

Université de Sherbrooke

**Étude sur l'inhibition du phénotype des gliomes malins par la voie de signalisation
du TGF- β**

Par
Yannick Sathoud
Département de Pharmacologie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé
en vue de l'obtention du grade de maître ès sciences (M. Sc.)
en pharmacologie

Sherbrooke, Québec, Canada
Décembre, 2013

Membres du jury d'évaluation
Pr David Forfin Md., département de pharmacologie, département de chirurgie,
Pr Klaus Klarskov Ph.D., département de pharmacologie,
Pre Christine Lavoie Ph.D., département de pharmacologie,
Pre Caroline Saucier Ph.D., département d'anatomie et de biologie cellulaire

© Yannick Sathoud, 2013



Library and Archives
Canada

Published Heritage
Branch

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Bibliothèque et
Archives Canada

Direction du
Patrimoine de l'édition

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence

ISBN: 978-0-499-00384-3

Our file Notre référence

ISBN: 978-0-499-00384-3

NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.

Canada

Étude sur l'inhibition du phénotype des gliomes malins par la voie de signalisation du TGF- β

Par
Yannick Sathoud
Département de pharmacologie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé en vue de l'obtention du diplôme de maître ès sciences (M.Sc.) en pharmacologie, Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4

RÉSUMÉ

Les gliomes malins prolifèrent d'une manière très anarchique et elles s'infiltrent dans le parenchyme cérébral. Plusieurs facteurs de croissance, tels que le *Transforming Growth Factor Beta* (TGF- β), sont surexprimés dans les gliomes malins. La voie de signalisation du TGF- β joue un rôle clé dans la régulation des mécanismes liés au métabolisme et à la prolifération cellulaire. L'objectif principal de cette étude est d'évaluer les effets de l'inhibition de la voie de signalisation du TGF- β sur le phénotype des gliomes malins. Deux méthodes ont été utilisées pour inhiber la voie du TGF- β . La première est un traitement à la chloroquine, un agent alcalinisant lysosomotropique, qui module à la hausse le pH du *Trans Golgi Network* (TGN)/endosome. Cet agent inhibe la furine, une protéase nécessaire à la maturation du TGF- β , ainsi que la métalloprotéases-2 (MMP-2) qui permet la libération du TGF- β de la matrice extracellulaire (MEC). La deuxième méthode est un traitement avec l'Avasimibe™, un agent qui inhibe l'Acyl-CoA-Acétyletransférase (ACAT) démontrée comme étant activé par le TGF- β . Les effets de ces deux agents ont été testés sur la sécrétion de TGF- β , sur le métabolisme et la prolifération cellulaire de la lignée de gliomes murins F98. Par l'immunobuvardage de type Western blot, notre étude a révélé la présence de la forme immature de TGF- β 1 et de *Latency Associated Peptide* (LAP) dans le surnageant de la lignée de gliomes murins F98. Par le test *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA), l'étude a indiqué que la chloroquine et l'Avasimibe™ diminuent de $85 \pm 3 \%$ et $65 \pm 1 \%$ la concentration de TGF- β 1 mature sécrétée dans le surnageant cellulaire. Les essais WST-1 et BrdU ont montré que des expositions de 24 h et 48 h à la chloroquine et l'Avasimibe™ diminuent significativement de plus de $74 \pm 9 \%$ et $86 \pm 2 \%$ le métabolisme et la prolifération cellulaire. La zymographie pousse à croire que les effets de chloroquine étaient associés à une inhibition de $75 \pm 1 \%$ de l'activité de la MMP-2 en 48 h. L'ajout de la chloroquine et de l'Avasimibe™ pourrait être bénéfique au traitement standard des gliomes malins en réduisant leur phénotype.

Mots-clés : gliomes, TGF- β , chloroquine, Avasimibe™, métabolisme, prolifération.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ.....	II
TABLE DES MATIÈRES.....	III
LISTE DES TABLEAUX.....	VI
LISTE DES FIGURES	VII
LISTES DES SIGLES, ABRÉVIATIONS ET SYMBOLES .	IX
INTRODUCTION	1
1. LES TUMEURS CÉRÉBRALES	1
1.1. Épidémiologie	1
1.2. Pathogenèse.....	1
2. TRAITEMENTS	2
2.1. Traitement standard.....	2
2.2. Limitations thérapeutiques	3
2.2.1. Nature infiltrante du GBM	3
2.2.2. Barrière hémato-encéphalique (BHE).....	3
2.2.3. Résistance à la radiothérapie et aux agents de chimiothérapie	5
3. <i>TRANSFORMING GROWTH FACTOR BETA (TGF-β)</i>	5
3.1. Caractéristique du TGF-β1	6
3.2. Caractéristique du TGF-β2.....	9
3.3. Caractéristique du TGF-β3.....	10
3.4. Biosynthèse du TGF-β	10
3.5. Maturation du TGF-β	11
3.6. Stockage du TGF-β	11
3.7. Activation du TGF-β.....	12
3.8. Récepteur du TGF-β.....	13
3.9. Signalisation du TGF-β.....	13
3.10. La famille des Smads	14

4.	LA CHLOROQUINE ET L'AVASIMIBE™ : INHIBITEURS POTENTIELS DE LA VOIE DE SIGNALISATION DU TGF- β	15
4.1.	Chloroquine.....	15
4.1.1.	Pharmacocinétique de la chloroquine	15
4.2.	Acyl-CoA-Acétyltransférase (ACAT)	17
4.2.1.	AVASIMIBE™	18
4.2.2.	Pharmacocinétique de l'Avasimibe™	19
	PROJET DE RECHERCHE	21
5.	OBJECTIF DE L'ÉTUDE	21
5.1.	Hypothèses de travail	21
	MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	22
6.	CULTURE CELLULAIRE.....	22
7.	DOSAGE DE BRADFORD	23
8.	IMMUNOBUVARDE DE TYPE WESTERN.....	23
8.1.	Électrophorèse.....	23
8.2.	Transfert	23
8.3.	Blocage.....	24
8.4.	Immunobuvadarge contre le LAP du TGF- β 1	24
9.	SPECTROMÉTRIE DE MASSE.....	25
9.1.	Définition et principe	25
9.2.	Utilisation de la spectrométrie de masse dans notre étude.....	25
9.3.	Préparation du standard BSA et des échantillons de TGF- β	26
9.4.	Digestion sur gel	26
9.5.	Acquisition des spectres par le LC/MS/MS	27
9.6.	Recherche sur la banque de données.....	28
10.	ELISA	28
11.	TEST DU MÉTABOLISME CELLULAIRE.....	29
12.	TEST DE LA PROLIFÉRATION CELLULAIRE.....	29
13.	ZYMOGRAPHIE.....	30
13.1.	Principe général.....	30

