Inhibition de l'activité des protéines kinases

Les protéines kinases sont des protéines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire. Les inhibiteurs de l'activité des trois kinases majeurs (la PKC, l'EGFR et la FAK) influencent la survie et la prolifération des cellules cancéreuses (Karunaweera et al. 2015). Les polyphénols tels que les flavonoïdes comme la quercétine contribuent à la régulation du cycle cellulaire en ciblant les protéines kinases. En particulier, la quercétine a montré qu'elle était capable d'inhiber la PKC. Cette protéine est une sérine/thréonine kinase ubiquitaire, dépendant des phospholipides et du calcium impliquée dans la prolifération tumorale, l'inflammation et la fonction des lymphocytes T. De plus, la quercétine bloque l'activité de l'EGFR. Enfin, la quercétine semble diminuer l'expression de certaines protéines phosphorylées cellulaires telle que la FAK qui joue un rôle important dans la prolifération tumorale et le processus de métastases (J. Lee et al. 2015).

I.6.4. Inhibition de la migration, de l'angiogenèse et des métastases

La dégradation protéolytique de la matrice extracellulaire et l'angiogenèse contribuent à une croissance accélérée de la tumeur. Cette dégradation a été corrélée à une expression des MMPs (Matrix Metalloproteinases) et des endopeptidases (Oku et al. 2003). Les MMPs sont impliquées dans la dégradation du collagène. Dans les cellules cancéreuses humaines, le phénomène de métastase est lié à l'expression et à la présence de collagène dans la membrane basale des cellules (Peng et al. 2012). Des composés phénoliques, comme le resvératrol, ont démontré une capacité à diminuer l'activité de MMP-2 ce qui inhibe directement la croissance des cellules humaines (Pandey et al. 2015). De la même manière, il a été démontré que la quercétine diminue la biosynthèse de la MMP-2 et de la MMP-9 dans de nombreuses cellules tumorales comme les lignées MiaPaCa-2 et A549 (Saragusti et al. 2010). De plus, la quercétine possède le pouvoir de diminuer l'activité de la pro-MMP-9 par la voie du PKC (Saragusti et al. 2010).

La stimulation des mastocytes par des peptides sécrétés par la tumeur, ainsi que la production des substances nécessaires à l'angiogenèse et la néovascularisation semblent être impliquées dans le processus des métastases et dans la croissance des cellules cancéreuses (Cao et al. 2013). De nombreux polyphénols, comme les flavonoïdes, ont montré des propriétés anti-tumorales par leur implication dans l'inhibition de la prolifération et de l'activation de ces mastocytes. Par exemple, des études ont montré la capacité de la quercétine à bloquer l'expression de certaines

molécules d'adhésion stimulées par le TNF alpha secrété par les mastocytes (Nair et al. 2006).

II- Partie expérimentale

Contexte et Objectif:

Notre projet étant ciblé sur le développement de modèles cellulaires appliqués au cancer hépatopancréatique, nous allons dans un premier temps, mettre en place et caractériser un nouveau modèle cellulaire hépatique humain présentant des propriétés spécifiques du foie et capables de métaboliser les médicaments, afin d'être plus représentatif de la situation *in vivo*. Pour les études sur le cancer pancréatique, nous utiliserons les cellules AsPC1 qui sont connue pour être un bon modèle cellulaire utilisé pour des études d'optimisation de l'activité des médicaments anticancéreux pancréatiques *in vitro*.

De plus, afin de tenir compte de l'environnement tumoral et de la structure spatiale, nous allons dans un second temps, mettre en place des modèles cellulaires en 3D et comparer leur comportement par rapport aux cellules cultivées en 2D.

Enfin, dans une troisième partie, nous allons tester des molécules bioactives seules et en combinaison afin de proposer des pistes qui pourraient permettre d'optimiser l'activité des traitements anticancéreux pancréatiques et hépatiques dans un environnement 3D comparé au 2D. Dans ce contexte, les objectifs de notre travail sont ciblés en 2 parties:

- i) Développer un modèle cellulaire hépatique et caractériser les mécanismes sous-jacents de la modulation de l'expression et de la fonctionnalité des transporteurs membranaires et des enzymes clés qui régissent le métabolisme des médicaments, ainsi que les mécanismes de dérégulation de l'apoptose ou de son contrôle sur des cellules en culture 2D et 3D.
- ii) Evaluer l'effet des traitements médicamenteux (gemcitabine et doxorubicine) dans ces processus en vue d'optimiser l'efficacité et la tolérance à ces traitements et d'évaluer la capacité de certaines substances naturelles bioactives à réguler les transporteurs membranaires, les enzymes ou les protéines régulatrices de l'apoptose susceptibles d'être altérés au cours des traitement anticancéreux, dans le cadre d'une stratégie thérapeutique adjuvante ou préventive sur les différents modèles cellulaires (foie et pancréas) en 2D et 3D. Ainsi, nous allons étudier *in vitro* l'effet de nouvelles stratégies par combinaison des médicaments anticancéreux associés à des polyphénols végétaux qui sont connues pour avoir des effets bénéfiques sur plusieurs domaines de la santé.

Résultats

I. 1. Développement et caractérisation d'un modèle cellulaire hépatique innovant

I.1.1. Objectifs

I.1.2. Article en cours de soumission: HepG2 derived cell line: a novel in vitro hepatotoxicity model for drug screening.

I.1.3. HepG2 derived cell line: a new human cell model in 2D and 3D culture for drug hepatotoxicity and metabolism studies. Sarah Hassan, Jean Peluso, Natacha Rochel and Genevieve Ubeaud-Sequier. GMP in Paris, France. (October 25-27, 2017).

I.2. Résultats complémentaires

I.2.1. Objectifs

I.2.2. Matériels et Méthodes

I.2.3. Résultats et Discussion

I.2.3.1 Comparaison de l'effet apoptotique des molécules testées entre HepG2 et HepaPSU cultivées en 2D

I.2.3.2 Comparaison de l'effet apoptotique des molécules testées après induction par la rifampicine dans les cellules cultivées en 2D

I.2.3.3 Morphologie des cellules HepaPSU cultivées pendant 7 jours

I.2.3.4 optimisées Comparaison de l'effet apoptotique des molécules testées dans des conditions optimisées (condition 2 ou J7)

I.2.3.5 Culture 3D des cellules HepaPSU

I.2.3.6 Comparaison de l'effet apoptotique des molécules testées sur les HepaPSU cultivées en 3D

I.2.4 Conclusion

I.1.1. Objectifs:

Les cellules HepG2 sont inappropriées pour étudier le métabolisme des médicaments comparées aux hépatocytes primaires car les quantités d'enzymes exprimées sont trop faibles voire inexistantes dans ces cellules HepG2 (Choi et al, 2015). Aussi, la première partie de notre travail a consisté à caractériser une nouvelle lignée hépatique développée au laboratoire, dérivée de la lignée HepG2, appelée « HepaPSU » (enveloppe Soleau INPI 488678) et à l'optimiser. Afin de pouvoir étudier le métabolisme hépatique des médicaments, nous avons étudié l'activité enzymatique de notre nouvelle lignée cellulaire et ses capacités à métaboliser les médicaments anticancéreux. Nous avons optimisé notre nouvelle lignée cellulaire en modifiant les conditions d'incubation. La caractérisation de notre lignée a consisté à comparer notre lignée dans diverses conditions d'incubation i) en établissant un bilan caryotypique (avec la collaboration du GHRMSA) ii) en comparant la morphologie des cellules hépatiques, iii) en établissant leurs activités fonctionnelles biochimiques comme leur capacité à synthétiser l'albumine iv) en étudiant leurs capacités de détoxification (étude de l'expression et de l'activité de certaines isoformes du CYP450 (CYP3A4, CYP2D6 et CYP2C9) et des transporteurs (MDR1, MRP2 et OATP1B1), v) en étudiant l'expression des transporteurs nucléaires tels que PXR, vi) en évaluant leur capacité d'induction métabolique CYP450 dépendant.

Article 1

**HepG2 derived cell line: a novel in vitro hepatotoxicity
model for drug screening**

**HepG2 derived cell line: a novel in vitro hepatotoxicity
model for drug screening (en cours de soumission)**

Sarah Hassan ^a, Jean Peluso ^a, Radhia M'Kacher ^b, Natacha Rochel ^c,
Eric Jeandidier ^d and Genevieve Ubeaud-Sequier ^a

- a. Plateforme eBiocyt-UPS1401, Faculty of pharmacy, University of Strasbourg, Illkirch, France
- b. Cell Environment DNA damages R&D, Oncology section, Paris, France
- c. Department of Integrative Structural Biology, Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC), (INSERM) U964, (CNRS) UMR 7104, Université de Strasbourg, Illkirch, France
- d. Service de Génétique, GHRMSA, Mulhouse, France

Abstract

During the later stages of drug development, the most important reasons for attrition of candidate drug is the drug-induced hepatotoxicity. To present, using current *in vitro* models, the study of prediction of drug hepatotoxicity and liver function are difficult. The first objective of our study is to characterize a novel *in vitro* hepatic model that derived from HepG2 cell line at the gene expression level such as Cytochrome P450 (CYP450) and study their metabolic cytochrome P450 capabilities. CYP450 expression is regulated by multiple nuclear receptors including the Hepatocyte nuclear factor 4- α (HNF4) and Pregnane X receptor (PXR). We have released the analysis of the karyotype and the expression level of liver enzymes of HepG2 derived cell line. Our results demonstrate that the novel cell line has a similar karyotype of HepG2 that derived from HepG2 cells with some differences. In addition, a higher expression level of HNF-4, PXR, CYP450, OAT1B1, MDR1 and MRP2 was found in this HepG2 derived cell line. The second objective is to investigate the predictivity of HepG2 derived cell line to detect hepatotoxicity. First, we have tested the toxic effects of some molecules that are known to have a different mechanism of toxicity (acetaminophen and aflatoxin B1). We observed that HepG2 derived cells are more sensitive than the other tested cultures to aflatoxin B1 and acetaminophen which are toxic upon metabolic activation in the liver. In summary, our data demonstrate that our novel model has an important expression level of CYP450 and the new model is best suited for the detection of hepatotoxic compounds.

Keywords: Hepatotoxicity, CYP450, transporters, PXR and HNF4- α .

1. Introduction

During the development of new drugs, due to their toxicological side effect, 40% of these novel drug fail in the development phase leading to discontinuation of clinical trials or withdrawal of approved drugs (Schuster, Laggner, and Langer 2005). Cardiovascular system and liver are the main sites affected by drug toxicity through multiple factor such as damage and alteration of cell function and cell death (Mandenius et al. 2011). The liver is a gland with a wide range of functions including metabolism and detoxification. The pregnan-X receptor (PXR) is involved in the modulation of the expression of metabolizing enzymes and transport protein in the liver (Guo et al. 2004). In contrast, PXR have a wide ligand spectrum such as xenobiotic or drugs. In addition, many study have been demonstrate that PXR can be activated by specific ligand such as rifampicin and then activation of the expression of CYP and transport proteins in liver (Cheng et al. 2009). Moreover, Hepatocyte nuclear factor 4-alpha (HNF4-alpha) is a nuclear receptor required for liver development and for controlling the expression of many hepatic-specific genes associated with important metabolic pathways such as CYP450 and transporters (Babeu & Bou dreau, 2014). Thus, it is now clear that HNF4-alpha modulates CYP expression in the liver by interacting with the xenosensor receptors (PXR and CAR) (Prakash et al. 2015). Cytochrome P450 (CYP) enzymes have the most important role in drug metabolism, accounting for about 75% of the metabolism including the modification an existing functional group or introducing a new functional group of compounds studies (Ma et al. 2008). In preclinical studies, stage of novel drug development, critical studies of drug metabolism and metabolites formation are needed (Mandenius et al. 2011). That is why a stable model *in vitro* with the characteristics of *in vivo* human hepatic cell is necessary to save time and to avoid the discontinuation of clinical studies. So, to study liver function and to prevent the toxicity of novel therapeutic agent, *in vitro* cell models more predictive are needed. To present, primary human hepatocytes (PHH) are considered as the best standard *in vitro* model system to study drug toxicity and metabolism (André Guillouzo 1998). PHH present high expression levels of several important genes that are important for xenobiotic metabolism and detoxification (Gómez-Lechón et al. 2003). However, PHH cannot be used to the long-term studies, due to their limited viability, also their availability is very limited (Godoy et al.

2009). Recently, a novel cell line has been established: HepaRG cell line. After special cultivation, HepaRG cells show some properties with human primary hepatocyte. HepG2 hepatocellular carcinoma cell line has been used *in vitro* studies screening the toxicity of new drugs in pharmaceutical development (Andre Guillouzo et al. 2007). However, HepG2 cell line shows very limited characteristics such as a low expression of CYP. That is why it is strongly recommended to establish a good *in vitro* model with a capacity of predicting *in vivo* hepatotoxicity of novel drugs (Gunnness et al. 2013).

The aim of our study is to characterize a novel cell line derived from HepG2 cells with a focus on the karyotype, protein expression, CYP activity and cytotoxicity evaluation. In a first instance, we have compared the karyotype of the novel cell line and HepG2 cell line. The different cellular models were exposed to rifampicin to study their protein expression modulation and their cytochrome P450 enzyme activities (CYP3A4). Subsequently, they were exposed to a reference compounds with known hepatotoxic potentials in humans. The objectives of our present study were to (1) compare karyotype and expression levels of proteins involved in metabolism and transporters of the novel cell line and HepG2 cells, (2) determine CYP450 activities and expression after exposure to the inducer and (3) compare the potential of HepG2 derived cells and HepG2 cells to detect hepatotoxic compounds.

2. Materials and Methods

2.1 Chemicals and drugs

Acetaminophen, aflatoxin B1 and rifampicin were purchased from Sigma-Aldrich. Final concentration of DMSO applied to cells during incubation with tested drugs was 0.5%. In the tested setup these concentrations had no adverse effects on cell viability or cell morphology.

2.2. Cell culture and maintenance

The human hepatocellular carcinoma cell line HepG2 was obtained from the American Type Culture Collection (Maryland, U.S.A.) and was cultured in a particular way in a medium supplemented with 10% FBS, P/S (100 unit/ml and 100 µg/ml) and Glutamine (2mM). Cells were grown at 37°C in a humidified incubator equilibrated with 5% CO₂. In our study, we have performed the same experiments in two conditions: HepG2

derived cell line aged 1 day or 7 days.

2.3. Drug exposure studies

HepG2 derived cell line and HepG2 were exposed to a range of drug concentrations for 24 h in a repeated dose study. HepG2 derived cell line were exposed in flask to 10 μ M rifampicin for 48h. Stock solutions of drugs were prepared in DMSO with end concentration of DMSO being 0.5%.

2.4 Karyotype

At 70-80% confluent, colcemid (0.1 μ g/ml) was added 2h before harvesting, and the slides with metaphase chromosomes prepared following the standard methanol/acetic acid (3/1, v/v) procedure. The chromosomes were R-banded stained for conventional karyotyping performed using a Cool Cube1 (Metasystems GmbH, Altlussheim, Germany) camera device coupled to a Zeiss Axioplan2 Imagine microscope (Carl Zeiss France SAS), using the Ikaros v5.8.5 software (Metasystems) for metaphase captures and karyotyping. Multicolor karyotyping (m-FISH) has been performed labeling the spread chromosomes with multi fluorescent chromosome paint probes (Metasystems) and karyotyping was realized using the Isis v5.8.5 software (Metasystems). Chromosome analysis was performed according to the ISCN 2016 guidelines and for each experiment (conventional and molecular approaches), at least, 50 metaphases were analyzed.

2.5 Fluorescence microscopic detection of functional biliary poles using CDF assay

HepG2 derived cell line were cultured in a small culture flask. Then the culture media was removed and cells were washed with HBSS. Subsequently, cells were incubated with CDFDA (5 and 6-carboxy-2', 7'-dichlorofluorescein diacetate), the specific substrate of MRP2, (5 μ M) at 37°C for 20 minutes. CDFDA is the diacetate moiety of CDF, the fluorescent substrate of MRP2. It enters the cells by passive diffusion where it is esterified to fluorescent CDF by esterase. In polarized hepatocytes, CDF should be transported to the apical (canalicular) pole where it will accumulate to be effluxed outside of the cell by MRP2. The accumulated CDF will emit a green fluorescence that may be detected by a fluorescence microscope (Saab L et al, 2013).

2.6. CYP3A4 activity

The activity of Cytochrome P450 isoform 3A4 was assessed using the P450-Glo™ assay from Promega GmbH (Mannheim, Germany). The cells were washed twice with PBS and incubated with 30 µl of the CYP3A4 substrate Luciferin-IPA (3.75 µM, dissolved in Williams Medium E). After 4 h incubation at 37°C, the Luciferin Detection Reagent was added. The reagent was pipetted up and down several times to ensure cell lysis. Reagents without cells were included as background control. After 20 min incubation at room temperature, luminescence was measured using a GloMax luminometer from Promega (Mannheim, Germany). CYP3A4 activities were calculated by subtracting the background and normalizing to the seeded cell number.

2.7 Detection of apoptosis by annexin-FITC

HepG2 derived cell line death was assessed using AnnexinV-FITC Kit (Miltenyi Biotec) according to manufacturer's protocol. Briefly, HepG2 derived cell line was incubated with acetaminophen and aflatoxin B1 for 24 hours. Cells were then washed with phosphate buffered saline (PBS) and stained with AnnexinV-FITC and PI following the manufacturer's protocol. The fluorescence intensity of AnnexinV-FITC stained cells at 530/540 nm and PI stained cells at 675/630 were analysed by Guava EasyCyte Plus capillary flow cytometer (Merck Millipore, Life Science division, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) and computed using the Guava ExpressPro software (Merck/Millipore/Guava Tech). The apoptotic potential of the tested drugs was compared to the apoptotic potential of celastrol, which is known to be a positive control of apoptosis.

2.8 Western Blot analysis

HepG2 and HepG2 derived cell line cultured were collected after trypsinisation transferred to 15 ml tubes and centrifuged at 500 g for 5 minutes. Cell pellets were washed three times with cold 10 mM Tris- HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, and solubilized in lysis buffer (RIPA) (150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% deoxycholic acid, 0.1% SDS, 0.5 M Tris pH 8.0). After spinning for 20 minutes at 10,000 g at 4°C, protein concentrations were determined in supernatants using Bradford assay. All samples, were denatured by heating for 5 minutes at 95° C, before being loaded onto a 10% gel. After electrophoresis, Western gels were blotted and the

transferred nitrocellulose membrane was blocked with 5% milk powder in 50mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, and 0.1 % Tween 20 at room temperature for 1 hour. The membrane was then immunoblotted with a rabbit monoclonal anti-CYP3A4, 2C9 and 2D6 (Cell Signalling Technology), rabbit anti-PXR, anti-HNF-4, anti-MDR1, anti-OATP1B1, anti-albumin and anti-MRP2 antibody (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany) (diluted 1/1000 in TBS tween 0.1%) overnight at 4°C. Subsequently the membrane was washed three times with 50 mM Tris-buffered saline and 0.1% Tween 20. Following incubation with horseradish peroxidase conjugated anti-mouse polyclonal anti-GAPDH secondary antibody (Abcam) (1:10000) for 1 hour at room temperature, the blots were developed using enhanced chemiluminescence (ECL) (GE Healthcare). The experiments were repeated three times.

2.9 Statistical Analysis

Data are expressed as mean +/- standard error of mean (S.E.M.) and analysed using GraphPad2 Prism5" (La Jolla, CA, USA). Statistical analysis was performed with either the one-way ANOVA test followed by Student's t-test. A $P < 0.05$ was considered significant. Experiments were performed at least in three separate experiments.

3. Results

3.1 Karyotype

Multicolours (multi-FISH) and conventional (R-banded) karyotypes have been performed for HepG2 (figure 1 A and B) and HepaPSU (figure 1 C and D) cell lines.

Both cell lines exhibited a hyperdiploid (from 52 to 78 chromosomes), complex karyotype with common whole chromosome copy number imbalances comprising trisomy 2, 14, and a tetrasomy 20, associated with structural aberrations including $\text{del}(1)(\text{p}22)$, $\text{der}(6)\text{t}(6;17)(\text{p}10;\text{q}22)$, $\text{der}(16)\text{t}(6;16)(\text{q}22;\text{p}13.3)$ and $\text{der}(21)\text{t}(1;21)(\text{p}22;\text{q}10)$. These chromosomal abnormalities have been well described for the HepG2 cell line. The difference between HepG2 and the derived cell line HepaPSU is the apparition of a unbalanced translocation between a chromosome 5 and one of the four chromosome 20 $\text{der}(20)\text{t}(5;20)(\text{p}11.2;\text{p}11)$, resulting in a gain of 5p (partial trisomy 5p) and the lost, as compare to the native HepG2

karyotype, of an important part of the short arm of one chromosome 20. This additional chromosome abnormality has been found in the 50 metaphases analyzed from HepaPSU cells and none of the 50 scored metaphases from HepG2 (figure 1).

3.2 Albumin expression in the novel cell line

Albumin expression was investigated in the novel cell line cultured for 1 or 7 days to be compared to its level in HepG2 cells. Our results demonstrate that HepG2 derived cell line present a comparable level of albumin secretion in HepG2 cells. In addition, the secretion was increased after 7 days of culture in both HepG2 cells and the novel cell line (figure 2).

3.3 Functional Activity of MRP2: accumulation of CDF between two polarized cells.

After incubating of HepG2 derived cell line with CDFDA, the latter freely entered the cell by passive diffusion and was hydrolysed by esterase to CDF, the fluorescent substrate of MRP2. CDF accumulated at the apical pole of HepG2 derived cells emitting a bright green fluorescence which was detected by fluorescence microscopy. These observations indicate that our cells are correctly polarized, with the canalicular pole located at its normal location between two adjacent cells. Furthermore, the fact that CDF accumulated at the canalicular pole strongly implies that the fluorescent substrate will be most probably effluxed outside the cell by its respective transporter, MRP2, indicating the presence of functional biliary poles (figure 3).

3.4 Expression of CYP450, Transporters, and Nuclear Receptors in HepG2 derived cell line.

Expression of CYP450, transporters, and nuclear receptors was investigated in both HepG2 cells and HepG2 derived cell line cultured for 1 or 7 days. CYP3A4, 2C9 and 2D6 only in HepG2 derived cell line expression was increased after 7 days of culture. In addition, expression of transporters OATP1B1, MDR1 and MRP2 was increased after 7 days of culture in HepG2 derived cell line. An induction of PXR and HNF4-alpha was observed after 7 days of culture in HepG2 derived cell line (figure 2).

3.5. Induction of CYP450, Transporters, and Nuclear Receptors Expression.

Expression of CYP450, transporters, and nuclear receptors was investigated in both HepG2 cells and HepG2 derived cell line in response to rifampicin. CYP3A4, 2C9 and 2D6 only in HepG2 derived cell line expression was induced by rifampicin. Likewise, expression of transporters OATP1B1, MDR1 and MRP2 was increased by the inducer in HepG2 derived cell line. An induction of PXR and HNF4-alpha was observed after rifampicin exposure in HepG2 derived cell line (figure 2).

3.6 CYP3A4 activity in HepG2 derived cell line

CYP3A4 activities in HepG2 and HepG2 derived cell line were cultivated for 1 day and 7 day for both cell line, and 48 h of rifampicin exposure. CYP3A4 activity, normalized to the initially seeded cell number, was significantly higher in the HepG2 derived cell line cultured for 7 days than HepG2 cells. Moreover, CYP3A4 activity was higher in the cells treated with rifampicin (figure 4).

3.7 Repeated dose toxicity assessment for Aflatoxin B1

After 24h treatment of HepG2 derived cell line with aflatoxin B1 (5-100 μ M), our data show toxicity in HepG2 derived cell line cells cultured for 1 day and for 7 days of 2D monolayer culture. HepG2 derived cell line cultures show EC50 values of 62 and 11 μ M respectively of HepG2 derived cell line cultured for 1 day and 7 days in 2D culture (figure 5).

3.8 Repeated dose toxicity assessment for Acetaminophen

After 24h treatment of HepG2 derived cell line with acetaminophen (5-100 mM), our data show toxicity in HepG2 derived cell line cells cultured for 1 day and for 7 days of 2D monolayer culture. HepG2 derived cell line cultures show EC50 values of 22 mM and 6 mM respectively of HepG2 derived cell line cultured for 1 day and 7 days (figure 5).

4. Discussion

Till present, in order to perform functional and toxicological studies and to mimic the human liver, *in vitro* cellular models are used (Gómez-Lechón et al. 2003). The gold standard of *in vitro* systems is PHH. However, PHH

lose rapidly the liver specific functions, due to their maintenance in simple 2D monolayer cultures (Bell et al. 2016). In contrast, HepG2 and a new cell line HepaRG are used such as a routinely *in vitro* model for toxicity and metabolism studies. However, HepG2 cells were the first alternatives but these cells have lost many liver-specific functions such as the expression levels of many cytochromes P450 (Westerink and Schoonen 2007). Moreover, the application of HepG2 as *in vitro* model for metabolism and hepatotoxicity are limit cause of these drawbacks (Haouzi et al. 2005). Presently, HepaRG cells, which are derived from a hepatocellular carcinoma cell line, have been shown a comparable key hepatic function with those found in primary human hepatocytes such as metabolic enzymes and nuclear receptors. PXR is highly expressed in human liver and is also found in intestine (Andre Guillouzo et al. 2007). PXR is a transcriptional regulator of the cytochrome P450 gene, it is activated by a range of compounds that induce CYP, including rifampicin (Wang and LeCluyse 2003). In the other hand, CYP is accounts for more than 50% of drug metabolism in human, and many studies have been shown that the expression and the activation of PXR was investigate in the regulation of CYP and then mediate drug metabolism *in vivo* (Ma et al. 2008). In the current study, rifampicin administration followed by PXR activation and CYP induction (Cheng et al. 2009). Moreover, Transporters investigated in our study are the major transporters in the liver. OATP1B1 is an uptake transporter that extract its substrates from portal blood into the hepatocytes (Shitara 2011). OATP1B1 has been shown to transport organic anionic compound (Kalliokoski and Niemi 2009). MDR1 and MRP2 are the most recognized efflux transporter that mediates the transports of hydrophobic cations (Hoffmann and Kroemer 2004). Hepatocyte nuclear factor 4 (HNF4) is a member of the nuclear receptor super-family that has shown up regulating effects on particular cytochrome P450 (Gonzalez 2008).

The aim of our study is to characterize a novel cell line derived from HepG2 cells, with the capacity to replace human hepatocytes in the preclinical screening of novel drugs. The present study are mainly focussed on the capacity of our novel model *in vitro* to express CYP450, transporters and nuclear receptor to compared their expression level in HepG2 cells.

Here, we tested the toxicity of two drugs on HepG2 derived cell line

cultured for 1 and 7 days in 2D monolayer culture. We did the drug exposure studies either in conventional 96 well plates.

Acetaminophen is the most non-prescription analgesic used over the world. However, 39% of drug induced acute hepatotoxicity due to the overdosing of acetaminophen. Acetaminophen is converted into NAPQI (Toxicity-associated et al. 2008). After analysis of acetaminophen metabolism, CYP3A4 is proposed to be the major responsible enzyme for its metabolism. Many studies have been demonstrated that the increasing in the expression of CYP3A4 led to transformation of acetaminophen into reactive intermediate electrophilic metabolites and exhaustion of hepatocellular glutathione that then triggers the cascade of events leading to hepatotoxicity (Guo et al. 2004). We found EC₅₀ values of 22 mM (2D cultured for 1 day) and 6 mM (2D cultured for 7 days) upon 24 h exposure for HepG2 derived cell line. Our data are comparable to a former study using of HepaRG for toxicity assessment where an EC₅₀ value of 2.7 mM was reported (24 h treatment) (Andre Guillouzo et al. 2007). The toxicity was significantly higher in HepG2 derived cell line cultured for 7 days.

Aflatoxin B1 is a fungal toxin that has been known to induce toxicity in hepatocytes in humans. Although, the hepatotoxicity is a result of the bio activation of aflatoxin B1 into AFB1-8,9-exo-epoxide and AFB1-8,9-endo-epoxide by CYP3A4 may result to the induction of toxicity in hepatocytes (El-Serag 2012). The metabolism reaction could be increased in liver cells in vivo. We found EC₅₀ values of 62 μ M (2D cultured for 1 day) and 11 μ M (2D cultured for 7 days) upon 24 h exposure for HepG2 derived cell line. Our data are comparable to a former study using of HepaRG for toxicity assessment where an EC₅₀ value of 7.7 μ M was reported (24 h treatment) (Mueller et al. 2014). The toxicity was significantly higher in HepG2 derived cell line cultured for 7 days.

In addition, our data show a significant increased level of the expression of CYP2D6, CYP2C9, CYP3A4, OATP1B1, MDR1 and MRP2 in HepG2 derived cell line cultured for 7 days. Moreover, our results show an induction in CYP3A4, CYP2C9, MDR1 and nuclear receptors expression in HepG2 derived cell line after treatment 48h with rifampicin. In this study, we found that HepG2 derived cell line cultured for 7 days shows high-level expression of transporters, CYP450 and nuclear receptors when compared with HepG2 cells. Our results demonstrate, that we have a novel

cell line derived from HepG2 with a difference in chromosome 20, we suggest that this difference maybe is the responsible of the difference of protein expression between the two cell lines. of In addition, high sensitivity of HepG2 derived cell line cultured for 7 days to acetaminophen mediated toxicity that is reported to be dependent on CYP450 metabolism when our results is comparable and correlate to publish data on HepaRG cells. Moreover, we assessed repeated dose toxicity of aflatoxin B1 on the tested cultures, and our data show that the toxicity of aflatoxin B1 is higher in both HepG2 derived cell line cultured for 7 days. Our data clearly correlate to publish data on HepaRG cells. In conclusion, we have demonstrate that HepG2 derived cell line is a good in vitro model with a capacity of predicting in vivo hepatotoxicity of novel drugs with high expression level of CYP, transporters and nuclear receptors.

Bibliography

- Babeu J, and Francois B. 2014. "Hepatocyte Nuclear Factor 4-Alpha Involvement in Liver and Intestinal Inflammatory Networks." *World journal of gastroenterology* 20(1): 22–30.
- Bell C, Lauschke VM and Ingelman-Sundberg M. 2016. "Characterization of Primary Human Hepatocyte Spheroids as a Model System for Drug-Induced Liver Injury, Liver Function and Disease." *Scientific reports* 6(October 2015): 25187.
- Briz O, Martin S and Marin J. 2006. "OATP8/1B3-Mediated Cotransport of Bile Acids and Glutathione: An Export Pathway for Organic Anions from Hepatocytes?" *Journal of Biological Chemistry* 281(41): 30326–35.
- Cheng J, Idle JR and Gonzalez FJ. 2009. "Rifampicin-Activated Human Pregnane X Receptor and CYP3A4 Induction Enhance Acetaminophen-Induced Toxicity." *Drug Metabolism and Disposition* 37(8): 1611–21.
- El-Serag B. 2012. "Epidemiology of Viral Hepatitis and Hepatocellular Carcinoma." *Gastroenterology* 142(6): 1264–1273.e1.
- Godoy P, Mueller SO and Dooley S.. 2009. "Extracellular Matrix Modulates Sensitivity of Hepatocytes to Fibroblastoid Dedifferentiation and Transforming Growth Factor ??-Induced Apoptosis." *Hepatology* 49(6): 2031–43.
- Gómez-Lechón M J, Donato M, Castell J, and Jover R. 2003. "Human Hepatocytes as a Tool for Studying Toxicity and Drug Metabolism." *Current drug metabolism* 4(4): 292–312.
- Gonzalez J. 2008. "Regulation of Hepatocyte Nuclear Factor 4 Alpha-Mediated Transcription." *Drug metabolism and pharmacokinetics* 23(1): 2–7.
- Guillouzo A, Morel F and Guguen-Guillouzo C. 2007. "The Human Hepatoma HepaRG Cells: A Highly Differentiated Model for Studies of Liver Metabolism and Toxicity of Xenobiotics." *Chemico-biological interactions* 168(1): 66–73.
- Guillouzo, André. 1998. "Liver Cell Models in in Vitro Toxicology."

- Environmental Health Perspectives* 106(SUPPL. 2): 511–32.
- Gunness, Patrina, Mueller D, Valery S and Elmar Heinzle F. 2013. “3D Organotypic Cultures of Human Heparg Cells: A Tool for in Vitro Toxicity Studies.” *Toxicological Sciences* 133(1): 67–78.
- Guo L, Huang D and Huand W. 2004. “Enhanced Acetaminophen Toxicity by Activation of the Pregnane X Receptor.” *Toxicological Sciences* 82(2): 374–80.
- Haouzi D, Baghdiguian S, Granier G, Travo P, Mangeat P and Hibner U. 2005. “Three-Dimensional Polarization Sensitizes Hepatocytes to Fas/CD95 Apoptotic Signalling.” *Journal of cell science* 118(Pt 12): 2763–73.
- Hoffmann U, and Heyo K. 2004. “The ABC Transporters MDR1 and MRP2: Multiple Functions in Disposition of Xenobiotics and Drug Resistance.” *Drug metabolism reviews* 36(3–4): 669–701.
- Kalliokoski A, and Niemi M. 2009. “Impact of OATP Transporters on Pharmacokinetics.” *British Journal of Pharmacology* 158(3): 693–705.
- Xiaochao M, Wang T, Idle J, and Gonzalez F. 2008. “A Double Transgenic Mouse Model Expressing Human Pregnane X Receptor and Cytochrome P450 3A4.” *Drug Metab. Dispos.* 36(12): 2506–12.
- Mandenius F and Nour F. 2011. “Cardiotoxicity Testing Using Pluripotent Stem Cell-Derived Human Cardiomyocytes and State-of-the-Art Bioanalytics: A Review.” *Journal of Applied Toxicology* 31(3): 191–205.
- Mueller D, Klein S and Nour F. 2014. “3D Organotypic HepaRG Cultures as in Vitro Model for Acute and Repeated Dose Toxicity Studies.” *Toxicology in Vitro* 28(1): 104–12.
- Schuster D, Laggner C, and Langer T. 2005. “Why Drugs Fail – A Study on Side Effects in New Chemical Entities.” *Current Pharmaceutical Design* 11(27): 3545–59.
- Shitara Y. 2011. “Clinical Importance of OATP1B1 and OATP1B3 in Drug-Drug Interactions.” *Drug metabolism and pharmacokinetics* 26(3): 220–27.

- Wang H and LeCluyse E. 2003. "Role of Orphan Nuclear Receptors in the Regulation of Drug-Metabolising Enzymes." *Clinical Pharmacokinetics* 42(15): 1331–57.
- Westerink A, and Schoonen W. 2007. "Phase II Enzyme Levels in HepG2 Cells and Cryopreserved Primary Human Hepatocytes and Their Induction in HepG2 Cells." *Toxicology in vitro* (8): 1592–1602.

FIGURES LEGEND

Figure 1: Comparison of karyotypes between HepG2 (figure 1 A and B) and HepG2 derived cell line (figure 1 C and D) cell lines.

Figure 2: Comparison of the expression level of albumin, MDR1, MRP2, OATP1B1, CYP3A4, CYP2D6, CYP2C9, PXR and HNF-4 alpha on HepG2 derived cell line in different conditions of culture with HepG2 cells. HepG2 derived cell line was harvest after 1 day or 7 days in 2D culture, in presence of rifampicin the expression level of proteins was compared to the 2D monolayer culture of HepG2 cells cultured for 1 day or 7 days.

Figure 3: accumulation of CDF at the bile canalicular pole between two adjacent HepG2 derived cells. The trafficking of CDF to the canalicular pole indicates that the HepG2 derived cell line exhibit correct membrane polarity, protein trafficking and cellular functionality. The accumulation of CDF at the canalicular pole is represented in the figure by the green fluorescent circles (some of which are indicated by the green arrows)

Figure 4: CYP3A4 activity (expressed as relative luminescence units (RLU) per seeded cell) in HepG2 derived cell line in different conditions of culture with HepG2 cells. Error bars indicate \pm standard deviation (n = 3).

Figure 5: Dose response curves to assess acute toxicity of aflatoxin B1 and acetaminophen on HepG2 derived cell line treated after 1 day or 7 days of culture. Viability is given as percentage of untreated control. Error bars indicate \pm standard deviations (n = 3).

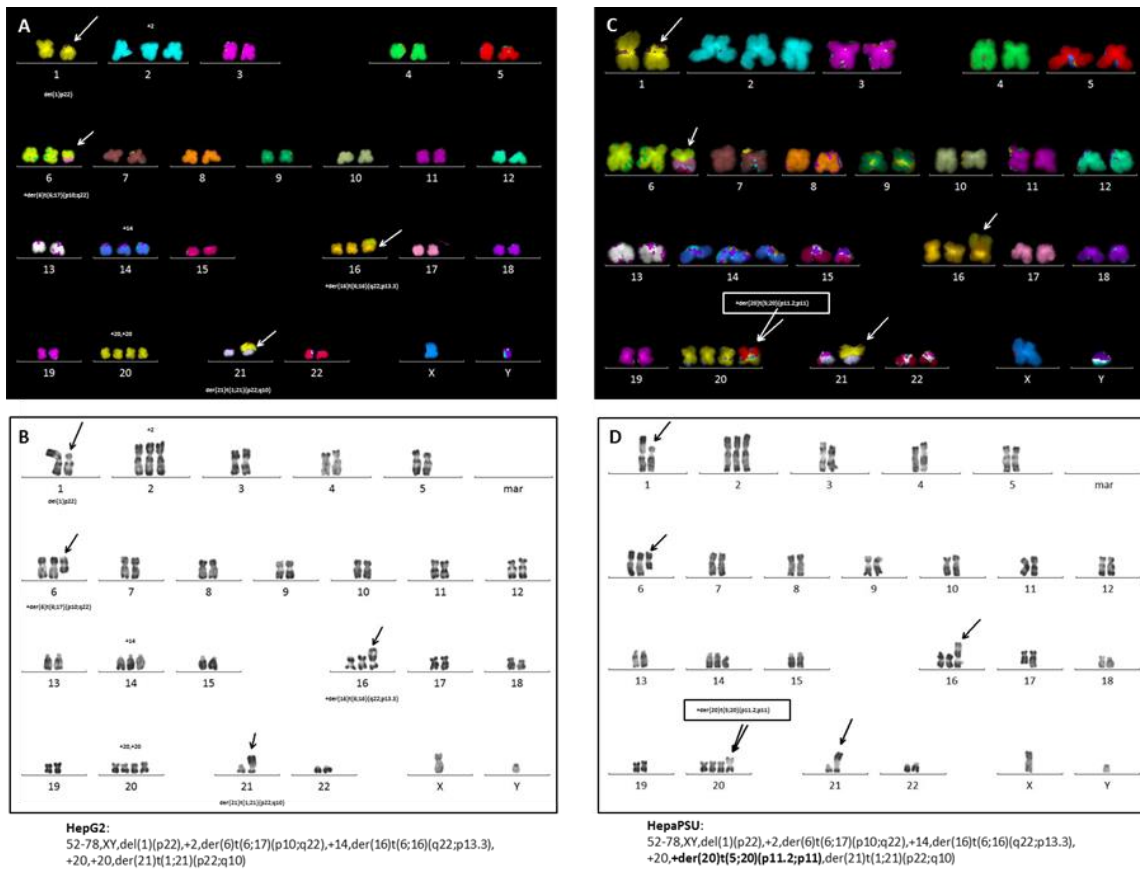


Figure 1: Comparison of karyotypes between HepG2 (figure 1 A and B) and HepG2 derived cell line (figure 1 C and D) cell lines.

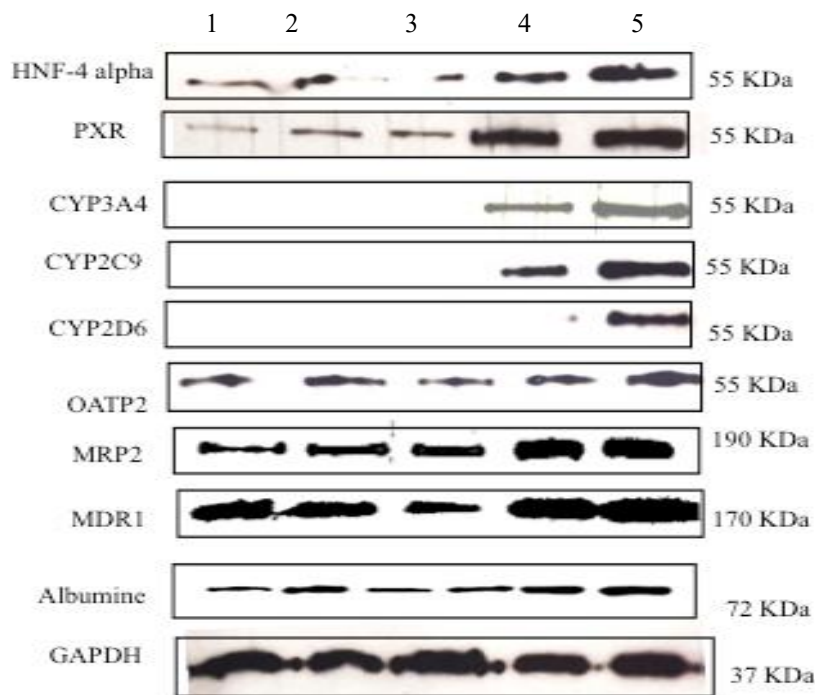


Figure 2: Comparison of the expression level of albumin, MDR1, MRP2, OATP1B1, CYP3A4, CYP2D6, CYP2C9, PXR and HNF-4 alpha on HepG2 derived cell line in different conditions of culture with HepG2 cells. HepG2 derived cell line was harvest after 1 day or 7 days in 2D culture, in presence of rifampicin the expression level of protein was compared to the 2D monolayer culture of HepG2 cells cultured for 1 day or 7 days in 2D culture. 1: HepG2 J1, 2: HepG2 J7, 3: HepG2 derived cell line J1, 4: HepG2 derived cell line +RIF, 5: HepG2 derived cell line J7.

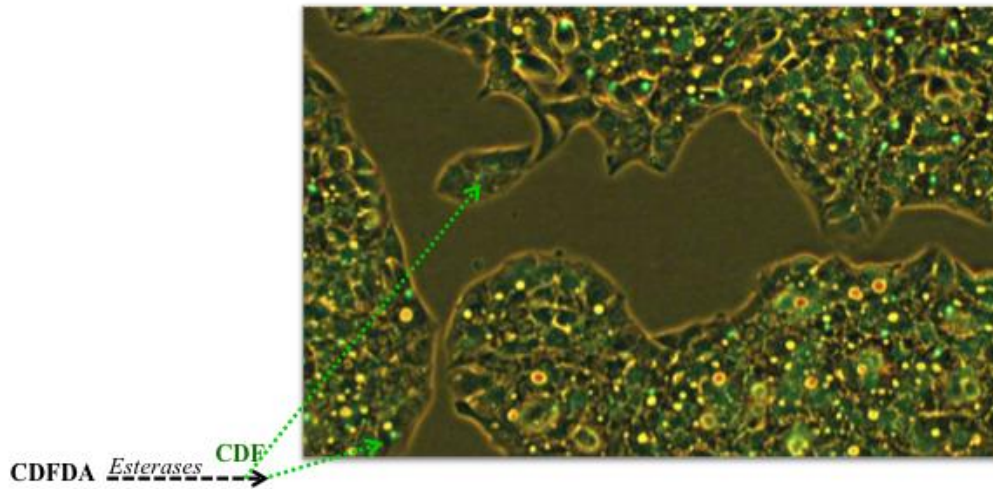


Figure 3: accumulation of CDF at the bile canalicular pole between two adjacent HepG2 derived cells. The trafficking of CDF to the canalicular pole indicates that the HepG2 derived cell line exhibit correct membrane polarity, protein trafficking and cellular functionality. The accumulation of CDF at the canalicular pole is represented in the figure by the green fluorescent circles (some of which are indicated by the green arrows)

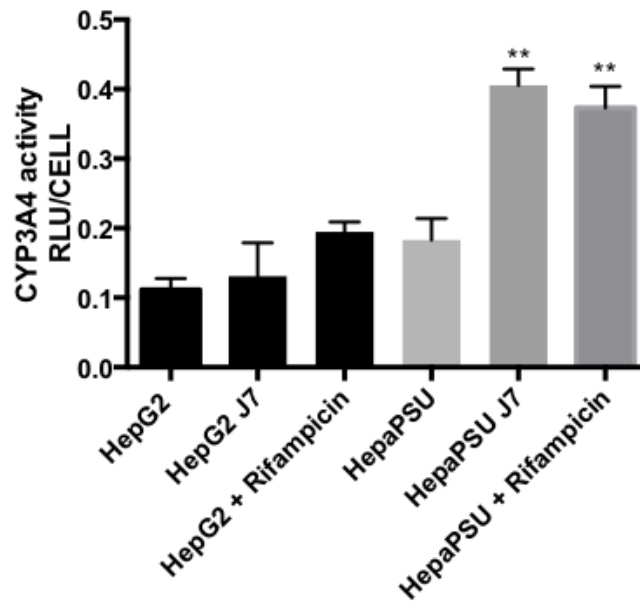


Figure 4: CYP3A4 activity (expressed as relative luminescence units (RLU) per seeded cell) in HepG2 derived cell line in different conditions of culture with HepG2 cells. Error bars indicate \pm standard deviation (n = 3). ** represents $P < 0.01$.

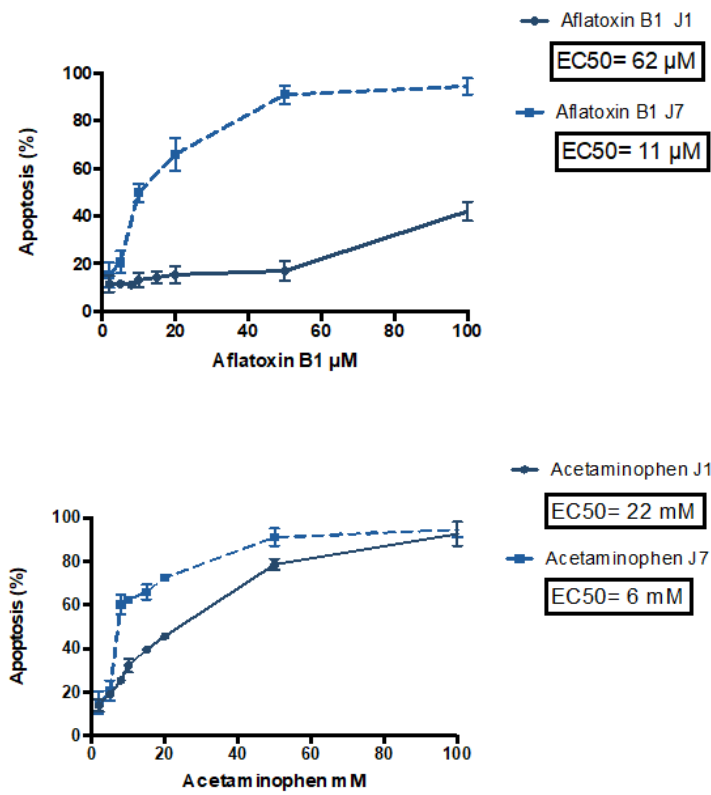


Figure 5: Dose response curves to assess acute toxicity of aflatoxin B1 and acetaminophen on HepG2 derived cell line treated after 1 day or 7 days of culture. Viability is given as percentage of untreated control. Error bars indicate \pm standard deviations (n = 3).

HepG2 derived cell line: a new human cell model in 2D and 3D culture for drug hepatotoxicity and metabolism studies. *Sarah Hassan, Jean Peluso, Natacha Rochel and Genevieve Ubeaud-Sequier. GMP in Paris, France. (October 25-27, 2017).*

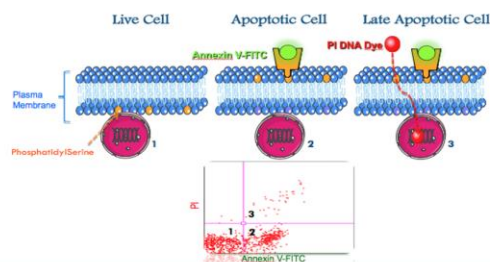
Sarah Hassan (a), Jean Peluso (a), Natacha Rochel (b) and Genevieve Ubeaud-Sequier (a)
(a) Plateforme eBioCyt-UPS1401, Faculty of pharmacy, (b) Department of Integrative Structural Biology, Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC), Université de Strasbourg, Illkirch, France

Abstract

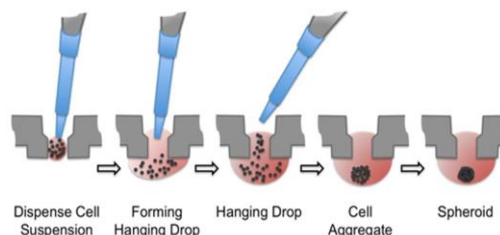
To present, using current *in vitro* models, the study of liver function and liver diseases are difficult. Conventional HepG2 cell model does not reflect the function and the expression of essential enzymes necessary present in liver such as CYP450, that is why, in our lab we have developed a novel *in vitro* human hepatic model that derived from HepG2 cell line. We have compared the morphology and the expression level of some specific liver proteins of HepG2 derived cell line cultured for 1 day or 7 days in 2D monolayer culture and in 3D culture respectively. We have tested the toxic effects of two drugs (acetaminophen and aflatoxin B1) in our HepG2 derived cell line cultured for 7 days or 1 day in 2D monolayer culture and 3D culture compared to conventional HepG2 cell line.

Methods

A. Hepatocellular death using a fluorescent apoptosis by Annexin V/PI.

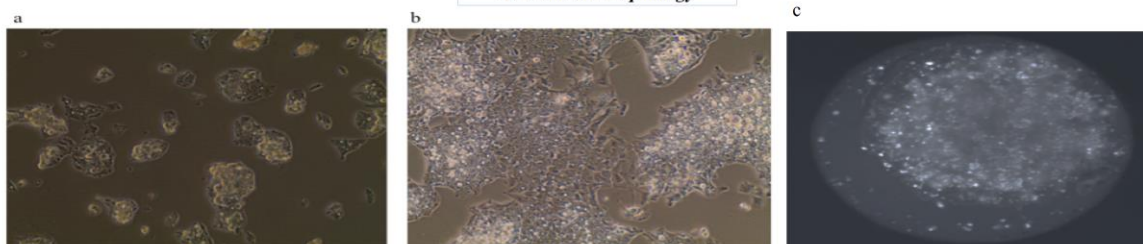


B. Spheroids created using the inSphero Gravity TRAP™ Plate.



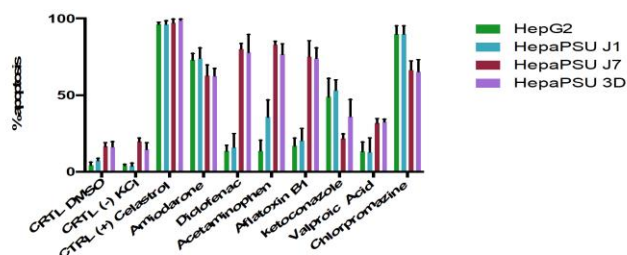
Results

A. Cellular morphology

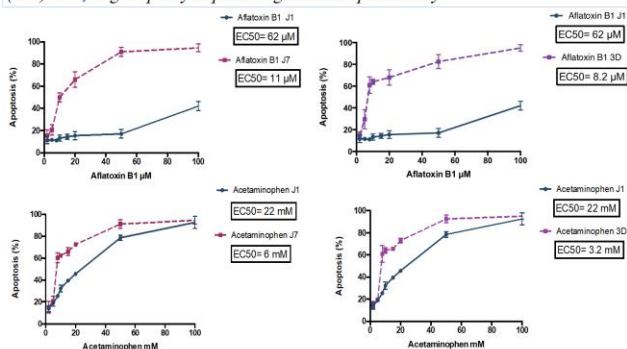


Light microscopy of (a) 2D HepG2 derived cell line cultures, for 1 day culture (x40) and (b) 2D HepG2 derived cell line cultures, for 7 day culture (x40) (c) Confocal microscopy pictures of 3D HepG2 derived cell line cultures (scale bar 200 μm).

B. Hepatotoxicity potential

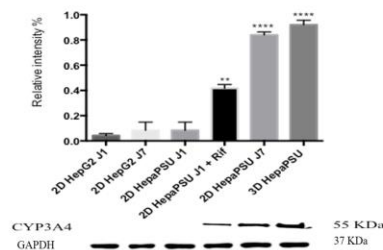


Comparison of acute toxicity of some drug with different mechanism of hepatotoxicity (n=4) → high capacity of predicting *in vitro* hepatotoxicity.

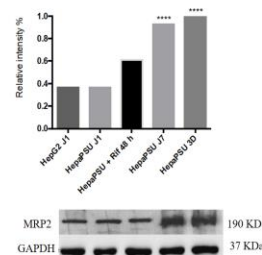


2D HepG2 derived cell line cultured for 7 days and 3D HepG2 derived cell are more sensitive to acetaminophen and aflatoxin B1 than 2D HepG2 derived cell cultured for 1 day. (n=3)

C. Expression level of CYP3A4 and Drug transporter



Increasing of the expression level of CYP3A4 on HepG2 derived cell line in special conditions and an inducible activity of CYP3A4 of cells treated with rifampicin. (n=3)



Increasing of the expression level of MRP2 on HepG2 derived cell line cells in special conditions. (n=1)

Conclusion

- HepG2 derived cell line is a new human liver cancer cell line.
 - 2D cultured for 7 days has an important expression level of CYP3A4 and transporters similar to their expression level in 3D culture.
 - Our hepatotoxicity data clearly correlate to publish data on HepaRG cells
- In conclusion, our novel model may be a promising tool of drug metabolism and toxicity studies.

References

- Schuster D, Laggner C, Langer T. Why drugs fail—a study on side effects in new chemical entities. *Curr Pharm Des.* 2005, 11(27), 3545-59.
- Guillozou, A. Liver cell models in *in vitro* toxicology. *Environ Health Perspect* 1998, 106, 511-532.
- Gómez-Lechón, M. J., Donato, M. T., Castell, J. V., & Jover, R. Human hepatocytes as a tool for studying toxicity and drug metabolism. *Curr Drug Metab* 2003, 4(4), 292-312.

I.2. Résultats complémentaires:

I.2.1. Objectifs:

Cette partie de notre travail a consisté à compléter la caractérisation de la nouvelle lignée hépatique développée au laboratoire, dérivée de la lignée HepG2, appelée « HepaPSU » et à l'optimiser. Nous avons optimisé notre nouvelle lignée cellulaire en modifiant les conditions de culture. La caractérisation de notre lignée a consisté à comparer notre lignée dans diverses conditions de culture. Les activités basales des enzymes du métabolisme médicamenteux et leur potentiel d'inductibilité sont ainsi testées dans une condition 1 standard (cellules âgées d'un jour J1) et dans une autre condition 2 optimisée (cellules âgées de 7 jours). D'abord, pour voir si nos cellules peuvent être un bon modèle de criblage de toxicité prenant en compte les métabolites, ces activités ont été testées de manière indirecte en suivant l'effet apoptotique de différentes molécules connues pour être hépatotoxiques par différents mécanismes. L'effet apoptotique est évalué par cytométrie de flux en utilisant l'annexine V-FITC/PI (méthodes déjà décrite dans l'article 1). Afin d'évaluer l'inductibilité des enzymes, l'effet apoptotique de ces molécules est étudié après induction des cellules par la rifampicine, molécule connue pour être un inducteur des CYP 450 (CYP3A4 et CYP2C9). De plus, afin d'être plus proches de la situation *in vivo*, nous avons également testé ces mêmes activités dans les cellules cultivées en 3D afin de comparer le comportement de nos cellules 2D vs 3D. Nous avons comparé les conditions de cultures 2D vs 3D, en comparant la morphologie des cellules hépatiques, en établissant leurs activités fonctionnelles biochimiques comme leur capacité à synthétiser l'albumine, en étudiant leurs capacités de détoxification : étude de l'expression et de l'activité de certaines isoformes du CYP450 (CYP3A4, CYP2D6 et CYP2C9) et des transporteurs (MDR1, MRP2 et OATP1B1), en étudiant l'expression des transporteurs nucléaires tels que PXR et l'effet apoptotique de différentes molécules utilisées en 2D connues pour être hépatotoxiques par différents mécanismes

I.2.2 Matériels et méthodes:

I.2.2.1 Les molécules testées:

Tableau 7: Différentes molécules utilisées pour l'évaluation de leur hépatotoxicité

Dénomination Commune Internationale	Classe pharmacologique	Concentrations testées (μM)	Médicaments hépatotoxiques
Chlorure de potassium	Sel de potassium	200	Contrôle négatif
Amiodarone	Antiarythmique	10	Toxique par elle-même
Diclofenac	Anti inflammatoire non stéroïdien	420	Métabolites toxiques
Paracétamol (Acetaminophen)	Analgésique, antipyrétique	12966	Métabolites toxiques
Aflatoxin B1	Mycotoxine	50	Métabolites toxiques
Acide valproïque	Antiépileptique et antidépresseur	50	Stéatose
Chlorpromazine	Antipsychotique	50	Cholestase

Afin de tester si nos cellules peuvent être utilisées comme un modèle prédictif de sélection de molécules hépatotoxiques, nous avons choisi différentes molécules de référence connues pour être hépatotoxiques par différents mécanismes (contrôles positifs) 1) toxicité de la molécule par elle-même (amiodarone), 2) toxicité impliquant totalement ou en partie l'accumulation des métabolites formées (paracétamol, diclofenac et aflatoxin B1), 3) toxicité par mécanismes de cholestase (chlorpromazine), 4) toxicité par mécanismes de stéatose (acide valproïque). Nous avons également utilisé dans ce modèle comme contrôle négatif, une molécule connue pour ne pas être hépatotoxique, le chlorure de potassium (KCl).

Les concentrations utilisées correspondent aux concentrations 100 fois supérieures aux concentrations plasmatiques maximales à l'état d'équilibre (C_{ss} max) reportées lors d'administration à des doses thérapeutiques de ces molécules comme indiqué dans la littérature, pour des études d'hépatotoxicité sur la lignée HepG2 (B. D. Cosgrove, *Toxicol Appl Pharmacol*, 237, 2009 et Xu, *Toxicol Sci*, 105, 2008,). Pour certains médicaments, les concentrations sont inférieures à ce seuil, en tenant

compte de la limite de solubilité des molécules testées. L'effet apoptotique des molécules est testé par cytométrie en flux dans les cellules « HepaPSU » dans les conditions de culture et dans les cellules HepG2 dans des conditions standard (n=3). Les molécules sont solubilisées dans le DMSO excepté le chlorure de potassium qui est hydrosoluble.

I.2.2.2 Incubation des cellules

a. Les cellules hépatiques âgées d'un seul jour (condition 1)

Les cellules « HepaPSU » et les cellules HepG2 cultivées en 2D sont incubées avec les molécules à tester durant 24 heures. Pour les études d'inductibilité, nous avons prétraité les cellules avec de la rifampicine (10 μ M) durant 48 heures. L'effet apoptotique est évalué par cytométrie de flux en utilisant l'annexine V-FITC/PI (méthodes déjà décrite dans l'article 1)

b. Les cellules hépatiques âgées de 7 jours (condition 2)

Les cellules « HepaPSU » et les cellules HepG2 cultivées en 2D pendant 7 jours, sont incubées avec les molécules à tester durant 24 heures.

c. Les cellules hépatiques cultivées en 3D

Les cellules en 3D sont cultivées dans des plaques de culture en goutte suspendue selon la méthode InSphero (méthode détaillée dans l'article 4). Les cellules sont ensuite cultivées en 3D pendant 7 jours. Après récupération des sphères, les cellules sont incubées avec les molécules à tester durant 24 heures.

I.2.2.3. Les analyses statistiques

Tous les résultats sont exprimés par leur moyenne +/- Erreur Standard Moyenne (ESM). Ces valeurs sont comparées en utilisant une analyse multifactorielle de la variance suivie d'un test t de Student pour les comparaisons multiples avec un nombre de répétition au minimum égale à 3. Les résultats sont considérés comme significatifs lorsque les ***P < 0.001, ** P<0.01, * P<0.05.

I.2.3 Résultats et Discussion:

I.2.3.1 Comparaison de l'effet apoptotique des molécules testées entre HepaPSU et HepG2 cultivées en 2D

Dans nos conditions expérimentales, les résultats montrent que le modèle cellulaire « HepaPSU » est un bon modèle de prédiction d'hépatotoxicité avec pour l'amiodarone un pourcentage d'apoptose de 80% quelque soit les cellules (80% +/- 9% dans les cellules « HepaPSU » et 90% +/- 8% dans HepG2). Nos résultats montrent également que les HepaPSU présentent une activité enzymatique fonctionnelle puisque le pourcentage d'apoptose est supérieur pour les molécules dont les métabolites CYP450 dépendant contribuent à leur hépatotoxicité par comparaison aux résultats obtenus avec les HepG2. Par exemple, pour le paracétamol (ou acétaminophène), le pourcentage d'apoptose est de 42.9% +/- 7.6% dans les HepaPSU vs 20% +/- 2.5% dans les HepG2).

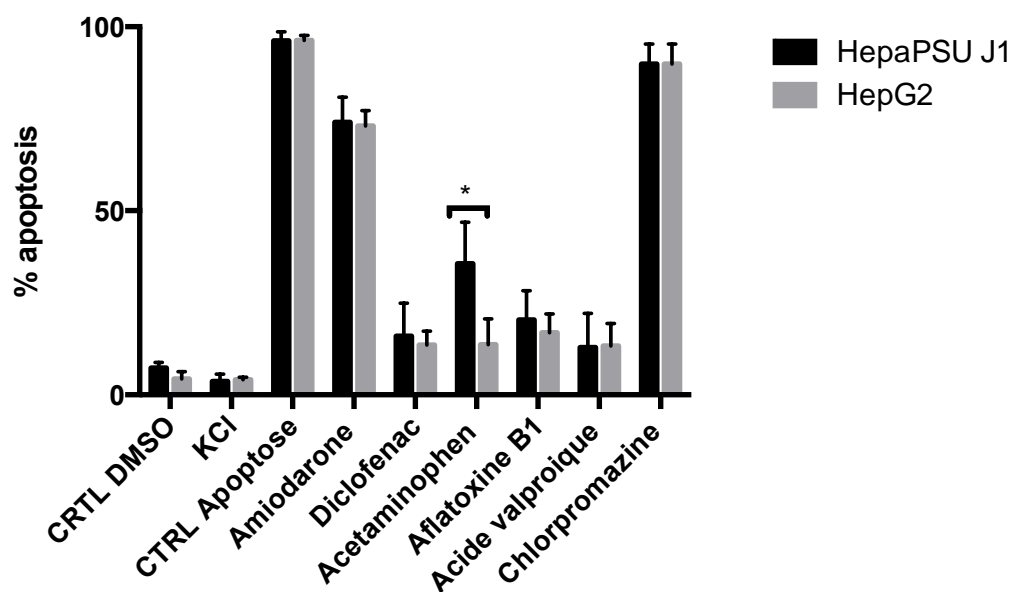


Figure 41: Effet apoptotique des molécules étudiées sur les HepaPSU à J1 et sur les HepG2 (N=3), * P<0.05.

I.2.3.2 Comparaison de l'effet apoptotique des molécules testées après induction par la rifampicine dans les cellules cultivées en 2D

Après incubation pendant 48 heures de nos cellules HepaPSU avec la rifampicine qui est un inducteur connu des CYP450, en présence de paracétamol ou de diclofenac ou d'aflatoxine B1, le pourcentage d'apoptose est augmenté (30% d'augmentation, 50% et 40% respectivement). Cette augmentation est due à la formation des métabolites toxiques de ces molécules par les CYP450. Dans nos conditions expérimentales, le pourcentage d'apoptose de l'acide valproïque est augmenté (45% d'augmentation). Ceci est en corrélation avec la littérature où il a été démontré que l'hépatotoxicité de l'acide valproïque est augmentée en présence d'un inducteur du CYP450 (Medix, 2018). De plus, nos résultats montrent une diminution significative de l'hépatotoxicité de la chlorpromazine (15% de diminution). Cette diminution peut être expliquée en partie par la formation de métabolites inactifs de cette molécule par les CYP450.

Nos résultats confirment bien que les CYP450 sont inducibles dans nos cellules contrairement aux cellules HepG2. (Hassan et al. GMP, Paris 2017).

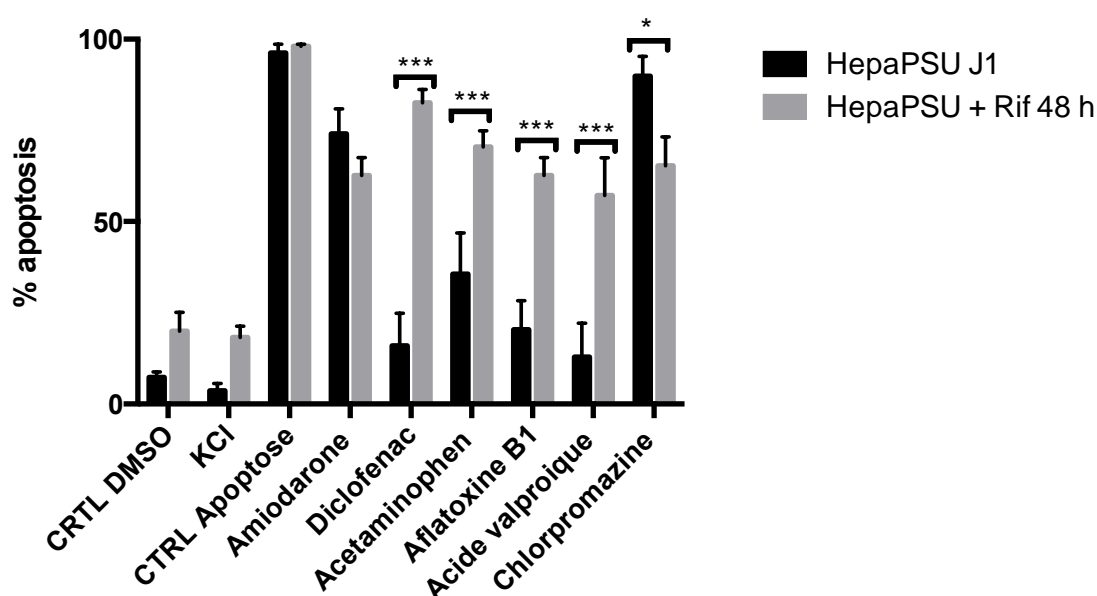


Figure 42: Effet apoptotique des molécules étudiées sur les HepaPSU à J1 et après traitement 48h avec la rifampicine (N=3), ***P < 0.001, * P<0.5

I.2.3.3 Morphologie des cellules HepaPSU cultivées en 2D pendant 7 jours

Ayant observé que les canalicules biliaires se forment au bout de 7 jours de culture dans nos cellules HepaPSU (article 1), nous avons décidé d'optimiser le temps de culture des cellules « HepaPSU » dans un milieu conditionné pendant 7 jours. La figure 43 nous montre la morphologie des cellules HepaPSU après 7 jours de culture (b) bien différenciées et structurées par comparaison aux cellules cultivées pendant un jour (a). Dans ces conditions de culture, afin de tester la fonctionnalité biochimique de nos cellules, nous avons évalué l'expression de l'albumine dans les cellules. Nos résultats montrent une expression d'albumine comparable entre les cellules à J1 (condition 1) et les cellules à J7 (condition 2) (figure 2 article 1).

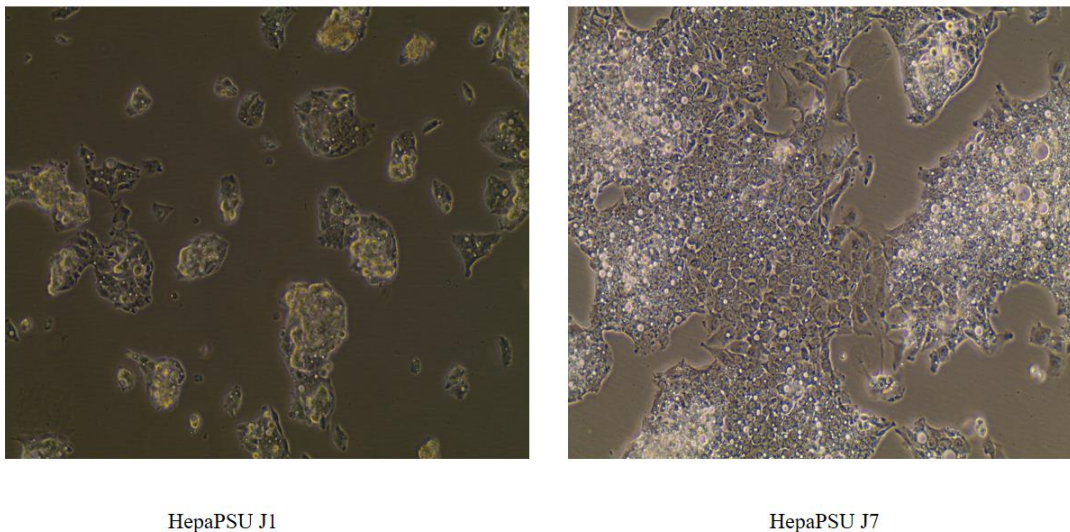


Figure 43: Photographies des HepaPSU (a) cultivées pendant un jour et (b) pendant 7 jours sous microscopie à contraste de phase (40X)

I.2.3.4 Comparaison de l'effet apoptotique des molécules testées dans des conditions optimisées (condition 2 ou J7):

Nos résultats montrent que nos cellules sont capables de prédire l'hépatotoxicité de ces molécules de façon plus prédictive que les HepG2, en particulier lorsque ces cellules « HepaPSU » cultivées en condition 2 (J7), pour prédire l'hépatotoxicité de molécules médicamenteuses par les métabolites toxiques formés par les CYP450. Ainsi, dans nos conditions expérimentales, un pourcentage d'apoptose important et significatif est observé: 72.9%, 75% et 68% d'apoptose avec respectivement, paracétamol, diclofenac et aflatoxine B1 (figure 44). Ainsi, de la même manière, la chlorpromazine dont les métabolites CYP450 dépendant sont inactifs sont moins hépatotoxique sur les cellules cultivées en condition 2 (Hassan et al. GMP, Paris 2017). Par contre, pour les cellules HepG2 cultivées en condition 1 ou 2, aucun effet hépatotoxique n'est observé avec des pourcentages d'apoptose inférieur ou égal à 12 % (10 %, 12% et 12% respectivement pour le paracétamol, le diclofenac et l'aflatoxine B1) pour les cellules HepG2 cultivées en condition 1 et avec des pourcentages d'apoptose inférieur ou égal à 25 % (15 %, 18% et 25% respectivement pour le paracétamol, le diclofenac et l'aflatoxine B1) pour les cellules HepG2 cultivées en condition 2 (figure 45). Ce résultat confirme que les CYP450 sont fonctionnels dans nos cellules « HepaPSU », contrairement aux cellules HepG2 puisque dans nos conditions nous avons observé des résultats différents entre les HepG2 J7 et « HepaPSU » J7 (figure 46).

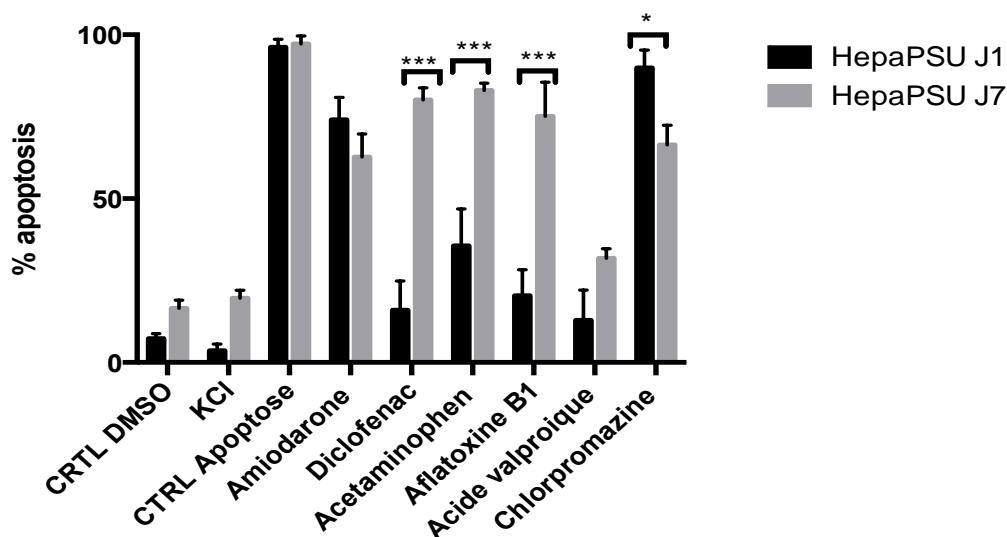


Figure 44: Effet apoptotique des molécules étudiées sur les HepaPSU à J1 et J7 (N=3), *** $P < 0.001$, * $P < 0.05$.

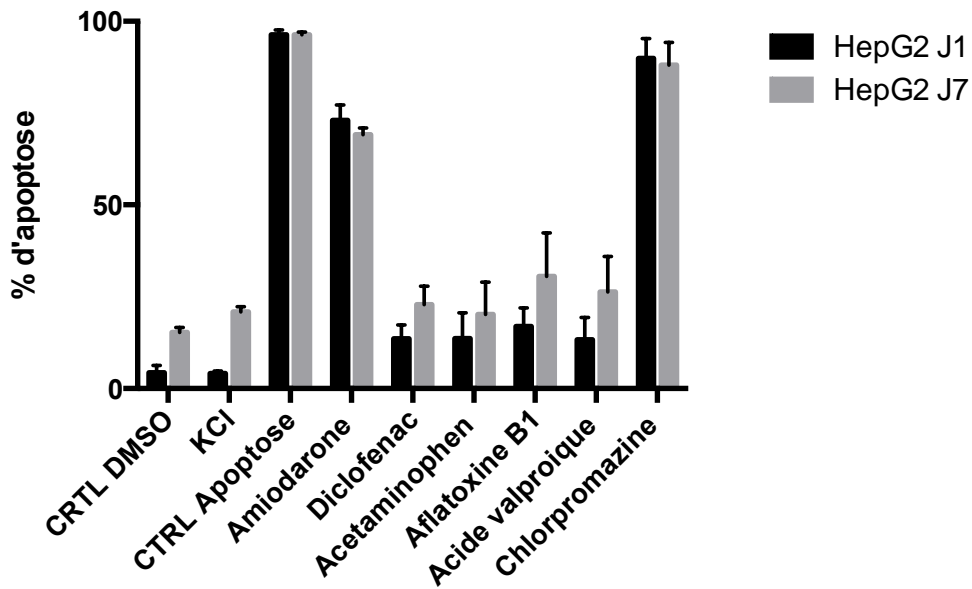


Figure 45: Effet apoptotique des molécules étudiées sur les HepG2 à J1 et J7 (N=3)

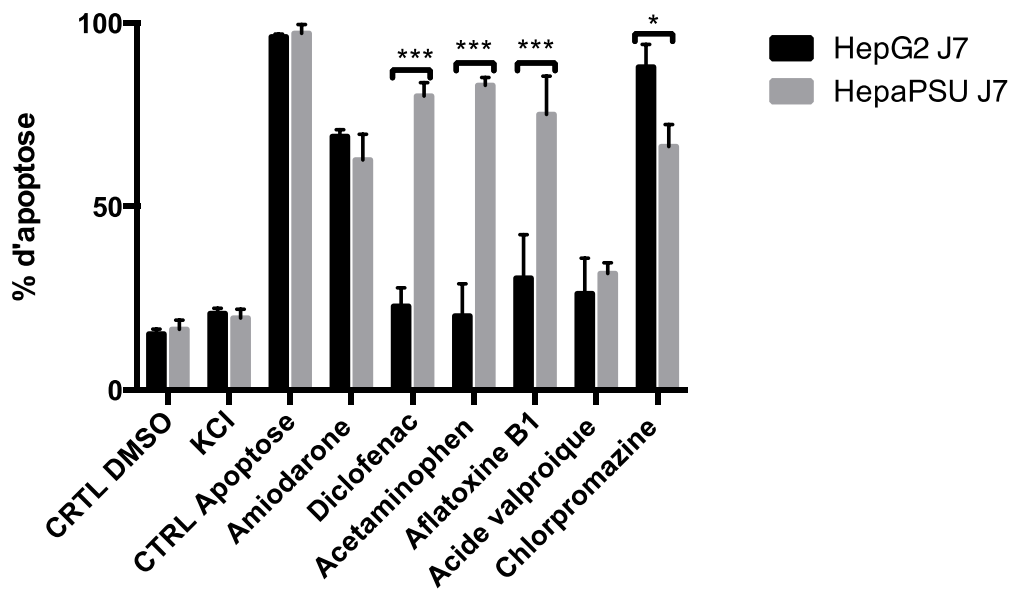


Figure 46: Effet apoptotique des molécules étudiées sur les HepaPSU J7 et HepG2 J7 (N=3), *** $P < 0.001$, * $P < 0.05$.

I.2.3.5 Culture 3D des cellules HepaPSU:

Nous avons mis en place et caractérisé une nouvelle lignée cellulaire « HepaPSU » présentant des propriétés spécifiques du foie, capables de métaboliser les médicaments et de prédire l'hépatotoxicité de molécules. Afin d'être plus représentatif de la situation *in vivo* et de tenir compte de la structure spatiale des cellules dans le foie, nous cultivons nos cellules HepaPSU en 3D et comparons leur comportement par rapport aux cellules cultivées en 2D.

La figure 47 nous montre la morphologie des cellules « HepaPSU » après suspension de 5000 cellules/puits cultivées pendant 7 jours en 3D sans marquage (a) et après marquage des noyaux des cellules à l'Hoechst (b).

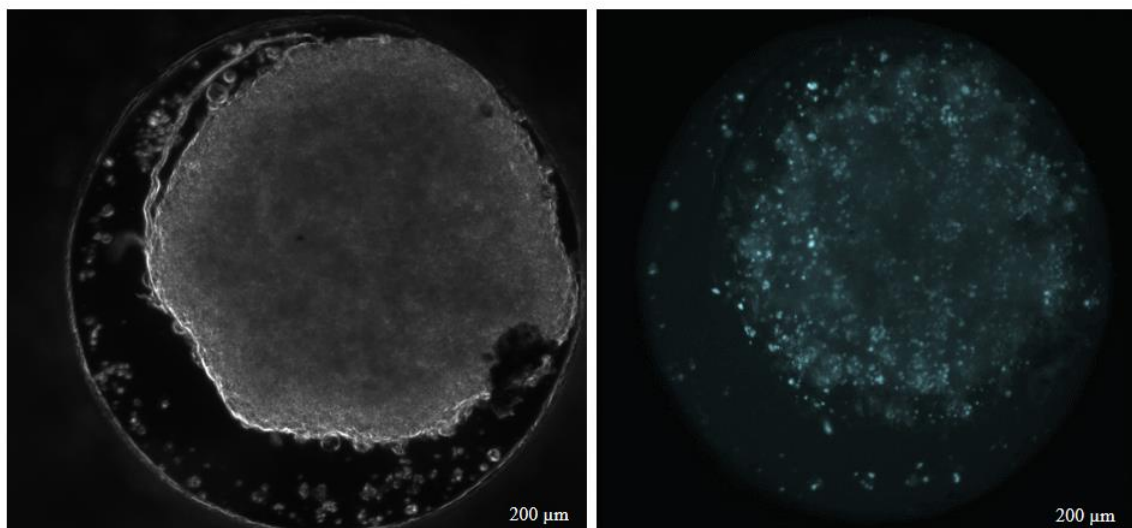


Figure 47: Photos des sphéroïdes HepaPSU (a) non marquées et (b) marquées avec l'Hoechst par microscopie confocale (scale barr 200 μm).

I.2.3.6 Comparaison de l'effet apoptotique des molécules testées sur les HepaPSU cultivées en 3D

Nos résultats montrent que nos cellules « HepaPSU » cultivées en 3D sont capables de mieux prédire l'hépatotoxicité des molécules choisies et, en particulier celles dont l'hépatotoxicité est liée aux métabolites CYP450 dépendants, que les cellules « HepaPSU » cultivées en 2D. Ainsi, dans nos conditions expérimentales, un pourcentage d'apoptose important et significatif est observé: 78.7%, 82% et 77.6% d'apoptose avec respectivement, le paracétamol, le diclofenac et l'aflatoxine B1. Nos résultats montrent une diminution du pourcentage d'apoptose de la chlorpromazine qui est connue pour former des métabolites inactifs après être métabolisée par les CYP450.

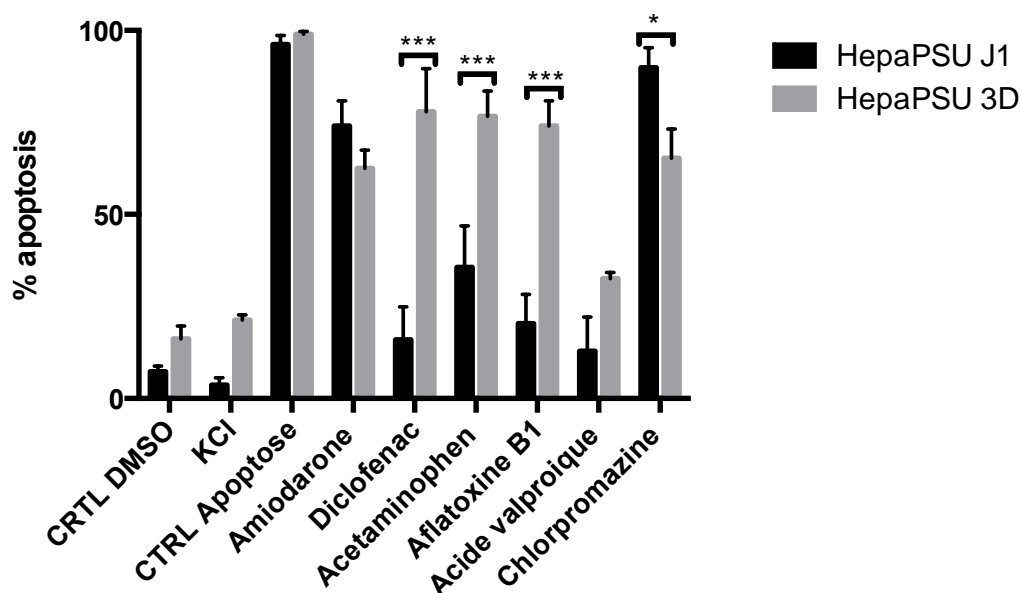


Figure 48: Effet apoptotique molécules étudiées sur les HepaPSU à J1 et en culture 3D (N=3), ***P < 0.001, * P<0.05.