13.2.	Zymographie sur gel de gélatine	31
14.	ANALYSES STATISTIQUES	32
	RÉSULTATS	33
15.	DÉTERMINATION DU MODÈLE CELLULAIRE.....	33
16.	CARACTÉRISATION DU TGF- β PAR SPECTROMÉTRIE DE MASSE	34
17.	EFFET DE LA CHLOROQUINE SUR LA MATURATION DU TGF- β 1	35
18.	EFFET DE LA CHLOROQUINE SUR LE MÉTABOLISME CELLULAIRE ..	37
19.	EFFET DE LA CHLOROQUINE SUR LA PROLIFÉRATION CELLULAIRE	39
20.	EFFET DE LA CHLOROQUINE SUR L'ACTIVITÉ DE LA MMP-2	40
21.	EFFET DE L'AVASIMIBE TM SUR LA SÉCRÉTION DU TGF- β 1	41
22.	EFFET DE L'AVASIMIBE TM SUR LE MÉTATOBOLISME CELLULAIRE ..	43
23.	EFFET DE L'AVASIMIBE TM SUR LA PROLIFÉRATION CELLULAIRE.....	44
	DISCUSSION	45
24.	DÉTERMINATION DU MODÈLE CELLULAIRE.....	45
25.	CARACTÉRISATION DU TGF- β 1 PAR SPECTROMÉTRIE DE MASSE	46
26.	EFFET DE LA CHLOROQUINE SUR LA MATURATION DU TGF- β 1	47
27.	EFFET DE LA CHLOROQUINE SUR LE MÉTABOLISME CELLULAIRE ..	47
28.	EFFET DE LA CHLOROQUINE SUR LA PROLIFÉRATION CELLULAIRE	48
29.	EFFET DE LA CHLOROQUINE SUR L'ACTIVITÉ DE LA MMP-2	50
30.	EFFET DE L'AVASIMIBE TM SUR LA SÉCRÉTION DU TGF- β 1	50
31.	EFFET DE L'AVASIMIBE TM SUR LE MÉTABOLISME CELLULAIRE	51
32.	EFFET DE L'AVASIMIBE TM SUR LA PROLIFÉRATION CELLULAIRE.....	52
33.	ANALYSES ALTERNATIVES	52
	CONCLUSION.....	55
	REMERCIEMENTS.....	57
	LISTES DES PUBLICATIONS	58
	ANNEXE 1	71
	ANNEXE 2	72

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Classification des tumeurs gliales selon leur grade histologique déterminé par l'Organisation Mondiale de la Santé..... 2

Tableau 2. Les données obtenues lors du test de métabolisme des cellules de la lignée de gliomes humains U-373 MG suite à une exposition de 240 minutes au WST-1 (9210 cellules/puits) après des traitements de 24 h et 48 h à la chloroquine. 72

Tableau 3. Les données obtenues lors du test de métabolisme cellulaire de gliomes humains U-373 MG suite à une exposition de 240 minutes au WST-1 (9210 cellules/puits) après des traitements de 24 h et 48 h avec l'AvasimibeTM 72

Tableau 4. Les données obtenues lors du test de métabolisme des cellules de la lignée de gliomes humains U-118 MG suite à une exposition de 240 minutes au WST-1 (9210 cellules/puits) après des traitements de 24 h et 48 h à la chloroquine. 73

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Illustration schématique de la BHE.....	4
Figure 2. Représentation schématique des précurseurs du TGF- β humain avec la position des sites de N-glycosylation (N-CHO)..	11
.....	12
Figure 3. Représentation schématique du processus de maturation, de stockage et d'activation du TGF- β	12
Figure 4. Représentation schématique de la voie de signalisation du TGF- β	14
Figure 5. Biosynthèse de l'ester de cholestérol.....	17
Figure 6. Structure de l'Avasimibe TM	20
Figure 7. Détection par immunobuvardage de type Western des formes sécrétées de TGF- β 1 dans le surnageant des lignées de gliomes malins	33
Figure 8. Les données obtenues par chromatographie capillaire en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS-MS)..	34
Figure 9. Diminution de la concentration du TGF- β 1 par la chloroquine	36
Figure 10. Test du métabolisme des cellules de la lignée de gliomes murins F98 suite à une exposition de 240 minutes au WST-1 (9210 cellules/puits) après des traitements de 24 h et 48 h à la chloroquine.....	38
Figure 11. Test de la prolifération des cellules de gliomes murins F98 suite à une exposition de 30 minutes au BrdU (2500 cellules/puits) après des traitements de 24 h et 48 h à la chloroquine.....	40
Figure 12. Zymographie des MMP-2.....	41
Figure 13. Diminution de la concentration du TGF- β 1 par l'Avasimibe TM	42
Figure 14. Test du métabolisme cellulaire de gliomes murins F98 suite à une exposition de 240 minutes au WST-1 des cellules F98 (9210 cellules/puits) après des traitements de 24 h et 48 h avec l'Avasimibe TM	43

Figure 15. Test de la prolifération des cellules de gliomes murins F98 suite à une exposition de 30 minutes au BrdU (2500 cellules/puits) après des traitements de 24 h et 48 h à l'AvasimibeTM 44

LISTES DES SIGLES, ABRÉVIATIONS ET SYMBOLES

a.a.	Acide aminé
ACAT	Acyl-CoA-Acétyltransférase
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADP	Adénosine diphosphate
ANOVA	<i>ANalysis Of VAriance</i>
AP-1	<i>Activator protein 1</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adénosine Triphosphate
Avasimibe™	(2,4,6-tris(1-méthylethyl)phenyl]acetyl}sulfamic acid, 2,6-bis(1-méthylethyl)
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
BHE	Barrière hémato-encéphalique
BMPs	<i>Bone Morphogenic Proteins</i>
BrdU	5-bromo-2'-désoxyuridine
CBP	<i>CREB-binding protein</i>
CDK	<i>Cyclin-Dependent Kinase</i>
Chloroquine	9-aminoquinoline
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DO	Densité optique
D-PBS	<i>Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline</i>
DTT	<i>Dithiothréitol</i>
ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence</i>
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
EMEM	<i>Eagle's Minimum Essential Medium</i>
ESI	<i>ElectroSpray Ionization</i>
FAST1	<i>Factor transcription</i>
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i>
FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i>
FITC	<i>fluorescein isothiocyanate</i>
F98	Lignée cellulaire de gliomes murins
GBM	Glioblastome multiforme
GLUT-1	Transporteur du glucose-1
h	Heure
HMG-CoA	3-hydroxy-3-méthyl-glutaryl-Coenzym A reductase
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HSP90	<i>Heat shock protein 90 (HSP90)</i>
INC	<i>Incorporated</i>
kDA	Kilodalton
LAP	<i>Latency Associated Peptide</i>