I.2.3.7. Comparaison de l'expression des transporteurs, du cytochrome P450 et des récepteurs nucléaires entre les HepaPSU cultivées en 2D J1 et J7 et 3D:

Les cellules HepaPSU cultivées en 3D sont capables de synthétiser de l'albumine comme les HepG2. Nos cellules « HepaPSU » expriment fortement les CYP3A4, CYP2D6 et CYP2C9 (augmentation de 5 fois dans des conditions de culture spéciales en 2D (J7, condition 2) et en culture 3D par rapport aux HepG2). De la même manière, les cellules expriment fortement les transporteurs membranaires (augmentation de 2 fois, 5 fois, et 2 fois par rapport aux cellules HepG2 pour MDR1, MRP2 et OATP1B1 respectivement). D'après tous les résultats obtenus, nous avons fait l'hypothèse que les « HepaPSU » cultivées en 2D dans des conditions spéciales ((J7, condition 2) arrivent à un stade de différenciation suffisant, permettant d'avoir des réponses d'hépatotoxicité et de métabolisme plus prédictives de *l'in vivo*, par comparaison à celles obtenues avec les cellules HepG2. Pour cela, nous avons étudié l'expression du HNF-4 alpha qui est une protéine impliquée dans la différenciation des hépatocytes (Ritu R. et al, 2006). Nos résultats montrent que notre nouvelle lignée cellulaire HepaPSU présente une expression relativement forte de HNF-4 alpha alors que cette expression est faible dans les cellules HepG2 (augmentation de 5 fois dans des conditions de culture spéciales (2D J7) et en culture 3D par rapport aux HepG2). De façon cohérente, nos résultats montrent que notre nouvelle lignée cellulaire « HepaPSU » présente également une expression relativement forte de PXR qui est un récepteur nucléaire impliqué dans la régulation des CYP450 et des transporteurs hépatiques de la famille des ABC (augmentation de 4 fois dans des conditions de culture spéciales en 2D J7 et en culture 3D par rapport aux HepG2).

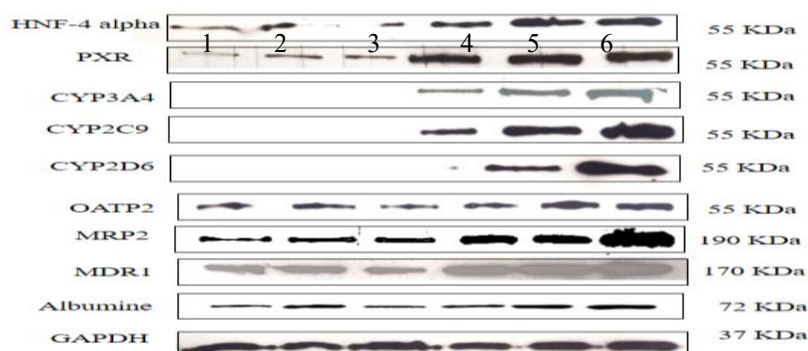


Figure 49: Expression des enzymes et transporteurs 1: HepG2 J1, 2: HepG2 J7, 3: HepaPSU J1, 4: HepaPSU + RIF, 5: HepaPSU J7, 6: HepaPSU 3D

I.2.3. Conclusion

L'étude du caryotype de la nouvelle lignée en comparaison avec la lignée de référence HepG2 a pu montrer que la lignée « HepaPSU » est une nouvelle lignée hépatique stable dérivée des HepG2 en gardant les mêmes anomalies présentes dans cette dernière. Par contre, nous avons observé des différences significatives pour les chromosomes 5, 17 et 20 (article 1). D'après ces résultats, nous avons fait l'hypothèse que ces mutations ont contribué à donner certaines capacités métaboliques à la nouvelle lignée. Le facteur nucléaire des hépatocytes (HNF4) est un membre de la superfamille des récepteurs nucléaires qui a montré des effets régulateurs sur le cytochrome P450 (Gonzalez 2008). La localisation cytogénétique du gène codant pour HNF-4 alpha, qui joue un rôle clé dans la différenciation hépatique, est située sur le chromosome 20 muté dans notre nouvelle lignée. Nos résultats montrent que notre nouvelle lignée présente une expression relativement forte de HNF-4 alpha alors que cette expression est faible dans les mêmes conditions dans les cellules HepG2. De plus, de façon cohérente, nos résultats montrent que notre nouvelle lignée cellulaire « HepaPSU » présente une expression relativement forte du PXR qui est un récepteur nucléaire impliqué dans la régulation des enzymes (CYP) et des transporteurs hépatiques (famille ABC) et qui est fortement exprimé dans le foie humain (Andre Guillouzo et al. 2007). La différence d'expression de ces récepteurs nucléaires dans les HepaPSU cultivées dans des conditions spéciales a joué un rôle important dans l'augmentation de l'expression des transporteurs et des CYP. Ces différences d'expression expliquent les réponses d'hépatotoxicité prédictives de molécules connues pour être hépatotoxiques via leur métabolisme. Clairement, nous avons mis en place une nouvelle lignée hépatique humaine qui fait l'objet d'un très bon modèle de prédiction d'hépatotoxicité en exprimant suffisamment et significativement les enzymes et les transporteurs hépatiques trouvés au niveau des hépatocytes *in vivo*. Ce modèle pourrait être ainsi un outil de choix dans les études précliniques de métabolisme et d'hépatotoxicité.

II. Evaluation de l'effet des traitements médicamenteux sur différents modèles cellulaires hépatique et pancréatique en 2D et 3D

II.1. Optimisation de l'effet de la gemcitabine sur les cellules du pancréas

II.1.1. Choix et optimisation du modèle cellulaire pancréatique

II.1.2. Objectif

II.1.3. Article 2: Synergistic Effect of the Combination of Polyphenols with Gemcitabine on Pancreatic Cancer Cell line AsPC-1. Sarah Hassan, Jean Peluso, Guy Fuhrmann and Genevieve Ubeaud-Sequier. *J Pharmaceut Res*, 2017 2(1): 2573-962

II.1.4. Article 3: Bergamottin potentializes the cytotoxic activity of gemcitabine through inhibition of MDR1 on pancreatic cancer cell line AsPC-1. Sarah Hassan, Jean Peluso, Guy Fuhrmann and Genevieve Ubeaud-Sequier. *Int. J. Cur. Adv. Res.*, 2017 06(17): 7275-7280.

II.1.5. Polyphenols potentialize the cytotoxic activity of gemcitabine on pancreatic cancer cell line AsPC-1. Sarah Hassan, Jean Peluso, Guy Fuhrmann and Genevieve Ubeaud-Sequier. *Biochem pharmacol*, 2017 06(2): 36.

II.1.6. Bergamottin potentializes the cytotoxic activity of gemcitabine on pancreatic cancer cell line. Sarah Hassan, Jean Peluso, Dominique Leveque, Guy Fuhrmann and Genevieve Ubeaud-Sequier *American association of pharmaceutical scientists (AAPS) in San Diego, CA. (November 12-15, 2017).*

II.2 Optimisation de l'effet de la doxorubicine sur les cellules hépatiques

II.2.1. Objectif

II.2.2. Matériel et Méthodes

II.2.3. Résultats et Discussion

II.2.3.1 Evaluation de l'effet des polyphénols seuls sur la lignée « HepaPSU » cultivée en 2D

II.2.3.2. Evaluation de l'effet de la doxorubicine en combinaison avec les polyphénols sur la lignée hépatique « HepaPSU » cultivées en 2D en condition (J1)

II.2.3.3. Evaluation de l'effet de la doxorubicine en combinaison avec les polyphénols sur la lignée hépatique « HepaPSU » cultivées en 2D en condition 2 (J7)

II.2.4. Conclusion

II.3. Comparaison entre les différences de réponse pharmacologique observée dans des modèles de culture 2D versus 3D

II.3.1. Contexte et objectif

II.3.2. Matériel et Méthodes

II.3.3. Résultats et Discussion

II.3.3.1 Evaluation de l'effet des polyphénols seuls sur la lignée AsPC-1 cultivée en 3D

II.3.3.2. Evaluation de l'effet de la gemcitabine combinée aux polyphénols sur la lignée AsPC-1 cultivée en 3D

II.3.3.3. Evaluation de l'effet des polyphénols seuls sur la lignée HepaPSU cultivée en 3D

II.3.3.4. Evaluation de l'effet de la doxorubicine combinée aux polyphénols sur la lignée HepaPSU cultivée en 3D

II.3.3.5. Comparaison des effets des combinaisons des médicaments anticancéreux avec les polyphénols dans les cellules pancréatiques et hépatiques cultivées en 2D versus 3D

II.3.4. Conclusion

II.3.5. Article 4 en cours de soumission: Quercetin potentializes the cytotoxic activity of gemcitabine and doxorubicin through the inhibition HIF-1 α and MDR1 in 3D culture of AsPC-1 and HepG2 cells.

II. Evaluation de l'effet des traitements médicamenteux sur différents modèles 2D et 3D

II.1. Optimisation de l'effet de la gemcitabine sur les cellules du pancréas

II.1.1. Choix et optimisation du modèle cellulaire pancréatique:

Le projet de notre travail est de rechercher un modèle cellulaire *in vitro* prédictif de la situation *in vivo* pour étudier des stratégies thérapeutiques nouvelles dans le cancer hépato-pancréatique. Dans ce contexte, pour nos études sur le cancer pancréatique, nous avons choisi d'utiliser des cellules AsPC-1 qui sont des cellules d'ascites issues d'un adénocarcinome pancréatique humain métastatique. Cette lignée cellulaire dérive d'une xénogreffe sur souris nude initiée par transplantation de cellules d'ascites d'une patiente de 62 ans ayant un cancer du pancréas. Ces cellules AsPC-1 produisent des antigènes humains carcinoembryonnaires et de santigenes humains spécifiques du pancréas. Cette lignée cellulaire est connue pour être un bon modèle cellulaire d'étude dans le cancer pancréatique.

II.1.2. Objectif:

L'objectif de la deuxième partie de notre travail consiste à évaluer la capacité de certaines substances naturelles bioactives à réguler les transporteurs membranaires, les enzymes ou les protéines régulatrices de l'apoptose susceptibles d'être altérées par des traitement anticancéreux comme la gemcitabine. Pour cela, nous avons choisi une série de polyphénols naturels et étudié in vitro l'effet de la combinaison de ces substances naturelles avec la gemcitabine dans le but d'optimiser l'activité apoptotique de la gemcitabine.

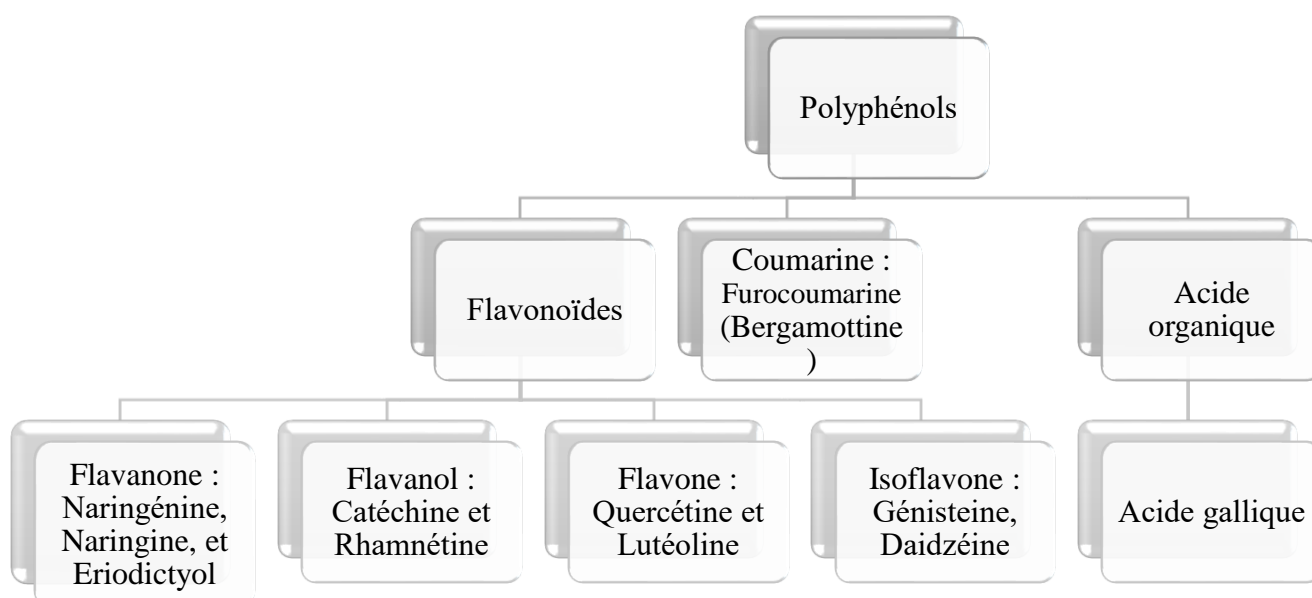


Figure 50: Différents polyphénols utilisés dans la deuxième partie

Article 2

**Synergistic effect of the combination of Polyphenols with
gemcitabine on pancreatic cancer cell line AsPC-1**

Synergistic Effect of the Combination of Polyphenols with Gemcitabine on Pancreatic Cancer Cell line AsPC-1

Sarah Hassan^{1,3*}, Jean Peluso³, Guy Fuhrmann² and Genevieve Ubeaud-Sequier¹

¹EA 7293, Vascular and Tissue Stress in Transplantation, Federation of Translational Medicine of Strasbourg, Faculty of Medicine, University of Strasbourg, Strasbourg, France.

²UMR7213 CNRS, Laboratory of Biophotonics and Pharmacology, Faculty of Pharmacy, University of Strasbourg, Illkirch, France.

³Plateforme eBiocyt-UPS1401, Faculty of pharmacy, University of Strasbourg, Illkirch, France.

Corresponding author

S. Hassan, EA 7293, eBiocyt-UPS1401, Faculté de Pharmacie, 74 route du Rhin, BP6024, F-67401 Illkirch Cedex, France; E-mail: sarah.w.hassan@gmail.com

Submitted: 14 Sep 2016; Accepted: 11 Oct 2016; Published: 16 Oct 2017

Abstract

In our diet, polyphenols are micronutrients with an important role in the prevention of degenerative diseases such as cancer and cardiovascular diseases. Particularly, Pancreatic cancer is one of the most aggressive cancers, with only about 5% of patients surviving 5 years past the initial diagnosis. Despite advances with current chemotherapy combinations, overall survival outcomes are still require novel therapeutic approaches. Here, we examined the efficacy of combined treatments of polyphenols and gemcitabine the standard of treatment for patients with metastatic pancreatic cancer in human pancreatic cancer cells. For that purpose, the pro-apoptotic effects of gemcitabine were studied on the human pancreatic cell line AsPC-1 in presence or absence of several polyphenols, in order to evaluate if they latter are able to potentialize gemcitabine cytotoxicity. Our study aims to investigate the implication of MDR1 (multidrug transporter) in resistance to gemcitabine and if the studied polyphenol could target this drug efflux pump in AsPC-1 cells by flow cytometric analysis. We observed that 5 µg/ml gemcitabine in combination with 15 µg/ml of selected polyphenol (Catechin, Quercetin, Bergamottin, Rhamnetin) was more effective than gemcitabine alone, by increased in the percentage of dead cells up to 60%. Moreover our results demonstrated that some polyphenols (Quercetin) inhibit the efflux activity of MDR1. Our study in vitro suggests therefore that chemotherapy with gemcitabine might be significantly increased upon combination with specific polyphenol. In conclusion, polyphenols may be promising agents for novel combination therapy since they potentialize the cytotoxic activity of gemcitabine to eradicate pancreatic cancer and therefore the cellular resistance.

Keywords: Pancreatic cancer, Gemcitabine, Polyphenols and Combination treatment.

Introduction

Polyphenols are natural compounds found in food such as fruits; vegetable and red wine with antioxidant activity [1]. Polyphenols can help in the preventing and reducing the progression of several diseases including cardiovascular diseases, cancer and diabetes [2]. It's also known that polyphenols contribute to the body being in an anti-inflammatory state, associated with a lower risk of some chronic diseases [3]. In contrast, Many studies with polyphenols, such as flavonoids from fruits and vegetables, have shown that they are efficient chemopreventive agents since they are able to promote apoptosis in a variety of cancer cells [4]. In addition, grapefruit juice contained dihydroxybergamotol and other furanocoumarins, which are known to inhibit the drug efflux transporters, such as MDR1 and increased the uptake of vinblastine by Caco-2 cells [5]. To enhance intracellular anticancer drug accumulation by impairing the MDR1 efflux function, the process of chemosensitization involves usually a co-administration

of a MDR1 inhibitor with an anticancer [6]. Numerous compounds have been shown to inhibit the drug efflux function of MDR1 and therefore, increase the intracellular concentration of cytotoxic anticancer agents and consequently decrease in the cellular resistance [7]. More specifically, pancreatic cancer is the eighth major form of cancer-related death worldwide, causing 227 000 deaths annually [8]. Gemcitabine is the most commonly used chemotherapeutic agent over the past decade. Current treatment modalities for advanced pancreatic cancer include gemcitabine as a single agent or in combination with multiple chemotherapeutic agents [9,10]. However, pancreatic cancer shows an important resistance against gemcitabine, when the major cause of chemotherapy failure with gemcitabine is the drug resistance to multiple chemotherapeutic agents [11]. Overexpression of MDR1 has been shown to induce resistance to various anticancer drugs [12]. MDR1 acts as an energy-dependent drug efflux pump, thereby decreasing the intracellular drug concentration and causing drug resistance. For example, colorectal cancer express high levels of MDR1, and this expression may contribute to the general resistance of colorectal cancer to anticancer drugs [13]. The very limited use

of chemotherapy for pancreatic cancer patients is associated with the inherent chemoresistant nature of this aggressive disease. However, MDR1 the ATP-dependent membrane-bound drug efflux pumps, is mediators of clinically relevant chemoresistance [15]. To enhance the anticancer therapeutic efficacy and reduce the side effects, natural products were combined with standard chemotherapy and radiotherapy [15]. In this context, the use of natural products, as a supplementary approach, to treat pancreatic cancer holds a great promise with minimal side effects [16].

The aim of our study is to establish whether polyphenols could have the ability to induce apoptosis and enhance the chemotherapeutic effect of gemcitabine in vitro in an established human pancreatic cancer cell line (AsPC-1) without causing damage on the normal cells.

Material and Methods

Chemicals and Drugs

Rhodamine 123 (RH 123) was purchased from Invitrogen. Verapamil, polyphenols and gemcitabine were purchased from Sigma-Aldrich. Final concentration of DMSO applied to cells during incubation with tested drugs was 0.5%. In the tested setup these concentrations had no adverse effects on cell viability or cell morphology on rhodamine-123 efflux.

Cell culture and maintenance

The human pancreatic adenocarcinoma cell line AsPC-1 cells (CRL-1682) purchased from ATCC (LGC Standards, Molsheim, France) were cultivated in the physiological nutrient-rich DMEM-based media (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) supplemented with 10% (v/v) foetal bovine serum (Lonza, Verviers, Belgium), 2 mM glutamine, P/S (100 unit/ml and 100 lg/ml) (Sigma-Aldrich). Cells were grown in petri dishes to 70-80% confluency prior to treatment. All plates were incubated in a humidified incubator at 37°C and 5% CO₂. Then cells were incubated with gemcitabine and polyphenols for 24 hours.

Detection of apoptosis by annexin-FITC

Pancreatic cancer cells AsPC-1 cells death was assessed using AnnexinV-FITC Kit (MiltenyiBiotec) according to manufacturer's protocol. Briefly, Aspc1 cells were incubated with the gemcitabine, polyphenols and their combination for 24 hours. Cells were then washed with phosphate buffered saline (PBS) and stained with AnnexinV-FITC and PI following the manufacturer's protocol. The fluorescence intensity of AnnexinV-FITC stained cells at 530/540 nm and PI stained cells at 675/630 were analysed by Guava EasyCyte Plus capillary flow cytometer (Merck Millipore, Life Science division, Merck KgaA, Darmstadt, Germany) and computed using the Guava ExpressPro software (Merck/Millipore/Guava Tech). The apoptotic potential of the tested drugs was compared to the apoptotic potential of celastrol, which is known to be a positive control of apoptosis.

MDR-1 function assay

MDR1-mediated efflux of rhodamine 123 was monitored on a Guava EasyCyte Plus capillary flow cytometer equipped with a 488 nm excitation laser. The accumulated intracellular fluorescence intensity of rhodamine 123 at 530/540 nm was computed on the Guava ExpressPro software (Merck/Millipore/Guava Tech) in terms of x-geometric mean arbitrary units. Dead cells were excluded based on propidium iodide staining. The inhibitory potential of tested compounds on rhodamine-123 efflux was expressed relative to maximum inhibition obtained with 100 µM verapamil in the same

experiment. The experiments were repeated three times.

Statistical Analysis

Data are expressed as mean +/- standard error of mean (S.E.M.) and analysed using Graph Pad Prism5™ (La Jolla, CA, USA). Statistical analysis was performed with either the one-way ANOVA test followed by Student's t-test. A P value <0.05 was considered significant. Experiments were performed at least in three separate experiments.

Results

Apoptotic potential of polyphenols and gemcitabine

AsPC-1 cells treated for 24 hours with polyphenols do not exhibit a significant apoptotic potential in the range tested (15 µg/ml) (figure 1) when compared to the negative control, except Gallic acid and Rhamnetin. In contrast, AsPC-1 cells treated for 24 hours with gemcitabine do not exhibit a significant apoptotic potential in the range tested (0.05-25 µg/ml) (figure 2) when compared to the negative control. Based on the above results and literature, we choose 5 µg/ml of gemcitabine for subsequent experiments to test the effects of gemcitabine in combination with polyphenols. In the range tested, the combination of gemcitabine with polyphenols exhibited more potent apoptotic effects than when they are administered alone (figure 3). The results demonstrated therefore that, some polyphenol, like Catechin, Quercetin, Bergamottin and Rhamnetin synergizes with gemcitabine to promote cellular apoptosis. The apoptotic potential of the investigated drugs is elucidated by an increase in the fluorescence of AnnexinV-FITC/PI stained cells.

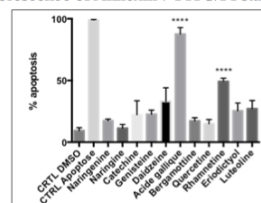


Figure 1: Apoptotic effect of polyphenols on Aspc1 cells. After incubating Aspc-1 cells 24h with polyphenols, cells death was assessed following the simultaneous staining of cells with AnnexinV-FITC and PI by capillary flow cytometry. Data are represented as Mean ± S.E.M (n=3). * Represents P < 0.5 and refers to the variation in apoptotic potential between non-treated and treated AsPC-1 cells with gemcitabine.

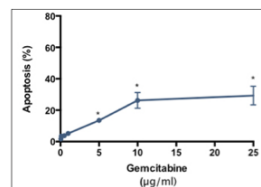


Figure 2: Apoptotic effect of gemcitabine on Aspc1 cells. After incubating Aspc1 cells 24h with gemcitabine, cells death was assessed following the simultaneous staining of cells with AnnexinV-FITC and PI by capillary flow cytometry. Figure 2 recapitulates in a dose response curves from the percentage of cells undergoing apoptosis after different treatments. Data are represented as Mean ± S.E.M (n=3). * Represents P < 0.5 and refers to the variation in apoptotic potential between non-treated and treated AsPC-1 cells with gemcitabine

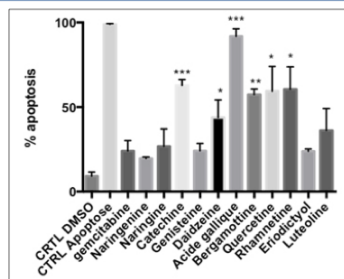


Figure 3: Apoptotic effect of polyphenols combined with gemcitabine on Aspc-1 cells. After incubating Aspc1 cells 24h with gemcitabine, cells death was assessed following the simultaneous staining of cells with AnnexinV-FITC and PI by capillary flow cytometry. Data are represented as Mean \pm S.E.M (n=3). * Represents $P < 0.5$ and refers to the variation in apoptotic potential between non-treated and treated AsPC-1 cells with gemcitabine.

Quercetin effect on MDR1 Activity

Based on above results, we choose 15 $\mu\text{g/ml}$ of Quercetin and 5 $\mu\text{g/ml}$ of gemcitabine to evaluate their impact on MDR1. The study of the effect of Quercetin, gemcitabine or their combination on the efflux activity of MDR1 showed that in the presence of Quercetin an inhibitory potential on the efflux activity of MDR1 when compared to the specific MDR1 inhibitor verapamil. For instant the inhibition is concluded through an increase in the intracellular fluorescence of rhodamine 123-loaded cells. Their inhibitory potential on the efflux activity of MDR1 as demonstrated by the increase in fluorescence of rhodamine 123-loaded cells (figure 4). It should be noted that even verapamil, which is considered as the standard MDR1 inhibitor.

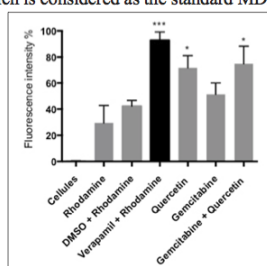


Figure 4: Effect of quercetin on the MDR1-mediated efflux of rhodamine 123. AsPC-1 cells were incubated for 24 h, in the presence of quercetin, gemcitabine or in combination. Bars represent the geometric mean values of % fluorescence intensity SD. The experiments were repeated three times. *** Represents $P < 0.001$.

Discussion

Polyphenols have an effect on human cancer cell lines, such as reduction of the number of tumors or of their growth. For example, many studies have been shown that quercetin possess anticancer property against lung carcinogenesis in mice. Specially, pancreatic cancer, due to its aggressive nature is one of the most challenging solid organs [17]. In a number of cancer types, the drug efflux pumps have been associated with chemoresistance (multiple drug

resistance/MDR) [18]. However, their presence with resistance in pancreatic cancer remains to be elucidated. Gemcitabine, which has been the frontline chemotherapeutic agent against pancreatic cancer, has offered some relief over the past two decades [19]. But frequently, gemcitabine failed in the overall survival benefit [20]. In addition, recent studies indicated that natural products could provide additional strategies for monotherapy or combination treatments in pancreatic cancer due to their efficacy and low toxicity [15]. Here, we examined the efficacy of combined treatments of gemcitabine and polyphenols in human pancreatic cancer cells. Many studies demonstrated the inhibitory action of flavonoids, but also furanocoumarins of drug rejection, including MDR1. The importance of this protein inhibition is to increase the sensibilisation of cancer cells to anti-cancer drugs and the enhancing of chemosensitization process [21]. To establish whether comparable toxicity occurs in pancreatic cancer, AsPC-1 was used and results compared with those for gemcitabine and combination with polyphenols, to evaluate any supra-additive effect. BJ cell line was also tested, as a non-transformed cell type which is similar to host components in tumours that are important for progression. BJ cells were unaffected when treated with polyphenols up to the highest concentration used 15 $\mu\text{g/ml}$. These cells are not transformed, yet similar phenotypes would be represented in *in vivo* cancers, and tumour vasculature has proved a popular therapeutic target. No normal pancreatic cells were available; such cells are not indexed in most catalogues. MDR1 inhibiting agents are pharmacologically active *in vitro* in concentration range from 1 to 15 $\mu\text{g/ml}$ [21]. A range of 15 $\mu\text{g/ml}$ of polyphenols were selected for AsPC-1 cells in this study, at minimally cytotoxic doses of the micronutrient, the combination with gemcitabine showed a strong supra-additive effects at lower doses of the anti-cancer drug. Many studies indicate that the expression of drug efflux pumps MDR1 is common in pancreatic tumours and so potentially could contribute, at least in part, to the chemoresistant properties of this cancer [18]. MDR1 blockade might have a very important role in the intracellular accumulation and the cellular pharmacokinetics of many anticancer drugs. Our results showed that Quercetin possesses a potent inhibitory potential on MDR1 mediated efflux of rhodamine 123 when compared to verapamil and then increasing in the intracellular accumulation of gemcitabine, in the pancreatic cancer cells used, leading to more apoptosis when gemcitabine were combined with Quercetin.

In conclusion, our present data indicate that the combined treatment of polyphenols and gemcitabine induces apoptosis in the established pancreatic cell line used indicating that the effects seen are potentialize and it is strongly recommended to study and find a natural and non-toxic MDR1 blockers to potentialize the efficacy of anticancer drugs.

References

- Pandey K, Syed R (2009) Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2: 270-278.
- Scalbert A, Manach C, Morand C, Remesy C (2005) Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 45:287-306.
- D'Archivio M, Filesì C, Benedetto RD, Gargiulo R, Giovannini C et al. (2007) Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Annali dell'Istituto Superiore Di Sanità* 43:348-61.
- Nakagawa T, Shimizu M, Shirakami Y (2009) Synergistic effects of acyclic retinoid and gemcitabine on growth inhibition in pancreatic cancer cells. *Cancer Letters* 18:250-256.

5. Ohnishi A, Matsuo H, Yamada S (2000) Effect of furanocoumarin derivatives in grapefruit juice on the uptake of vinblastine by Caco-2 cells and on the activity of cytochrome P450 3A4. *British Journal of Pharmacology*130:1369-1377.
6. Gollapudi S, Thadepalli F, Kim CH (1995) Difloxacin reverses multidrug resistance in HL-60/AR cells that overexpress the multidrug resistance-related protein (MRP) gene. *Oncology Research*7:213-225.
7. Louisa M, Soediro TM, Suyatna FD (2014) In vitro modulation of P-glycoprotein, MRP-1 and BCRP expression by mangiferin in doxorubicin-treated MCF-7 cells. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*15:1639-1642.
8. Jemal A, Siegel R, Xu J (2010) Cancer Statistics. *A Cancer Journal for Clinicians*61:133-134.
9. Louvet C, Labianca R, Hammel P (2005) Gemcitabine in combination with oxaliplatin compared with gemcitabine alone in locally advanced or metastatic pancreatic cancer: Results of a GERCOR and GISCAD phase III trial. *Journal of Clinical Oncology* 23:3509-3516.
10. Cunningham D, Chau I, Stocken DD (2009) Phase III randomized comparison of gemcitabine versus gemcitabine plus capecitabine in patients with advanced pancreatic cancer. *Journal of Clinical Oncology* 27:5513-5518.
11. Kornmann M, Beger HG, Link KH (2003) Chemosensitivity testing and test-directed chemotherapy in human pancreatic cancer. *Recent Results Cancer Research*161:180-189.
12. Cantwell BJ, Bozzino JM, Corris P (1988) The multidrug resistant phenotype in clinical practice; evaluation of cross resistance to ifosfamide and mesna after VP16-213, doxorubicin and vincristine (VPAV) for small cell lung cancer. *European Journal of Cancer and Clinical Oncology*24:123-129.
13. Linn SC, Giaccone G (1995) MDR1/P-glycoprotein expression in colorectal cancer. *European Journal of Cancer*7:1291-1294.
14. Bradley G, Ling V (1994) P-glycoprotein, multidrug resistance and tumor progression. *Cancer and Metastasis Reviews* 13:223-233.
15. Mohammed A, Janakiram NB, Pant S (2015) Molecular targeted intervention for pancreatic cancer. *Cancers (Basel)*7:1499-1542.
16. Zhu L, Li L, Li Y (2016) Chinese herbal medicine as an adjunctive therapy for breast cancer: A systematic review and meta-analysis. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 17.
17. Torre LA, Bray F, Siegel RL (2015) Global Cancer Statistics. *A Cancer Journal for Clinicians* 65:87-108.
18. O'Driscoll L, Walsh N, Larkin A (2007) MDR1/P-glycoprotein and MRP-1 drug efflux pumps in pancreatic carcinoma. *Anticancer Research*27:2115-2120.
19. Burris HA, Moore MJ, Andersen J (1977) Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer. *Journal of Clinical Oncology*15:2403-2413.
20. Heinemann V. Gemcitabine: progress in the treatment of pancreatic cancer. *Journal of Oncology* 2001; 60:8-18.
21. Abdallah HM, Al-Abd AM, El-Dine RS (2015) P-glycoprotein inhibitors of natural origin as potential tumor chemosensitizers. *Journal of Advanced Research* 61:45-62.

Copyright: ©2017 Sarah Hassan, et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Article 3

**Bergamottin potentializes the cytotoxic activity of gemcitabine
through inhibition of MDR1 on pancreatic cancer cell line**

AsPC-1



BERGAMOTTIN POTENTIALIZES THE CYTOTOXIC ACTIVITY OF GEMCITABINE THROUGH INHIBITION OF MDR1 ON PANCREATIC CANCER CELL LINE ASPC-1

Sarah Hassan^{1,2*}, Jean Peluso², Guy Fuhrmann³ and Genevieve Ubeaud-Sequier^{1,2}

¹EA 7293, Vascular and Tissular Stress in Transplantation, Federation of Translational Medicine of Strasbourg, Faculty of Medicine, University of Strasbourg, Strasbourg, France

²Plateforme eBiocyt-UPS1401, Faculty of pharmacy, University of Strasbourg, Illkirch, France

³Faculty of Pharmacy, University of Strasbourg, UMR7213 CNRS, Laboratory of Biophotonics and

ARTICLE INFO

Article History:

Received 15th August, 2017

Received in revised form 29th

September, 2017

Accepted 20th October, 2017

Published online 28th November, 2017

Key words:

Pancreatic cancer, Gemcitabine, Bergamottin and Combination treatment.

ABSTRACT

Pancreatic cancer is one of the most aggressive cancers, with only about 5% of patients surviving 5 years past the initial diagnosis. Gemcitabine monotherapy is the standard of treatment for patients with metastatic pancreatic cancer. Here, we examined the efficacy of combined treatments of bergamottin and gemcitabine in human pancreatic cancer AsPC-1 cells. For that purpose, the pro-apoptotic effects of gemcitabine were studied in presence or absence of bergamottin, in order to evaluate if this latter is able to potentialize gemcitabine cytotoxicity. Our study aims to investigate the implication of MDR1 in resistance to gemcitabine and if bergamottin could target these drug efflux pumps in AsPC-1 cells by flow cytometric. We observed that 5 µg/ml gemcitabine in combination with 15 µg/ml bergamottin was more effective than gemcitabine alone as shown by increasing in the percentage of dead cells up to 60%. In addition, the combination of gemcitabine and bergamottin increased the expression levels of cleaved caspase-3 and p53. Moreover our results demonstrated that bergamottin inhibits the efflux activity of MDR1. In conclusion, our study in vitro suggests therefore that chemotherapy with gemcitabine might be significantly increased upon combination with bergamottin and then may be promising agents for novel combination therapy.

Copyright©2017 Sarah Hassan et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

INTRODUCTION

Pancreatic cancer is the eighth major form of cancer-related death worldwide, causing 227 000 deaths annually, (Torre *et al.*, 2015). In 2016 it was estimated that 53,070 patients will be diagnosed with pancreatic cancer and 41,780 patients with pancreatic cancer will die in the United States, most of them dying within the first year of diagnosis, (Jemal *et al.*, 2010).

For most patients with pancreatic cancer, surgery is a pivotal curative therapeutic approach. However, the success rate of resection surgery remains very low because about 80% to 85% patients diagnosed with a pancreatic cancer were already in an advanced stage. So, only 10% to 20% of patients with pancreatic cancer are eligible for surgical resection after being primarily diagnosed, (Paulson *et al.*, 2013). Therefore, as standard treatment approaches for patients with pancreatic cancer, chemotherapy and radiotherapy are considered, especially for locally advanced or metastatic patients, (Perkhofer *et al.*, 2015).

Gemcitabine is the most commonly used chemotherapeutic agent over the past decade. Current treatment modalities for advanced pancreatic cancer include gemcitabine as a single agent or in combination with multiple chemotherapeutic agents, (Cunningham *et al.*, 2009) (Louvret *et al.*, 2005).

Numerous phase III trials testing gemcitabine combined with other cytotoxic drugs have failed to reveal any additional benefit compared with gemcitabine alone. Recently it has been reported that a combination of an antiepidermal growth factor receptor agent (Erlotinib) with gemcitabine may be more effective than gemcitabine alone, (Donadelli *et al.*, 2007).

The major cause of chemotherapy failure is the drug resistance to multiple chemotherapeutic agents, (Korrmann *et al.*, 2003). Overexpression of MDR1 has been shown to induce resistance to various anticancer drugs, (Cantwell *et al.*, 1988). MDR1 acts as an energy-dependent drug efflux pump, thereby decreasing the intracellular drug concentration and causing drug resistance. For example, colorectal cancer express high levels of MDR1, and this expression may contribute to the general resistance of colorectal cancer to anticancer drugs, (Linn & Giaccone, 1995). The very limited use of chemotherapy for pancreatic cancer patients is associated with the inherent chemoresistant nature of this aggressive disease.

*Corresponding author: Sarah Hassan

EA 7293, Vascular and Tissular Stress in Transplantation, Federation of Translational Medicine of Strasbourg, Faculty of Medicine, University of Strasbourg, Strasbourg, France

However, MDR1 the ATP-dependent membrane-bound drug efflux pumps, is mediators of clinically relevant chemoresistance, (Bradley & Ling, 1994). Studies of the prevalence of MDR1 in pancreatic tumours have been limited. To determine the potential involvement of these drug efflux pumps, we study MDR1 activity in pancreatic tumours in AsPC-1 cells.

To enhance the anticancer therapeutic efficacy and reduce the side effects, natural products were combined with standard chemotherapy and radiotherapy, (Mohammed *et al.*, 2015). In this context, the use of natural products, as a supplementary approach, to treat pancreatic cancer holds a great promise with minimal side effects, (Zhu, *et al.*, 2016). Many studies with polyphenols, such as flavonoids from fruits and vegetables, many studies have shown that they are efficient a chemopreventative agents since they are able to promote apoptosis in a variety of cancer cells, (Nakagawa *et al.*, 2009). To enhance intracellular anticancer drug accumulation by impairing the MDR1 efflux function, the process of chemosensitization involves usually a co-administration of a MDR1 inhibitor with an anticancer, (Gollapudi *et al.*, 1995). Numerous compounds have been shown to inhibit the drug efflux function of MDR1 and therefore, increase the intracellular concentration of cytotoxic anti cancer agents and consequently decrease in the cellular resistance, (Louisa *et al.*, 2014). Grape fruit juice contained dihydroxybergamottin and other furanocoumarins, such as bergamottin; bergaptol and bergapten that are known to inhibit the drug efflux transporters, such as MDR1 and increased the uptake of vinblastine by Caco-2 cells. Bergamottin is also found in the oil of bergamot orange and in the essential oils of other citrus fruits from which it was first isolated and from which its name is derived, (Ohnishi *et al.*, 2000).

The aim of our study is to establish whether bergamottin could have the ability to induce apoptosis and enhance the chemotherapeutic effect of gemcitabine in vitro in an established human pancreatic cancer cell line (AsPC-1) without causing damage on the normal cells.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals and Drugs

Rhodamine 123 (RH 123) was purchased from Invitrogen. Verapamil, bergamottin and gemcitabine were purchased from Sigma-Aldrich. Final concentration of DMSO applied to cells during incubation with tested drugs was 0.5%. In the tested setup these concentrations had no adverse effects on cell viability or cell morphology or on rhodamine-123 efflux.

Cell culture and maintenance

The human pancreatic adenocarcinoma cell line AsPC-1 cells (CRL-1682) and the fibroblastic cell line BJ (CRL-2522) all purchased from ATCC (LGC Standards, Molsheim, France) were cultivated in the physiological nutrient-rich DMEM-based media (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) supplemented with 10% (v/v) foetal bovine serum (Lonza, Verviers, Belgium), 2 mM glutamine, P/S (100 unit/ml and 100 lg/ml) (Sigma-Aldrich). Cells were grown in petri dishes to 70-80% confluency prior to treatment. All plates were incubated in a humidified incubator at 37°C and 5% CO₂. Then cells were incubated with gemcitabine and bergamottin for 24 hours.

Detection of apoptosis by annexin-FITC

Pancreatic cancer cells AsPC-1 and BJ cells death was assessed using AnnexinV-FITC Kit (Miltenyi Biotec) according to manufacturer's protocol. Briefly, Aspc1 and BJ cells were incubated with the gemcitabine, bergamottin and their combination for 24 hours. Cells were then washed with phosphate buffered saline (PBS) and stained with AnnexinV-FITC and PI following the manufacturer's protocol. The fluorescence intensity of AnnexinV-FITC stained cells at 530/540 nm and PI stained cells at 675/630 were analyzed by Guava EasyCyte Plus capillary flow cytometer (Merck Millipore, Life Science division, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) and computed using the Guava ExpressPro software (Merck/Millipore/Guava Tech). The apoptotic potential of the tested drugs was compared to the apoptotic potential of celastrol, which is known to be a positive control of apoptosis.

MDR-1 function assay

MDR1-mediated efflux of rhodamine 123 was monitored on a Guava EasyCyte Plus capillary flow cytometer equipped with a 488 nm excitation laser. The accumulated intracellular fluorescence intensity of rhodamine 123 at 530/540 nm was computed on the Guava ExpressPro software (Merck/Millipore/Guava Tech) in terms of x-geometric mean arbitrary units. Dead cells were excluded based on propidium iodide staining. The inhibitory potential of tested compounds on rhodamine-123 efflux was expressed relative to maximum inhibition obtained with 100 µM verapamil in the same experiment. The experiments were repeated three times.

Western Blot analysis

After incubating AsPC-1 cells for 24 hours with the gemcitabine in presence and absence of bergamottin cells were collected after trypsinisation transferred to 15 ml tubes and centrifuged at 500 g for 5 minutes. Cell pellets were washed three times with cold 10 mM Tris- HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, and solubilized in lysis buffer (RIPA) (150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% deoxycholic acid, 0.1% SDS, 0.5 M Tris pH 8.0). After spinning for 20 minutes at 10,000 g at 4°C, protein concentrations were determined in supernatants using Bradford assay. All samples, were denatured by heating for 5 minutes at 95° C, before being loaded onto a 10% gel for p53 detection and 15% gel for cleaved caspase 3. After electrophoresis, Western gels were blotted and the transferred nitrocellulose membrane was blocked with 5% milk powder in 50mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.1 % Tween 20 at room temperature for 1 hour. The membrane was then immunoblotted with a rabbit monoclonal anti-cleaved caspase 3 (Cell Signaling Technology) or anti-p53 antibody (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany) (diluted 1/1000 in TBS tween 0.1%) overnight at 4°C. Subsequently the membrane was washed three times with 50 mM Tris- buffered saline and 0.1% Tween 20. Following incubation with horseradish peroxidase conjugated anti-mouse polyclonal anti-beta tubulin secondary antibody (Abcam) (1:10000) for 1 hour at room temperature, the blots were developed using enhanced chemiluminescence (ECL) (GE Healthcare). The experiments were repeated three times.

Statistical Analysis

Data are expressed as mean +/- standard error of mean (S.E.M.) and analysed using GraphPad Prism5[®] (La Jolla, CA,

USA). Statistical analysis was performed with either the one-way ANOVA test followed by Student's t-test. A P value <0.05 was considered significant. Experiments were performed at least in three separate experiments.

RESULTS

Apoptotic potential of bergamottin and gemcitabine

Non-cancerous fibroblast cells (BJ) were treated with bergamottin or gemcitabine to evaluate their toxicity. Our results demonstrate BJ to be unaffected when treated with bergamottin in the range up to 3 µg/ml as shown in figure 1A and gemcitabine up to 2.5 µg/ml as shown in figure 1B. In addition, the combination of 0, 05 µg/ml gemcitabine with bergamottin did not enhance apoptosis in fibroblast cells (figure 1C).

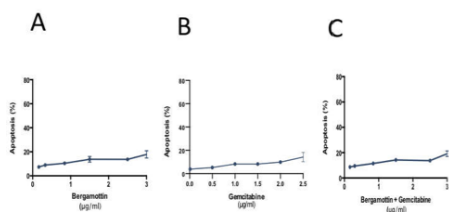


Figure 1 Effect of bergamottin (A), gemcitabine (B) and their combination (C) on BJ. Fibroblast cells were treated with bergamottin or gemcitabine. Cell death was assessed following the simultaneous staining of cells with AnnexinV-FITC and PI by capillary flow cytometry. Data are represented as Mean ± S.E.M (n=3).

AsPC-1 cells treated for 24 hours with gemcitabine do not exhibit a significant apoptotic potential in the range tested (0.05-25 µg/ml) (figure 2) when compared to the negative control. Moreover, administration of bergamottin in the range tested (1-30 µg/ml) alone did not enhance apoptosis in AsPC-1.

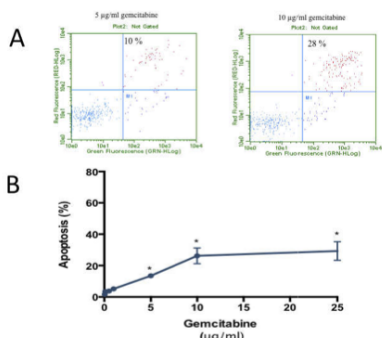


Figure 2 Apoptotic effect of gemcitabine on AsPC1 cells. After incubating AsPC1 cells 24h with gemcitabine, cell death was assessed following the simultaneous staining of cells with AnnexinV-FITC and PI by capillary flow cytometry. (A) Shows the results of representative scatter plots obtained after the different treatments, cells of the lower left quadrant are viable, cells on the upper and lower right quadrants are in late and early apoptosis, respectively. The number of cells in the late apoptosis, expressed as percent relative to the total cell number, is indicated. (B) Recapitulates in a dose response curves from the percentage of cells undergoing apoptosis after different treatments. Data are represented as Mean ± S.E.M (n=3). * represents P < 0.5 and refers to the variation in apoptotic potential between non-treated and treated AsPC-1 cells with gemcitabine.

Based on the above results and literature, we choose 5 µg/ml of gemcitabine for subsequent experiments to test the effects

of gemcitabine in combination with bergamottin. In the range tested, the combined drugs exhibited more potent apoptotic effects than when they are administered alone. The results demonstrated therefore that, gemcitabine synergizes with bergamottin to promote cellular apoptosis (figure 3). The apoptotic potential of the investigated drugs is elucidated by an increase in the fluorescence of AnnexinV-FITC/PI stained cells.

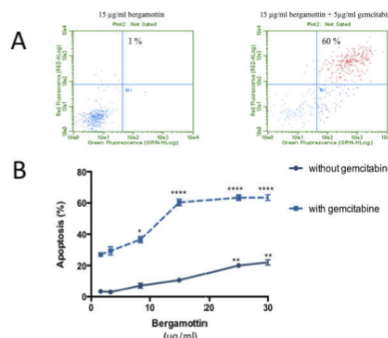


Figure 3 Effect of bergamottin and its combination with gemcitabine on AsPC-1 cells.

AsPC-1 cell cytotoxicity was induced by treatment with gemcitabine. Gemcitabine at 5 µg/mL in combination or not with 15 µg/mL of bergamottin reduces the cell viability up to 60%. (A) Shows the results of representative scatter plots obtained after the different treatments, cells of the lower left quadrant are viable, cells on the upper and lower right quadrants are in late and early apoptosis, respectively. The number of cells in the late apoptosis, expressed as percent relative total cell number, is indicated. (B) Recapitulates in a dose response curves from the percentage of cells undergoing apoptosis after different treatments. Data are represented as Mean ± S.E.M (n=3). **** represents P < 0.001 and refers to the variation in apoptotic potential between non-treated and treated AsPC-1 cells with the combination of bergamottin and gemcitabine.

Bergamottin effect on MDR1 Activity

Based on above results, we choose 15 µg/ml of bergamottin and 5 µg/ml of gemcitabine to evaluate their impact on MDR1. The study of the effect of bergamottin, gemcitabine or their combination on the efflux activity of MDR1 shown that in the

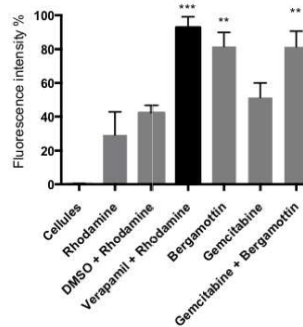


Figure 4 Effect of bergamottin on the MDR1-mediated efflux of rhodamine 123. AsPC-1 cells were incubated for 24 h, in the presence of bergamottin, gemcitabine or in combination. Bars represent the geometric mean values of % fluorescence intensity SD. The experiments were repeated three times. ** represents P < 0.001.

presence of bergamottin as an inhibitory potential on the efflux activity of MDR1 when compared to the specific MDR1 inhibitor verapamil. For instant the inhibition is concluded through an increase in the intracellular fluorescence of rhodamine 123-loaded cells. Their inhibitory potential on the efflux activity of MDR1 as demonstrated by the increase in fluorescence of rhodamine 123-loaded cells (figure 4 and 5). It should be noted that even verapamil, which is considered as the standard MDR1 inhibitor.

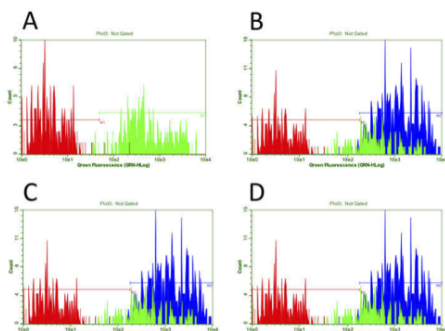


Figure 5 Intracellular retention of rhodamine 123 in AsPC-1 cells. In the presence of 0.5 μ M rhodamine 123 (A), 100 μ M Verapamil (B), 15 μ g/mL bergamottin (C), and 15 μ g/mL bergamottin in combination with 5 μ g/mL gemcitabine (D). Prior to cytometry analysis cells were treated as described under Materials and Method. Histograms represent the cell counter numbers versus geometric fluorescent intensity (AU). In each figure, three overlaid histograms represent, from left to right, the peak from auto-fluorescence of control cells without rhodamine 123, the peak from rhodamine loaded-cells and the peak from rhodamine loaded-cells in the presence of verapamil (B), bergamottin (C), and bergamottin in combination with gemcitabine (D).

Addition of Bergamottin to Gemcitabine Increases Apoptosis Rate in Cancer Pancreatic Cells Via A Caspase-Dependent Mechanism

Based on above results, we chose 15 μ g/ml of bergamottin and 5 μ g/ml of gemcitabine for subsequent experiments to test the effects of this drug combination on the expression of

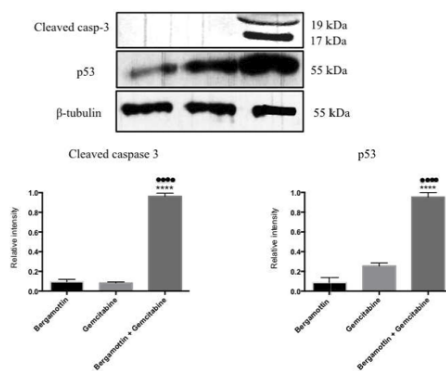


Figure 6 Effect of gemcitabine, bergamottin or their combination on the expression of p53 and cleaved caspase 3 in AsPC-1 cells. After incubating, AsPC-1 cells treated with gemcitabine in absence or presence of bergamottin. The quantification of p53 and cleaved caspase 3 expressions was analysed using Image J and represented as bar graphs. Data are represented as Mean \pm S.E.M (n=3). **** represents $P < 0.0001$ and refers to the variation in p53 or cleaved caspase 3 expression between cells treated with gemcitabine and the combination of bergamottin and gemcitabine. **** represents $P < 0.0001$ and refers to the variation in p53 or cleaved caspase 3 expression between the cells treated with bergamottin and the combination of bergamottin and gemcitabine

apoptosis regulator p53 and the apoptosis effector caspase 3 (in its cleaved form) in AsPC-1 cell line. Our results show that cleaved caspase 3 and p53 expression level are increased when the two drugs are combined if compared to the cells treated with bergamottin or gemcitabine alone. These results indicate that the combination of gemcitabine and bergamottin induced apoptosis and increased the expression of cleaved caspase 3 and p53 in pancreatic cancer cells (figure 6).

DISCUSSION

Due to its aggressive nature, frequent late detection with advanced disease, and chemoresistant properties, pancreatic cancer is one of the most challenging solid organs, (Torre *et al.*, 2015). In a number of cancer types, the drug efflux pumps have been associated with chemoresistance (multiple drug resistance/MDR), (O'Driscoll *et al.*, 2007). However, their presence with resistance in pancreatic cancer remains to be elucidated.

Until 1997, 5-FU was used as standard treatment for pancreatic cancer. After that gemcitabine has been the drug of choice for its safety quality, (Snady *et al.*, 2000) (Burriss *et al.*, 1997).

Gemcitabine, which has been the frontline chemotherapeutic agent against pancreatic cancer, has offered some relief over the past two decades, (Burriss *et al.*, 1997). But frequently, gemcitabine failed in the overall survival benefit, (Heinemann, 2001). Trials in mixed regimens including gemcitabine had variable success. National Comprehensive Cancer Network (NCCN) guidelines indicated the success improved in the gemcitabine based combination regimen, (Zhao, 2011). In addition, recent studies indicated that natural products could provide additional strategies for monotherapy or combination treatments in pancreatic cancer due to their efficacy and low toxicity, (Mohammed *et al.*, 2015). Here, we examined the efficacy of combined treatments of gemcitabine and bergamottin in human pancreatic cancer cells. Bergamottin a natural furanocoumarin found in oil of bergamot, grapefruit juice and other citrus fruits. People who eat a large amount of grapefruit have show a greater bioavailability of certain drugs, these observations have been explained by the inhibition of the activity of certain cytochrome P450 enzymes, especially CYP3A4 by bergamottin and its related metabolites present in grapefruit, (Dresser *et al.*, 2002). Many studies demonstrated the inhibitory action of flavonoids, but also furanocoumarins of drug rejection, including MDR1. The importance of this protein inhibition is to increase the sensibilisation of cancer cells to anti-cancer drugs and the enhancing of chemosensitization process, (Abdallah *et al.*, 2015). To establish whether comparable toxicity occurs in pancreatic cancer, AsPC-1 was used and results compared with those for gemcitabine and combination with bergamottin, to evaluate any supra-additive effect. BJ cell line was also tested, as a non transformed cell type which are similar to host components in tumours that are important for progression. BJ cells were unaffected when treated with bergamottin up to the highest concentration used 3 μ g/ml. These cells are not transformed, yet similar phenotypes would be represented in in vivo cancers, and tumour vasculature has proved a popular therapeutic target. No normal pancreatic cells were available; such cells are not indexed in most catalogues. MDR1 inhibiting agents are pharmacologically active in vitro in concentration range from 1 to 15 μ g/ml, (Abdallah *et al.*, 2015). A range of 1-30 μ g/ml of bergamottin was selected for

AsPC-1 cells in this study, at minimally cytotoxic doses of the micronutrient, the combination with gemcitabine showed a strong supra-additive effects at lower doses of the anti-cancer drug.

Many studies indicate that the expression of drug efflux pumps MDR1 is common in pancreatic tumours and so potentially could contribute, at least in part, to the chemoresistant properties of this cancer, (O'Driscoll *et al.*, 2007). MDR1 blockade might have a very important role in the intracellular accumulation and the cellular pharmacokinetics of many anticancer drugs. Our results showed that bergamottin possesses a potent inhibitory potential on MDR1 mediated efflux of rhodamine 123 when compared to verapamil and then increasing in the intracellular accumulation of gemcitabine, in the pancreatic cancer cells used, leading to more apoptosis when gemcitabine were combined with bergamottin.

An effective strategy to halt tumour growth is the induction of cell apoptosis by chemotherapeutic agents in cancer cells. The tumour suppressor p53 is a cell cycle checkpoint protein that contributes to the preservation of genetic stability by mediating apoptosis in response to DNA damage. To repair the DNA damage, p53 induce apoptosis to eliminate the damaged cells, (Yamaguchi *et al.*, 2008) (Roos & Kaina, 2013). In our study, treatment with gemcitabine and bergamottin in combination increased expression of p53 and induced apoptosis in AsPC-1 cells compared to pancreatic cancer cells treated with gemcitabine only. Also, the combination of gemcitabine and bergamottin up-regulated cleaved caspase 3 expression at the protein level AsPC-1 cells compared to AsPC-1 cells treated with gemcitabine only, which contributed to the induction of apoptosis.

In conclusion, our present data indicate that the combined treatment of bergamottin and gemcitabine induces apoptosis in the established pancreatic cell line used indicating that the effects seen are potentialize and it is strongly recommended to study and find a natural and non-toxic MDR1 blockers to potentialize the efficacy of anticancer drugs.

References

- Abdallah, H. M., Al-Abd, A. M., El-Dine, R. S., El-Halawany, A. M., 2015. P-glycoprotein inhibitors of natural origin as potential tumor chemo-sensitizers. *J. Adv. Res.* 61, 45-62.
- Bradley, G., Ling, V., 1994. P-glycoprotein, multidrug resistance and tumor progression. *Cancer Metastasis Rev.* 13, 223-233.
- Burris HA, Moore MJ, Andersen J, Green MR, Rothenberg ML, Modiano MR, Cripps MC, Portenoy RK, Storniolo AM, Tarassoff P, Nelson R, Dorr FA, Stephens CD, V. H. D., 1997. Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer. *J. Clin. Oncol.* 15, 2403-2413.
- Cantwell, B. M. J., Bozzino, J. M., Corris, P., Harris, A. L., 1988. The multidrug resistant phenotype in clinical practice; evaluation of cross resistance to ifosfamide and mesna after VP16-213, doxorubicin and vincristine (VPAV) for small cell lung cancer. *Eur J Cancer Clin Oncol.* 24, 123-129.
- Cunningham, D., Chau, I., Stocken, D. D., Valle, J. W., Smith, D., Steward, W., Neoptolemos, J. P., 2009. Phase III randomized comparison of gemcitabine versus gemcitabine plus capecitabine in patients with advanced pancreatic cancer. *J. Clin. Oncol.* 27, 5513-5518.
- Donadelli, M., Costanzo, C., Beghelli, S., Scupoli, M. T., Dandrea, M., Bonora, A., Palmieri, M., 2007. Synergistic inhibition of pancreatic adenocarcinoma cell growth by trichostatin A and gemcitabine. *Biochim. Biophys. Acta.* 1773, 1095-1106.
- Dresser GK1, Bailey DG, Leake BF, Schwarz UI, Dawson PA, Freeman DJ, K. R., 2002. Fruit juices inhibit organic anion transporting polypeptide mediated drug. *Clin Pharmacol Ther.* 71, 11-20.
- Gollapudi, S., Thadepalli, F., Kim, C. H., Gupta, S., 1995. Difloxacin reverses multidrug resistance in HL-60/AR cells that overexpress the multidrug resistance-related protein (MRP) gene. *Oncol Res.* 7, 213-225.
- Heinemann, V., 2001. Gemcitabine: progress in the treatment of pancreatic cancer. *J. Oncol.* 60, 8-18.
- Jemal, A., Siegel, R., Xu, J., E., W., 2010. Cancer Statistics, 2010. *CA Cancer J Clin.* 61, 133-134.
- Kornmann, M., Begeer, H. G., Link, K. H., 2003. Chemosensitivity testing and test-directed chemotherapy in human pancreatic cancer. *Recent Results Cancer Res.* 161, 180-9.
- Linn, S. C., & Giaccone, G., 1995. MDR1/P-glycoprotein expression in colorectal cancer. *Eur. J. Cancer.* 7, 1291-1294.
- Louisa, M., Soediro, T. M., Suyatna, F. D., 2014. In vitro modulation of P-glycoprotein, MRP-1 and BCRP expression by mangiferin in doxorubicin-treated MCF-7 cells. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 15, 1639-1642.
- Louvet, C., Labianca, R., Hammel, P., Lledo, G., Zampino, M. G., André, T., De Gramont, A., 2005. Gemcitabine in combination with oxaliplatin compared with gemcitabine alone in locally advanced or metastatic pancreatic cancer: Results of a GERCOR and GISCAD phase III trial. *J. Clin. Oncol.* 23, 3509-3516.
- Mohammed, A., Janakiram, N. B., Pant, S., Rao, C. V., 2015. Molecular targeted intervention for pancreatic cancer. *Cancers (Basel).* 7, 1499-1542.
- Nakagawa, T., Shimizu, M., Shirakami, Y., Tatebe, H., Yasuda, I., Tsurumi, H., Moriwaki, H., 2009. Synergistic effects of acyclic retinoid and gemcitabine on growth inhibition in pancreatic cancer cells. *Cancer Lett.* 18, 250-256.
- O'Driscoll, L., Walsh, N., Larkin, A., Ballot, J., Ooi, W. S., Gullo, G., Kennedy, S., 2007. MDR1/P-glycoprotein and MRP-1 drug efflux pumps in pancreatic carcinoma. *Anticancer Res.* 27, 2115-2120.
- Ohnishi, A., Matsuo, H., Yamada, S., Takanaga, H., Morimoto, S., Shoyama, Y., Sawada, Y., 2000. Effect of furanocoumarin derivatives in grapefruit juice on the uptake of vinblastine by Caco-2 cells and on the activity of cytochrome P450 3A4. *Br. J. Pharmacol.* 130, 1369-1377.
- Paulson, A. S., Tran Cao, H. S., Tempero, M. A., Lowy, A. M., 2013. Therapeutic advances in pancreatic cancer. *Gastroenterol.* 144, 1316-1326.
- Perkhofer, L., Ettrich, T. J., Seufferlein, T., 2015. Pancreatic Cancer: Progress in Systemic Therapy. *Gastrointest Tumors.* 1, 167-179.
- Roos, W. P., Kaina, B., 2013. DNA damage-induced cell death: From specific DNA lesions to the DNA damage

- response and apoptosis. *Cancer Lett.* 332, 237-248.
- Snady, H., Bruckner, H., Cooperman, A., Paradiso, J., Kiefer, L., 2000. Survival advantage of combined chemoradiotherapy compared with resection as the initial treatment of patients with regional pancreatic carcinoma: An outcomes trial. *CA Cancer J Clin.* 89, 314-327.
- Torre, L. A., Bray, F., Siegel, R. L., Ferlay, J., Lortet-tieulent, J., Jemal, A., 2015. Global Cancer Statistics. *CA Cancer J Clin.* 65, 87-108.
- Yamaguchi, M., Fujimori-Tonou, N., Yoshimura, Y., Kishi, T., Okamoto, H., Masai, I., 2008. Mutation of DNA primase causes extensive apoptosis of retinal neurons through the activation of DNA damage checkpoint and tumor suppressor p53. *Development.* 135, 1247-1257.
- Zhao, Y. P., 2011. Interpretation of the Chinese edition of NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology-Pancreatic Adenocarcinoma Guideline 2011. *Chin. J. Surg.* 49, 15-29.
- Zhu, L., Li, L., Li, Y., Wang, J., Wang, Q., 2016. Chinese herbal medicine as an adjunctive therapy for breast cancer: A systematic review and meta-analysis. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 17.

How to cite this article:

Sarah Hassan *et al* (2017) 'Bergamottin Potentializes the Cytotoxic Activity of Gemcitabine Through Inhibition of Mdr1 on Pancreatic Cancer Cell Line Aspc-1', *International Journal of Current Advanced Research*, 06(11), pp. 7275-7280.
DOI: <http://dx.doi.org/10.24327/ijcar.2017.7280.1115>

Polyphenols potentialize the cytotoxic activity of gemcitabine on pancreatic cancer cell line AsPC-1. *Sarah Hassan, Jean Peluso, Guy Fuhrmann and Genevieve Ubeaud-Sequier. Biochem pharmacol, 2017 06(2): 36*

Polyphenols potentiate the cytotoxic activity of gemcitabine on pancreatic cancer cell line AsPC-1

Sarah Hassan, Jean Pelusa, Guy Fuhrmann and Genevieve Ubeaud-Sequier
University of Strasbourg, France

Pancreatic cancer is one of the most aggressive cancers, with only about 5% of patients surviving 5 years past the initial diagnosis. Gemcitabine monotherapy is the standard of treatment for patients with metastatic pancreatic cancer since several decades. Despite advances with current chemotherapy combinations, overall survival outcomes are still require novel therapeutic approaches. Here, we examined the efficacy of combined treatments of polyphenols and gemcitabine in human pancreatic cancer cells. For that purpose, the proapoptotic effects of gemcitabine were studied on the human pancreatic cell line AsPC-1 in presence or absence of several polyphenols, in order to evaluate if they latter are able to potentiate gemcitabine cytotoxicity. Our study aims to investigate the implication of MDR1 (multidrug transporter) in resistance to gemcitabine and if the studied polyphenol could target this drug efflux pump in AsPC-1 cells by flow cytometric analysis. We observed that 5 μ M/ml gemcitabine in combination with 50 μ M of selected polyphenol (catechin, quercetin, bergamottin, rhamnetin) was more effective than gemcitabine alone, as shown by increased in the percentage of dead cells up to 60%. In addition, our results indicate that the combination of gemcitabine and each polyphenol increased the expression levels of cleaved caspase-3 and the regulator of apoptosis p53. Moreover our results demonstrated that some polyphenols inhibit the efflux activity of MDR1. Our study *in vitro* suggests therefore that chemotherapy with gemcitabine might be significantly increased upon combination with specific polyphenol. In conclusion, polyphenols may be promising agents for novel combination therapy since they potentiate the cytotoxic activity of gemcitabine to eradicate pancreatic cancer and therefore the cellular resistance.

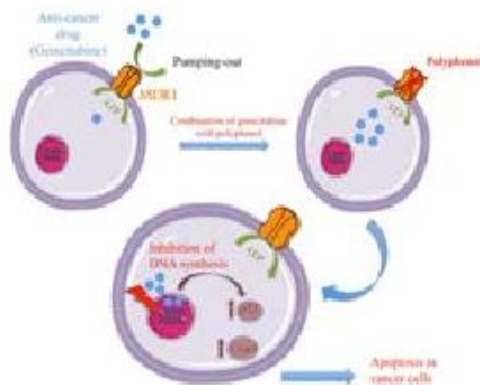


Figure1: Intracellular accumulation of anti-cancer drug by inhibition of MDR1 with polyphenols

Biography

Sarah Hassan is a PhD student at University of Strasbourg. She holds Master's degree in Pharmacology from Holy Spirit University of Kaslik and BS in Biochemistry from Lebanese University. Her research and thesis focused in anticancer drugs, enhancing their efficacy and reducing their toxicity potential by their combination with natural substances.

sarah.w.hassan@gmail.com

Notes:

Bergamottin potentializes the cytotoxic activity of gemcitabine on pancreatic cancer cell line. *Sarah Hassan, Jean Peluso, Dominique Leveque, Guy Fuhrmann and Genevieve Ubeaud-Sequier* American association of pharmaceutical scientists (AAPS) in San Diego, CA. (November 12-15, 2017).

W1086

Bergamottin potentializes the cytotoxic activity of gemcitabine on pancreatic cancer cell line AsPC-1

Sarah Hassan (1), Jean Peluso (1), Dominique Leveque (2), Guy Fuhrmann (1), Geneviève Ubeaud-Sequier (1,2)

1. Université de Strasbourg, 2. Hôpitaux Universitaires de Strasbourg



2017
AAPS ANNUAL
MEETING & EXPOSITION

DEVELOPING SCIENCE. IMPACTING HEALTH.

PURPOSE

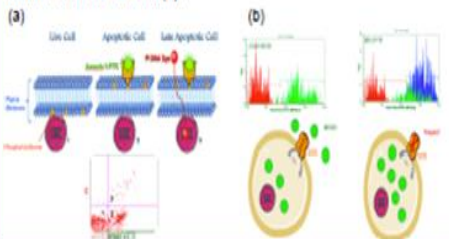
Pancreatic cancer is one of the most aggressive cancers, with only about 5% of patients surviving 5 years past the initial diagnosis. Gemcitabine monotherapy is a standard treatment for patients with metastatic pancreatic cancer since several decades. Despite advances with current chemotherapy combinations, overall survival outcomes are still require novel therapeutic approaches. Here, we examined the efficacy of combined treatments of polyphenols and gemcitabine in human pancreatic cancer cells and if bergamottin could target the drug efflux pump in AsPC-1 cells.

OBJECTIVE

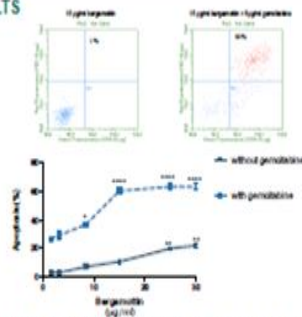
The objective of our study is to establish whether bergamottin could have the ability to induce apoptosis and enhance the chemotherapeutic effect of gemcitabine in vitro in an established human pancreatic cancer cell line (AsPC-1).

METHODS

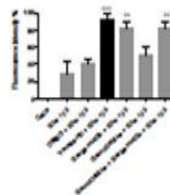
The pro-apoptotic effect of gemcitabine was studied on the human pancreatic cell line AsPC-1 in presence or absence of polyphenols by flow cytometry (a). In order to evaluate if these latter are able to potentialize gemcitabine cytotoxicity. Moreover the role of MDR1 in the resistance to gemcitabine in AsPC-1 cells was studied by flow cytometry using Rhodamine 123 (Rho 123) as MDR1 substrate and verapamil as a control of MDR1 inhibitor (b).



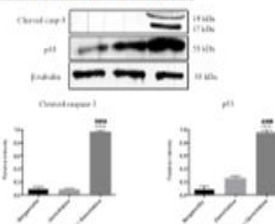
RESULTS



1. Gemcitabine (5 µg/ml) with bergamottin (15 µg/ml), was more effective than gemcitabine alone.

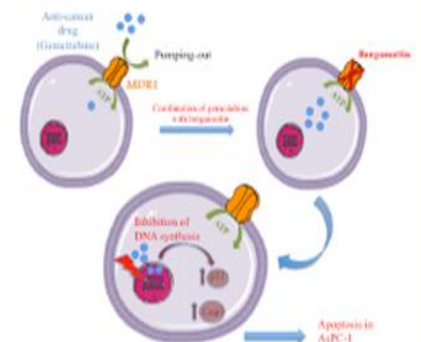


2. Bergamottin inhibits the efflux activity of MDR1



3. The combination of gemcitabine and bergamottin increased the expression levels of cleaved caspase-3 and the regulator of apoptosis p53

CONCLUSION



Bergamottin may be a promising agent for a novel combination therapy with gemcitabine to eradicate pancreatic cancer preventing the cellular resistance.

REFERENCES

Zhang, Guan-Nan; Liang, Yi; Zhou, Ling-Jun; Chen, Shu-Peng; Chen, Ge; et al. Combination of salinomycin and gemcitabine eliminates pancreatic cancer cells. *Cancer Letters*, Clare 313.2 Dec 27, 2011: 137-144.

Yanfei J.; Jingwu X. Promising molecular mechanisms responsible for gemcitabine resistance in cancer. *Genes & Diseases*. Volume 2, Issue 4, December 2015, Pages 299-306.



II.2 Optimisation de l'effet de la doxorubicine sur les cellules hépatiques

II.2.1. Objectif:

De même que les études d'optimisation des traitements anticancéreux ont été réalisées sur les cellules pancréatiques, nous avons utilisé la même méthodologie sur les cellules hépatiques en utilisant un traitement standard dans les carcinomes hépatocellulaires, la doxorubicine, un agent anticancéreux de la famille des antracyclines. Il agit comme un agent d'intercalation en s'insérant entre les bases d'ADN et bloque la synthèse de l'ADN et l'ARN. De plus, il bloque l'activité de la topoisomérase II. Ces 2 mécanismes conduisent à des ruptures dans la double hélice d'ADN nécessaire à la transcription.

L'objectif de notre travail est d'étudier in vitro l'effet apoptotique de la doxorubicine seule et en combinaison avec des polyphénols naturels afin d'optimiser l'activité apoptotique de la doxorubicine et d'évaluer la capacité de certains polyphénols naturels à réguler les enzymes et les transporteurs membranaires impliqués dans la résistance aux traitements ou les protéines régulatrices de l'apoptose susceptibles d'être altérées par la doxorubicine.

Pour cela, nous avons étudié la même série de polyphénols naturels que pour l'étude sur le pancréas

II.2.2. Matériels et Méthodes

II.2.2.1 incubations des cellules avec les molécules testées:

Les cellules « HepaPSU » cultivées en 2D en condition 1 (J1) sont incubées avec les polyphénols seuls (50 μ M) pendant 24 heures. Ensuite, les mêmes cellules sont cultivées avec la doxorubicine (10 μ M) seule ou en présence des polyphénols durant 24 h.

Les mêmes expériences sont réalisées ensuite avec des « HepaPSU » cultivées en 2D en condition 2 (J7).

L'effet apoptotique de la doxorubicine seule et en combinaison avec les polyphénols sont étudiés par cytométrie en flux en utilisant l'annexine V-FITC/PI (méthodes déjà décrite dans les articles 2 et 3).

II.2.2.2 Les analyses statistiques

Toutes les valeurs sont représentées par leur moyenne +/- Erreur Standard Moyenne (ESM). Ces valeurs sont comparées en utilisant One Way ANOVA suivie d'un test de Student pour les comparaisons multiples. Toutes les valeurs sont comparées avec le control négatif DMSO. Les résultats sont considérés comme significatifs lorsque les *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$.

II.2.3. Résultats et Discussion:

II.2.3.1 Evaluation de l'effet des polyphénols seuls sur la lignée « HepaPSU » cultivée en 2D :

En utilisant la nouvelle lignée hépatique « HepaPSU » dérivant des cellules HepG2, les polyphénols n'ont pas montré d'effets apoptotiques significatifs, à l'exception de la rhamnétine et de l'acide gallique, par comparaison au contrôle négatif DMSO.

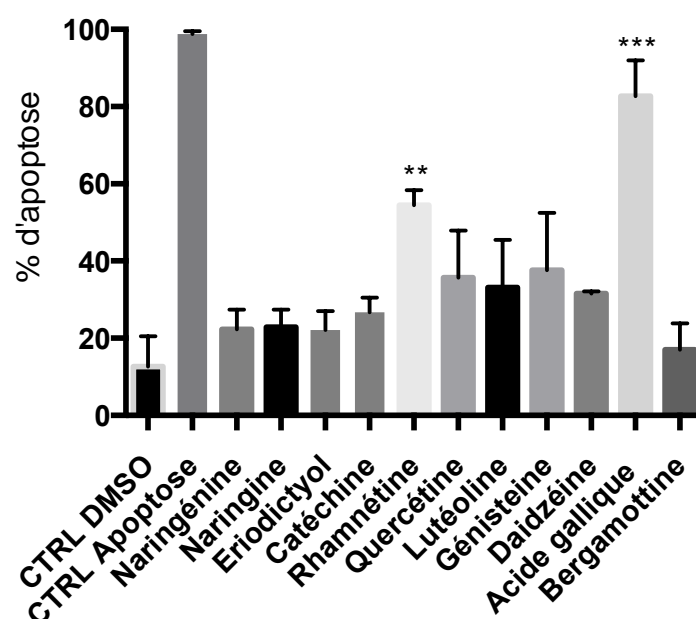


Figure 51: Effet apoptotique des polyphénols seuls sur les cellules HepaPSU J1, *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$.

II.2.3.2. Evaluation de l'effet de la doxorubicine en combinaison avec les polyphénols sur la lignée hépatique « HepaPSU » cultivées en 2D en condition (J1)

Dans nos conditions expérimentales, la doxorubicine à 10 μM n'a pas montré d'effet apoptotique significatif. Cependant, la combinaison de la doxorubicine avec certains polyphénols comme la naringénine, la catéchine, la quercétine, la génistéine et la daidzéine a montré une augmentation significative de l'activité de la doxorubicine par augmentation significative de pourcentage des cellules mortes jusqu'à 40% avec la naringénine et la catéchine, 50% avec la génistéine et la daidzéine et 60% avec la quercétine. Nos résultats suggèrent que la combinaison de

polyphénols naturels peut être une bonne stratégie pour optimiser l'activité de la doxorubicine. Ces substances naturelles étant connues pour inhiber les transporteurs d'efflux, et la doxorubicine étant un substrat de transporteurs ABC d'efflux, ce mécanisme pourrait expliquer l'augmentation significative du pourcentage d'apoptose de la Doxorubicine par augmentation de sa concentration intracellulaire.

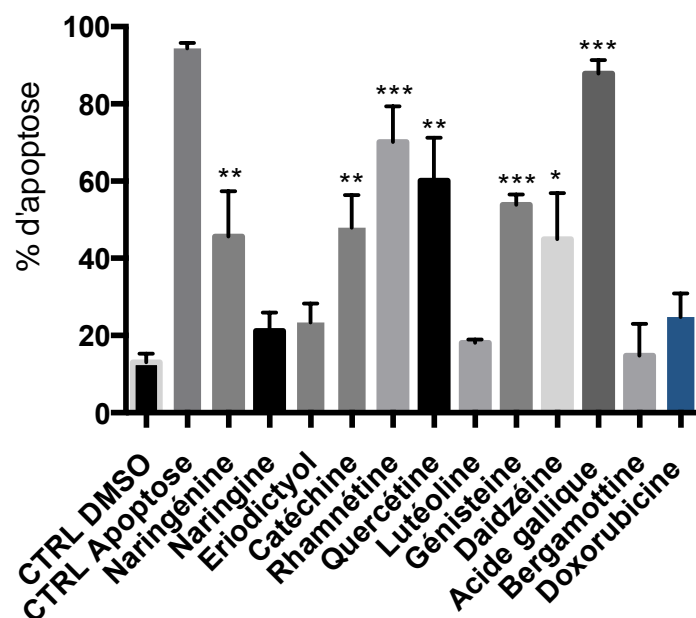


Figure 52: Effet apoptotique de la de la doxocubicine sur les cellules HepaPSU coincubées avec les polyphénols et la doxorubicine pendant 24 heures, *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$.

II.2.3.3. Evaluation de l'effet de la doxorubicine en combinaison avec les polyphénols sur la lignée hépatique « HepaPSU » cultivées en 2D en condition 2 (J7)

Dans nos conditions expérimentales, la Doxorubicin à 10 μM n'a pas montré d'effet apoptotique significatif. Cependant, la combinaison de la doxorubicine avec certains polyphénols comme la quercétine, génisteine et lutéoline a montré une augmentation significative de l'activité de la doxorubicine par augmentation significative de pourcentage des cellules mortes jusqu'à 38% avec la daidzéine, 35% avec la lutéoline et 57% avec la quercétine. Nos résultats montrent que la combinaison des polyphénols avec la doxorubicine sur les cellules « HepaPSU » cultivées en condition 2 semble moins active par comparaison aux cellules cultivées en condition 1 (Figure 51).

Nos résultats montrent une diminution significative de taux d'apoptose des cellules HepaPSU en condition 2 avec la naringénine, la cathéchine, la génistéine et la daidzéine (20 %, 25 %, 18% et 10% respectivement) par rapport aux cellules HepaPSU cultivées en condition 1.

Ces quatre molécules sont connues pour être des inhibiteurs de P-gp (Nabekura et al. 2018) (Ughachukwu et al. 2012). Or, nous avons observé dans nos cellules HepaPSU cultivées en condition 2 (J7) une expression des P-gp plus importante que dans celles cultivées en condition 1 (article 4, figure 4). Aussi, ces différences de résultats observées entre les cellules peuvent s'expliquer par leur différence d'expression des transporteurs d'efflux

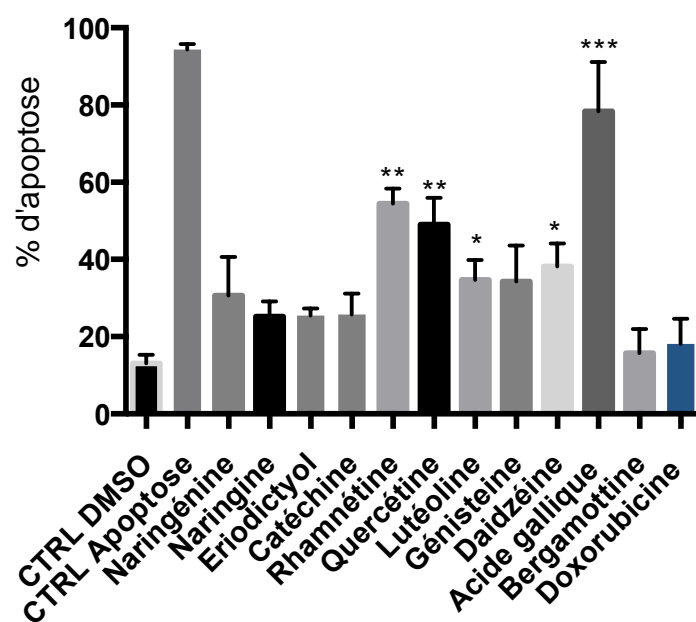


Figure 53: Effet apoptotique de la doxorubicine sur les cellules HepaPSU cultivées pendant 7 jours puis coincubées avec les polyphénols et la doxorubicine pendant 24 heures, *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$.

II.2.4. Conclusion

Dans nos conditions expérimentales le pourcentage d'apoptose des cellules pancréatiques et hépatiques en présence de la gemcitabine et de la doxorubicine seules est faible (taux d'apoptose au niveau des cellules cancéreuses est inférieure à 20%) suggérant une résistance de nos cellules à ces deux médicaments anticancéreux. Mais la combinaison de ces médicaments anticancéreux avec des polyphénols naturels montre une potentialisation significative de l'effet apoptotique de ces médicaments (augmentation du pourcentage d'apoptose des cellules cancéreuses traitées avec les médicaments anticancéreux combinées avec la bergamottine, la catéchine, la quercétine et l'acide gallique) (Hassan S. et al, J Pharmaceut Res, 2017). Nous avons montré que les mécanismes mis en jeu dans cette potentialisation impliquent la modulation des transporteurs P-gp (El najjar M. et al 2012). Ces médicaments anticancéreux sont des substrats de P-gp et certains polyphénols sont de puissants inhibiteurs de l'activité de P-gp (bergamottine et quercétine inhibent près de 80% de l'activité de P-gp). De plus, nous avons montré que la combinaison de la gemcitabine avec la bergamottine augmente l'expression de p53 (un régulateur du cycle cellulaire) et de la caspase-3 clivée au niveau des cellules cancéreuses (Hassan S. et al, Biochem Pharmacol, 2017).

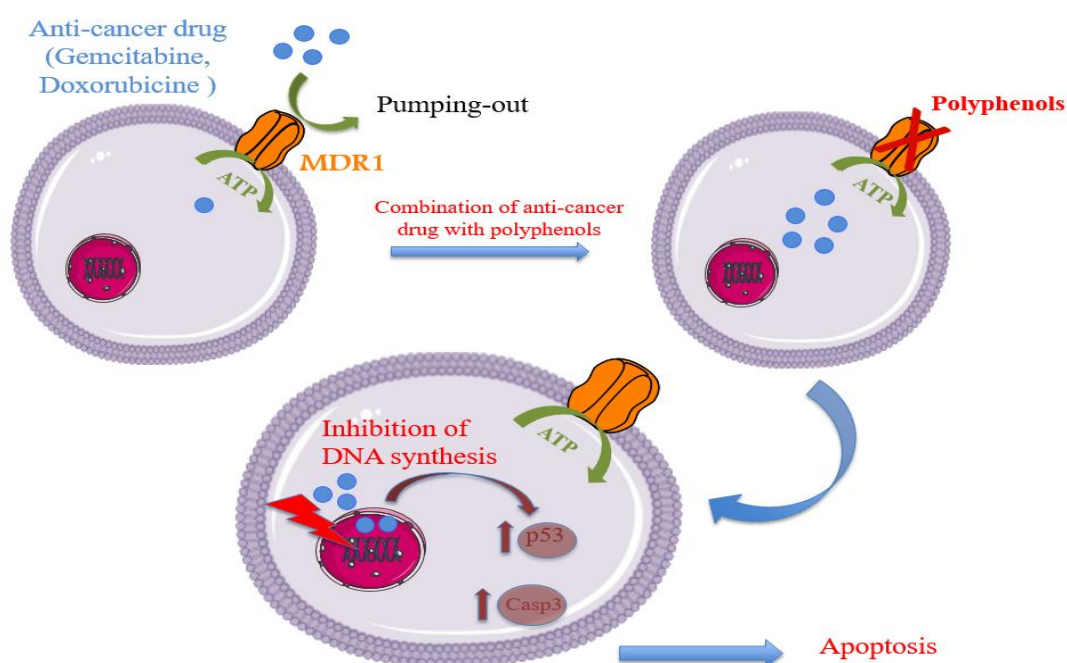


Figure 54: Mécanisme proposé de la potentialisation des activités des anticancéreux par les polyphénols.