LC	Chromatographie liquide
LTBP	<i>Latent TGFβ-Binding Protein</i>
LTGF- β :	<i>Latent Transforming Growth Factor β</i>
MALDI	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization</i>
MAP	<i>Mitogen-Activated Protein</i>
MEC	matrice extracellulaire
MGMT	<i>O⁶-methylguanine-DNA methyltransférase</i>
mg	Milligramme
MH	<i>Mad Homology</i>
MTIC	3-methyltriazén-1-yl-imidazole-4-carboxamide
ml	Millilitre
mM	Millimolaire
MMPs	<i>Matrix Metalloproteinases</i>
MS	Spectrométrie de masse
MS/MS	Spectrométrie de masse tandem
m/z	Ratio masse/charge
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PAGE	<i>Polyacrylamide gel electrophoresis</i>
PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i>
PDIA6	<i>Protein disulfide-isomerase A6</i>
PEP	Phosphoénolpyruvate
PGK1	<i>Phosphoglycerate kinase 1</i>
P-gp	P-glycoprotéine
POD	Peroxydase
pro-MMPs	Précurseur des <i>matrix metalloproteinases</i>
Pro-TGF- β	Précurseur du facteur de croissance tumoral de type β
PVDF	Polyfluorure de vinylidène
PXR	<i>Pregnane X Receptor</i>
rhMMP	<i>Recombinant human matrix metalloproteinase</i>
R-Smads	<i>receptor-regulated Smads</i>
RI	<i>Ribonuclease inhibitor</i>
RT-PCR	<i>Reverse transcription polymerase chain reaction</i>
SARA	<i>Smad-Anchor for Receptor Activation</i>
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
SIP1	<i>Smad interacting protein 1</i>
SMIF	<i>Smad4 intereacting protein</i>
SNC	Système nerveux central
SOAT	Stérols O-acyltransférase
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
T β R	<i>Transforming Growth Factor Beta Receptor</i>
TEMODAL®	Temozolomide
TGF- β	<i>Transforming Growth Factor Beta</i>
TGN	<i>Trans Golgi Network</i>
TGIF	<i>Transforming Growth Factor Beta Induced Factor</i>
Tris	Tris(hydroxyméthyl)-aminométhane
TOF	Temps de vol (<i>Time of flight</i>)

U-87 MG	Lignée cellulaire de gliomes humains
U-118 MG	Lignée cellulaire de gliomes humains
U-373 MG	Lignée cellulaire de gliomes humains
μL	Microlitre
μM	Micromolaire
v	Volume
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
WST-1	<i>Water Soluble Tetrazolium Salt-1</i>

INTRODUCTION

1. LES TUMEURS CÉRÉBRALES

1.1. Épidémiologie

Une tumeur cérébrale est un cancer qui prend naissance à partir du parenchyme cérébral (tumeur primaire). Elle peut aussi provenir des métastases d'une tumeur située ailleurs dans l'organisme (tumeur secondaire) (Demeule *et al.*, 2004). Statistiques Canada estimait qu'en 2011, il y aurait eu 2700 nouveaux cas de tumeurs cérébrales et que 1800 patients seraient décédés de cette maladie (SOCIÉTÉ CANADIENNE DU CANCER ET INSTITUT NATIONAL DU CANCER DU CANADA, 2011). Les tumeurs qui se développent à partir des cellules gliales (gliomes) du système nerveux central (SNC) représentent plus de 50 % de toutes les tumeurs intracrâniennes de l'adulte (Djedid *et al.*, 2010). En Amérique du Nord, le glioblastome multiforme (GBM) représente la forme la plus fréquente des gliomes avec une incidence de 3,3 nouveaux cas pour de 100 000 habitants (AMERICAN BRAIN TUMOR ASSOCIATION, 2011; Baldi *et al.*, 2010).

1.2. Pathogenèse

Les gliomes sont classés par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) en 4 grades histologiques selon leur degré de malignité (Tableau 1). En clinique, cette classification en grade permet de poser un diagnostic et de planifier le traitement le plus adéquat chez les patients. Le grade 0 représente les tissus sains. Le grade 1 est une forme juvénile et bénigne. Il est curable par chirurgie. Les tumeurs gliales de grade 2 sont des lésions pré-malignes à faible activité mitotique. Le grade 3 est représenté par des formes anaplasiques. Elles correspondent aux lésions malignes. L'activité mitotique et la densité cellulaire sont plus élevées par rapport aux grades inférieurs. Les tumeurs de grade 2 et 3 ont tendance à évoluer en grade 4 qui est le stade le plus malin. Il est associé au glioblastome multiforme (GBM) qui est caractérisé par des mitoses excessives, une prolifération très anarchique, la présence d'une forte densité cellulaire et l'apparition des zones de nécroses (Wechsler-Reya *et Scott*, 2001; Bababeygy *et al.*, 2009).

Grade	Astrocytomes	Oligodendrogliomes	Oligo-astrocytomes
I	Astrocytome pilocytique,	-	-
II	Astrocytome fibrillaire de bas grade	Oligodendrogliome	Oligo-astrocytome
III	Astrocytome anaplasique	Oligodendrogliome anaplasique	Oligo-astrocytome anaplasique
IV	Glioblastome multiforme	-	-

Tableau 1. Classification des tumeurs gliales selon leur grade histologique déterminé par l'Organisation Mondiale de la Santé. Produit par Marie Blanchette, 2009. Laboratoire du Pr. Fortin, Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé, Université de Sherbrooke.