II.3. Comparaison entre les différences de réponse pharmacologique observée dans des modèles de culture 2D versus 3D

II.3.1 Contexte et objectif:

Les cellules cancéreuses sont caractérisées par une perte de polarité et un détachement de la membrane basale naturelle, permettant aux cellules de former une structure tridimensionnelle (3D) par interaction les unes avec les autres et avec leur microenvironnement. Dans la littérature, les études *in vitro* menées en cancérologie utilisent des cellules cultivées en culture classique 2D. Or cette condition ne reflète pas les caractéristiques essentielles des tissus tumoraux parce que les communications et les interactions cellule-cellule qui se produisent au cours des métastases cancéreuses sont manquantes. Souvent, les résultats obtenus avec les cellules cultivées en 2D ne sont pas prédictifs des résultats *in vivo* (Goodman et al, 2008). En effet, les cellules cultivées en 2D sont exposées à un environnement uniforme suffisant en oxygène et en nutriments, alors que les cellules des tumeurs solides sont exposées à des variations de nutriments et de composés chimiques et/ou biologiques (Moreau et al, 2012). Ces modifications du microenvironnement, ainsi que le manque de profondeur spatiale et de connectivité cellulaire, limitent l'application des cultures 2D pour tester des composés pharmacologiquement actifs. Ainsi, afin de maintenir les caractéristiques du microenvironnement de la tumeur native et les intercommunications, différents modèles cellulaires de tumeurs 3D sont développés afin d'être plus prédictibles et proches de la situation *in vivo*. Les cellules tumorales cancéreuses sont généralement résistantes aux chimiothérapies, même après une première dose de médicaments cytotoxiques. Cette résistance a été attribuée à la surexpression de protéines multi résistantes type ABC (phénotype MDR) par les cellules tumorales (Sanchez et al, 2009; Wartenberg et coll., 1998). Dans un tissu tumoral, les cellules sont en hypoxie (Milane et al, 2011), et exposées à un faible apport nutritif (Zhu et al, 2012) expliquant l'augmentation de l'expression des MDR à l'origine de la résistance des cellules cancéreuses à la chimiothérapie. Afin d'être plus représentatif de la situation *in vivo*, nous allons mener nos expériences sur des cellules cultivées en 3D. Nous allons réaliser les mêmes expériences que précédemment et tester des molécules bioactives afin d'optimiser l'activité des traitements anticancéreux sur des cellules cultivées en 3D.

II.3.2. Matériels et Méthodes

Pour cultiver les cellules en 3D, nous avons utilisé les plaques en gouttes InSphero (méthode détaillée dans l'article 4). Les cellules sont cultivées en 3D pendant 7 jours. Après récupération des sphères, les cellules sont incubées avec les molécules testées durant 24 heures. Dans cette partie, nous étudions l'effet apoptotique de la doxorubicine seule et en combinaison avec les polyphénols par cytométrie en flux en utilisant l'annexine V-FITC/PI (méthodes déjà décrite dans les articles 2 et 3).

II.3.3. Résultats et Discussion

II.3.3.1 Evaluation de l'effet des polyphénols seuls sur la lignée AsPC-1 cultivée en 3D:

Les mêmes expériences que précédemment sont réalisées dans les cellules 3D (sphéroïdes).

Après incubation des cellules en 3D avec les polyphénols seuls, nos résultats montrent que les polyphénols ne présentent pas d'effets apoptotiques significatifs sur les cellules AsPC-1 cultivées en 3D, à l'exception de l'acide gallique, par comparaison au contrôle négatif DMSO (Figure 55).

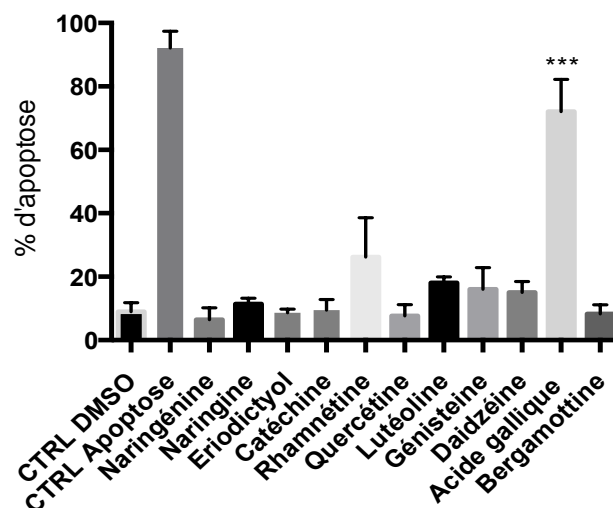


Figure 55: Effet apoptotique des polyphénols sur les cellules AsPC-1 cultivée en 3D, *** $P < 0.001$.

II.3.3.2. Evaluation de l'effet de la gemcitabine combiné aux polyphénols sur la lignée AsPC-1 cultivée en 3D :

Après incubation de la gemcitabine seule et en présence des polyphénols dans les cellules AsPC-1, la gemcitabine n'a pas montré un effet apoptotique significatif. De plus, la plupart des polyphénols n'interagit pas avec la gemcitabine dans les cellules cultivées en 3D, contrairement aux résultats observés avec les cellules cultivées en 2D incubées dans les mêmes conditions, à l'exception de la quercétine. En effet, en présence de la quercétine le pourcentage d'apoptose de la gemcitabine dans les cellules cultivées en 3D est proche de celui obtenu avec les cellules cultivées en 2D. Les cellules cultivées en 3D sont dans des conditions proches des cellules tumorales *in vivo*. Dans ces conditions expérimentales, les cellules résistent aux médicaments anticancéreux seuls et en combinaison avec les polyphénols, certainement dus à l'état d'hypoxie des cellules. Cette résistance observée des cellules à ces combinaisons, pourrait être due au microenvironnement des cellules cultivées en 3D sous un gradient d'oxygène et de nutriments faible et non homogène pour toutes les cellules dans la sphère (avec des différences entre le centre et la couche externe des cellules de la sphère).

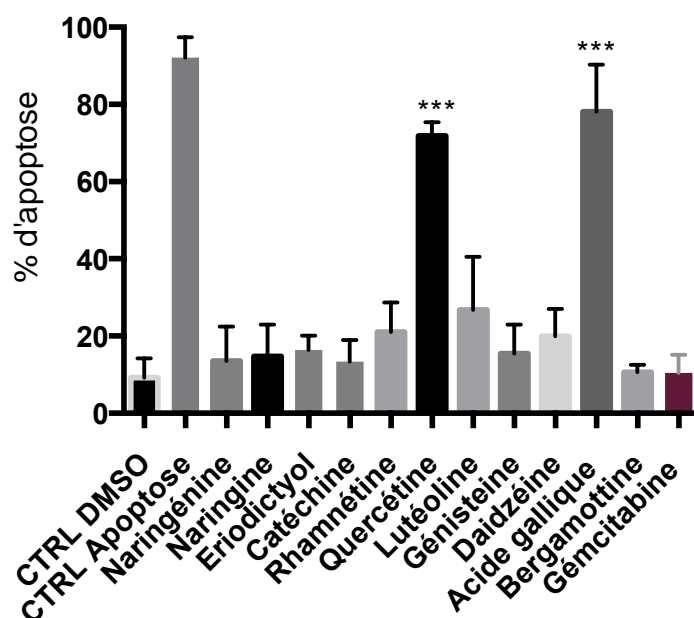


Figure 56: Effet apoptotique de la gemcitabine combinée à différents polyphénols sur les AsPC-1 cultivées en 3D, *** $P < 0.001$.

II.3.3.3. Evaluation de l'effet des polyphénols seuls sur la lignée HepaPSU cultivée en 3D:

Après incubation des polyphénols avec les cellules « HepaPSU » cultivées en 3D, les polyphénols n'ont pas montré d'effets apoptotiques significatifs sur ces cellules, à l'exception de l'acide gallique en comparaison avec le contrôle négatif DMSO.

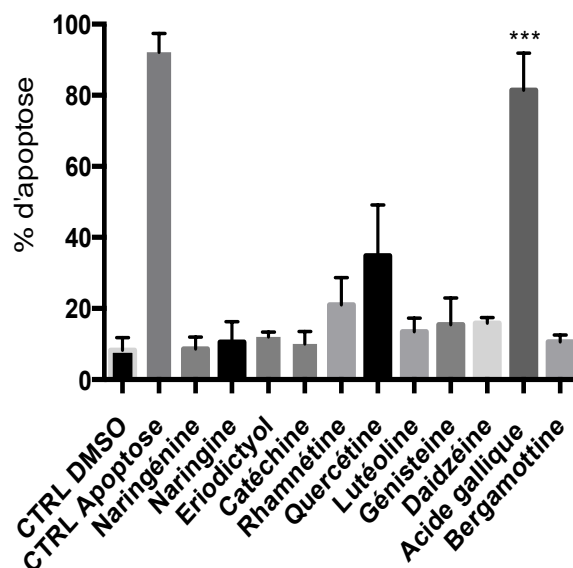


Figure 57: Effet apoptotique des polyphénols sur les cellules HepaPSU cultivées en 3D, *** $P < 0.001$.

II.3.3.4. Evaluation de l'effet de la doxorubicine combinée aux polyphénols sur la lignée HepaPSU cultivée en 3D:

Après incubation de la doxorubicine seule et en présence des polyphénols dans les cellules « HepaPSU » cultivées en 3D, la doxorubicine n'a pas montré un effet apoptotique significatif. De plus, la plupart des polyphénols n'interagit pas avec la doxorubicine dans ces cellules cultivées en 3D, contrairement aux résultats observés avec les cellules cultivées en 2D incubées dans les mêmes conditions, à l'exception de la quercétine. En présence de la quercétine, le pourcentage d'apoptose des cellules cultivées en 3D en présence de doxorubicine, est proche de celui obtenu avec les cellules cultivées en 2D. Les cellules cultivées en 3D sont dans des conditions proches des cellules tumorales *in vivo*. Dans ces conditions expérimentales, la résistance observée des cellules aux combinaisons peut être due à l'état d'hypoxie des cellules cultivées en 3D et à leur microenvironnement sous un gradient d'oxygène et nutriments faible et non homogène pour toutes les cellules dans la sphère.

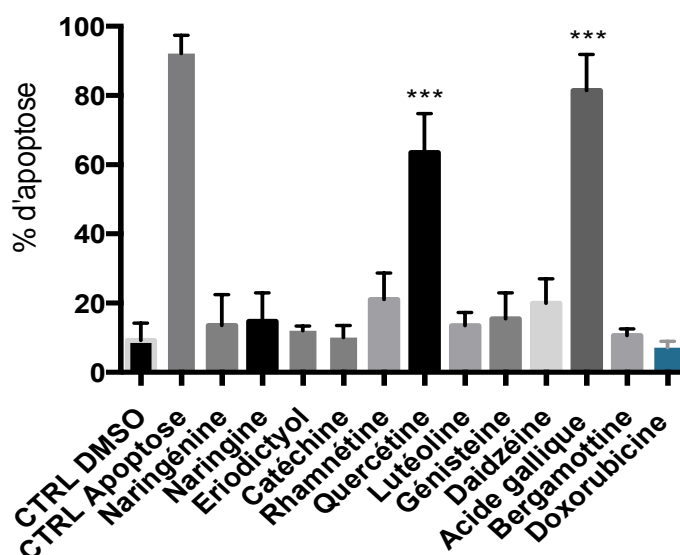


Figure 58: Effet apoptotique de la doxorubicine combinée avec les polyphénols sur les cellules HepaPSU cultivées en 3D, *** $P < 0.001$.

II.3.3.5. Comparaison des effets des combinaisons des médicaments anticancéreux avec les polyphénols dans les cellules pancréatiques et hépatiques cultivées en 2D versus 3D:

Dans les cellules 3D (sphéroïdes), modèle plus représentatif de la situation *in vivo*, les cellules pancréatiques et hépatiques montrent dans nos conditions expérimentales une différence de réponses apoptotiques aux anticancéreux seuls et en combinaison avec les polyphénols. Cette résistance des cellules en 3D est certainement due à l'état d'hypoxie des cellules (figures 59 et 60). Pour les cellules AsPC-1, nos résultats montrent une diminution significative des taux d'apoptose des cellules cultivées en 3D pour la catéchine, la daidzéine et la bergamottine (diminution de 50%, 20% et 50% respectivement). De mêmes pour les « HepaPSU », nos résultats montrent une diminution significative des taux d'apoptose des cellules cultivées en 3D pour la naringénine, la catéchine, la génisteine et la daidzéine (diminution de 30 %, 35%, 40%, et 20% respectivement). Cependant, les cellules pancréatiques et hépatiques montrent dans nos conditions expérimentales et à la concentration étudiée des réponses apoptotiques similaires à l'acide gallique seul et en combinaison avec les anticancéreux. De plus, la quercétine montre également dans nos conditions expérimentales des réponses similaires d'augmentation de l'activité apoptotique des anticancéreux similaires sur les cellules pancréatiques et hépatiques cultivées en 2D et en 3D.

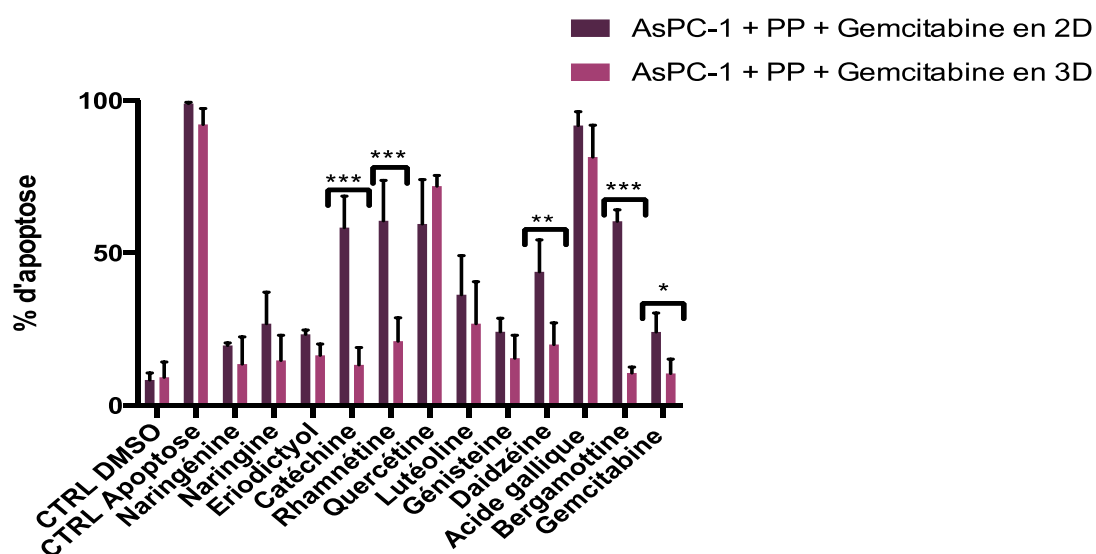


Figure 59: Comparaison de réponse apoptotique d'association de la gemcitabine avec les polyphénols sur les cellules AsPC-1 cultivées en 2D et 3D, *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$.

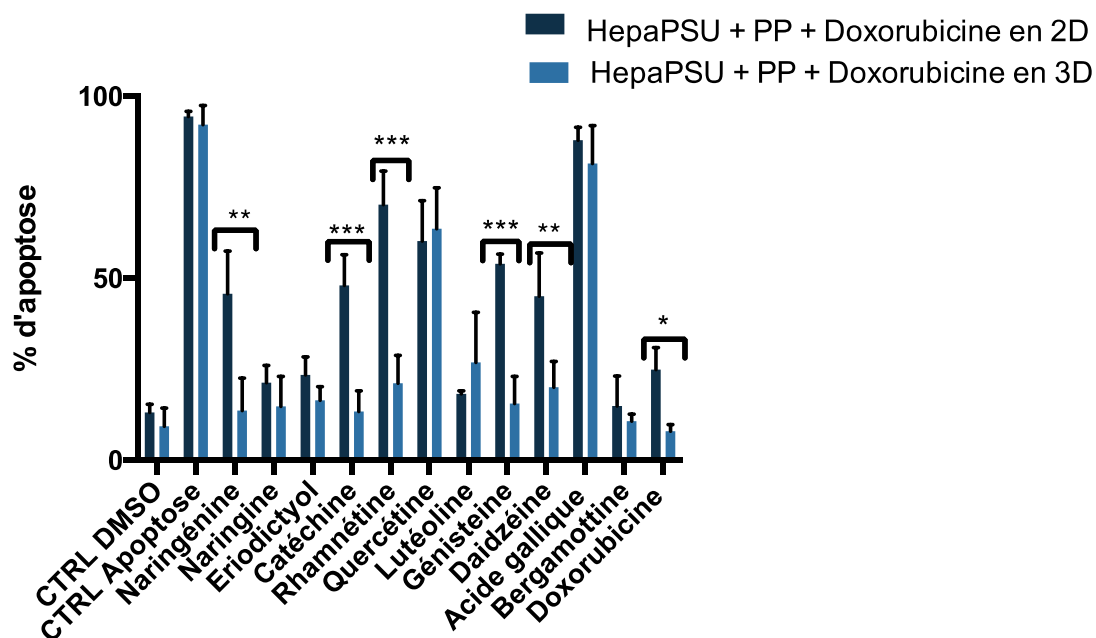


Figure 60: Comparaison de réponse apoptotique d'association de la doxorubicine avec les polyphénols sur les cellules HepaPSU cultivées en 2D et 3D, *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$.

II.3.4. Conclusion

Dans nos conditions expérimentales, le pourcentage d'apoptose des cellules pancréatiques et hépatiques cultivées en 3D en présence de la gemcitabine et de la doxorubicine est faible (taux d'apoptose au niveau des cellules cancéreuses est inférieure à 10%) suggérant une résistance de nos cellules à ces deux médicaments anticancéreux. De plus, la plupart des combinaisons des anticancéreux avec les polyphénols n'ont pas montré les mêmes réponses que celles obtenues sur les cellules cultivées en 2D. Ces différences peuvent être attribuées au microenvironnement hypoxique des cellules cultivées en 3D (Milane et al, 2011), et à la faible exposition d'apport nutritif expliquant l'augmentation de l'expression des MDR à l'origine de la résistance des cellules cancéreuses à la chimiothérapie. Cependant, dans nos conditions expérimentales, la quercétine possède une capacité d'augmenter l'activité des anticancéreux même en culture 3D (augmentation du pourcentage des cellules mortes en apoptose jusqu'à 60%). Ce résultat pourrait être expliqué en partie par son effet inhibiteur des MDR1 des cellules cancéreuses. Cependant, les autres polyphénols sont des inhibiteurs des MDR1 et n'ont pas cette capacité. En particulier, la bergamottine qui en 2D est capable d'augmenter l'effet apoptotique de la gemcitabine mais qui, dans nos expérimentales en 3D, n'ont plus cette capacité, certainement à cause de la surexpression des MDR1 dans les sphéroïdes. Nos résultats nous permettent de faire l'hypothèse que la quercétine est capable d'augmenter l'activité apoptotique des anticancéreux en culture 3D grâce à son pouvoir inhibiteur de l'effecteur initial de l'hypoxie HIF-1 alpha. Afin d'étudier le mécanisme d'apoptose de la quercétine dans ces conditions, nous allons étudier l'effet de la quercétine sur l'expression de HIF-1 alpha.

Article 4

Quercetin potentializes the cytotoxic activity of gemcitabine and doxorubicin through the inhibition HIF-1 α and MDR1 in 3D culture of AsPC-1 and HepG2 cells

Quercetin potentializes the cytotoxic activity of gemcitabine and doxorubicin through the inhibition HIF-1 α and MDR1 in 3D culture of AsPC-1 and HepG2 cells.

(soumis dans Cancer Chemotherapy and Pharmacology)

Sarah Hassan ^{a, b}, Jean Peluso ^b, Sandra Chalhoub ^c, Ysia Idou Gillet ^a,
Nadia Jessel ^a, Natacha Rochel ^c, Guy Fuhrmann ^a and Genevieve
Ubeaud-Sequier ^{a, b}

- a) INSERM UMR 1260: Régénérative Nanomédecine, University of Strasbourg, Strasbourg, France
- b) Plateforme eBiocyt-UPS1401, Faculty of pharmacy, University of Strasbourg, Illkirch, France
- c) Department of Integrative Structural Biology, Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC), (INSERM) U964, (CNRS) UMR 7104, Université de Strasbourg, Illkirch, France

Abstract

Background and Purpose: The resistance to anti-cancer drugs is a major problem in clinical trials. The expression of drug efflux pumps, the pharmacokinetic properties of the drug and hypoxia most be the major causes of chemotherapy failure. Hypoxia-inducible factor (HIF-1) has been associated with resistance to chemotherapy and reduced survival rate. That is why one of the challenges to fight against cancer is to find new molecules with therapeutic potential. Here, we examined the efficacy of combined treatments of quercetin and known anti-cancer drugs.

Experimental approach: The pro-apoptotic effects of anti-cancer drugs were studied on the human pancreatic cell line AsPC-1 and hepatic cell line HepG2, cultured in 3D culture, in presence or absence of quercetin, to evaluate if this latter is able to potentialize the cytotoxicity of gemcitabine or doxorubicin. Our study aims to investigate the implication of multidrug transporter and HIF-1 α expression in cell resistance and if quercetin could target drug efflux pump and HIF-1 α expression.

Key Results: The anti-cancer drugs in combination with quercetin, were more effective than when administered alone, as shown by increased in the percentage of dead cells up to 60% in 2D and 3D cultures. In addition, our results indicated that the combination of anti-cancer drugs and quercetin down regulated the expression of HIF-1 α and increased the expression levels of the regulator of apoptosis p53. Moreover our results demonstrated that quercetin inhibits the efflux activity of MDR1.

Conclusions: our in vitro study suggests that chemotherapy might be significantly increased upon combination with quercetin.

Keywords: Cancer, HIF-1 α , MDR1, p53, Quercetin, Gemcitabine and Doxorubicin

INTRODUCTION

A variety of phytochemicals with promising anticancer potential has been tested against human cancer ¹. Especially, quercetin is a one of the polyphenol family which has been intensively studied for anticancer properties². Quercetin (3,5,7,3',4'-Pentahydroxyflavone) is most common flavonoid in nature which is characterized by the presence of five hydroxyl groups on C6-C3-C6 backbone structure, especially a 3-OH group on the pyrone ring ³. The beneficial effect of quercetin have been reported in various diseases since it displays anti-cancer, anti-inflammation and anti-oxidant effects ⁴. For instance, quercetin has been shown to inhibit the expression of nuclear factor-kappa B dependent inflammatory genes. Moreover, it inhibits the proliferation of cancer cells through the activation of various apoptotic signals. Previous studies suggest another mechanism for suppressing cancer metastasis independently of its properties to induce cell death ⁵.

Hypoxia is a common condition in solid malignancies where cells proliferate under a low pressure of oxygen and nutrients ⁶. The hypoxia inducible factor (HIF-1) is the most important protein that regulates the growth and metastasis of cancer cells ⁷. HIF-1 α acts as transcription factor of many components associated with the cell survival, oxygen transport, metastasis, angiogenesis and glucose transport ⁸. Various natural products that are able to down-regulate HIF-1 α have been identified such as luteolin ⁹. Furthermore, the anti-oxidant effect of several phytochemicals could be associated with the down-regulation of HIF-1 α and is associated with increased reactive oxygen species (ROS) which are present at high level in cancer cells ¹⁰. This accumulation of ROS results from mitochondrial dysfunction and increased metabolic activity ¹¹.

One of the first report on molecular mechanisms explaining the contribution of hypoxia to drug resistance was the finding that the hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) is able to activate the multidrug resistance gene 1 (MDR1) ¹². It is therefore highly valuable to find novel ways to block the expressions of HIF-1 α and MDR1 in tumor cells under hypoxic stress.

One of the major cause of chemotherapy failure is resistance developed by the cancer cell to the anticancer drug ¹³. Overexpression of MDR1 has been shown be involved in this. Indeed, MDR1 acts as an energy-dependent

drug efflux pump, there by decreasing the intracellular drug concentration and causing drug resistance ¹⁴. For example, colorectal cancer express high levels of MDR1, and this expression may contribute to the general resistance of colorectal cancer to anticancer drugs. The very limited use of chemotherapy for cancer patients is therefore associated with the inherent chemoresistant nature of this aggressive disease ¹⁵. To enhance the anticancer therapeutic efficacy and reduce the side effects, natural products can be combined with standard chemotherapy and radiotherapy ¹⁶. Many studies with polyphenols, such as flavonoids from fruits and vegetables, have shown that they are efficient chemopreventative agents since they are able to promote apoptosis in a variety of cancer cells ¹⁷. To enhance intracellular anticancer drug accumulation by impairing the MDR1 efflux function, the process of chemosensitization involves usually a co-administration of a MDR1 inhibitor with an anticancer drug.

Tumor heterogeneity, drug inactivation, increased drug efflux, epithelial-to-mesenchymal transition and the involvement of the tumor microenvironment contribute to chemoresistance. Most important is the diversity within the tumor microenvironment in terms of the amount of oxygen available and the acidity of the environment ¹⁸. Recent studies has been demonstrated that the three-dimensional (3D) model can recapitulate the structure, organization and functionality of *in vivo* tissue. Cells in 3D environment have very different behavior in comparison to cells on two-dimensional (2D) since the cellular responses in 3D, might not be observed in 2D environment ¹⁹. Starting from simple 2D monocultures, the complexity was historically increased stepwise to include stromal cells in 2D co-cultures, and in a meet step the cultures in 3D have reached a growing interest ²⁰. That why, it is strongly recommended to upgrade cell culture from 2D to 3D models ²¹. Between 2D and 3D cultures cancer cells present differences between gene expression levels and sensitivity of chemotherapeutic drugs, those differences are influenced by the organization of cell receptors, the interactions with surrounding cells and the physical constraint to cells that affect genes expression and cellular behaviour from the outside to the inside of cells ²². Here we showed that quercetin could sensitize pancreatic and liver cancer cells cultured in 3D culture to respectively gemcitabine and doxorubicin which are the current anticancer drugs known to target them. Additionally, we demonstrated that

the combination of the drugs induce cell death by inhibiting the expression of HIF-1 α and the activity of MDR.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals and Drugs

Rhodamine 123 (RH 123) was purchased from Invitrogen. Verapamil, quercetin, doxorubicin and gemcitabine were purchased from Sigma-Aldrich. Final concentration of DMSO applied to cells during incubation with tested drugs was 0.5%. In the tested setup, these concentrations had no adverse effects on cell viability, and cell morphology or on rhodamine-123 efflux.

Cell culture and maintenance

The human pancreatic adenocarcinoma cell line AsPC-1 cells (CRL-1682) and the human hepatocellular carcinoma cell line HepG2 (CRL-8065) was obtained from the American Type Culture Collection (LGC Standards, Molsheim, France), cells were cultivated in the physiological nutrient-rich DMEM-based media (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) supplemented with 10% (v/v) foetal bovine serum (Lonza, Verviers, Belgium), 2 mM glutamine, penicillin (100 unit/ml and 100 I g/ml) (Sigma-Aldrich). Cells were grown in petri dishes to 70-80% confluency prior to treatment. All plates were incubated in a humidified incubator at 37°C and 5% CO₂.

3D organotypic spheroid culture

The culture of multicellular spheroids was accomplished on the Gravity^{Plus} system (InSphero AG, Zürich, Switzerland). The micro tissues were transferred into Gravity^{Trap} plates that are 96-well plates (InSphero AG, Zürich, Switzerland) for toxicity studies.

Detection of apoptosis by annexin-FITC

Cells death was assessed using AnnexinV-FITC Kit (Miltenyi Biotec) according to manufacturer's protocol. Briefly, Aspc1 and HepG2 cells were incubated with the gemcitabine, doxorubicin alone or in combination with quercetin for 24 hours. Cells were then washed with phosphate

buffered saline (PBS) and stained with AnnexinV-FITC and PI. The fluorescence intensity of AnnexinV-FITC stained cells at 530/540 nm and PI stained cells at 675/630 were analyzed by Guava EasyCyte Plus capillary flow cytometer (Merck Millipore, Life Science division, Merck KgaA, Darmstadt, Germany) and computed using the Guava ExpressPro software (Merck/Millipore/Guava Tech). The apoptotic potential of the tested drugs was compared to the apoptotic potential of celastrol, which is known to be a positive control of apoptosis.

MDR-1 function assay

MDR1-mediated efflux of rhodamine 123 was monitored on a Guava EasyCyte Plus capillary flow cytometer equipped with a 488 nm excitation laser. The accumulated intracellular fluorescence intensity of rhodamine 123 at 530/540 nm was computed on the Guava ExpressPro software in terms of x-geometric mean arbitrary units. Dead cells were excluded based on propidium iodide staining. The inhibitory potential of tested compounds on rhodamine-123 efflux was expressed relative to maximum inhibition obtained with 100 μ M verapamil in the same experiment. The experiments were repeated three times.

Western Blot analysis

AsPC-1 and HepG2 cells were incubated for 24 hours with the gemcitabine and doxorubicin respectively in presence or absence of quercetin, cells were collected after trypsinisation transferred to 15 ml tubes and centrifuged at 500 g for 5 minutes. Cell pellets were washed three times with cold 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, and solubilized in lysis buffer (RIPA) (150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% deoxycholic acid, 0.1% SDS, 0.5 M Tris pH 8.0). After spinning for 20 minutes at 10,000 g at 4°C, protein concentrations were determined in supernatants using Bradford assay. All samples, were denatured by heating for 5 minutes at 95°C, before being loaded onto a 10% gel for p53, cleaved caspase 3 and HIF-1 α detections. After electrophoresis, Western gels were blotted and the transferred nitrocellulose membrane was blocked with 5% milk powder in 50mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.1 % Tween 20 at room temperature for 1 hour. The membrane was then immunoblotted with a rabbit monoclonal anti-HIF-1 α (Cell Signaling Technology) or anti-p53 or anti-cleaved caspase 3 (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany) (diluted

1/1000 in TBS tween 0.1%) overnight at 4°C. Subsequently membranes were washed three times with 50 mM Tris- buffered saline and 0.1% Tween 20. Following incubation with horseradish peroxidase conjugated anti-mouse polyclonal anti-GAPDH secondary antibody (Abcam) (1:10000) for 1 hour at room temperature, the blots were developed using enhanced chemiluminescence (ECL) (GE Healthcare). The experiments were repeated three times.

Statistical Analysis

Data were expressed as means +/- standard error of mean (S.E.M.) and analysed using GraphPad Prism5[®] (La Jolla, CA, USA). Statistical analysis was performed with the one-way ANOVA test followed by Student's t-test. A P value <0.05 was considered significant. Experiments were repeated at least three times.

RESULTS

Apoptotic potential of quercetin, doxorubicin and gemcitabine

AsPC-1 cells cultured in 2D and treated for 24 hours with gemcitabine do not exhibit a significant apoptotic potential in the range tested (1-25 µg/ml) (figure 1A) when compared to the negative control. However, our results show increasing resistance to gemcitabine when the cells were cultured in 3D culture. Moreover, administration of quercetin in the range tested (0-100 µM) does not induce cell death in AsPC-1 (figure 2A) either in 2D or 3D culture. Based on the above results and literature, we choose 5 µg/ml of gemcitabine for subsequent experiments to test the effects of gemcitabine in combination with quercetin. In the range tested, the combined drugs exhibited significantly more potent apoptotic effects than when they are administered alone or both 2D and 3D culture. The results demonstrated therefore that, gemcitabine synergizes with quercetin to promote cellular apoptosis (figure 3). In addition, HepG2 cells treated in 2D culture for 24 hours with doxorubicin do not exhibit a significant apoptotic potential in the range tested (5-50 µM) (figure 1A) when compared to the negative control. However, our results show increasing resistance to doxorubicin when cells were cultured in 3D culture. Moreover, administration of quercetin alone in the range tested (0-100 µM)

has not effect on the apoptos rate in either 2D or 3D culture (figure 2B). Based on the above results and literature, we choose 10 μM of doxorubicin for subsequent experiments to test the effects of doxorubicin in combination with quercetin. In the range tested, the combined drugs exhibited more potent apoptotic effects than when they are administered alone or both 2D and 3D culture. The results demonstrated therefore that doxorubicin synergizes with quercetin to promote cellular apoptosis (figure 4) even in 3D culture.

Quercetin effect on MDR1 Activity

Based on above results, we choose 50 μM of quercetin to evaluate its impact on MDR1. The study of the effect of quercetin in presence or not of anti-cancer drugs shows that, in the presence of quercetin the MDR activity is decreasing with the specific MDR1 inhibitor verapamil in both 2D and 3D cultures. Indeed, the inhibition has been evidenced through an increase of the intracellular fluorecence of rhodamine 123-loaded cells. Their inhibitory potential on the efflux activity of MDR1 as demonstrated by the increase in fluorecence of rhodamine 123-loaded cells (figure 5). It should be noted that even verapamil, which is considered as the standard MDR1 inhibitor.

Addition of quercetin to gemcitabine and doxorubicin increases the expression pf p53 and cleaved caspase 3 in cancer cells

Based on above results, we chose 50 μM of quercetin, 10 μM of doxorubicin and 5 $\mu\text{g/ml}$ of gemcitabine for subsequent experiments to test the effects of the considered drug combination on the expression of apoptosis regulator p53 or cleaved caspase 3 in either AsPC-1 or HepG2 cell line. Our results show that p53 and cleaved caspase 3 expression level are increased when the two drugs are combined if compared to the cells treated with the anticancer drugs alone. These results indicate therefore that the combination of gemcitabine or doxorubicin and quercetin induced apoptosis and increased the expression of p53 and cleaved caspase 3 in pancreatic or liver cancer cells (figure 6).

Addition of quercetin to gemcitabine and doxorubicin down-regulate HIF-1 α in cancer cells

Based on above results, we chose 50 μM of quercetin, 10 μM of doxorubicin and 5 $\mu\text{g/ml}$ of gemcitabine for subsequent experiments to test

the effects of the considered drug combination on the expression of HIF-1 α in either AsPC-1 or HepG2 cell line cultured in 3D culture. First, our results demonstrate that AsPC-1 and HepG2 cells cultured in 2D monolayer culture do not express HIF-1 α (data not shown). In contrast, our results show that HIF-1 α is expressed in 3D culture and its levels are decreased when the two drugs are combined if compared to the cells treated with the anticancer drugs alone. These results indicate therefore that the combination of gemcitabine or doxorubicin and quercetin induced apoptosis and decreased the expression level of HIF-1 α in pancreatic and liver cancer cells in 3D culture (figure 6).

DISCUSSION

In a number of cancer types increased activity of the drug efflux pumps have been associated with chemoresistance known as multiple drug resistance (MDR) ²³. Gemcitabine, which has been the frontline chemotherapeutic agent against pancreatic cancer, has offered some relief over the past two decades ²⁴. On the other side, doxorubicin is one of the most effective and widely used chemotherapeutic agent for treatment of human malignancies including liver cancer ²⁵. But frequently, these two anticancer drugs failed in the overall survival benefit. However, trials in mixed regimens with gemcitabine or doxorubicin had variable success as indicated by the National Comprehensive Cancer Network (NCCN) guidelines which highlighted a successful therapy if the anticancer drugs are administrated in combination regimen ²⁶. In addition, recent studies indicated that natural products could provide additional strategies for monotherapy or combination treatments in pancreatic and liver cancer due to their efficacy and low toxicity ²⁷. Accordingly, many studies demonstrated the inhibitory action of flavonoids, but also furanocoumarins on drug rejection, by targeting MDR1. As a consequence, the inhibition of the activity of this protein increases the sensibilisation of cancer cells to anti-cancer drugs and therefore enhances chemosensitivity process ²⁸.

The fail rate of new anti-cancer compounds in clinical trial is currently 96%, that is why, before proceeding into clinical trials, there is an urgent need for new pre-clinical in-vitro model to test promising molecules ²⁹. 3D models might be more predictive and could recapitulate the response to anti-cancer drugs in vivo. Indeed, 2D monolayer culture lacks to develop interaction of cancer cells with their microenvironment ³⁰. Many studies

have demonstrated that spheroids are more predictive of cancer cell metastasis³¹. Recently, 3D cultures are getting the focus of cancer models as a tool to screen therapeutic agents over 2D cultures, because they develop physiological cell–cell and cell–ECM interactions, mimicking better the specificity of *in vivo* tissues³². One of the major interest of 3D culture is that dense and large spheroids may get hypoxic regions with an important expression of HIF-1 α , due to the lack of nutrients and chemical gradients of oxygen, as observed *in vivo*³³.

In a recent study we have tested the combination of anticancer drugs with 50 μ M of selected polyphenol (Catechin, Bergamottin, Rhamnetin), our results showed that the combination was more effective than anticancer drugs alone since we observed increasing percentage of dead cells up to 60% on cells cultured in 2D monolayer culture. However, the same combinations were not effective on AsPC-1 and HepG2 cells cultured in 3D culture³⁴. The present work, was therefore designed to study the potential of another polyphenol, quercetin to potentialize the cytotoxic activity of gemcitabine and doxorubicin in pancreatic and liver cancer cells respectively when cultured in 3D culture.

For this purpose, AsPC-1 and HepG2 cell lines were used and the cytotoxicity results compared with either for gemcitabine, doxorubicin or in combination with quercetin in order to evaluate any supra-additive effect. MDR1 inhibiting agents are pharmacologically active *in vitro* in concentration range from 1 to 15 μ g/ml³⁵. A range of 1-50 μ M of quercetin was selected for AsPC-1 and HepG2 cells in this study, as minimally cytotoxic doses of the micronutrient. As observed, the combination with gemcitabine or doxorubicin showed a strong supra-additive effects when lower doses of the anti-cancer drugs were administrated. Many studies indicate that the expression of drug efflux pump MDR1 is common in pancreatic and hepatic tumours and so potentially could contribute, at least in part, to the chemo resistant properties of these cancers. MDR1 blockade might have a very important role in the intracellular accumulation and the cellular pharmacokinetics of many anticancer drugs. Our results showed that quercetin possesses a potent inhibitory potential on MDR1 mediated efflux of rhodamine 123 when compared to verapamil suggesting an increasing in the intracellular accumulation of gemcitabine and doxorubicin, in the cancer cell lines used,

such mechanism explains when more apoptosis is detected when anti-cancer drugs were combined with quercetin.

An effective strategy to halt tumour growth is the induction of cell apoptosis by chemotherapeutic agents in cancer cells. The tumour suppressor p53 is a cell cycle checkpoint protein that contributes to the preservation of genetic stability by mediating apoptosis in response to DNA damage ³⁶. In our study, treatment with anti-cancer drugs and quercetin in combination increased expression of p53 and cleaved caspase 3 and induced apoptosis in cells compared to cancer cells treated with anti-cancer drugs alone. Also, the combination of anti-cancer drugs and quercetin down-regulated HIF-1 α expression at the protein level of cells in 3D culture when compared to cells treated with anti-cancer drugs only, such mechanism is also known to contribute to the induction of apoptosis. Many studies have shown that the induction of anti-oxidant protein and heme oxygenase-1 reduces free radicals, which subsequently result in the inhibition of inflammatory response ³⁷. In addition, a decreased level of ROS in colorectal cancer cells is known to suppress accumulation of HIF-1 α caused by free radicals ¹¹. Our results indicate that quercetin suppresses ROS (Data not shown), induced production in a 3D cultures. This could contribute therefor to the suppression of HIF-1 α in cancer cells.

In conclusion, our present data indicate that the combined treatment of quercetin and anti-cancer drugs induces increased apoptosis in pancreatic and hepatic cell lines indicating a potentialized response it is therefore recommended to study in a meet step natural and non-toxic MDR1 and HIF-1 α blockers which is able to potentialize the efficacy of anticancer drugs in cancer cells, especially for pancreatic or hepatic origin.

Bibliography

1. Pratheeshkumar P, Son Y-O, Korangath P, Manu KA, Siveen KS. Phytochemicals in Cancer Prevention and Therapy. *Biomed Res Int.* 2015;2015:1-2.
2. Brito AF, Ribeiro M, Abrantes AM, et al. Quercetin in Cancer Treatment, Alone or in Combination with Conventional Therapeutics? *Curr Med Chem.* 2015;22(26):3025-3039.
3. Salem Alrawaiq N, Abdullah A. A review of flavonoid quercetin: Metabolism, Bioactivity and antioxidant properties. *Int J PharmTech Res.* 2014;6(3):933-941.
4. Griffiths K, Aggarwal BB, Singh RB, Buttar HS, Wilson D, De Meester F. Food Antioxidants and Their Anti-Inflammatory Properties: A Potential Role in Cardiovascular Diseases and Cancer Prevention. *Dis (Basel, Switzerland).* 2016;4(3).
5. Kee J-Y, Han Y-H, Kim D-S, et al. Inhibitory effect of quercetin on colorectal lung metastasis through inducing apoptosis, and suppression of metastatic ability. *Phytomedicine.* 2016;23(13):1680-1690.
6. Brown JM. Tumor microenvironment and the response to anticancer therapy. *Cancer Biol Ther.* 2002;1(5):453-458.
7. Masoud GN, Li W. HIF-1 α pathway: role, regulation and intervention for cancer therapy. *Acta Pharm Sin B.* 2015;5(5):378-389.
8. Krock BL, Skuli N, Simon MC. Hypoxia-induced angiogenesis: good and evil. *Genes Cancer.* 2011;2(12):1117-1133.
9. Pratheeshkumar P, Son Y-O, Divya SP, et al. Luteolin inhibits Cr(VI)-induced malignant cell transformation of human lung epithelial cells by targeting ROS mediated multiple cell signaling pathways. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2014;281(2):230-241.
10. Liou M-Y, Storz P. *Reactive Oxygen Species in Cancer.* Vol 44.; 2010.