Le GBM a le plus mauvais pronostic. Le taux de survie médiane des patients est de 9 à 14 mois lorsqu'une radiothérapie et une chimiothérapie adjuvantes à la chirurgie sont prescrites (SOCIÉTÉ CANADIENNE DU CANCER ET INSTITUT NATIONAL DU CANCER DU CANADA, 2011; Djedid *et al.*, 2010; Lefranc *et al.*, 2006). L'évolution du GBM est souvent rapide (en 2-3 mois). Les signes neurologiques ne sont pas spécifiques, ils se traduisent par une hypertension intracrânienne (céphalées et vomissements) qui s'associe souvent à des changements de comportements ou à de déficits neurologiques (Louis *et al.*, 2007).

2. TRAITEMENTS

2.1. Traitement standard

Le traitement standard recommandé consiste à une résection chirurgicale suivie d'une radiothérapie associée à une chimiothérapie avec le Temozolomide (Temodal®) (Stupp *et al.*, 2005). Le Temozolomide est un agent alkylant. Lorsqu'il est administré *per os*, le Temozolomide est rapidement converti en 3-methyltriazén-1-yl-imidazole-4-carboxamide (MTIC) par l'hydrolyse spontanée à pH physiologique. Le MTIC provoque une alkylation et une méthylation des bases guanines de l'ADN en position O⁶ et N⁷, ce qui gère une activité cytotoxique qui entraîne la mort des cellules tumorales. Une étude

canado-européenne a démontré que le Temozolomide peut prolonger la survie médiane des patients à 14,6 mois (Nieder *et al.*, 2009) lorsqu'ajouté à la radiothérapie.

2.2. Limitations thérapeutiques

Depuis plus de 40 ans, les traitements contre le GBM ont montré une faible efficacité parce qu'ils n'ont pas produit une amélioration significative de la survie des patients. Jusqu'à aujourd'hui, ce gliome de haut grade reste toujours incurable. L'échec des approches thérapeutiques actuelles s'expliquent par les facteurs suivants: la nature infiltrante du GBM, la présence d'une barrière hémato-encéphalique (BHE), la résistance des cellules gliales malignes à la radiothérapie et aux agents de chimiothérapie (Stupp *et al.*, 2005).

2.2.1. Nature infiltrante du GBM

Le GBM est souvent diagnostiqué à un stade avancé quand la taille de la tumeur et la dissimulation des cellules gliales malignes deviennent excessives (Behin *et al.*, 2003). Une excision totale de la tumeur ne peut être effectuée afin de préserver les structures du cerveau et pour éviter la perte des fonctions cognitives (Kemper *et al.*, 2004). La résection chirurgicale est limitée par la nature très infiltrante des cellules gliales tumorales dans le parenchyme cérébral (Vescovi *et al.*, 2006). Elles utilisent les fibres de la matière blanche et le corps calleux pour se propager dans les hémisphères du cerveau (Claes *et al.*, 2007). Ces cellules malignes infiltrantes situées en périphérie de la zone réséquée donneront lieu à une récurrence tumorale à cause de leur caractère invasif (Rich *et Bigner*, 2004; Hsieh *et al.*, 2012).

2.2.2. Barrière hémato-encéphalique (BHE)

Le cerveau possède une structure particulière appelée la barrière hémato-encéphalique (BHE). Elle limite le passage des molécules thérapeutiques vers le cerveau. Son rôle principal est de protéger le cerveau des bactéries, des virus, des toxines et des déchets métaboliques qui se retrouvent dans la circulation sanguine. Pour assurer l'approvisionnement du SNC en nutriments essentiels, la BHE régule finement les échanges entre le SNC et la circulation sanguine (Cecchelli *et al.*, 2007). En effet, les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins du cerveau forment des jonctions serrées et

effectuent un contrôle strict sur le transport des molécules vers le cerveau afin de réguler le microenvironnement cérébral. Ces jonctions serrées constituent un obstacle qui empêche l'ensemble des composés circulant dans le sang de se rendre au cerveau (Figure 1) (Chamberlain, 1998). Les molécules lipophiles ayant un poids moléculaire inférieur à 400-500 Da ont la capacité de traverser la BHE par diffusion passive afin d'atteindre le cerveau (Kemper *et al.*, 2004; Deeken *et Loscher*, 2007; Pardridge, 2007). La diffusion passive à travers la BHE est un phénomène marginal parce que les jonctions serrées rendent la BHE imperméable. Le cerveau ne produit pas les molécules nécessaires à son fonctionnement et il a besoin des nutriments. La BHE possède quelques transporteurs qui permettent un apport nutritionnel au milieu cérébral. Ainsi, l'oxygène, le dioxyde de carbone, les molécules polaires et le glucose utilisent des transporteurs spécifiques pour traverser la BHE (Abbot *et al.*, 2006). Le transporteur du glucose-1 (GLUT-1) est essentiel parce que le glucose est la source énergétique principale du cerveau (Bell *et al.* 1990).