11. Seo S, Seo K, Ki SH, Shin SM. Isorhamnetin Inhibits Reactive Oxygen Species-Dependent Hypoxia Inducible Factor (HIF)-1 α Accumulation. *Biol Pharm Bull.* 2016;39(11):1830-1838.
12. Zhao Q, Li Y, Tan B-B, Fan L-Q, Yang P-G, Tian Y. HIF-1 α Induces Multidrug Resistance in Gastric Cancer Cells by Inducing MiR-27a. *PLoS One.* 2015;10(8):e0132746.
13. O'Driscoll L, Walsh N, Larkin A, et al. MDR1/P-glycoprotein and MRP-1 drug efflux pumps in pancreatic carcinoma. *Anticancer Res.* 2007;27(4 B):2115-2120.
14. Xia CQ, Smith PG. Drug efflux transporters and multidrug resistance in acute leukemia: therapeutic impact and novel approaches to mediation. *Mol Pharmacol.* 2012;82(6):1008-1021.
15. Bonhoure E, Pchejetski D, Aouali N, et al. Overcoming MDR-associated chemoresistance in HL-60 acute myeloid leukemia cells by targeting sphingosine kinase-1. *Leukemia.* 2006;20(1):95-102.
16. Nakagawa T, Shimizu M, Shirakami Y, et al. Synergistic effects of acyclic retinoid and gemcitabine on growth inhibition in pancreatic cancer cells. *Cancer Lett.* 2009;273(2):250-256.
17. Mohammed A, Janakiram NB, Pant S, Rao C V. Molecular targeted intervention for pancreatic cancer. *Cancers (Basel).* 2015;7(3):1499-1542.
18. Senthebane DA, Rowe A, Thomford NE, et al. The role of tumor microenvironment in chemoresistance: To survive, keep your enemies closer. *Int J Mol Sci.* 2017;18(7).
19. Herrmann D, Conway JRW, Vennin C, et al. Three-dimensional cancer models mimic cell-matrix interactions in the tumour microenvironment. *Carcinogenesis.* 2014;35(8):1671-1679.
20. Duval K, Grover H, Han L-H, et al. Modeling Physiological Events in 2D vs. 3D Cell Culture. *Physiology (Bethesda).* 2017;32(4):266-277.
21. Breslin S, O'Driscoll L. The relevance of using 3D cell cultures, in

- addition to 2D monolayer cultures, when evaluating breast cancer drug sensitivity and resistance. *Oncotarget*. 2016;7(29):45745-45756.
22. Longati P, Jia X, Eimer J, et al. 3D pancreatic carcinoma spheroids induce a matrix-rich, chemoresistant phenotype offering a better model for drug testing. *BMC Cancer*. 2013;13:95.
 23. Lee Y-H, Yang H-W, Yang L-C, et al. DHFR and MDR1 upregulation is associated with chemoresistance in osteosarcoma stem-like cells. *Oncol Lett*. 2017;14(1):171-179.
 24. Kanji ZS, Edwards AM, Mandelson MT, et al. Gemcitabine and Taxane Adjuvant Therapy with Chemoradiation in Resected Pancreatic Cancer: A Novel Strategy for Improved Survival? *Ann Surg Oncol*. 2018;25(4):1052-1060.
 25. Chang J-E, Shim W-S, Yang S-G, et al. Liver cancer targeting of Doxorubicin with reduced distribution to the heart using hematoporphyrin-modified albumin nanoparticles in rats. *Pharm Res*. 2012;29(3):795-805.
 26. Zhao YP. [Interpretation of the Chinese edition of NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology-Pancreatic Adenocarcinoma Guideline 2011]. *Zhonghua Wai Ke Za Zhi*. 2011;49(9):771-773.
 27. Bayat Mokhtari R, Homayouni TS, Baluch N, et al. Combination therapy in combating cancer. *Oncotarget*. 2017;8(23):38022-38043.
 28. Abdallah HM, Al-Abd AM, El-Dine RS, El-Halawany AM. P-glycoprotein inhibitors of natural origin as potential tumor chemosensitizers: A review. *J Adv Res*. 2015;6(1):45-62.
 29. Adcock AF. Three-Dimensional (3D) Cell Cultures in Cell-based Assays for in-vitro Evaluation of Anticancer Drugs. *J Anal Bioanal Tech*. 2015;6(3).
 30. Birgersdotter A, Sandberg R, Ernberg I. Gene expression perturbation in vitro--a growing case for three-dimensional (3D) culture systems. *Semin Cancer Biol*. 2005;15(5):405-412.

31. Riedl A, Schleder M, Pudelko K, Stadler M, Walter S. Comparison of cancer cells cultured in 2D vs 3D reveals differences in AKT / mTOR / S6- kinase signaling and drug response *Journal of Cell Science* • Advance article Abstract *Journal of Cell Science* • Advance article. 2016;(September).
32. Antoni D, Burckel H, Josset E, Noel G. Three-dimensional cell culture: a breakthrough in vivo. *Int J Mol Sci*. 2015;16(3):5517-5527.
33. Eales KL, Hollinshead KER, Tennant DA. Hypoxia and metabolic adaptation of cancer cells. *Oncogenesis*. 2016;5(1):e190.
34. Hassan, S., Peluso, J., Fuhrmann, G., & Ubeaud, G. (2017) . Synergistic Effect of the Combination of Polyphenols with Gemcitabine on Pancreatic cancer cell line AsPC-1. *Journal of pharmaceutical research* 2(1), 2–5.
35. Thani NAA, Keshavarz S, Lwaleed BA, Cooper AJ, Rooprai HK. Cytotoxicity of gemcitabine enhanced by polyphenolics from *Aronia melanocarpa* in pancreatic cancer cell line AsPC-1. *J Clin Pathol*. 2014;67(11):949-954.
36. Roos WP, Kaina B. DNA damage-induced cell death: From specific DNA lesions to the DNA damage response and apoptosis. *Cancer Lett*. 2013;332(2):237-248.
37. Seo K, Yang JH, Kim SC, Ku SK, Ki SH, Shin SM. The antioxidant effects of isorhamnetin contribute to inhibit COX-2 expression in response to inflammation: a potential role of HO-1. *Inflammation*. 2014;37(3):712-722.

Legends of figures

Figure 1: Respective apoptotic effect of gemcitabine and doxorubicin on Aspc1 and HepG2 cells. After incubating cells 24h with gemcitabine or doxorubicin, cells death was assessed following the simultaneous staining of cells with AnnexinV-FITC and PI by capillary flow cytometry. (A) Recapitulates in a dose response curves the percentage of AsPC-1 cells cultured in 2D or 3D cultures undergoing apoptosis after different treatments with gemcitabine at different concentration. (B) Recapitulates in a dose response curves the percentage of HepG2 cells in 2D or 3D cultures undergoing apoptosis after treatments with doxorubicin at different concentration. Data are represented as mean \pm S.E.M (n=3).

Figure 2: Respective apoptotic effect of quercetin on Aspc1 and HepG2 cells. After incubating cells 24h with gemcitabine or doxorubicin, cells death was assessed following the simultaneous staining of cells with AnnexinV-FITC and PI by capillary flow cytometry. (A) Recapitulates in a dose response curves the percentage of AsPC-1 cells cultured in 2D or 3D cultures undergoing apoptosis after quercetin treatment at different concentration. (B) Recapitulates in a dose response curves the percentage of HepG2 cells in 2D or 3D cultures undergoing apoptosis after quercetin treatment at different concentration. Data are represented as mean \pm S.E.M (n=3).

Figure 3: Apoptotic effect of quercetin in presence or not of gemcitabine on AsPC-1 cells in 2D or 3D culture. AsPC-1 cell cytotoxicity was induced by treatment with gemcitabine at 5 μ g/mL in combination or not with 50 μ M of quercetin. (A) Shows the results of representative scatter plots obtained after the different treatments, cells of the lower left quadrant are viable, cells on the upper and lower right quadrants are in late and early apoptosis, respectively. The number of cells in the late apoptosis, expressed as percent relative to total cell number, is indicated. Data are represented as mean \pm S.E.M (n=3). ** represents $P < 0.01$.

Figure 4: Apoptotic effect of quercetin in presence or not of doxorubicin on HepG2 cells in 2D or 3D culture. HepG2 cell cytotoxicity was induced by treatment with doxorubicin at 10 μ M in combination or not with 50 μ M of quercetin. (A) Shows the results of representative scatter plots obtained

after the different treatments, cells of the lower left quadrant are viable, cells on the upper and lower right quadrants are in late and early apoptosis, respectively. The number of cells in the late apoptosis, expressed as percent relative to total cell number, is indicated. Data are represented as mean \pm S.E.M (n=3). ** represents $P < 0.01$, * $P < 0.05$.

Figure 5: Effect of quercetin on the MDR1-mediated efflux of rhodamine 123. AsPC-1 (A) and HepG2 (B) cells were incubated for 24 h, in the presence of quercetin in presence or not of gemcitabine or doxorubicin respectively. Data are represented as mean \pm S.E.M (n=3). ***represents $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.5$.

Figure 6: Respective effect of Gemcitabine or doxorubicin in presence or not of quercetin on the expression of p53, cleaved caspase 3 and HIF-1 alpha in AsPC-1 and HepG2 cells. After incubating, AsPC-1 or HepG2 cells were treated respectively with gemcitabine or doxorubicin in absence or presence of quercetin.

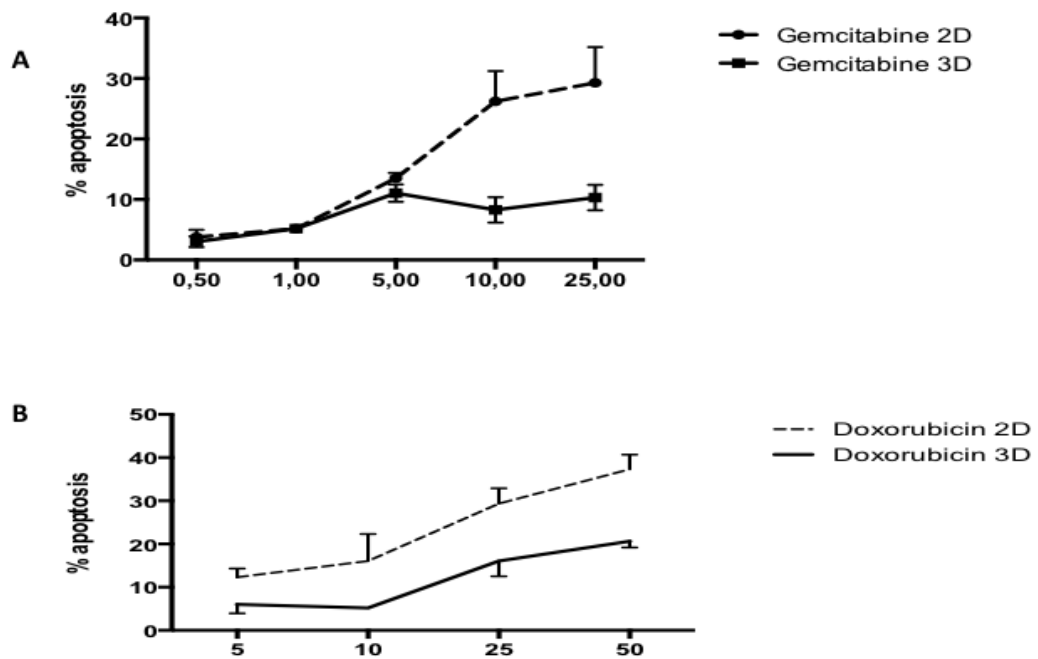


Figure 1: Respective apoptotic effect of gemcitabine and doxorubicin on Aspc1 and HepG2 cells. After incubating cells 24h with gemcitabine or doxorubicin, cells death was assessed following the simultaneous staining of cells with AnnexinV-FITC and PI by capillary flow cytometry. (A) Recapitulates in a dose response curves the percentage of AsPC-1 cells cultured in 2D or 3D cultures undergoing apoptosis after different treatments with gemcitabine at different concentration. (B) Recapitulates in a dose response curves the percentage of HepG2 cells in 2D or 3D cultures undergoing apoptosis after treatments with doxorubicin at different concentration. Data are represented as mean \pm S.E.M (n=3).

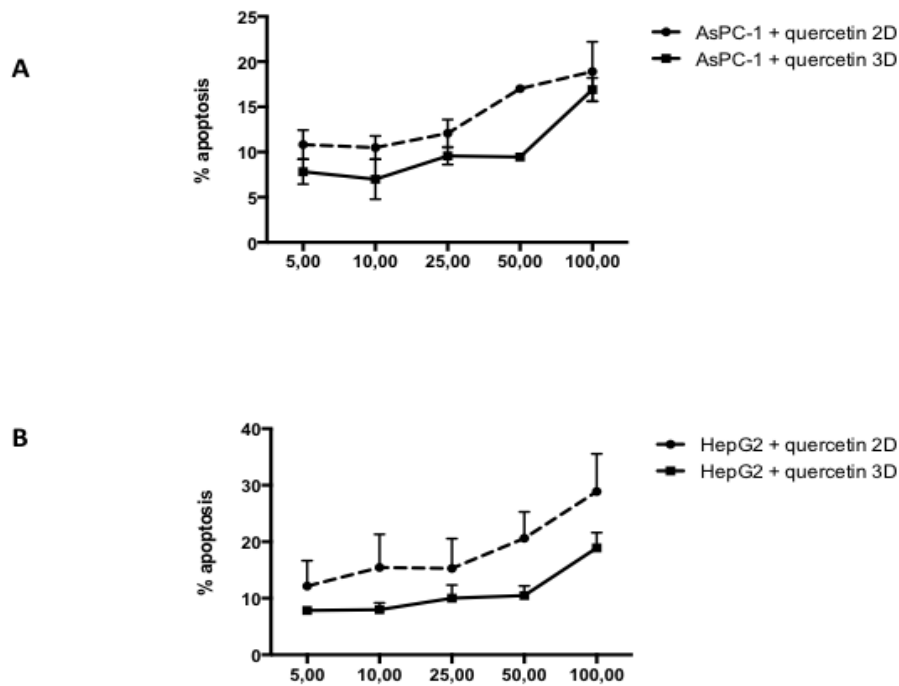


Figure 2: Respective apoptotic effect of quercetin on Aspc1 and HepG2 cells. After incubating cells 24h with gemcitabine or doxorubicin, cells death was assessed following the simultaneous staining of cells with AnnexinV-FITC and PI by capillary flow cytometry. (A) Recapitulates in a dose response curves the percentage of AsPC-1 cells cultured in 2D or 3D cultures undergoing apoptosis after quercetin treatment at different concentration. (B) Recapitulates in a dose response curves the percentage of HepG2 cells in 2D or 3D cultures undergoing apoptosis after quercetin treatment at different concentration. Data are represented as mean \pm S.E.M (n=3).

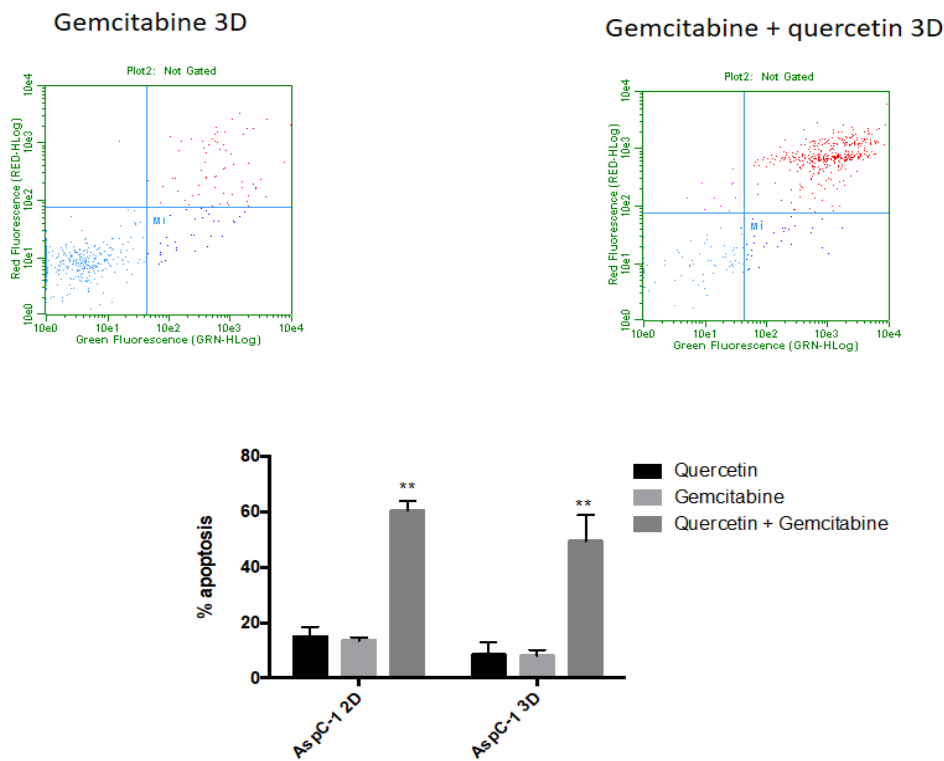


Figure 3: Apoptotic effect of quercetin in presence or not of gemcitabine on AsPC-1 cells in 2D or 3D culture. AsPC-1 cell cytotoxicity was induced by treatment with gemcitabine at 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in combination or not with 50 μM of quercetin. (A) Shows the results of representative scatter plots obtained after the different treatments, cells of the lower left quadrant are viable, cells on the upper and lower right quadrants are in late and early apoptosis, respectively. The number of cells in the late apoptosis, expressed as percent relative to total cell number, is indicated. Data are represented as mean \pm S.E.M (n=3). ** represents $P < 0.01$.

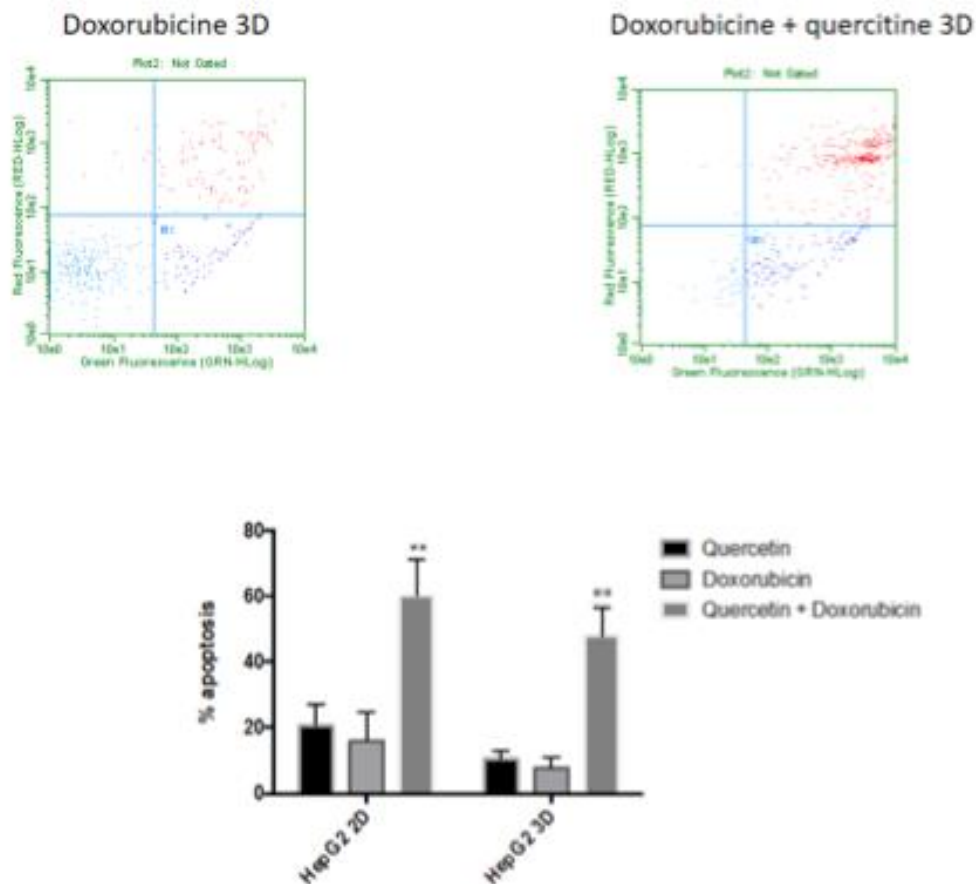


Figure 4: Apoptotic effect of quercetin in presence or not of doxorubicin on HepG2 cells in 2D or 3D culture. HepG2 cell cytotoxicity was induced by treatment with doxorubicin at 10 μ M in combination or not with 50 μ M of quercetin. (A) Shows the results of representative scatter plots obtained after the different treatments, cells of the lower left quadrant are viable, cells on the upper and lower right quadrants are in late and early apoptosis, respectively. The number of cells in the late apoptosis, expressed as percent relative to total cell number, is indicated. Data are represented as mean \pm S.E.M (n=3). ** represents $P < 0.01$, * $P < 0.05$.

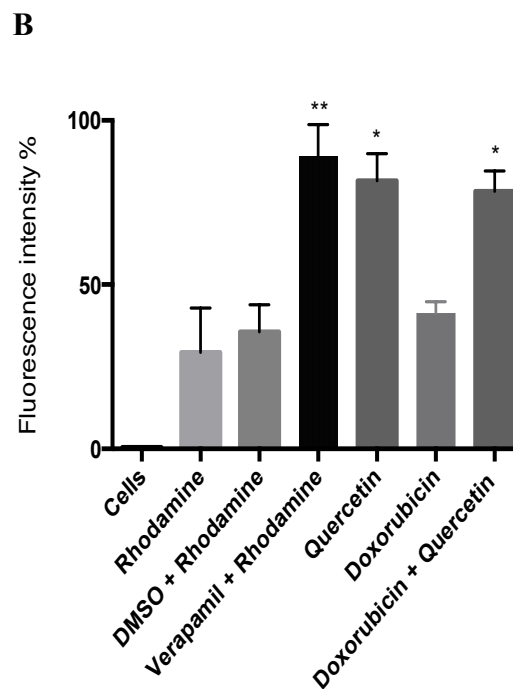
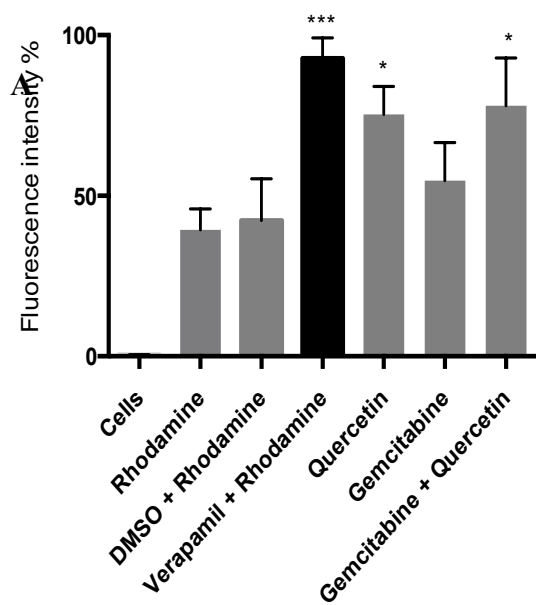


Figure 5: Effect of quercetin on the MDR1-mediated efflux of rhodamine 123. AsPC-1 (A) and HepG2 (B) cells were incubated for 24 h, in the presence of quercetin in presence or not of gemcitabine or doxorubicin respectively. Data are represented as mean \pm S.E.M (n=3). *** represents $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$.

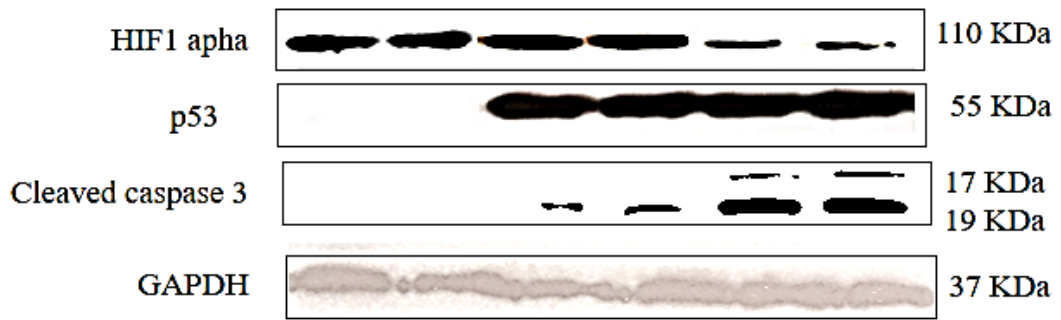


Figure 6: Respective effect of Gemcitabine or doxorubicin in presence or not of quercetin on the expression of p53, cleaved caspase 3 and HIF-1 alpha in AsPC-1 and HepG2 cells. After incubating, AsPC-1 or HepG2 cells were treated respectively with gemcitabine or doxorubicin in absence or presence of quercetin.

Discussion générale

Le nombre croissant d'individus diagnostiqués de cancer constitue un problème majeur de santé publique (J Ferlay et al. 2013). Les cancers du foie et du pancréas présentent des taux de survie faibles par rapport à d'autres types de cancers tel que le cancer du sein. Selon le type et le stade d'évolution du cancer, les traitements peuvent être différents, allant de la chirurgie, la radiothérapie jusqu'à la chimiothérapie, avec des protocoles spécifiques comme la chimioembolisation (Lee et al. 2018). Lors de la chimiothérapie conventionnelle, les protocoles diffèrent en fonction du type de cancer, associant ou non des médicaments présentant des mécanismes différents pour en optimiser l'efficacité et, selon la réponse des patients, associant ou non des thérapies ciblées ou de l'immunothérapie spécifique. En effet, on sait actuellement qu'il n'existe pas un cancer par organe mais une multitude de sous types de cancers avec chacun des anomalies particulières au sein des cellules cancéreuses et de leur environnement. Des traitements de thérapie ciblée et /ou d'immunothérapie visent ainsi à corriger ces perturbations en ciblant des anomalies moléculaires. Lors de la chimiothérapie conventionnelle, un des obstacles majeurs à la réponse aux traitements, est la résistance des cellules tumorales aux médicaments anticancéreux, qui peut être due à différents facteurs comme l'altération du métabolisme ou des paramètres pharmacocinétiques de ces médicaments, l'inactivation de leurs cibles pharmacologiques, des défauts de pénétration ou d'accumulation de ces médicaments dans les cellules tumorales par altération de leurs transports transmembranaires ou l'altération des processus de détoxification cellulaire liée à une activation des systèmes de réparation de l'ADN (Sielaff et al, 2018). Dans le but d'améliorer l'efficacité des traitements tout en diminuant leur toxicité, afin de rallonger l'espérance de vie des patients, des combinaisons de médicaments anticancéreux sont étudiées. Pour mieux comprendre la résistance des cellules cancéreuses à la chimiothérapie, il est indispensable de prendre en compte les enzymes de métabolisme des médicaments tels que les isoformes du cytochrome P450 (CYP450), les transporteurs ABC (phénotype de Multi Drug Resistance (MDR)) et l'environnement de la tumeur. Les enzymes qui métabolisent les médicaments et les transporteurs membranaires type ABC jouent un rôle clé dans l'activation et la désactivation des médicaments et la détoxification de l'organisme. L'élucidation des influences du métabolisme de ces médicaments qui se produit dans le foie, semble être une étape extrêmement importante dans le développement de nouveaux médicaments anticancéreux, d'autant plus dans le cas du cancer hépatique mais pour tout type de cancer avancé métastatique présentant des métastases hépatiques comme le cancer du

pancréas. En effet, dans le cas du cancer pancréatique, les tumeurs sont généralement diagnostiquées à un stade avancé. A ce stade, les cellules tumorales possèdent le pouvoir de passer dans la voie sanguine en arrivant au foie pour former des métastases hépatiques (Gibson et al. 2018). Compte tenu du besoin continu de rechercher des chimiothérapies sûres et efficaces avec une moindre toxicité, les études sur le métabolisme des nouveaux médicaments puissants sont indispensables à mettre en œuvre très tôt dans le développement des médicaments. Pour effectuer ces études précliniques, jusqu'à présent, les modèles cellulaires *in vitro* sont couramment utilisés. Le modèle hépatique cellulaire standard est les hépatocytes primaires humains issus de résections chirurgicales. Cependant ce modèle a des limites (durée de vie des cellules en culture de 48-72h maximum, grandes variabilités interindividuelles (1 lot par individu), influence des traitements et de l'environnement tumoral sur l'isolement des cellules et la difficulté de récupération de morceaux de foie humain de malades présentant des problèmes éthiques. Devant cette difficulté, des lignées cellulaires hépatiques humaines ont été testées comme les cellules HepG2. Mais ces cellules ne présentent pas toutes les enzymes nécessaires comme les CYP450 en quantité et en activité suffisante pour des études de métabolisme (Bell et al, 2016) et peuvent sous estimer des réponses toxiques de certains médicaments liés à leurs métabolites. D'autres lignées cellulaires ont été développées pour ces études comme les cellules Fa2N-4 dérivées d'hépatocytes primaires par transfection avec l'antigène T de SV40 ou les cellules HepG2/C3A. Cependant ces lignées présentent une très faible expression de récepteurs nucléaires et de CYP450. Elles n'ont pas montré de réelles améliorations et ne sont pas utilisées pour les études en phase préclinique du développement des médicaments. Plus récemment, la lignée cellulaire HepaRG dérivée d'un carcinome hépatocellulaire humain a été développée par une équipe française à Rennes (Guillouzo et al, 2007). Cette lignée cellulaire a montré une fonctionnalité hépatique clé comparable aux hépatocytes humains primaires en termes d'enzymes métaboliques et de récepteurs nucléaires. Introduite dans les tests de toxicité, cette lignée représente un modèle plus pertinent que les cellules HepG2 car elles présentent une expression stable des gènes caractéristiques des hépatocytes différenciés impliqués dans le métabolisme et le transport des xénobiotiques (Doktorova et al. 2014). De part leurs caractéristiques, leur fonctionnalités et leur forte expression en CYP et en transporteurs membranaires (Jennen et al. 2010), les cellules HepaRG sont référencées comme des outils cellulaires utilisables pour des études de métabolisme

(tests de validation FDA). Cependant, à ce jour, ces cellules restent peu utilisées au profit des hépatocytes primaires humains. Dans leur mode de préparation, les cellules HepaRG confluentes requièrent en effet une étape de différenciation après un traitement au DMSO qui est une molécule toxique et qui limite leur utilisation et leur production, la lignée étant finie. Malgré ces limites, les lignées cellulaires HepG2 et HepaRG sont néanmoins utilisées comme des modèles cellulaires *in vitro* pour les études de toxicité (Westerink et Schoonen 2007). Aussi, il est nécessaire de mettre au point un nouveau modèle cellulaire hépatique humain présentant à la fois les caractéristiques de métabolisme essentielles du foie et une réelle stabilité de lignée cellulaire. Notre projet consiste d'abord à mettre en place et à caractériser un nouveau modèle cellulaire hépatique humain présentant des propriétés spécifiques du foie et capables de métaboliser les médicaments. La plupart des cellules ont besoin de s'attacher à un support pour survivre, se diviser et exprimer leurs fonctions spécifiques. La culture en 2D (monocouche cellulaire) recouverte d'un milieu de culture empêche souvent le maintien de la différenciation cellulaire à cause de pertes d'informations structurales. Cependant, la facilité de culture fait que beaucoup d'études de toxicologie et/ou de pharmacologie cellulaire sont utilisées dans ces conditions. Ainsi, afin d'être plus représentatif de la situation *in vivo* et de tenir compte de la structure spatiale nécessaire à améliorer la différenciation et la performance des cellules, nous allons mettre en place ce nouveau modèle cellulaire en 3D et comparer son comportement par rapport aux cellules cultivées en 2D.

Dans une première partie de notre travail, nous avons poursuivi le développement et la caractérisation de notre nouvelle lignée hépatique humaine dérivée des HepG2 appelée « HepaPSU » (Enveloppe Soleau INPI 488678) et nous avons comparé nos résultats à ceux obtenus sur les lignées HepG2 fournies par ATCC (HB-8065). Morphologiquement, dans des conditions spécifiques, nous observons dans nos cellules, des canalicules biliaires se formant avec le temps, par opposition aux HepG2 (figure 3 article 1). Afin de s'assurer que les cellules « HepaPSU » ont gardé la fonctionnalité d'une cellule hépatique, nous avons montré la capacité de nos cellules à synthétiser de l'albumine (figure 2 article 1) de la même manière que les cellules HepG2. Nous avons par la suite effectué le caryotype de notre nouvelle lignée en comparaison avec la lignée de référence HepG2, avec l'aide du Dr Eric Jeandidier du Groupe Hospitalier Régional de Mulhouse Sud-Alsace (GHRMSA). Clairement, le caryotype montre que notre nouvelle lignée « HepaPSU » est une nouvelle lignée

hépatique stable dérivée des HepG2, en gardant les mêmes anomalies présentes dans les HepG2 mais avec des spécificités propres. Nous avons ainsi observé des différences significatives sur les chromosomes 5, 17 et 20 suggérant que ces mutations pouvaient contribuer à donner certaines capacités métaboliques à notre nouvelle lignée (figure 1 article 1). En effet, la localisation cytogénétique du gène codant pour le facteur nucléaire hépatique HNF-4 alpha, qui joue un rôle clé dans la différenciation hépatique, est située sur le chromosome 20 (20q13.12) (Genetics home reference, 2018). Or, HNF-4 est un membre de la superfamille des récepteurs nucléaires, de la famille des récepteurs orphelins, ayant montré des effets régulateurs sur le cytochrome P450. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons étudié l'expression du facteur HNF-4 alpha dans les cellules HepaPSU (conditions 1 et 2) et les cellules HepG2 en présence ou non de la rifampicine, inducteur des CYP450. Nos résultats montrent que notre nouvelle lignée cellulaire présente une expression relativement forte de HNF-4 alpha dans nos cellules alors que cette expression est faible dans les mêmes conditions dans les cellules HepG2 (augmentation de 5 fois dans les cellules « HepaPSU » cultivées dans des conditions spéciales (condition 2) par rapport aux cellules HepG2). De plus, en présence de rifampicine, cette expression est augmentée de 4 fois dans nos cellules par rapport aux cellules HepG2. De façon cohérente, nos résultats montrent également que notre nouvelle lignée cellulaire « HepaPSU » présente une expression relativement forte de PXR qui est un récepteur nucléaire impliqué dans la régulation des enzymes CYP450 et des transporteurs hépatiques de la famille des ABC et qui est fortement exprimé dans le foie humain (Andre Guillouzo et al. 2007). Dans les cellules « HepaPSU » cultivées dans des conditions spéciales l'expression de PXR est augmentée de 4 fois par rapport aux cellules HepG2. De plus, nos cellules « HepaPSU » expriment fortement les CYP3A4, CYP2D6 et CYP2C9 (figure 2 article 1) avec une augmentation de l'expression des CYP450 de 5 fois dans les cellules « HepaPSU » (condition 2) par rapport aux cellules HepG2. Ces 3 isoformes du CYP450 (CYP3A4, CYP2D6 et CYP2C9) ont été choisies car ce sont les principales enzymes contenues dans le foie et impliquées dans le métabolisme médicamenteux. De plus, l'isoforme CYP3A4 est la plus fragile dans les cultures d'hépatocytes primaires avec une activité décroissante après 24h de culture. Nos résultats d'expression du CYP450 sont corrélés aux études d'activité. Nos résultats montrent que l'activité CYP3A4 est maintenue dans les cellules HepaPSU (en condition 2) par rapport aux cellules HepG2. De la même manière, nos cellules expriment fortement les transporteurs type ABC (augmentation de 2 fois

pour MDR1 et de 4 fois pour MRP2 par rapport aux cellules HepG2) et le transporteur OATP1B1 appartenant à la famille SLC et spécifique du foie (expression doublée par rapport aux cellules HepG2). De même, des résultats préliminaires montrent une augmentation de 2 fois de l'expression de BCRP par rapport aux cellules HepG2. De plus, les enzymes du CYP450, fortement exprimées dans les cellules « HepaPSU », sont inductibles. Ainsi, après avoir incubé nos cellules pendant 48h avec de la rifampicine (10 μ M), un inducteur connu des CYP3A4 et CYP2C9, l'expression et l'activité de CYP3A4 est augmentée respectivement de 4 fois et 3 fois par rapport aux cellules HepG2. De la même manière, nos résultats montrent une induction du PXR et des transporteurs après avoir incubé nos cellules pendant 48h avec de la rifampicine.

De plus, afin d'être plus proche de la situation *in vivo*, nous avons également testé ces mêmes activités et expressions des protéines dans les cellules cultivées en 3D afin de comparer le comportement de nos cellules 2D vs 3D. Les cellules « HepaPSU » cultivées en 3D sont capables de synthétiser de l'albumine de la même façon quel que soit les conditions (figure 49). Nos cellules « HepaPSU » en 3D expriment fortement les CYP3A4, CYP2D6 et CYP2C9 de la même manière que nos cellules en 2D dans les conditions spéciales (J7) (augmentation de 5 fois par rapport aux cellules HepaPSU dans la condition 1). De même, les cellules expriment fortement les transporteurs membranaires de la même manière que nos cellules en 2D dans les conditions spéciales (augmentation de 2 fois, 5 fois, et 2 fois par rapport aux cellules « HepaPSU » dans la condition 1 pour MDR1, MRP2 et OATP1B1 respectivement). Nos résultats montrent également que notre nouvelle lignée présente une expression relativement forte de HNF-4 alpha et PXR dans les cellules cultivées en 3D ou en 2D condition 2 alors que cette expression est faible dans les cellules « HepaPSU » en condition 1. Dans nos conditions expérimentales, nos résultats montrent que l'expression des CYP450, des transporteurs et des récepteurs nucléaires est comparable entre les cellules « HepaPSU » cultivées en 2D et en 3D. En conclusion, nos résultats montrent que nous avons mis en place une nouvelle lignée hépatique humaine qui exprime suffisamment et significativement les enzymes et les transporteurs hépatiques trouvés dans les hépatocytes humains par rapport aux cellules HepG2 et qui semble être un bon modèle de prédiction du métabolisme des médicaments.

Dans un deuxième temps, nous avons étudié si nos cellules pouvaient être un bon modèle cellulaire pour des études de toxicologie en développant

des tests spécifiques par cytométrie en flux. Pour cela, nous avons étudié si nos cellules étaient capables de prédire l'hépatotoxicité de diverses molécules de référence connues pour être cytotoxiques par différentes voies (cytotoxique par elle-même, ou par l'intermédiaire de métabolites toxiques ou par cholestase, ou par stéatose). Nos résultats montrent que les cellules « HepaPSU » sont effectivement un bon modèle de prédiction d'hépatotoxicité par comparaison aux cellules HepG2, modèle de référence dans le domaine de la toxicité hépatique. Nos cellules sont incubées pendant 24 h avec des molécules de référence connues pour être hépatotoxiques et avec des contrôles négatifs non hépatotoxiques comme le chlorure de potassium. Les concentrations utilisées sont choisies conformément à la littérature. Afin de tester si les cellules étaient capables de métaboliser les médicaments et de prendre en compte ce mécanisme dans la réponse cytotoxique, nous avons choisi diverses molécules connues pour être toxiques après métabolisme comme le paracétamol, le diclofenac et l'aflatoxine B1. En effet, le paracétamol, médicament analgésique, est connu pour être métabolisé par 2 voies majeures de phase 2, la glucuroconjugaison (glucuronyl transférases) et la sulfoconjugaison et également par une voie mineure impliquant les CYP2E1, CYP1A2 et CYP3A4 aboutissant à la formation d'un intermédiaire réactif, le NAPQI (N- acetyl para benzoquinone imine). (Toxicity-associated et al. 2008). Ce NAPQI est normalement éliminé par réaction avec le glutathion réduit et éliminé dans les urines après conjugaison à la cystéine et à l'acide mercaptopurique. Le paracétamol est connu pour être hépatotoxique à forte dose par l'intermédiaire de ce métabolite réactif électrophile NAPQI et après épuisement du glutathion hépatocellulaire qui déclenche alors la cascade d'événements menant à l'hépatotoxicité. De la même manière, la toxicité du diclofenac est principalement liée à la formation au niveau du foie de métabolites réactifs impliquant les cytochromes P450 et les UDP Glucuronyl transférases (UGT). Les CYP2C9 et CYP3A4 conduisent ainsi à la formation de métabolites actifs hydroxylés, le 4'-hydroxydiclofenac et le 5-hydroxydiclofenac respectivement, eux-mêmes biotransformés en quinone-imines, molécules potentiellement toxiques qui forment des adduits aux macromolécules et qui sont responsables de la formation de radicaux libres en réagissant avec le Glutathion. L'aflatoxine B1 est une toxine fongique à l'origine d'hépatotoxicité chez l'homme. Cette hépatotoxicité semble elle aussi être le résultat de la bioactivation de l'aflatoxine B1 (AFB1) en dérivés époxyde, AFB1-8,9-exo-époxyde et AFB1-8,9-endo-époxyde par les CYP3A4 (El-Serag 2012). Après incubation de ces molécules de référence dans nos cellules « HepaPSU »

cultivées en 2D dans les conditions 1 et 2 durant 24 h, nous observons des valeurs EC50 de 22 mM, 20 mM et 62 μ M pour respectivement le paracétamol, le diclofenac et l'aflatoxine B1 dans les cellules cultivées en condition 1 et 6 mM, 9 mM et 11 μ M pour ces mêmes molécules dans les cellules cultivées en condition 2 (article 1 figure 5). Ces derniers résultats obtenus avec nos cellules « HepaPSU » dans des conditions de cultures spécifiques (condition 2) sont comparables aux EC50 rapportées avec les HepaRG incubées dans des conditions similaires et aux mêmes concentrations de médicaments (valeurs issues de la littérature: Guillouzo et al 2007 et Mueller et al 2014) avec des valeurs de EC50 de 2.7 mM et 7.7 μ M pour respectivement le Paracétamol et Aflatoxine B1. L'amiodarone, médicament antiarythmique de classe III, est associée à de nombreux effets indésirables dont une cytoxicité hépatique. Nos résultats montrent que les cellules HepG2 et les cellules « HepaPSU » (condition 1) répondent de la même manière avec un pourcentage d'apoptose élevé de 85 % et 80 % respectivement. Cependant, dans les cellules « HepaPSU » optimisées (condition 2), il y a bien une réponse positive d'apoptose (contrôle positif) mais on note une diminution de 10 % d'apoptose qui peut être expliqué par le fait que l'amiodarone à forte dose est certes toxique mais qu'une partie est métabolisée par le CYP3A4 en métabolite inactif. L'acide valproïque, médicament anticonvulsivant, est connu pour être hépatotoxique par des mécanismes de stéatose en induisant une accumulation des acides gras dans le foie, ce qui perturbe le métabolisme des acides gras ou la sécrétion de la bile. Cette molécule a montré un pourcentage d'apoptose faible de 15% dans les HepG2, 12% dans les « HepaPSU » condition 1 et 25 % dans les « HepaPSU » optimisées avec un pourcentage d'apoptose plus élevé de 10% dans nos cellules optimisées. Après incubation de la chlorpromazine, médicament antipsychotique connu pour être hépatotoxique par cholestase impliquant des transporteurs d'efflux ABC, nos résultats montrent que les cellules « HepaPSU » condition 1 ont un comportement similaire aux cellules HepG2. Cependant dans les cellules « HepaPSU » optimisées, (condition 2) avec un pourcentage d'apoptose élevée de 90 %, ce pourcentage d'apoptose est diminué significativement (75 % d'apoptose). Cette diminution peut être expliquée par la formation de métabolites inactifs de chlorpromazine dans les cellules « HepaPSU » optimisées. En effet, il est connu que la chlorpromazine est métabolisée en 7-hydroxychlorpromazine inactif par les enzymes CYP2D6.