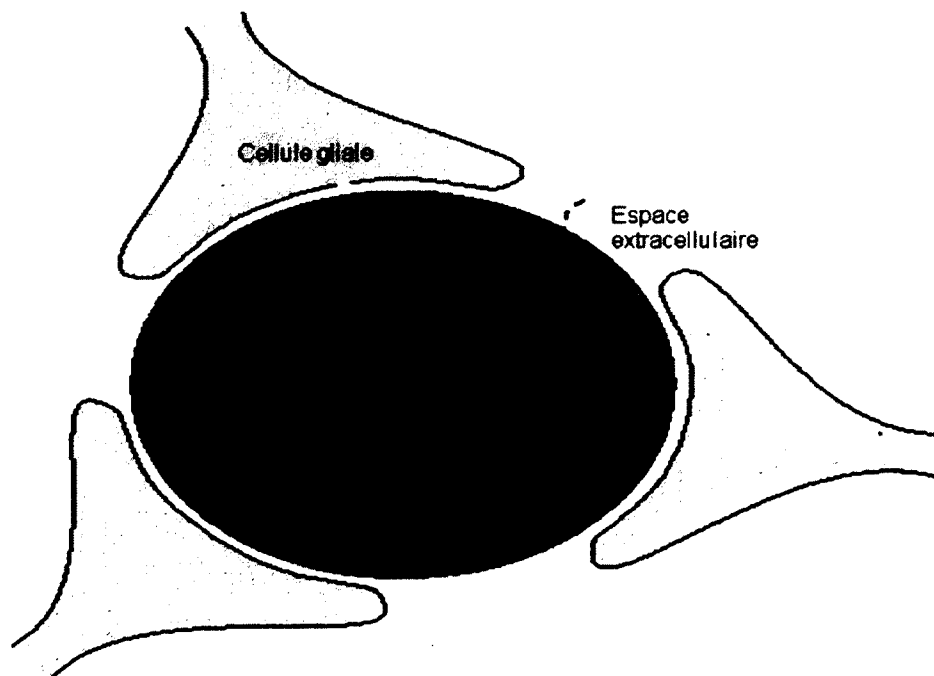


Figure 1. Illustration schématique de la BHE. L'absence de fenestration et la présence de jonctions serrées entre les cellules endothéliales sont les caractéristiques principales lui conférant son imperméabilité. La présence de pompes à efflux est aussi un facteur limitant l'acheminement des molécules thérapeutiques au sein du SNC. Produit par Marie Blanchette, 2009. Laboratoire du Pr. Fortin, Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé, Université de Sherbrooke.

2.2.3. Résistance à la radiothérapie et aux agents de chimiothérapie

Le GBM a une haute résistance à la radiothérapie et aux agents de chimiothérapie, ce qui réduit l'efficacité du traitement (Rich *et Bigner*, 2004; Nakada *et al.*, 2007; Claes *et al.*, 2007). La radiothérapie est limitée par la neurotoxicité provoquée par les dérivées radio-actives utilisées lors du traitement du GBM (Shaw *et Robbins*, 2006; Wen *et Kesari*, 2008). Les cellules du GBM, comme la BHE, possèdent des pompes à efflux, tels que la P-glycoprotéine (P-gp) (Figure 1). Ce sont des pompes membranaires ATP dépendant qui expulsent la majorité des molécules hydrophobes ou des agents antitumoraux à l'extérieur des cellules, ce qui affecte grandement l'efficacité de la chimiothérapie (Cordon-Cardo *et al.*, 1989). Les cellules cancéreuses du cerveau expriment des enzymes de réparation de l'ADN dont la *O*⁶-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) qui participent aussi à la chimiorésistance (Bredel *et al.*, 2001; Kishida *et al.*, 2012). Il y a aussi de nombreux autres mécanismes de résistance.

3. TRANSFORMING GROWTH FACTOR BETA (TGF- β)

Le GBM fait partie des gliomes malins les plus invasifs qui surexpriment plusieurs facteurs de croissance comme par exemple le *Transforming Growth Factor Beta* (TGF- β), le *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) et l'*Epidermal Growth Factor* (EGF). Parmi ces facteurs, le TGF- β joue un rôle majeur dans des voies de signalisation associées à la prolifération du GBM (Blobe *et al.*, 2000).

Le TGF- β a été découvert vers la fin des années 1970. Ce facteur de croissance est actif sur tous les types cellulaires. Cette cytokine joue un rôle primordial dans la détermination du devenir cellulaire au cours de l'embryogenèse et contrôle un large spectre de réponses biologiques. Le TGF- β contrôle la prolifération, la différenciation, la motilité, l'invasion, l'adhésion ou la mort cellulaire. Ces fonctions participent au contrôle du développement et de l'homéostasie des tissus dans des situations normales et dans plusieurs pathologies, telles que le cancer, la fibrose tissulaire ou encore des maladies auto-immunes (De Larco *et Torado*, 1978; Roberts *et al.*, 1998). Le TGF- β est surexprimé par les cellules gliales malignes et il est très impliqué dans le développement des GBMs (Blobe *et al.*, 2000). La superfamille du TGF- β dénombre une trentaine de facteurs (familles) parmi lesquels des TGF- β s, des activines, des *Bone Morphogenic Proteins* (BMPs), des oestrogénines, etc

(Feige *et al.*, 1998). Il existe 5 gènes distincts (TGF- β 1 à TGF- β 5) dans la famille du TGF- β . Seulement 3 des 5 gènes (TGF- β 1, TGF- β 2, et TGF- β 3) sont exprimés chez les humains. Ces isoformes sont au niveau structural très similaires. Ils partagent une analogie de structure supérieure à 70 %. L'homologie de ces protéines réside dans la partie C-terminale du précurseur qui contient 9 résidus cystéines conservés (Massagué *et al.*, 1987; Feige *et al.*, 1998).

3.1. Caractéristique du TGF- β 1

Le TGF- β 1 est l'isomère du TGF- β le plus abondant dans l'organisme et le plus étudié aussi. Cette protéine est exprimée en homodimère de deux sous-unités de 12,5 kDa liées par un pont disulfure. Dans les cellules gliales normales, le TGF- β 1 inhibe la prolifération et déclenche le mécanisme d'apoptose (Okragly *et al.*, 1994). Le TGF- β 1 arrête la progression du cycle cellulaire en activant les inhibiteurs du cycle cellulaire (p53 et p21). Ce qui aura pour effet d'inhiber la prolifération cellulaire. Le gène p53 (du chromosome 17p) est un gène suppresseur de tumeur. Il exerce des effets anti-cancéreux en contrôlant le cycle cellulaire, en induisant les réparations à l'ADN quand celui est endommagé. Lorsque les dommages à l'ADN sont irréparables, p53 se lie à l'ADN sous l'effet du TGF- β 1, ce qui provoque l'expression de certains gènes comme celui de p21. Il y aura la production de la protéine p53 qui arrête le cycle cellulaire et déclenche l'apoptose. Les mutations du gène p53 sont souvent impliquées dans la pathogenèse du GBM. La protéine p53 ne peut plus se lier à l'ADN de façon efficace, ce qui a pour conséquence de déclencher une prolifération du GBM puisque p21 ne peut plus exercer sa fonction d'arrêter le cycle cellulaire. Dans les cas pathologiques, les cellules cancéreuses se mettent à proliférer d'une manière anarchique. Cette prolifération cellulaire désordonnée est induite par l'effet du TGF- β dans le cas des tumeurs cérébrales. Ceci s'explique par la surexpression des récepteurs du TGF- β à la surface des cellules, par la réduction de l'expression ou l'inactivation des suppresseurs de tumeurs (p53, p21) qui régulent la signalisation du TGF- β (Dunn *et al.*, 2000).

Le TGF- β 1 joue aussi un rôle essentiel dans l'activation des voies de l'angiogenèse et de l'invasion dans les tumeurs primaires malignes (Okragly *et al.*, 1994).

Le TGF- β 1 joue un rôle crucial dans la formation de nouveaux vaisseaux sanguins (néoangiogenèse). L'angiogenèse est contrôlée par une balance d'inducteurs et d'inhibiteurs produits par des cellules normales ou tumorales (Yance *et Sagar*, 2006). Dans les cellules saines, il existe un équilibre entre les facteurs anti-angiogéniques et les facteurs pro-angiogéniques. Parmi ces facteurs, il y a le facteur de croissance des fibroblastes (*fibroblast growth factor*, FGF), le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (*vascular endothelial growth factor*, VEGF) et les métalloprotéases de la matrice (*matrix metalloproteinases*, MMPs). Ces molécules sont primordiales pour la régulation du processus d'angiogenèse (Papetti *et Herman*, 2002; Yance *et Sagar*, 2006). Elles sont respectivement sous-exprimées, surexprimées ou dérégulées dans les processus tumoraux ce qui permet d'induire une angiogenèse excessive (Yance *et Sagar*, 2006). Les gliomes malins, dont le GBM, font partie des cancers les plus vascularisés et la prolifération vasculaire sert d'indice de malignité (Rich *et al.*, 2003). Ces cellules ont besoin d'un apport en oxygène. Ce sont les nouveaux vaisseaux sanguins qui permettent d'apporter l'oxygène et les nutriments aux cellules à travers le flux sanguin afin de permettre croissance. Dans ces cellules cancéreuses, l'augmentation de la production du TGF- β induit la néoangiogenèse. Le TGF- β potentialise l'effet du VEGF et du FGF, il active la synthèse de PDGF-A et de PDGF-B dans les cellules endothéliales. Le TGF- β contrôle l'activité et l'expression des protéines impliquées dans le processus de l'angiogenèse tumorale (Dunn *et al.*, 2000). La dégradation de la matrice membrane basale et de la matrice extracellulaire sont nécessaires lors de l'angiogenèse et se fait surtout par les MMPs (Sawaya *et al.*, 1998). Elles appartiennent à la famille des endopeptidases Ca²⁺-dépendantes. Leur activité est optimale à pH neutre. La structure des MMPs affecte l'activité enzymatique (Nagase *et Woessner*, 1999; Stamenkovic *et al.*, 2003). Les MMPs possèdent à l'extrémité N-terminale un peptide signal (20 a.a.) et un pro-domaine (80 a.a.) constitué d'une séquence de résidus conservés (PRCGVPD). Le rôle de cette séquence est de bloquer le domaine catalytique afin de maintenir la forme latente (pro-MMP) (Nagase *et Woessner*, 1999). Le domaine catalytique (160-170 a.a.) contient un site actif de l'enzyme, un site de fixation du zinc et une séquence HExGHxxGxxHs qui permet la stabilité du zinc. L'ion zinc a un rôle essentiel dans l'activation des MMPs. Dans les pro-MMPs, le zinc du domaine catalytique forme une

liaison avec la cystéine du pro-domaine (Fanjul-Fernandez *et al.*, 2010). L'activation des pro-MMPs est basée sur la propriété que possèdent certaines substances de briser la liaison cystéine-zinc, soit directement, soit en modifiant la conformation du pro-domaine. La rupture de cette liaison active les MMPs. Lors du clivage de la liaison cystéine-zinc, il se produit une libération du zinc. Une molécule d'eau se lie au zinc et remplace la cystéine. C'est à ce moment que les pro-MMPs deviennent actives (Springman *et al.*, 1990; Wart *et* Birkedal-Hansen, 1990). Cette activation peut être faite *in vivo* par l'action de protéases (plasmine) ou *in vitro* par des radicaux libres, des détergents (SDS et l'urée), de la chaleur ou un pH acide (Nagase *et al.*, 1997; Liotta *et* Stetler-Stevenson., 1989; Sternlicht *et* Werb, 2001). Toutes les MMPs, (à l'exception de MMP-7, -23 et-26), possèdent une région riche en proline qui relie le domaine C-terminal (200 a.a.) au domaine catalytique (Egeblad *et* Werb, 2002; Fanjul-Fernandez *et al.*, 2010). Le domaine C-terminal est aussi appelé le domaine hémopexine. Il correspond au site d'interaction des MMPs avec leurs substrats spécifiques (Fanjul-Fernandez *et al.*, 2010).

Les MMPs sont classées 4 catégories en fonction de leurs affinités pour les substrats. Les collagénases interstitielles (MMP-1, MMP-8 et MMP-13) clivent les fibrilles de collagène. Au niveau des membranes basales, les collagénases de type IV (MMP-2 et MMP-9) dégradent le collagène, la gélatine et l'élastine. Les stromélysines (MMP-3, MMP-10 et MMP-11) clivent les protéoglycanes, la fibronectine, la laminine, la gélatine et les protéines globulaires. Les MMPs membranaires (MMP-14, MMP-15, MMP-16 et MMP-17) qui sont ancrées à la surface cellulaire par un domaine transmembranaire situé dans la partie C-terminale (Mignatti *et* Rifkin, 1996). Les MMPs sont nécessaires lors de la migration et l'invasion dans les tumeurs malignes en général et du GBM en particulier (Yamada *et al.*, 1994; Rooprai *et* McCormick, 1997). L'invasion par les cellules tumorales dont le GBM nécessite une dégradation de la membrane basale (composée notamment de collagène de type IV) et de la matrice extracellulaire (Chintala *et al.*, 1999). Dans les gliomes malins, cette dégradation se fait principalement à l'aide des collagénases MMP-2 et MMP-9 ainsi que par l'héparinase. Dans les tumeurs gliales de grade 4, le TGF- β 1 augmente l'expression des enzymes collagénase et l'héparinase qui dégradent la matrice extracellulaire, ce qui provoque l'invasion des cellules du GBM.

Le TGF- β 1 permet l'invasion des gliomes dans les tissus avoisinants (Platten *et al.*, 2001). Par contre, dans les cellules saines, il se produit un effet inverse. Le TGF- β 1 stimule la production de la matrice en augmentant l'expression des protéines de la matrice (collagène et fibronectine) et en diminuant les enzymes de dégradation de la matrice extracellulaire. Le TGF- β 1 joue également un rôle important dans le maintien des fonctions immunitaires. Quand les allèles codants pour le TGF- β 1 sont inactivés chez des souris, ces dernières meurent d'une nécrose tissulaire et d'une réponse inflammatoire généralisée. Le TGF- β 1 a non seulement une action anti-proliférative sur les lymphocytes T et les thymocytes, mais il contrôle également leur activation et leur différenciation (Chen *et Wahl*, 2002).