Nos résultats montrent que nos cellules cultivées en 2D sont capables de mieux prédire l'hépatotoxicité de ces molécules que les HepG2, en particulier lorsque nos cellules sont incubées dans des conditions spéciales permettant de prédire l'hépatotoxicité des molécules toxiques via la formation des métabolites actifs. Pour être plus prédictif de la situation *in vivo* nous avons testé les mêmes molécules en 3D en comparant les réponses d'apoptose aux cellules en 2D. Dans ces conditions expérimentales, nos résultats montrent que nos cellules en 3D sont capables de prédire l'hépatotoxicité avec un pourcentage d'apoptose important et significatif, similaire à nos résultats obtenus en 2D (condition 2): 78.7%, 82% et 77.6% d'apoptose avec respectivement, paracétamol, diclofenac et aflatoxine B1.

Nous avons ensuite étudié si nos cellules « HepaPSU » selon le protocole optimisé étaient un bon modèle de prédiction d'hépatotoxicité idiosyncrasique dans un contexte inflammatoire. Pour cela, nous avons choisi des molécules de référence connues pour être hépatotoxiques selon un mode idiosyncrasique, le nimésulide et la néfazodone, et nous avons suivi le même protocole que celui établi lors du doctorat de Léa Saab (07/2013). Nos résultats montrent que, après inflammation par TNF alpha et LPS, le pourcentage d'apoptose des cellules « HepaPSU » par les deux molécules augmente de 40% jusqu'à 80%, ce qui n'est pas le cas pour les cellules HepG2.

Au vu de nos résultats, nos cellules « HepaPSU » semblent être un bon modèle de prédiction d'hépatotoxicité lorsque les cellules sont cultivées en 3D ou en 2D dans des conditions optimisées par rapport aux HepG2. Cependant, des études complémentaires comme des ajustements de concentrations, sont nécessaires pour vérifier et standardiser nos résultats, en particulier dans le mode idiosyncrasique.

Après avoir développé notre modèle cellulaire hépatique pour des études de toxicité prédictive et mis au point des cellules hépatiques capables de métaboliser les médicaments, nous avons utilisé ce modèle cellulaire hépatique pour des études pharmacologiques en cancérologie. Notre objectif était de tester une stratégie d'optimisation des traitements anticancéreux par association de polyphénols naturels à des traitements standard, dans les cancers hépato-pancréatiques sur des modèles cellulaires en 2D et 3D. Ainsi, dans la deuxième partie de notre thèse, nous avons testé si des polyphénols naturels étaient capables de potentialiser l'effet apoptotique des médicaments anticancéreux dans le cancer du foie et du

pancréas. La gemcitabine seule est une chimiothérapie standard pour le traitement du cancer du pancréas métastatique. La doxorubicine est un des anticancéreux standards dans le traitement du cancer hépatique avancé pour son action anti-tumorale. Cependant, ces molécules ont montré une efficacité insuffisante. De nombreuses combinaisons de gemcitabine ou de doxorubicine avec d'autres médicaments ont déjà été testées. Mais, jusqu'à présent, aucune n'a montré d'avantages évidents, quant à l'allongement de l'espérance de vie des patients. Les polyphénols naturels sont des molécules bioactives qui ont montré des effets bénéfiques sur la santé (Khurana et al. 2013). Nous avons choisi des polyphénols de différentes familles: i) les flavonoïdes appartenant à la classe des Flavanones (Naringénine, Naringine, et Eriodictyol), des Flavanols (Catéchine et Rhamnétine), des Flavones (Quercétine et Lutéoline), des Isoflavones (Génisteine, Daidzéine), ii) les furocoumarines (Bergamottine) et iii) les acides organiques (acide gallique).

En utilisant la nouvelle lignée hépatique qui dérive des cellules HepG2 « HepaPSU », les polyphénols n'ont pas montré d'effets apoptotiques significatifs. Dans nos conditions expérimentales, la doxorubicine à la concentration utilisée n'a pas montré un effet apoptotique significatif (20% d'apoptose). Par contre, la combinaison de la doxorubicine avec certains polyphénols comme la naringénine, la catéchine, la quercétine, la génisteine et la daidzéine a montré une augmentation significative de l'activité de la doxorubicine par augmentation significative de pourcentage de cellules mortes jusqu'à 40% avec la naringénine et la catéchine, 50% avec la génisteine et la daidzéine, et 60% avec la quercétine. Par contre, avec les « HepaPSU » cultivées en condition 2, seuls certains polyphénols comme la quercétine, la daidzéine et la lutéoline étaient capables d'augmenter de manière significative l'activité apoptotique de la doxorubicine par augmentation significative du pourcentage de cellules mortes jusqu'à 38% avec la daidzéine, 35% avec la lutéoline et 57% avec la quercétine. Selon le mode de culture de nos cellules, les réponses apoptotiques de la doxorubicine en présence des polyphénols sont différentes en termes de pourcentage d'apoptose avec une diminution dans les cellules optimisées (diminution significative du pourcentage d'apoptose de la naringénine, la catéchine, la génisteine et la daidzeine de 20 %, 25 %, 18% et 10% respectivement) par rapport aux cellules « HepaPSU » en condition 1. De plus, seuls certains flavonoïdes répondent. En effet la naringénine (flavanone) et la catéchine (flavanol) ne répondent pas dans les cellules optimisées. Ces flavonoïdes sont connus

pour être des inhibiteurs de MDR1. Or, dans nos conditions expérimentales les cellules « HepaPSU » optimisées surexpriment les MDR1 par rapport aux cellules « HepaPSU » en condition 1 (première partie de la thèse). Ces différences des résultats entre les modes de culture des cellules sont certainement dues à la différence de l'expression des transporteurs d'efflux et à la différence de puissance de l'inhibition de MDR1 de chacun des polyphénols testés.

En utilisant les cellules pancréatiques AsPC-1 dans nos conditions expérimentales, les polyphénols seuls et la gemcitabine seule n'ont pas montré d'effets apoptotiques significatifs. Par contre, la combinaison de la gemcitabine avec certains polyphénols comme la catéchine, la rhamnétine, la lutéoline, la quercétine, la daidzéine ou la bergamottine a montré une augmentation significative de l'activité apoptotique de la gemcitabine par augmentation significative du pourcentage des cellules mortes jusqu'à 40% avec la lutéoline et la daidzéine, 50% avec la catéchine, la rhamnétine et la bergamottine, 50% avec la génistéine et 60% avec la quercétine. La combinaison de ces médicaments anticancéreux avec des polyphénols naturels montre une potentialisation significative de l'effet apoptotique de ces médicaments (augmentation du pourcentage d'apoptose au niveau des cellules cancéreuses combinées avec la bergamottine, catéchine et quercétine) (Hassan S. et al, J Pharmaceut Res 2017).

Nos résultats montrent que les cellules pancréatiques et hépatiques cultivées en 2D résistent respectivement à la gemcitabine et à la doxorubicine seule (pourcentage d'apoptose des cellules cancéreuses inférieur à 20%), mais la combinaison de ces médicaments anticancéreux avec des polyphénols naturels montre une potentialisation significative de l'effet apoptotique de ces médicaments. Les mécanismes mis en jeu impliqueraient la modulation des transporteurs MDR1. En effet, certains polyphénols sont des puissants inhibiteurs de l'activité de MDR1 (dans nos conditions expérimentales la bergamottine et quercétine inhibent près de 80% de l'activité de MDR1 (article 4 figure 5)). De plus, nous avons montré que la combinaison de la gemcitabine avec la bergamottine augmente l'expression de p53 et de la caspase-3 clivée dans les cellules pancréatiques cancéreuses (Hassan S. et al, Biochem Pharmacol, 2017), (Hassan S. et al, Int J Cur Adv Res, 2017). L'inhibition des transporteurs d'efflux joue ainsi un rôle vital dans la réponse des cellules tumorales aux agents chimiques. Cette inhibition est responsable de l'augmentation de la concentration intracellulaire des médicaments anticancéreux qui sont capables d'agir en déclenchant la mort des cellules cancéreuses.

Ainsi, afin de maintenir les caractéristiques du microenvironnement de la tumeur native et les intercommunications et d'être plus représentatif de la situation *in vivo*, nous avons réalisé les mêmes expériences dans les cellules cultivées en 3D (sphéroïdes). Cependant, dans ces conditions expérimentales, après incubation des médicaments seuls et en présence ou non des polyphénols avec les cellules pancréatiques AsPC-1 ou nos cellules hépatiques, les cellules ne meurent pas par apoptose (pourcentage d'apoptose inférieur à 10 %) et résistent aux médicaments anticancéreux seuls et en combinaison avec les polyphénols, certainement dus à l'état d'hypoxie des cellules. Pour les cellules AsPC-1, nos résultats montrent une diminution significative des pourcentages d'apoptose des cellules cultivées en 3D par rapport aux cellules en 2D pour la catéchine, la daidzéine et la bergamottine (diminution de 50%, 20% et 50% respectivement). De même, pour les « HepaPSU », nos résultats montrent une diminution significative du pourcentage d'apoptose des cellules cultivées en 3D par rapport aux cellules « HepaPSU » en condition 1 pour la naringénine, la catéchine, la génistéine et la daidzéine (diminution de 30%, 35%, 40% et 20% respectivement). En particulier, la bergamottine qui, dans les cellules AsPC-1 en 2D est capable d'augmenter l'effet apoptotique de la gemcitabine n'a plus cette capacité sur les cellules cultivées en 3D, certainement à cause de la surexpression des MDR1 dans les sphéroïdes. Les polyphénols qui sont des inhibiteurs des MDR1 ne semblent plus avoir cette capacité d'interagir avec les anticancéreux dans les cellules cultivées en 3D. Cependant, la quercétine en présence de gemcitabine ou doxorubicine, entraîne une augmentation de l'effet apoptotique de ces anticancéreux de façon similaire dans les cellules pancréatiques et hépatiques cultivées en 2D et en 3D. Nos résultats nous permettent de faire l'hypothèse que la quercétine est capable d'augmenter l'activité apoptotique des anticancéreux en culture 3D grâce à son pouvoir inhibiteur de l'effecteur initial de l'hypoxie HIF-1 alpha. Afin d'étudier le mécanisme d'apoptose de la quercétine dans ces conditions, nous avons étudié l'effet de la quercétine seul et en présence des anticancéreux sur l'expression de HIF-1 alpha. Nos résultats montrent une augmentation significative de l'expression de p53 (augmentation de 5 fois), ainsi qu'une diminution significative du facteur HIF-1 alpha (diminution de 3 fois) dans les cellules traitées avec la quercétine associée aux anticancéreux par rapport aux cellules non traitées avec la quercétine. Nos résultats nous permettent de faire l'hypothèse que la quercétine est capable d'augmenter l'activité apoptotique des anticancéreux en culture 3D grâce à son pouvoir inhibiteur de l'effecteur initial de l'hypoxie HIF-1 alpha. En effet, les polyphénols sont connus pour leurs activités anti-oxydantes par inhibition de la génération des ROS (espèces réactives de l'oxygène) qui peuvent changer selon l'environnement et le type cellulaire (Apostolou et al. 2013)

(Huyut, Beydemir, and Gülçin 2017). Les ROS sont générés d'une manière continue au niveau des cellules cancéreuses ce qui cause l'augmentation de la multiplication et la prolifération des cellules tumorales (Gu et al. 2018). Il a été démontré que les ROS jouaient un rôle important dans la régulation et la stabilisation de HIF-1 alpha au niveau des cellules tumorales (Seo et al. 2016). Dans les tumeurs *in vivo* et en culture 3D, HIF-1 alpha activée par l'hypoxie, est connu pour augmenter l'expression des transporteurs d'efflux au niveau des cellules cancéreuses. Dans notre étude, nous avons montré que les polyphénols possédaient la capacité d'augmenter l'activité apoptotique de certains agents anticancéreux médiés par l'inhibition des transporteurs d'efflux type MDR1. Par contre, les cellules cultivées en 3D ont montré une résistance non négligeable par rapport aux mêmes combinaisons. Cette réponse peut être expliquée par le changement d'environnement, un pH acide et la surexpression des MDR1 dans les cellules hépatiques et pancréatiques cultivées en 3D qui rend les polyphénols incapables de modifier l'activité des anticancéreux. De plus, les flavonoïdes montrent des réponses différentes en fonction de l'environnement et du pH du milieu. En effet, il a été confirmé dans la littérature que les réponses des flavonoïdes dépendaient de la variation du pH. Par contre, seule la quercétine a montré une activité significative sur les cellules sous forme de sphéroïdes puisque l'activité de la quercétine est connue pour agir quel que soit le pH. La quercétine est un flavonoïde essentiel dans le règne végétal et qui a beaucoup été étudié *in vitro* et *in vivo* et a montré des effets bénéfiques sur la santé de l'homme comme la prévention du cancer (G. Wang et al. 2012). Récemment il a été démontré que la quercétine pouvait inhiber l'expression de VEGF dans les tumeurs et dans les cellules LNCaP, CX-1 et SkBr3 cultivées en 3D ce qui corrèle parfaitement avec nos résultats.

Nous avons ainsi pu montrer que la quercétine possédait un pouvoir inhibiteur de HIF-1 alpha expliqué en partie par son activité anti-oxydante en inhibant les ROS qui possèdent un rôle non négligeable dans la stabilisation de HIF-1 alpha sous un environnement pauvre en oxygène. Ainsi, les polyphénols, telle que la quercétine, pourraient être une nouvelle stratégie dans l'association avec les médicaments pour optimiser les traitements par inhibition des MDR1 et inhibition de HIF-1 alpha sur les cellules en 3D.

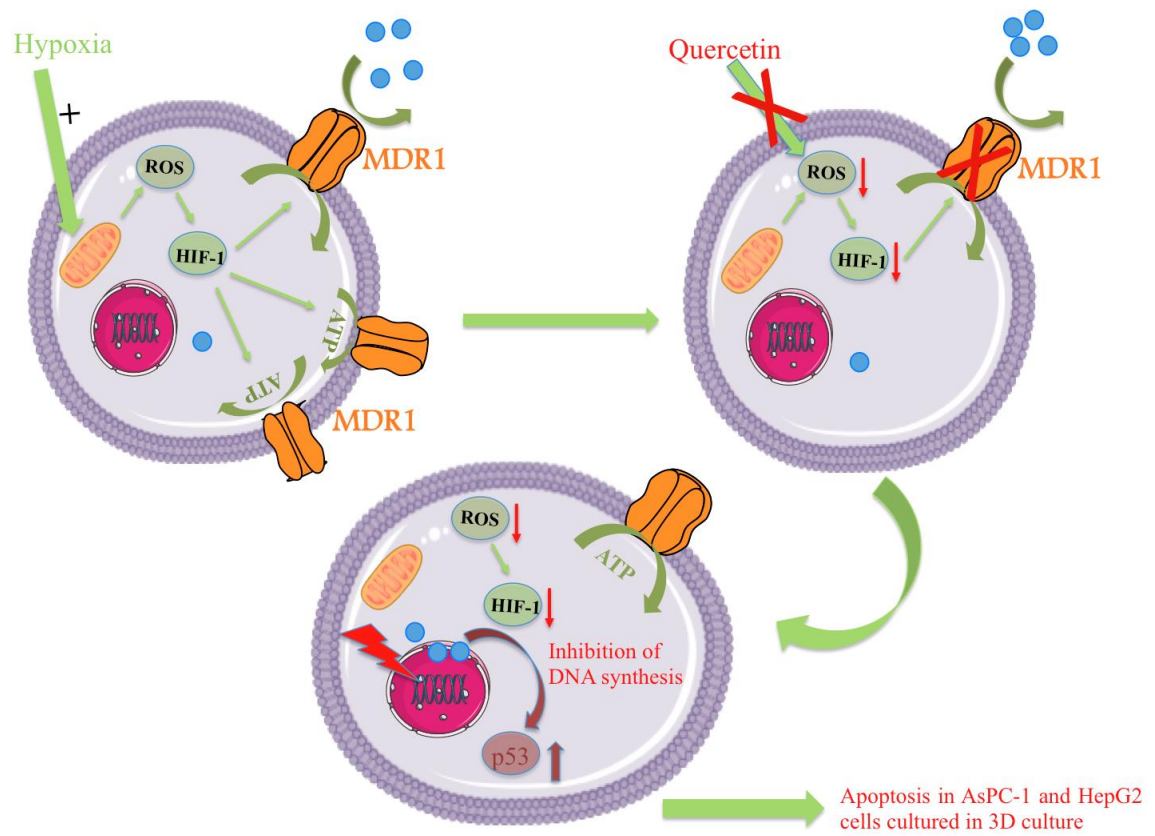


Figure 61 : Mécanisme proposé de la potentialisation des activités des anticancéreux par la quercétine sur les cellules cultivées en 3D

Conclusion et perspectives

En conclusion, nos résultats ont montré clairement que nous avons mis en place une nouvelle lignée hépatique humaine qui fait l'objet d'un très bon modèle de prédiction d'hépatotoxicité en exprimant suffisamment et significativement les enzymes et les transporteurs hépatiques trouvés au niveau des hépatocytes *in vivo*. Ce modèle pourrait être ainsi un outil de choix dans les études précliniques de métabolisme et d'hépatotoxicité. Néanmoins, la caractérisation de notre nouvelle lignée doit être poursuivie et nos résultats d'expression des cytochromes P450 et des transporteurs doivent être comparés aux HepaRG et aux hépatocytes primaires.

Nous avons montré que la combinaison des médicaments anticancéreux avec les polyphénols peut augmenter leur activité apoptotique des cellules hépatiques et pancréatiques cultivées en 2D. Ces combinaisons ont été testées sur les cellules cultivées en 3D connues pour avoir des caractéristiques proches de la situation *in vivo* par rapport aux cellules cultivées en 2D. Nous avons observé que le modèle de cellules pancréatiques et hépatiques dans un environnement 3D était plus prédictif d'une tumeur *in vivo* et pourrait être un modèle de choix pour des études pharmacologiques de criblage de nouveaux médicaments anticancéreux ou pour des stratégies de combinaisons de molécules. Dans ce contexte, nos résultats ont montré que certains polyphénols permettaient à certains anticancéreux d'être plus actifs en leur permettant d'atteindre leur cible, en entrant dans les cellules, en induisant leur apoptose et en diminuant la chimiorésistance par inhibition de l'activité des transporteurs d'efflux, ainsi que par diminution de l'expression de HIF-1 alpha, dans les cellules cancéreuses cultivées dans des conditions 3D prédictives des tumeurs *in vivo*. De plus, la quercétine pourrait être un outil pharmacologique pour mieux comprendre les mécanismes de résistance acquise en culture 3D. Puisque les enzymes qui métabolisent les médicaments et les transporteurs membranaires jouent un rôle clé dans l'activation et la désactivation des médicaments et la détoxification de l'organisme, l'élucidation des influences du métabolisme de ces médicaments qui se produit dans le foie est une étape extrêmement importante dans le développement de nouveaux médicaments anticancéreux. Compte tenu du besoin continu de rechercher des chimiothérapies sûres et efficaces avec une moindre toxicité, les études sur le métabolisme des nouveaux médicaments puissants sont indispensables à mettre en œuvre très tôt dans le développement des médicaments. Pour ces raisons et afin de se rapprocher de l'environnement des tumeurs pancréatiques ou hépatiques et de mieux comprendre des interrelations de ces 2 organes dans la réponse aux traitements, nos

perspectives seront de développer un nouveau modèle cellulaire *in vitro* de co-culture foie-pancréas, par transfert de milieu ou dans des inserts, afin de tester l'activité des nouvelles molécules et des combinaisons avec des substances naturelles. De plus, dans le but d'améliorer ce modèle de co-culture et de prendre en compte le microenvironnement de la tumeur, il serait pertinent d'y intégrer la vascularisation. Le développement de ce modèle de co-culture humain de cellules de foie et de pancréas vascularisé serait un bon modèle alternatif i) pour comprendre les interrelations existantes entre le foie et le pancréas et la progression du cancer pancréatique et ii) pour expliquer en partie la résistance aux traitements du cancer pancréatique par altération et inactivation des médicaments anticancéreux par métabolisme hépatique. Ce modèle pourra servir également d'outil *in vitro* pour sélectionner de nouvelles molécules à activité anticancéreuse et/ou pour tester de nouvelles stratégies par association de médicaments et/ou de molécules bioactives dans l'optique de trouver des traitements plus efficaces tout en diminuant leur toxicité dans un système cellulaire intégré.

Bibliographie

- Afanas'ev I, Dorozhko A, Brodskii A, Kostyuk V and Potapovitch A 1989. "Chelating and Free Radical Scavenging Mechanisms of Inhibitory Action of Rutin and Quercetin in Lipid Peroxidation." *Biochemical pharmacology* 38(11): 1763–69.
- Alexakis N, Halloran C, Raraty M, Ghaneh P, Sutton R and Neoptolemos P. 2004. "Current Standards of Surgery for Pancreatic Cancer." *British journal of surgery* 91(11): 1410–27.
- Antolino-Lobo I, Meulenbelt J, Nijmeijer SM, Maas-Bakker RF, Meijerman I, van den Berg M and van Duursen M 2011. "3,4-Methylenedioxymethamphetamine (MDMA) Interacts with Therapeutic Drugs on CYP3A by Inhibition of Pregnane X Receptor (PXR) Activation and Catalytic Enzyme Inhibition." *Toxicology letters* 203(1): 82–91.
- Apostolou A, Stagos D, Galitsiou E, Spyrou A, Haroutounian S, Portesis N, Trizoglou I, Wallace Hayes A, Tsatsakis AM and Kouretas D. 2013. "Assessment of Polyphenolic Content, Antioxidant Activity, Protection against ROS-Induced DNA Damage and Anticancer Activity of Vitis Vinifera Stem Extracts." *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* 61: 60–68.
- Aragonès G, Francesca D, Daniele D, and Pedro M. 2017. "The Importance of Studying Cell Metabolism When Testing the Bioactivity of Phenolic Compounds." *Trends in Food Science & Technology* 69: 230–42.
- Asa L. 2011. "Pancreatic Endocrine Tumors." *Modern Pathology* 24(S2): S66–77.
- Aznavoorian S, Stracke ML, Krutzsch H, Schiffmann E and Liotta L.. 1990. "Signal Transduction for Chemotaxis and Haptotaxis by Matrix Molecules in Tumor Cells." *The Journal of cell biology* 110(4): 1427–38.
- Bardeesy N, and Ronald A. 2002. "Pancreatic Cancer Biology and Genetics." *Nature Reviews Cancer* 2(12): 897–909.
- Bazou D, Nir M, Gabriel G, and Lance L. 2016. "Self-Assembly of Vascularized Tissue to Support Tumor Explants in Vitro." *Integrative biology : quantitative biosciences from nano to macro* 8(12): 1301–11.
- Beaugerie L and Sokol H. 2014. "Les Fondamentaux de La Pathologie Digestive." *CDU-HGE - Editions Elsevier-Masson*: 1–17.
- Beck B and Blam. 2011. "A Vascular Niche and a VEGF-Nrp1 Loop

- Regulate the Initiation and Stemness of Skin Tumours.” *Nature* 478(7369): 399–403.
- Becker A and Lyden D. 2016. “Extracellular Vesicles in Cancer: Cell-to-Cell Mediators of Metastasis.” *Cancer cell* 30(6): 836–48.
- Bell C, Juhila S, Richert L and Ingelman-Sundberg M. 2018. “Comparison of Hepatic 2D Sandwich Cultures and 3D Spheroids for Long-Term Toxicity Applications: A Multi-Center Study.” *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*.
- Bell H, Whittle I, Walker M, Leaver H and Wharton S. 2001. “The Development of Necrosis and Apoptosis in Glioma: Experimental Findings Using Spheroid Culture Systems.” *Neuropathology and applied neurobiology* 27(4): 291–304.
- Benhamouch, S and Colnot S. 2006. “Apc Tumor Suppressor Gene Is the ‘Zonation-Keeper’ of Mouse Liver.” *Developmental Cell* 10(6): 759–70.
- Benien P and Archana S. 2014. “3D Tumor Models: History, Advances and Future Perspectives.” *Future oncology (London, England)* 10(7): 1311–27.
- Benz I. 2011. “Rôle Des Transporteurs Dans L’élimination Des Médicaments et Leurs Effets Indésirables.” *La lettre du Pharmacologue* 25(1): 130–37.
- Bianchi S and Pichelin F 2014. “Analysis of the Structure of Condensed Tannins in Water Extracts from Bark Tissues of Norway Spruce.” *Industrial Crops and Products* 61: 430–37.
- Bilal S, Khan A, Waqas M, Shahzad R, Kim I, Lee I and Shin D 2016. “Biochemical Constituents and in Vitro Antioxidant and Anticholinesterase Potential of Seeds from Native Korean Persimmon Genotypes.” *Molecules (Basel, Switzerland)* 21(7).
- Bissell M and Radisky D. 2001. “Putting Tumours in Context.”. *Cancer* 1(1): 46–54.
- Blouin A, Bolender R, and Weibel E. 1977. “Distribution of Organelles and Membranes between Hepatocytes and Nonhepatocytes in the Rat Liver Parenchyma. A Stereological Study.” *Journal of Cell Biology* 72(2): 441–55.
- Boubekri C. 2014. “Etude de L’activité Antioxydante Des Polyphénols Extraits de Solanum Melongena Par Des Techniques Electrochimiques.” : 176.

- Bouchenak M and Myriem L. 2013. "Nutritional Quality of Legumes, and Their Role in Cardiometabolic Risk Prevention: A Review." *Journal of medicinal food* 16(3): 185–98.
- Van B, Leon F, Roland B, and Wouter P. 2017. "Mimicking Tumors: Toward More Predictive In Vitro Models for Peptide- and Protein-Conjugated Drugs." *Bioconjugate chemistry* 28(3): 846–56.
- Breslin S and O'Driscoll L. 2013. "Three-Dimensional Cell Culture: The Missing Link in Drug Discovery." *Drug discovery today* 18(5–6): 240–49.
- Briz O, Martin S and Marin J. 2006. "OATP8/1B3-Mediated Cotransport of Bile Acids and Glutathione: An Export Pathway for Organic Anions from Hepatocytes?" *Journal of Biological Chemistry* 281(41): 30326–35.
- Broeders J, Hermens J and Blaauboer B. 2015. "Biokinetics of Chlorpromazine in Primary Rat and Human Hepatocytes and Human HepaRG Cells after Repeated Exposure." *Toxicology in vitro: an international journal published in association with BIBRA* 30(1): 52–61.
- Brouwer K, Rieder M and Wildt S. 2016. "Recommendations of the Pediatric Transporter." *clinical pharmacology and therapeutics* 98(3): 266–87.
- Brunner T and Martin S. 2010. "The Role of Radiotherapy in Multimodal Treatment of Pancreatic Carcinoma." *Radiation oncology (London, England)* 5(1): 64.
- Buchler W, Uhl W, Friess H and Z'graggen K. 2003. "Changes in Morbidity after Pancreatic Resection: Toward the End of Completion Pancreatectomy." *Archives of surgery (Chicago, Ill. : 1960)* 138(12): 1310–4; 1315.
- Burke D, Chia-Ning S, Kate L, and David T. 2006. "Characterization of Liver Function in Transdifferentiated Hepatocytes." *Journal of cellular physiology* 206(1): 147–59.
- Burris H, Moore M, Andersen J, Green M, Rothenberg M, Modiano M et al. 1997. "Improvements in Survival and Clinical Benefit with Gemcitabine as First-Line Therapy for Patients with Advanced Pancreas Cancer." *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology* (15): 2403–13.
- Cao Z, Shang B, Zhang G, Miele L, Sarkar FH, Wang Z and Zhou Q.. 2013. "Tumor Cell-Mediated Neovascularization and Lymphangiogenesis

- Contrive Tumor Progression and Cancer Metastasis.” *Biochimica et biophysica acta* 1836(2): 273–86.
- Cariou B, Kuipers F and Staels B. 2006. “The Farnesoid X Receptor Modulates Adiposity and Peripheral Insulin Sensitivity in Mice.” *Journal of Biological Chemistry* 281(16): 11039–49.
- Cascinu S, Celleribo R and Catalano C. 1999.- A Combination of Gemcitabine and 5-Fluorouracil in Advanced Pancreatic Cancer, a Report from the Italian Group for the Study of Digestive Tract Cancer (GISCAD).” *British journal of cancer* 80(): 1595–98.
- Cassim S, Valerie R, Pascal L and Marc B. 2017. “From in Vivo to in Vitro: Major Metabolic Alterations Take Place in Hepatocytes during and Following Isolation.” *PloS one* 12(12): e0190366.
- Cheng A and Xiangian C. 2014. “Polyphenols from Blueberries Modulate Inflammation Cytokines in LPS-Induced RAW264.7 Macrophages.” *International journal of biological macromolecules* 69: 382–87.
- Cheyrier V. 2005. “Polyphenols in Foods Are More Complex than Often Thought.” *American journal of clinical nutrition* 81(1 Suppl): 223S–229S.
- Clifford N, Justin J and Alan C. 2013. “Human Studies on the Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion of Tea Polyphenols.” *American journal of clinical nutrition* 98(6 Suppl): 1619S–1630S.
- Collier J, and Donald K. 2004. “Sweet Changes: Glucose Homeostasis Can Be Altered by Manipulating Genes Controlling Hepatic Glucose Metabolism.” *Molecular Endocrinology* 18(5): 1051–63.
- Colucci G Maiello E and Lopez M.. 2002. “Gemcitabine Alone or with Cisplatin for the Treatment of Patients with Locally Advanced And/or Metastatic Pancreatic Carcinoma: A Prospective, Randomized Phase III Study of the Gruppo Oncologia dell’Italia Meridionale.” *Cancer* 94(4): 902–10.
- Conotte S Zouaoui Boudjeltia K and Legrand A. 2018. “Metabonomic Profiling of Chronic Intermittent Hypoxia in a Mouse Model.” *Respiratory physiology & neurobiology* 256:157-173.
- Cullinan S, Marschke R and Foley J. 1985. “A Comparison of Three Chemotherapeutic Regimens in the Treatment of Advanced Pancreatic and Gastric Carcinoma. Fluorouracil vs Fluorouracil and Doxorubicin vs Fluorouracil, Doxorubicin, and Mitomycin.” *Journal of American Medical Association* 253(14): 2061–67.

- Cunningham D, Herrmann R and Neoptolemos J. 2009. "Phase III Randomized Comparison of Gemcitabine versus Gemcitabine plus Capecitabine in Patients with Advanced Pancreatic Cancer." *Journal of Clinical Oncology* 27(33): 5513–18.
- Custodio J, Chi Y, and Leslie Z. 2008. "Predicting Drug Disposition, Absorption/elimination/transporter Interplay and the Role of Food on Drug Absorption." *Advanced drug delivery reviews* 60(6): 717–33.
- D'Archivio M, Scazzocchio B, and Roberta Masella R. 2010. "Bioavailability of the Polyphenols: Status and Controversies." *International Journal of Molecular Sciences* 11(4): 1321–42.
- Dankers A, Russel F and Masereeuw R. 2012. "Localization of Breast Cancer Resistance Protein (Bcrp) in Endocrine Organs and Inhibition of Its Transport Activity by Steroid Hormones." *Cell and Tissue Research* 349(2): 551–63.
- Delpu Y, Hanoun N, Lulka H, Sicard F, Selves J, Buscail L, Torrisani J and Cordelier P. 2011. "Genetic and Epigenetic Alterations in Pancreatic Carcinogenesis." *Current Genomics* 12(1): 15–24.
- Dembinska A, Otto M, Beata K, and Hannu My. 2008. "Antioxidant Phytochemicals against Type 2 Diabetes." *The British journal of nutrition* 99 E Suppl: ES109-17.
- Demols A, Hendlisz A and Van Laethem J. 2006. "Gemcitabine and Oxaliplatin (GEMOX) in Gemcitabine Refractory Advanced Pancreatic Adenocarcinoma: A Phase II Study." *British journal of cancer* 94(4): 481–85.
- Desai J and Udugamasooriya D. 2016. "Identification of Lipid-Phosphatidylserine (PS) as the Target of Unbiasedly Selected Cancer Specific Peptide-Peptoid Hybrid PPS1." *Oncotarget* 7(21): 30678–90.
- Deutsch G, Jung J, Zheng M, Lóra J and Zaret K.. 2001. "A Bipotential Precursor Population for Pancreas and Liver within the Embryonic Endoderm." *Development (Cambridge, England)* 128(6): 871–81.
- Doktorova Y, Herwig R and Rogiers V. 2014. "Testing Chemical Carcinogenicity by Using a Transcriptomics Heparg-Based Model?" *Experimental and Clinical Sciences* 13: 623–37.
- Donato T, Laia T, and Maria J. 2015. "Culture and Functional Characterization of Human Hepatoma HepG2 Cells." *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 1250: 77–93.
- Duda-Chodak A, Tomasz T, Paweł S, and Paweł S. 2015. "Interaction of

- Dietary Compounds, Especially Polyphenols, with the Intestinal Microbiota: A Review.” *European Journal of Nutrition* 54(3): 325–41.
- Eales K and Tennant D. 2016. “Hypoxia and Metabolic Adaptation of Cancer Cells.” *Oncogenesis* 5(1): e190.
- El-Serag B. 2011. “Hepatocellular Carcinoma.” *New England Journal of Medicine* 365(12): 1118–27.
- Elkiweri A and Henthorn T. 2009. “Competitive Substrates for P-Glycoprotein and Organic Anion Protein Transporters Differentially Reduce Blood Organ Transport of Fentanyl and Loperamide: Pharmacokinetics and Pharmacodynamics in Sprague-Dawley Rats.” *Anesthesia and analgesia* 108(1): 149–59.
- Ellem J , and Gail P. 2014. “In Vitro Modeling of the Prostate Cancer Microenvironment.” *Advanced drug delivery reviews* 79–80: 214–21.
- Evans B and Wolff R. 2008. “Preoperative Gemcitabine-Based Chemoradiation for Patients with Resectable Adenocarcinoma of the Pancreatic Head.” *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 26(21): 3496–3502.
- Faggio C and Nabavi S. 2017. “Flavonoids and Platelet Aggregation: A Brief Review.” *European journal of pharmacology* 807: 91–101.
- Fahrmayr C, Martin F, and Jorg K. 2010. “Hepatic OATP and OCT Uptake Transporters: Their Role for Drug-Drug Interactions and Pharmacogenetic Aspects.” *Drug metabolism reviews* 42(3): 380–401.
- Ferber S, Kaiser N and Karasik A. 2000. “Pancreatic and Duodenal Homeobox Gene 1 Induces Expression of Insulin Genes in Liver and Ameliorates Streptozotocin-Induced Hyperglycemia.” *Nature medicine* 6(5): 568–72.
- Ferlay J, Forman D and Bray F. 2013. “Cancer Incidence and Mortality Patterns in Europe: Estimates for 40 Countries in 2012.” *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* 49(6): 1374–1403.
- Ferlay J, Shin H, Bray F, Forman D, Mathers C and Parkin D. 2010. “Estimates of Worldwide Burden of Cancer in 2008: GLOBOCAN 2008.” *International Journal of Cancer* 127(12): 2893–2917.
- Flecknell P. 2002. “Replacement, Reduction and Refinement.” *Alternative to Animal Experimentation* 19(2): 73–78.
- Friedman L. 2006. “Transcriptional Regulation of Stellate Cell Activation.” *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 21: S79–83.

- Fukumura D, and Rakesh K. 2007. “Tumor Microenvironment Abnormalities: Causes, Consequences, and Strategies to Normalize.” *Journal of cellular biochemistry* 101(4): 937–49.
- Furuyama K, Nakamura T and Uemoto S. 2011. “Continuous Cell Supply from a Sox9-Expressing Progenitor Zone in Adult Liver, Exocrine Pancreas and Intestine.” *Nature Genetics* 43(1): 34–41.
- Gibson E, Liu E and Shi C. 2018. “Hepatic Micrometastases Are Associated with Poor Prognosis in Patients with Liver Metastases from Neuroendocrine Tumors of the Digestive Tract.” *Human pathology* 79:109-115.
- Gradwohl G, Dierich L, and Guillemo Ft. 2000. “Neurogenin3 Is Required for the Development of the Four Endocrine Cell Lineages of the Pancreas.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(4): 1607–11.
- Grego S and Yoon M. 2017. “Systems Biology for Organotypic Cell Cultures.” *ALTEX* 34(2): 301–10.
- Grosse-Siestrup C, Fischer A and Groneberg D. 2002. “Isolated Hemoperfused Slaughterhouse Livers as a Valid Model to Study Hepatotoxicity.” *Toxicologic pathology* 30(6): 749–54.
- Gu H and Weing Y 2018. “Reactive Oxygen Species-Mediated Tumor Microenvironment Transformation: The Mechanism of Radioresistant Gastric Cancer.” *Oxidative medicine and cellular longevity* 2018: 5801209.
- Guan Y, and Yuan L. 2006. “Interventional Treatments for Hepatocellular Carcinoma.” *Hepatobiliary & pancreatic diseases international: HBPD INT* 5(4): 495–500.
- Guéguen Y, Gourmelon P and Souidi M. 2006. “[Cytochromes P450: Xenobiotic Metabolism, Regulation and Clinical Importance].” *Annales de biologie clinique* 64(6): 535—548
- Guillouzo A, Corlu A, Aninat C, Glaise D, Morel F and Guguen-Guillouzo C. 2007. “The Human Hepatoma HepaRG Cells: A Highly Differentiated Model for Studies of Liver Metabolism and Toxicity of Xenobiotics.” *Chemico-biological interactions* 168(1): 66–73.
- Guillouzo A and Guguen-Guillouzo C. 2008. “Evolving Concepts in Liver Tissue Modeling and Implications for in Vitro Toxicology.” *Expert opinion on drug metabolism & toxicology* 4(10): 1279–94.
- Gural N, Sattabongkot J and Bhatia S. 2018. “In Vitro Culture, Drug

- Sensitivity, and Transcriptome of Plasmodium Vivax Hypnozoites.” *Cell host & microbe* 23(3):395-406.
- Hagerman E. 2010. “Hydrolyzable Tannin Structural Chemistry.” *Tannin Handbook*: 1–8.
- Haines C, Elcombe C and Lake B. 2018. “Comparison of the Effects of Sodium Phenobarbital in Wild Type and Humanized Constitutive Androstane Receptor (CAR)/pregnane X Receptor (PXR) Mice and in Cultured Mouse, Rat and Human Hepatocytes.” *Toxicology*.
- Hanahan D, and Weinberg A. 2000. “The Hallmarks of Cancer.” *Cell* 100(1): 57–70.
- Hanslickr L, Mennerick S and Farber N.. 2009. “Dimethyl Sulfoxide (DMSO) Produces Widespread Apoptosis in the Developing Central Nervous System.” *Neurobiology of disease* 34(1): 1–10.
- Hariparsad N, Brian A, Raymond E, and Xiaoyan C. 2008. “Comparison of Immortalized Fa2N-4 Cells and Human Hepatocytes as in Vitro Models for Cytochrome P450 Induction.” *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 36(6): 1046–55.
- Haugk B. 2010. “Pancreatic Intraepithelial Neoplasia-Can We Detect Early Pancreatic Cancer?” *Histopathology* 57(4): 503–14.
- Henry J, Rivers P, and Payne R. 1988. “Protein and Energy Metabolism in Starvation Reconsidered.” *European journal of clinical nutrition* 42(7): 543–49.
- Heppner M, DiMarchi R and Tschöp M. 2010. “Glucagon Regulation of Energy Metabolism.” *Physiology & behavior* 100(5): 545–48.
- Hernaiz A and Fito M. 2015. “Olive Oil Polyphenols Decrease LDL Concentrations and LDL Atherogenicity in Men in a Randomized Controlled Trial.” *The Journal of nutrition* 145(8): 1692–97.
- Higuchi S, Wu R, Zhou M, Ravikumar T and Wang P. 2007. “Downregulation of Hepatic Cytochrome P-450 Isoforms and PPAR-Gamma: Their Role in Hepatic Injury and Proinflammatory Responses in a Double-Hit Model of Hemorrhage and Sepsis.” *Journal of surgical research* 137(1): 46–52.
- Higuchi Y and suemizo H. 2016. “Functional Polymer-Dependent 3D Culture Accelerates the Differentiation of HepaRG Cells into Mature Hepatocytes.” *Hepatology research : the official journal of the Japan Society of Hepatology* 46(10): 1045–57.
- Hillen F and Arjan G. 2007. “Tumour Vascularization: Sprouting

- Angiogenesis and beyond.” *Cancer and Metastasis Reviews* 26(3–4): 489–502.
- Hirschhaeuser F, Mueller-Klieser W and Kunz-Schughart L. 2010. “Multicellular Tumor Spheroids: An Underestimated Tool Is Catching up Again.” *Journal of Biotechnology* 148(1): 3–15.
- Hirt C and Spaqnoli G. 2014. “‘In Vitro’ 3D Models of Tumor-Immune System Interaction.” *Advanced Drug Delivery Reviews* 79–80: 145–54.
- Horsman R, and Jens O. 2016. “The Impact of Hypoxia and Its Modification of the Outcome of Radiotherapy.” *Journal of Radiation Research* 57(S1): i90–98.
- Hu B, Xixia L, Chunlan Z and Xiaoxiong Z. 2017. “Food Macromolecule Based Nanodelivery Systems for Enhancing the Bioavailability of Polyphenols.” *Journal of food and drug analysis* 25(1): 3–15.
- Huggett T, and Stephen P. 2011. “Diagnosing and Managing Pancreatic Cancer.” *The Practitioner* 255(1742): 2-3-25.
- Hughes K, Steven K and Robert M. 2004. “Hepatoid Carcinoma of the Pancreas.” *American Surgeon* 70(11): 1030–33. ???
- Hutchinson L, and Rebecca K. 2011. “High Drug Attrition Rates--Where Are We Going Wrong?” *Nature reviews. Clinical oncology* 8(4): 189–90.
- Imamura Y, Nakatsura T and Minami H. 2015. “Comparison of 2D- and 3D-Culture Models as Drug-Testing Platforms in Breast Cancer.” *Oncology reports* 33(4): 1837–43.
- Irani S and Arash D. 2017. “Expression of Vascular Endothelial-Cadherin in Mucoepidermoid Carcinoma: Role in Cancer Development.” *Journal of International Society of Preventive & Community Dentistry* 7(6): 301–7.
- Iyanagi T. 2007. “Molecular Mechanism of Phase I and Phase II Drug-Metabolizing Enzymes: Implications for Detoxification.” *International review of cytology* 260: 35–112.
- Jancova P, Pavel A, and Eva A. 2010. “Phase II Drug Metabolizing Enzymes.” *Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czechoslovakia* 154(2): 103–16.
- Jennen J and Delft J. 2010. “Comparison of HepG2 and HepaRG by Whole-Genome Gene Expression Analysis for the Purpose of Chemical Hazard Identification.” *Toxicological sciences : an official*

journal of the Society of Toxicology 115(1): 66–79.