3.2. Caractéristique du TGF- β 2

Le TGF- β 2 est une cytokine sécrétée qui effectue de nombreuses fonctions cellulaires. Il s'agit d'une protéine extracellulaire glycosylée qui contrôle plusieurs fonctions. Le TGF- β 2 affecte le développement des membres, des yeux, des oreilles, du coeur, des poumons et du système uro-génital (Dunker *et al.*, 2000). Le TGF- β 2 a été initialement caractérisé comme étant le *Glioblastoma-derived T cell suppressor factor* (facteur suppresseur des cellules T dérivés du GBM) (Merzak *et al.*, 1994). Les cellules tumorales expriment des antigènes spécifiques qui peuvent être reconnus par le système immunitaire. Normalement, ces antigènes activeraient des macrophages, des cellules dendritiques et des lymphocytes T, ce qui provoquerait une destruction des cellules cancéreuses. Cependant, les cellules malignes du GBM ont développé des mécanismes pour échapper à l'action du système immunitaire. Dans le cas du GBM, les cellules malignes sécrètent le TGF- β 2 qui est un puissant immunosuppresseur du système immunitaire. Le TGF- β 2 provoque la suppression des lymphocytes T, il inhibe la maturation des macrophages. Le TGF- β 2 inhibe aussi la synthèse des cytokines pro-inflammatoires. Le TGF- β 2 agit aussi comme un inhibiteur fonctionnel de l'interleukine 2. Par ses actions immunosuppressives le TGF- β 2 favorise une croissance du GBM. La production de TGF- β 2 contribue aussi à l'augmentation de l'angiogenèse, à la stimulation de la croissance autocrine des cellules tumorales et à l'augmentation de la capacité de migration des cellules du GBM (Merzak *et al.*, 1994; Nakano *et al.*, 1995; Jachimczak *et*

al., 1996). Le TGF- β 2 représente donc un facteur qui participe à la progression des cellules tumorale dans le cerveau. Le TGF- β 1/2 est surexprimé dans le GBM. L'expression de TGF- β 1/2 augmente avec le grade des gliomes malins (Kjellman *et al.*, 2000). Chez l'humain, les cellules de GBM produisent une quantité significative de TGF- β 1/2 biologiquement actives à la fois *in vitro* et *in vivo* (Bodmer *et al.*, 1989; Malipiero *et al.*, 1990; Roszman *et al.*, 1991). Le plasma des patients atteints de GBM ont des concentrations de TGF- β 1/2 latent significativement élevées ($5,7 \pm 4,2$ ng/ml et $38,9 \pm 11,4$ ng/ml) par rapport aux contrôles sains dont le plasma ne contient pas de TGF- β . Le taux plasmatique de TGF- β 1/2 actif est supérieur ($0,60 \pm 2,3$ ng/ml et $0,17 \pm 0,16$ ng/ml) dans les patients atteints de GBM (Schneider *et al.*, 2006). Ce résultat semble indiquer que le TGF- β 1/2 actif peut être une cible pharmacologique dans de nouveaux traitement anti-GBM. Dans ce cas, l'utilisation des inhibiteurs spécifiques de la voie du TGF- β constituerait une stratégie contre le GBM.

3.3. Caractéristique du TGF- β 3

Le TGF- β 3 est impliqué dans la différenciation cellulaire, dans l'embryogenèse ainsi que dans le développement des poumons et du palais chez les mammifères (Kartinen *et al.*, 1995). En effet, le TGF- β 3 est censé réguler les molécules impliquées dans l'adhésion cellulaire et de la formation de la matrice extracellulaire (Herpin *et al.*, 1999; Taja *et al.*, 1999; Dudas *et al.*, 2004). Le TGF- β 3 est l'isoforme le moins connu.

3.4. Biosynthèse du TGF- β

Le TGF- β est synthétisé sous forme d'un précurseur immature qui est constitué de 3 domaines. Le pré-domaine contient un peptide signal à l'extrémité N-terminale. Le pro-domaine est composé d'un *Latency-Associated Peptide* (LAP). L'extrémité C-terminale contient le peptide qui deviendra le TGF- β mature (Figure 2).

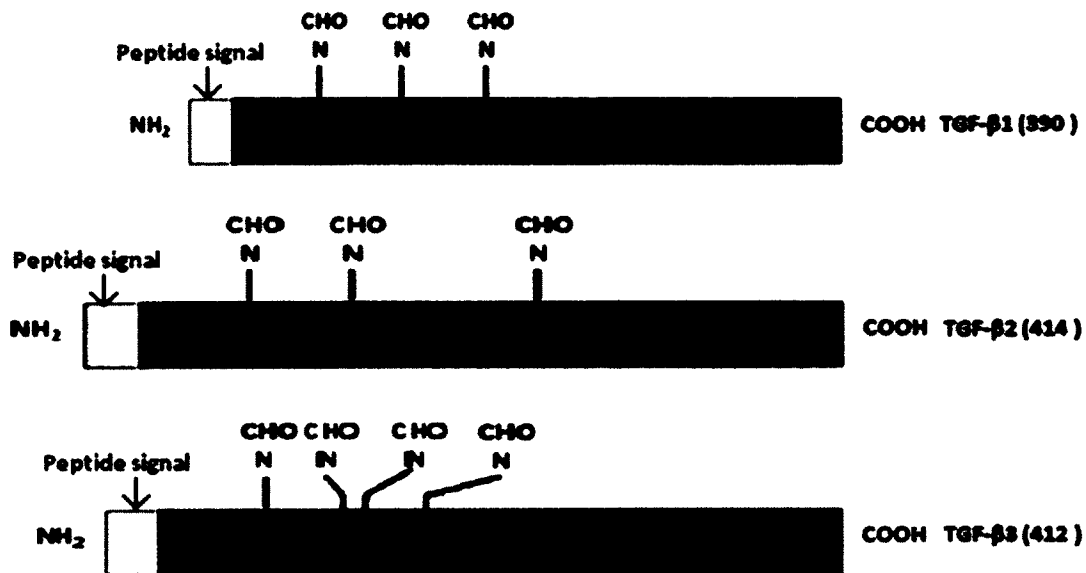


Figure 2. Représentation schématique des précurseurs du TGF- β humain avec la position des sites de N-glycosylation (N-CHO). Tiré et modifié de Ten *et al.*, 1990.