- Jigorel E, Le Vee M, Boursier-Neyret C, Parmentier Y and Fardel O. 2006. “Differential Regulation of Sinusoidal and Canalicular Hepatic Drug Transporter Expression by Xenobiotics Activating Drug-Sensing Receptors in Primary Human Hepatocytes.” *Drug Metabolism and Disposition* 34(10): 1756–63.
- Jimenez V, Sun S and Wirtz D. 2015. “Collective Cancer Cell Invasion Induced by Coordinated Contractile Stresses.” *Oncotarget* 6(41): 43438–51.
- Johnson J, Arbuck S, Hollingshead M and Sausville E. 2001. “Relationships between Drug Activity in NCI Preclinical in Vitro and in Vivo Models and Early Clinical Trials.” *British journal of cancer* 84(10): 1424–31.
- Juliano R and Ling V. 1976. “A Surface Glycoprotein Modulating Drug Permeability in Chinese Hamster Ovary Cell Mutants.” *Biochimica et biophysica acta* 455(1): 152–62.
- Kadoma Y and Seiichiro F. 2008. “A Comparative Study of the Radical-Scavenging Activity of the Phenolcarboxylic Acids Caffeic Acid, P-Coumaric Acid, Chlorogenic Acid and Ferulic Acid, with or without 2-Mercaptoethanol, a Thiol, Using the Induction Period Method.” *Molecules (Basel, Switzerland)* 13(10): 2488–99.
- Kamb A. 2005. “What’s Wrong with Our Cancer Models?” *Nature reviews. Drug discovery* 4(2): 161–65.
- Kampa M, Nifli A, Notas G and Castanas E. 2007. “Polyphenols and Cancer Cell Growth.” *Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology* 159: 79–113.
- Karamac M and Ronald B. 2009. “Limitations of the Tetramethylmurexide Assay for Investigating the Fe(II) Chelation Activity of Phenolic Compounds.” *Journal of agricultural and food chemistry* 57(14): 6425–31.
- Karlgren M, Haglund U and Artursson P. 2012. “Classi Fi Cation of Inhibitors of Hepatic Organic Anion Transporting Polypeptides (OATPs): In Fl Uence of Protein Expression on Drug – Drug Interactions.” *Journal of Medicinal Chemistry* 55: 4740–63.
- Karunaweera N, Ritesh R, Erika G and Gerald M. 2015. “Plant Polyphenols as Inhibitors of NF-kappaB Induced Cytokine Production-a Potential Anti-Inflammatory Treatment for Alzheimer’s Disease?” *Frontiers in molecular neuroscience* 8: 24.

- Kawaguchi K, Tsukasa M and Yoshio K. 2011. “Effects of Antioxidant Polyphenols on TNF-Alpha-Related Diseases.” *Current topics in medicinal chemistry* 11(14): 1767–79.
- Khurana S and Tai C. 2013. “Polyphenols: Benefits to the Cardiovascular System in Health and in Aging.” *Nutrients* 5(10): 3779–3827.
- Kim D and Kwon S. 2018. “Hypoxia-Dependent Mitochondrial Fission Regulates Endothelial Progenitor Cell Migration, Invasion, and Tube Formation.” *The Korean journal of physiology & pharmacology : official journal of the Korean Physiological Society and the Korean Society of Pharmacology* 22(2): 203–13.
- Kim S, Shin J, Kim H, Fisher RC, Lee M and Kim C. 2007. “Streptozotocin-Induced Diabetes Can Be Reversed by Hepatic Oval Cell Activation through Hepatic Transdifferentiation and Pancreatic Islet Regeneration.” *Laboratory Investigation* 87(7): 702–12.
- Kim Y, Kim B and Shin H. 2009. “Can Preoperative CA19-9 and CEA Levels Predict the Resectability of Patients with Pancreatic Adenocarcinoma?” *Journal of Gastroenterology and Hepatology (Australia)* 24(12): 1869–75.
- Kola I and John L. 2004. “Can the Pharmaceutical Industry Reduce Attrition Rates?” *Nature reviews. Drug discovery* 3(August): 1–5.
- Konig J, Cui Y, Nies T, and Keppler D. 2000. “A Novel Human Organic Anion Transporting Polypeptide Localized to the Basolateral Hepatocyte Membrane.” *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* 278(1): G156-64.
- Koprowski H, Herlyn M, Steplewski Z and Sears H. 1981. “Specific Antigen in Serum of Patients with Colon Carcinoma.” *Science (New York, N.Y.)* 212(4490): 53–55.
- Koya Y, Kajiyama H, Liu W, Shibata K, Senga T and Kikkawa Fet al. 2016. “Murine Experimental Model of Original Tumor Development and Peritoneal Metastasis via Orthotopic Inoculation with Ovarian Carcinoma Cells.” *Journal of visualized experiments : JoVE* (118).
- Krah A, and Ulrich Z. 2017. “Insights into the Ion-Coupling Mechanism in the MATE Transporter NorM-VC.” *Physical biology* 14(4): 45009.
- Krakowski L, Gu D and Sarvetnick N. 1999. “Pancreatic Expression of Keratinocyte Growth Factor Leads to Differentiation of Islet Hepatocytes and Proliferation of Duct Cells.” *American Journal of Pathology* 154(3): 683–91.

- Krishna R and Klotz U. 1994. "Extrahepatic Metabolism of Drugs in Humans." *Clinical pharmacokinetics* 26(2): 144–60.
- Kruh D, and Martin G. 2003. "The MRP Family of Drug Efflux Pumps." *Oncogene* 22(47): 7537–52.
- Kugaevskaya V, Timoshenko O, and Solovyeva N. 2015. "[Angiotensin converting enzyme: the antigenic properties of the domain, role in Alzheimer's disease and tumor progression]." *Biomeditsinskaiia khimiia* 61(3): 301–11.
- Kuroda T and Tomofusa T. 2009. "Multidrug Efflux Transporters in the MATE Family." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* 1794(5): 763–68.
- Lacombe D and Yan L. 2013. "The Future of Clinical Research in Oncology: Where Are We Heading To?" *Chinese clinical oncology* 2(1): 9.
- Lal G, Redston M and Gallinger S. 2000. "Inherited Predisposition to Pancreatic Adenocarcinoma : Role of Family History and Germ-Line p16 , BRCA1 , and BRCA2 Mutations." *Cancer Research* 60(2):409-1.
- LeCluyse L, Rafal W, Melvin E and Mark J. 2012. "Organotypic Liver Culture Models: Meeting Current Challenges in Toxicity Testing." *Critical Reviews in Toxicology* 42(6): 501–48.
- Lee J and Hwang J. 2018. "Management of Recurrent Pancreatic Cancer after Surgical Resection: A Protocol for Systematic Review, Evidence Mapping and Meta-Analysis." *BMJ open* 8(4): e017249.
- Lee J, Song H, Jeong Y and Jae H. 2015. "Quercetin 3-O-Glucoside Suppresses Epidermal Growth Factor-Induced Migration by Inhibiting EGFR Signaling in Pancreatic Cancer Cells." *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 36(12): 9385–93.
- Lee L, Hauner M and Thasler W. 2013. "Isolation of Human Hepatocytes by a Two-Step Collagenase Perfusion Procedure." *Journal of Visualized Experiments* (79): 1–9.
- Li L, Lee T, Meier P and Ballatori N. 1998. "Identification of Glutathione as a Driving Force and Leukotriene C4 as a Substrate for oatp1, the Hepatic Sinusoidal Organic Solute Transporter." *Journal of Biological Chemistry* 273(26): 16184–91.
- Li S and Fang Y. 2018. "The Potential and Action Mechanism of

- Polyphenols in the Treatment of Liver Diseases.” *Oxidative medicine and cellular longevity* 2018: 8394818.
- Liao D, and Randall J. 2007. “Hypoxia: A Key Regulator of Angiogenesis in Cancer.” *Cancer metastasis reviews* 26(2): 281–90.
- Lin J, Polzer R and Winter S. 2003. “The Role of Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion and Toxicity in Drug Discovery.” *Current Topics in Medicinal Chemistry* 3(860): 1125–54.
- Loeb A, and Harris C. 2008. “Advances in Chemical Carcinogenesis: A Historical Review and Prospective.” *Cancer Research* 68(17): 6863–72.
- Louafi S and Taeib J. 2007. “Gemcitabine plus Oxaliplatin (GEMOX) in Patients with Advanced Hepatocellular Carcinoma (HCC): Results of a Phase II Study.” *Cancer* 109(7): 1384–90.
- Lu H and Jianping Y. 2016. “Transient Hypoxia Reprograms Differentiating Adipocytes for Enhanced Insulin Sensitivity and Triglyceride Accumulation.” *International journal of obesity (2005)* 40(1): 121–28.
- Lu Q, Chun B, and Dong C. 2008. “Investigating Noncovalent Interactions of Rutin-Serum Albumin by Capillary Electrophoresis-Frontal Analysis.” *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 47(4–5): 888–91.
- Madoff C, Eddie A, and Jean-Nicolas V. 2005. “Portal Vein Embolization in Preparation for Major Hepatic Resection: Evolution of a New Standard of Care.” *Journal of vascular and interventional radiology : JVIR* 16(6): 779–90.
- Maitra A and Hurban R. 2003. “Multicomponent Analysis of the Pancreatic Adenocarcinoma Progression Model Using a Pancreatic Intraepithelial Neoplasia Tissue Microarray.” *Modern Pathology* 16(9): 902–12.
- Marie N. 2013. “Caractérisation Par Imagerie En Temps Réel de Cultures Cellulaires Hépatiques En Biopuces Mic Rofluidiques.”
- Mendoza A, Jiri B, Dean J, and Charles S. 2016. “Cellular Microenvironment Controls the Nuclear Architecture of Breast Epithelia through β 1-Integrin.” *Cell Cycle* 15(3): 345–56.
- Mazzaferro V, Ammatuna M, Morabito A and Gennari L. 1996. “Liver Transplantation for the Treatment of Small Hepatocellular Carcinomas in Patients with Cirrhosis.” *The New England journal of medicine*

334(11): 693–99.

- Mazzaferro V and Salvatore A. 2004. “Radiofrequency Ablation of Small Hepatocellular Carcinoma in Cirrhotic Patients Awaiting Liver Transplantation: A Prospective Study.” *Annals of surgery* 240(5): 900–909.
- McLean K and Geeta M. 2017. “Tumor Microenvironment and Models of Ovarian Cancer: The 11th Biennial Rivkin Center Ovarian Cancer Research Symposium.” *International journal of gynecological cancer: official journal of the International Gynecological Cancer Society* 27(9S Suppl 5): S2–9.
- McLin V, Rankin A, and Zorn A. 2007. “Repression of Wnt/ -Catenin Signaling in the Anterior Endoderm Is Essential for Liver and Pancreas Development.” *Development* 134(12): 2207–17.
- Michalik L, Staels B and Wahli W. 2006. “International Union of Pharmacology. LXI. Peroxisome Proliferator-Activated Receptors.” *Pharmacological reviews* 58(4): 726–41.
- Mills B, Rose KA, Sadagopan N, Sahi J and de Morais S. 2004. “Induction of Drug Metabolism Enzymes and MDR1 Using a Novel Human Hepatocyte Cell Line.” *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 309(1): 303 LP-309.
- Miwa M, Umeda I and Ishitsuka H. 1998. “Design of a Novel Oral Fluoropyrimidine Carbamate, Capecitabine, Which Generates 5-Fluorouracil Selectively in Tumours by Enzymes Concentrated in Human Liver and Cancer Tissue.” *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* 34(8): 1274–81.
- Moeller J, Rachel A and Mark W. 2007. “Hypoxia and Radiotherapy: Opportunities for Improved Outcomes in Cancer Treatment.” *Cancer metastasis reviews* 26(2): 241–48.
- Mohn C, Häcker HG, Hilger RA, Gütschow M and Jaehde U. 2013. “Defining the Role of MRP-Mediated Efflux and Glutathione in Detoxification of Oxaliplatin.” *Die Pharmazie* 68(7): 622–27.
- Morisset J. 2008. “Negative Control of Human Pancreatic Secretion: Physiological Mechanisms and Factors.” *Pancreas* 37(1): 1–12.
- Mottino A. 2008. “Hepatic Drug Transporters and Nuclear Receptors: Regulation by Therapeutic Agents.” *World Journal of Gastroenterology* 14(46): 7068.
- Murota K, and Teroa J. 2004. “Quercetin-4'-glucoside Is More Potent than

- Quercetin-3-Glucoside in Protection of Rat Intestinal Mucosa Homogenates against Iron Ion-Induced Lipid Peroxidation.” *Journal of agricultural and food chemistry* 52(7): 1907–12.
- Muz B, Pilar P, Feda A, and Abdel K. 2015. “The Role of Hypoxia in Cancer Progression Angiogenesis Metastasis and Resistane to Therapy.” *Hypoxia* 3: 83–92.
- Nair P and Chithan K. 2006. “The Flavonoid Quercetin Inhibits Proinflammatory Cytokine (Tumor Necrosis Factor Alpha) Gene Expression in Normal Peripheral Blood Mononuclear Cells via Modulation of the NF-Kappa Beta System.” *Clinical and vaccine immunology : CVI* 13(3): 319–28.
- Nakamura K, Kato N, Aizawa K, Mizutani R, Yamauchi J and Tanoue A. 2011. “Expression of Albumin and Cytochrome P450 Enzymes in HepG2 Cells Cultured with a Nanotechnology-Based Culture Plate with Microfabricated Scaffold.” *The Journal of toxicological sciences* 36(5): 625–33.
- Naugler E, and Jonathan M. 2008. “Hepatocellular Carcinoma.” *Disease-a-month : DM* 54(7): 432–44.
- Netti A, Berk D, Swartz MA, Grodzinsky A and Jain R. 2000. “Role of Extracellular Matrix Assembly in Interstitial Transport in Solid Tumors.” *Cancer research* 60(9): 2497–2503.
- Nolan C and Deangelis L. 2018. “Overview of Metastatic Disease of the Central Nervous System.” *Handbook of clinical neurology* 149: 3–23.
- Novik I and Jayyози Z. 2017. “Long-Enduring Primary Hepatocyte-Based Co-Cultures Improve Prediction of Hepatotoxicity.” *Toxicology and applied pharmacology* 336: 20–30.
- O’Brien L, Mirjam Z, and Keith M. 2002. “Opinion: Building Epithelial Architecture: Insights from Three-Dimensional Culture Models.” *Nature reviews. Molecular cell biology* 3(7): 531–37.
- Oboh G, Ademiluyi A, Agunloye O, Ademosun A and Ogunsakin B. 2018. “Inhibitory Effect of Garlic, Purple Onion, and White Onion on Key Enzymes Linked with Type 2 Diabetes and Hypertension.” *Journal of dietary supplements*: 1–14.
- Oku N and Akizawa T. 2003. “Inhibitory Effect of Green Tea Polyphenols on Membrane-Type 1 Matrix Metalloproteinase, MT1-MMP.” *Biological & pharmaceutical bulletin* 26(9): 1235–38.
- Ortmann B, Jimena D and Sonia R. 2014. “Cell Cycle Progression in

- Response to Oxygen Levels.” *Cellular and Molecular Life Sciences* 71(18): 3569–82.
- Pandey A, Paul S and Patnaik R. 2015. “Resveratrol Inhibits Matrix Metalloproteinases to Attenuate Neuronal Damage in Cerebral Ischemia: A Molecular Docking Study Exploring Possible Neuroprotection.” *Neural regeneration research* 10(4): 568–75.
- Pastor C and Suter P. 1999. “Hepatic Hemodynamics and Cell Functions in Human and Experimental Sepsis.” *Anesth.Analg.* 89(0003–2999 (Print)): 344–52.
- Peng W and Wang J. 2012. “Matrix Metalloproteinases: A Review of Their Structure and Role in Systemic Sclerosis.” *Journal of clinical immunology* 32(6): 1409–14.
- Polonsky S, Frank B, Karrison T, and Cauter E et al. 1988. “Quantitative Study of Insulin Secretion and Clearance in Normal and Obese Subjects.” *The Journal of clinical investigation* 81(2): 435–41.
- Previs F, Withers D, Ren M, White F and Shulman I. 2000. “Contrasting Effects of IRS-1 versus IRS-2 Gene Disruption on Carbohydrate and Lipid Metabolism in Vivo.” *Journal of Biological Chemistry* 275(50): 38990–94.
- Qi W, Dalian D and Richard J. 2008. “Cytotoxic Effects of Dimethyl Sulphoxide (DMSO) on Cochlear Organotypic Cultures.” *Hearing research* 236(1–2): 52–60.
- Rakic R, Demoor M and Galera P. 2017. “RNA Interference and BMP-2 Stimulation Allows Equine Chondrocytes Redifferentiation in 3D-Hypoxia Cell Culture Model: Application for Matrix-Induced Autologous Chondrocyte Implantation.” *International journal of molecular sciences* 18(9).
- Raoul L, Deugnier M and Gosselin M. 1997. “Prospective Randomized Trial of Chemoembolization versus Intra-Arterial Injection of ¹³¹I-Labeled-Iodized Oil in the Treatment of Hepatocellular Carcinoma.” *Hepatology (Baltimore, Md.)* 26(5): 1156–61.
- Ripp L, Liras J, Maurer T and de Morais M. et al. 2006. “Use of Immortalized Human Hepatocytes to Predict the Magnitude of Clinical Drug-Drug Interactions Caused by CYP3A4 Induction.” *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 34(10): 1742–48.
- Risbridger P, Roxanne T and Renea T. 2018. “Preclinical Models of Prostate Cancer: Patient-Derived Xenografts, Organoids, and Other

- Explant Models.” *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 8(8): 30-536.
- Rofstad K, Kanthi G, Berit M and Else-Beate R. 2007. “Fluctuating and Diffusion-Limited Hypoxia in Hypoxia-Induced Metastasis.” *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 13(7): 1971–78.
- Rohwer N and Thorsten C. 2011. “Hypoxia-Mediated Drug Resistance: Novel Insights on the Functional Interaction of HIFs and Cell Death Pathways.” *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy* 14(3): 191–201.
- Russo G, Idolo T, Carmela S and Maria R. 2017. “Antioxidant Polyphenols in Cancer Treatment: Friend, Foe or Foil?” *Seminars in Cancer Biology* 46: 1–13.
- Salas J and Covas M 2008. “Effect of a Mediterranean Diet Supplemented with Nuts on Metabolic Syndrome Status: One-Year Results of the PREDIMED Randomized Trial.” *Archives of internal medicine* 168(22): 2449–58.
- Salvatore V, Focaroli S, Teti G, Mazzotti A and Falconi M 2015. “Changes in the Gene Expression of Co-Cultured Human Fibroblast Cells and Osteosarcoma Cells: The Role of Microenvironment.” *Oncotarget* 6(30): 28988–98.
- Saragusti C, Marti M and Chiabrando A. 2010. “Inhibitory Effect of Quercetin on Matrix Metalloproteinase 9 Activity Molecular Mechanism and Structure-Activity Relationship of the Flavonoid-Enzyme Interaction.” *European journal of pharmacology* 644(1–3): 138–45.
- Schiffer R, Merk H, Jugert F and Baron M. 2003. “Active Influx Transport Is Mediated by Members of the Organic Anion Transporting Polypeptide Family in Human Epidermal Keratinocytes.” *Journal of Investigative Dermatology* 120(2): 285–91.
- Schito L and Gregg S. 2016. “Hypoxia-Inducible Factors: Master Regulators of Cancer Progression.” *Trends in cancer* 2(12): 758–70.
- Semenza, Gregg L. 2012. “Hypoxia-Inducible Factors: Mediators of Cancer Progression and Targets for Cancer Therapy.” *Trends in pharmacological sciences* 33(4): 207–14.
- Seo S, Kyuhwa S, Sung H and Sang M. 2016. “Isorhamnetin Inhibits Reactive Oxygen Species-Dependent Hypoxia Inducible Factor (HIF)-1 α Accumulation.” *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 39(11):

1830–38.

- Sharma B, and Shamsheer S. 2017. “Phosphatidylserine: A Cancer Cell Targeting Biomarker.” *Seminars in cancer biology*.
- Shitara Y, Toshiharu H and Yuichi S. 2006. “Transporters as a Determinant of Drug Clearance and Tissue Distribution.” *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences* 27(5): 425–46.
- Shitara Y, Hitoshi S and Yuichi S. 2005. “Evaluation of Drug-Drug Interaction in the Hepatobiliary and Renal Transport of Drugs.” *Annual review of pharmacology and toxicology* 45: 689–723.
- Shoemaker H, Mayo J and Boyd R. 1988. “Development of Human Tumor Cell Line Panels for Use in Disease-Oriented Drug Screening.” *Progress in clinical and biological research* 276: 265–86.
- Shrikhande V and Melroy A. 2008. “Pancreatic Fistula after Pancreatectomy: Evolving Definitions, Preventive Strategies and Modern Management.” *World Journal of Gastroenterology* 14(38): 5789–96.
- Sielaff M, and Shaker A. 2018. “Status and Future Directions in the Management of Pancreatic Cancer: Potential Impact of Nanotechnology.” *Journal of cancer research and clinical oncology* 144(7):1205-1217.
- Simic A, Dragan M, Dejan S and Marija T. 2007. “Electrochemical Behavior and Antioxidant and Prooxidant Activity of Natural Phenolics.” *Molecules (Basel, Switzerland)* 12(10): 2327–40.
- Simmons L, Purcell S, Carolanne M and Shawna L. 2009. “Dietary *Ascophyllum Nodosum* Increases Urinary Excretion of Tricarboxylic Acid Cycle Intermediates in Male Sprague-Dawley Rats.” *The Journal of nutrition* 139(8): 1487–94.
- Soars G, Dermot M, Ken G and Robert J. 2007. “The Pivotal Role of Hepatocytes in Drug Discovery.” *Chemico-Biological Interactions* 168(1): 2–15.
- Soleti R, Ramarosan A and Martinez C. 2018. “Impact of Polyphenols on Extracellular Vesicle Levels and Effects and Their Properties as Tools for Drug Delivery for Nutrition and Health.” *Archives of biochemistry and biophysics* 644: 57–63.
- Rubens V, and Wagner F. 2004. “Antioxidant Properties of Complexes of Flavonoids with Metal Ions.” *Redox report : communications in free*

- radical research* 9(2): 97–104.
- Stanger Z, Akemi J and Douglas A. 2007. “Organ Size Is Limited by the Number of Embryonic Progenitor Cells in the Pancreas but Not the Liver.” *Nature* 445(7130): 886–91.
- Statistics Canada. 2016. “Canadian Cancer Statistics - Special Topic: Skin Cancers.” : 1–132.
- Stephens L. 2009. “Personal Reflections on Russell and Burch, FRAME, and the HSUS.” *Alternatives to laboratory animals : ATLA* 37 Suppl 2: 29–33.
- Sunman A, Roy L, Lecluyse E, and Angela D. 2004. “ABSTRACT :” 32(3): 359–63.
- Tannenbaum J and Bennett B. 2015. “Russell and Burch’s 3Rs Then and Now: The Need for Clarity in Definition and Purpose.” *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS* 54(2): 120–32.
- Tarascou I. 2010. “The Hidden Face of Food Phenolic Composition.” *Archives of biochemistry and biophysics* 501(1): 16–22.
- Taucher V and Johannes H. 2017. “Pancreatic Carcinogenesis.” *Mechanisms of Molecular Carcinogenesis* 2: 83–118.
- Terada T, and Ken-ichi I. 2008. “Physiological and Pharmacokinetic Roles of H⁺/organic Cation Antiporters (MATE/SLC47A).” *Biochemical pharmacology* 75(9): 1689—1696.
- Thakkar N, Jason S, and Kim L. 2017. “Effect of Liver Disease on Hepatic Transporter Expression and Function.” *Journal of pharmaceutical sciences* 106(9): 2282–94.
- Therade S, Laemmel E, Duranteau J and Vicaut E. 2004. “Reoxygenation after Hypoxia and Glucose Depletion Causes Reactive Oxygen Species Production by Mitochondria in HUVEC.” *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 287(5): R1037-43.
- Thomas Q, Brown A and Beddington R. 1998. “Hex: A Homeobox Gene Revealing Peri-Implantation Asymmetry in the Mouse Embryo and an Early Transient Marker of Endothelial Cell Precursors.” *Development (Cambridge, England)* 125: 85–94.
- Thompson C and Horacio M. 1984. “Kinetics of the Complexation of iron(II) with Ferrozine.” *Analytical Chemistry* 56(4): 755–57.

- Thompson F and Amit M. 2014. "Radiotherapy and the Tumor Microenvironment: Mutual Influence and Clinical Implications." *Advances in experimental medicine and biology* 772: 147–65.
- Tien S and Negishi M. 2006. "Nuclear Receptors CAR and PXR in the Regulation of Hepatic Metabolism." *Xenobiotica* 36(10–11): 1152–63.
- Tirona G, Brenda L, Allan W, and Richard B. 2003. "Human Organic Anion Transporting Polypeptide-C (SLC21A6) Is a Major Determinant of Rifampin-Mediated Pregnane X Receptor Activation." *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 304(1): 223–28.
- Tow W, Robert P, Hao J and Said A. 2011. "Antioxidant and Antiproliferation Effects of Extractable and Nonextractable Polyphenols Isolated from Apple Waste Using Different Extraction Methods." *Journal of food science* 76(7): T163-72.
- Tredan O, Carlos G, Krupa P and Ian T. 2007. "Drug Resistance and the Solid Tumor Microenvironment." *Journal of the National Cancer Institute* 99(19): 1441–54.
- Tsao R. 2010. "Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols." *Nutrients* 2(12): 1231–46.
- Verma S, Amit S and Abha M. 2015. "Complex Disruption Effect of Natural Polyphenols on Bcl-2-Bax: Molecular Dynamics Simulation and Essential Dynamics Study." *Journal of biomolecular structure & dynamics* 33(5): 1094–1106.
- Vermeire K, Hofkens A and Van de Heyning H. 2005. "Quality-of-Life Benefit from Cochlear Implantation in the Elderly." *Otology & neurotology : official publication of the American Otological Society, American Neurotology Society [and] European Academy of Otology and Neurotology* 26(2): 188–95.
- Vetrani C, Orešič M and, Aura M. 2016. "Metabolic Transformations of Dietary Polyphenols: Comparison between in Vitro Colonic and Hepatic Models and in Vivo Urinary Metabolites." *The Journal of nutritional biochemistry* 33: 111–18.
- Viau C. 2002. "Biological Monitoring of Exposure to Mixtures." *Toxicology letters* 134(1–3): 9–16.
- Vincent A. 2011. "Pancreatic Cancer." *Lancet (London, England)* 378(9791): 607–20.

- Voskoglou T, Joseph P, and Lesley S. 2003. "Clinical Predictive Value of the in Vitro Cell Line, Human Xenograft, and Mouse Allograft Preclinical Cancer Models." *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* 9(11): 4227–39.
- Wang G, Zhang J, Liu L, Sharma S and Dong Q.. 2012. "Quercetin Potentiates Doxorubicin Mediated Antitumor Effects against Liver Cancer through p53/Bcl-X1." *PLoS ONE* 7(12).
- Wang H, Chen J, Hollister K, Sowers L and Forman M. 1999. "Endogenous Bile Acids Are Ligands for the Nuclear Receptor FXR/BAR." *Molecular cell* 3(5): 543–53.
- Wang Y, Su S, Sergio C and Taosheng CChen. 2012. "Role of CAR and PXR in Xenobiotic Sensing and Metabolism." *Expert opinion on drug metabolism & toxicology* 8(7): 803–17.
- Welker M and Joerg T. 2011. "Anti-Angiogenesis in Hepatocellular Carcinoma Treatment: Current Evidence and Future Perspectives." *World journal of gastroenterology* 17(26): 3075–81.
- Westerink A, and Willem G. 2007. "Phase II Enzyme Levels in HepG2 Cells and Cryopreserved Primary Human Hepatocytes and Their Induction in HepG2 Cells." *Toxicology in vitro: an international journal published in association with BIBRA* 21(8): 1592–1602.
- Whiteside L. 2008. "The Tumor Microenvironment and Its Role in Promoting Tumor Growth." *Oncogene* 27(45): 5904–12.
- Williams M and Michael J. 2002. "Alteration of Liver Cell Function and Proliferation: Differentiation between Adaptation and Toxicity." *Toxicologic pathology* 30(1): 41–53.
- Wolf K, Burchette J, Garcia J and Michalopoulos G. 1990. "Exocrine Pancreatic Tissue in Human Liver: A Metaplastic Process?" *The American journal of surgical pathology* 14(6): 590–95.
- Wouters B, Corthals G and Schoenmakers J. 2017. "A Cyclic-Olefin-Copolymer Microfluidic Immobilized-Enzyme Reactor for Rapid Digestion of Proteins from Dried Blood Spots." *Journal of chromatography. A* 1491: 36–42.
- Rongqian W, Cui X, Dong W, Zhou M, Simms H and Wang P. 2006. "Suppression of Hepatocyte CYP1A2 Expression by Kupffer Cells via AhR Pathway: The Central Role of Proinflammatory Cytokines." *International Journal of Molecular Medicine* 18(2): 339–46.

- Xia Q and Peter S. 2012. “Drug Efflux Transporters and Multidrug Resistance in Acute Leukemia: Therapeutic Impact and Novel Approaches to Mediation.” *Molecular pharmacology* 82(6): 1008–21.
- Xu X, Mary C and Xinqiao J. 2014. “Three-Dimensional in Vitro Tumor Models for Cancer Research and Drug Evaluation.” *Biotechnology advances* 32(7): 1256–68.
- Yamada H. 2006. “Surgical Treatment of Liver Metastases from Pancreatic Cancer.” *HPB: the official journal of the International Hepato Pancreato Biliary Association* 8(2): 85–88.
- Yu N, Dordick J, Will Y and Lee Y. 2017. “Prediction of Metabolism-Induced Hepatotoxicity on Three-Dimensional Hepatic Cell Culture and Enzyme Microarrays.” *Archives of toxicology* 92(3):1295-1310.
- Yurdaydin C, Idilman R, Bozkaya H and Bozdayi A. 2010. “Natural History and Treatment of Chronic Delta Hepatitis.” *Journal of viral hepatitis* 17(11): 749–56.
- Zanone M, Enrica F and Giovanni C. 2008. “From Endothelial to Beta Cells: Insights into Pancreatic Islet Microendothelium.” *Current diabetes reviews* 4(1): 1–9.
- Zanoni M and Tesei A. 2016. “3D Tumor Spheroid Models for in Vitro Therapeutic Screening: A Systematic Approach to Enhance the Biological Relevance of Data Obtained.” *Scientific Reports* 6: 1–11.
- Zhang J and Viant R. 2016. “Gene Expression and Metabolic Responses of HepG2/C3A Cells Exposed to Flame Retardants and Dust Extracts at Concentrations Relevant to Indoor Environmental Exposures.” *Chemosphere* 144: 1996–2003.
- Zhou Y, Chen Y and Li Het al. 2016. “Natural Polyphenols for Prevention and Treatment of Cancer.” *Nutrients* 8(8):515.

Publications et communications

❖ Publications:

1. **Sarah Hassan**, Jean Peluso, Guy Fuhrmann and Genevieve Ubeaud-Sequier. Synergistic Effect of the Combination of Polyphenols with Gemcitabine on Pancreatic Cancer Cell line AsPC-1. *J Pharmaceut Res*, 2017 2(1): 2573-962
2. **Sarah Hassan**, Jean Peluso, Guy Fuhrmann and Genevieve Ubeaud-Sequier. Bergamottin potentializes the cytotoxic activity of gemcitabine through inhibition of MDR1 on pancreatic cancer cell line AsPC-1. *Int. J. Cur. Adv. Res.*, 2017 06(17): 7275-7280.
3. **Sarah Hassan**, Jean Peluso, Guy Fuhrmann and Genevieve Ubeaud-Sequier. Polyphenols potentialize the cytotoxic activity of gemcitabine on pancreatic cancer cell line AsPC-1. *Biochem pharmacol*, 2017 06(2): 36.
4. **Sarah Hassan**, Jean Peluso, Radhia M'Kacher, Natacha Rochel, Eric Jeandidier and Genevieve Ubeaud-Sequier. HepG2 derived cell line: a novel in vitro hepatotoxicity model for drug screening in 2D and 3D culture. **En cours de soumission**
5. **Sarah Hassan**, Jean Peluso, Sandra Chalhoub, Ysia Idou Gillet, Nadia Jessel, Natacha Rochel, Guy Fuhrmann and Genevieve Ubeaud-Sequier. Quercetin potentializes the cytotoxic activity of gemcitabine and doxorubicin through the inhibition HIF-1 α and MDR1 in 3D culture of AsPC-1 and HepG2 cells. **En cours de soumission**
6. Fathi Emhemmed, Sarah Ali Azouaou, Qian Zhao, **Sarah Hassan**, Laurent Désaubry, Christian D. Muller and Guy Fuhrmann. Bad phosphorylation protects fibroblast stem-like cells against the cytotoxic anticancer effect of the synthetic flavagline FL. **En cours de soumission**

- ❖ **Communication orale:** Polyphenols potentialize the cytotoxic activity of gemcitabine on pancreatic cancer cell line AsPC-1. *9th world congress on pharmacology in Paris, France. (September 04-06, 2017)*

❖ **Poster:**

1. **Sarah Hassan**, Jean Peluso, Dominique Leveque, Guy Fuhrmann and Genevieve Ubeaud-Sequier. Bergamottin potentializes the cytotoxic activity of gemcitabine on pancreatic cancer cell line. *American association of pharmaceutical scientists (AAPS) in San Diego, CA. (November 12-15, 2017).*
2. **Sarah Hassan**, Jean Peluso, Natacha Rochel and Genevieve Ubeaud-Sequier. HepG2 derived cell line: a new human cell model in 2D and 3D culture for drug hepatotoxicity and metabolism studies. *GMP in Paris, France. (October 25-27, 2017).*
3. Kreutter G, El Habab A, Kassem M, **Sarah Hassan**, Amoura L, Yver B, El Ghazouani F, Ubeaud-Séquier G, Toti F, Kessler L. Société francophone du Diabète. « Etude de l'effet du dulaglutide, analogue du GLP1, sur la protection des cellules bêta dans un modèle de stress inflammatoire mimant la greffe d'îlots pancréatiques». *Société francophone du Diabète, Lille, France. (Mars 28-31, 2017).*
4. Kreutter G, Kassem M, El Habab A, Abbas M, **Sarah Hassan**, Yver B, El Ghazouani F, Ubeaud-Sequier G, Toti F, Kessler L. «Intérêt des Microparticules de cellules endothéliales stimulées par Protéine C activée comme vecteur thérapeutique en greffe d'îlots pancréatiques: Preuve du concept dans un modèle cellulaire. ». *Société francophone du Diabète, Lille, France. (Mars 28-31, 2017).*

Sarah HASSAN

***Etudes pharmacologiques d'un modèle cellulaire 2D/3D dans le cancer
hépato-pancréatique***

Résumé

Les cancers du foie et du pancréas sont classés parmi les cancers les plus fréquents et agressifs à travers le monde et présentent une résistance à la chimiothérapie. L'efficacité des médicaments anticancéreux est affectée par les activités des enzymes métaboliques, transporteurs membranaires et par l'environnement tumoral. Le but de notre thèse est 1) de développer un modèle cellulaire hépatique et caractériser les mécanismes sous-jacents de la modulation de l'expression et de la fonctionnalité des transporteurs membranaires et des enzymes clés qui régissent le métabolisme des médicaments et 2) d'évaluer *in vitro*, dans différents modèles cellulaires (hépatique et pancréatique) en 2D et 3D, l'effet apoptotique de médicaments anticancéreux associés à des polyphénols en vue d'optimiser leur activité. Dans une première partie, nous avons mis en place une nouvelle lignée cellulaire hépatique humaine dérivée des HepG2, stable, exprimant suffisamment et significativement les enzymes CYP450 et les transporteurs hépatiques (MRP2, MDR1 et OATP1B1). Ce modèle pourrait être un outil de choix pour des études précliniques de métabolisme et de prédiction d'hépatotoxicité. Dans une deuxième partie, nous avons pu voir que les cellules pancréatiques et hépatiques dans un environnement 3D sont plus prédictives d'une tumeur *in vivo* et peuvent être un modèle de choix pour des études pharmacologiques de criblage de nouveaux médicaments anticancéreux ou des stratégies de combinaisons de molécules (avec des PP). Ainsi, nous avons montré que la quercétine, dans les cellules 3D, était capable d'augmenter l'activité de la gemcitabine et de la doxorubicine, en augmentant le taux des cellules mortes jusqu'à 60 %, par modulation des protéines MDR1 et par diminution significative du facteur HIF-1 alpha dans les cellules cancéreuses.

En conclusion, les polyphénols peuvent être des molécules d'intérêt en combinaison avec des médicaments anticancéreux pour diminuer la résistance à ces traitements et servir d'outil pharmacologique pour mieux comprendre les mécanismes de résistance des cellules tumorales.

Mots clés : Cancer, hépatotoxicité, transporteurs hépatiques, CYP450, culture 3D, résistance et HIF-1 alpha.

Abstract

Liver and pancreatic cancers are among the most common and aggressive cancers worldwide that are resistant to chemotherapy. The efficacy of anticancer drugs is affected by the activities of metabolic enzymes, transporters and the tumor environment. The aim of my thesis was based on to main objectives: 1) development of a hepatic cellular model and characterize the underlying mechanisms of modulation of the expression and functionality of transporters and key enzymes involved in the regulation of drug metabolism 2) study the effect of new strategies *in vitro* by combining anti-cancer drugs with polyphenols in these processes in order to optimize their activities on different cellular models (hepatic and pancreatic) in 2D and 3D cultures. Our results showed that we have developed a new human hepatic cell line derived from HepG2 cells. The novel cell line is a good *in vitro* model with a capacity of predicting hepatotoxicity of novel drugs with significant differences for chromosomes 5, 17 and 20 and high expression level of CYP450 and transporters (MRP2, MDR1 and OATP1B1). Secondly, our results indicate that the combination of anticancer drugs and polyphenols increased the rate of apoptosis in cancer cells by up regulation of the expression levels of cleaved caspase-3 and the regulator of apoptosis p53. Moreover, our results demonstrated that polyphenols inhibit the efflux activity of MDR1. In addition, our results indicate that the combination of anti-cancer drugs and quercetin down regulated the expression of HIF-1 α and increased the expression levels of the cleaved caspase-3 and p53 on human pancreatic and liver cell line cultured in 3D culture. In conclusion, polyphenols may be promising agents for novel combination therapy since they potentialize the cytotoxic activity of anticancer drugs to eradicate cancer and therefore the cellular resistance.

Keywords: Cancer, hepatotoxicity, CYP450, 3D culture, resistance and HIF-1 alpha.