3.5. Maturation du TGF- β

Après le clivage du peptide signal, le précurseur (pro-TGF- β) subira un processus de maturation qui nécessite des conditions acides. La maturation du TGF- β se produit en conditions acides au niveau du *Trans Golgi Network* (TGN)/endosome lorsque le pro-TGF- β est clivé par la furine (Feige *et al.*, 1996). Le TGF- β mature forme un dimère constitué de 2 molécules identiques qui sont liées par des ponts disulfures. Le TGF- β mature reste associé au LAP de façon non covalente et forme ainsi un petit complexe latent (complexe TGF- β mature-LAP). Le LAP est responsable de la latence du TGF- β mature, c'est-à-dire que le TGF- β mature est sous une forme inactive (Figure 3).

3.6. Stockage du TGF- β

Le processus de stockage se déroule dans l'espace extracellulaire (MEC). Le LAP du petit complexe latent se lie par des ponts disulfures à une protéine *Latent TGF β -Binding Protein* (LTBP) et forme un grand complexe latent (Miyazono *et al.*, 1992). Le LTBP permet l'ancrage de LAP et du TGF- β mature à la matrice extracellulaire (MEC), ce qui permet leur stockage dans les composantes de la matrice (Figure 3).

3.7. Activation du TGF- β

Après son stockage dans la MEC, le TGF- β mature est encore inactif parce qu'il est lié au LAP. Pour acquérir son activité biologique, le TGF- β mature doit être activé, ce qui signifie que le TGF- β doit être dissocié du LAP (Figure 3). L'activation du TGF- β mature se fait *in vitro* par l'acide et la chaleur. *In vitro*, différentes protéases (MMP-2, MMP-9, plasmine, thrombospondine-1, intégrine $\alpha\beta_6$) dégradent la MEC. Ce processus mène à la libération de la forme bioactive du TGF- β mature qui ira interagir avec des récepteurs (Barcellos-Hoff *et al.*, 1996; Feige *et al.*, 1996).

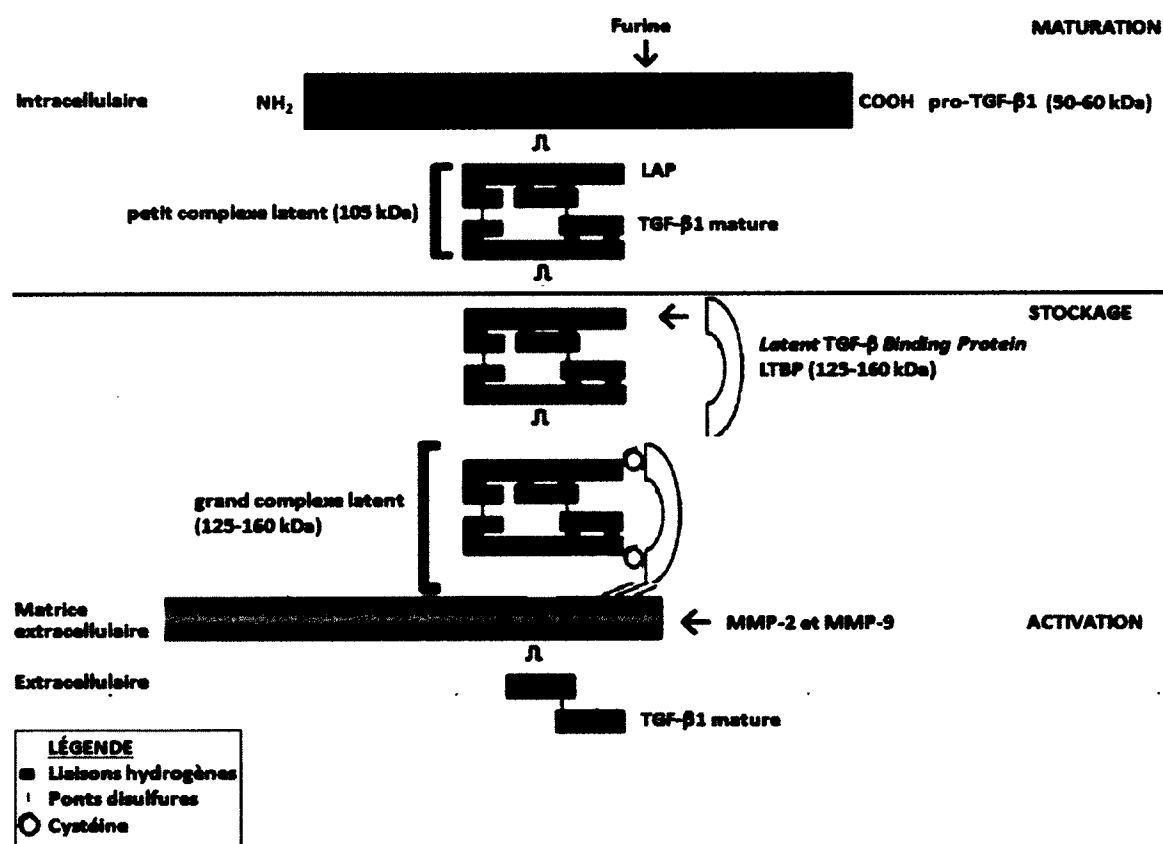


Figure 3. Représentation schématique du processus de maturation, de stockage et d'activation du TGF- β . Le précurseur du TGF- β 1 (la protéine Pro-TGF- β ; 50-60 kDa) est clivé par la furine en homodimère (12,5 kDa) qui se dimérise pour former le TGF- β 1 actif (25 kDa). Adapté de Feige *et al.*, 1996 et de la figure du Pr. André Cantin, 2007. Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé, Université de Sherbrooke.

3.8. Récepteur du TGF- β

Le TGF- β possède 3 différents types récepteurs (T β R-I, T β R-II et T β R-III). Ces derniers sont des récepteurs spécifiques de la famille des sérine/thréonine kinase. Ce sont des récepteurs transmembranaires constitués de glycoprotéines. La classification de ces récepteurs se fait sur la base de la structure de leurs domaines de liaison à l'hormone (Attisano *et al.*, 1998). Le T β R-I et le T β R-II ont un poids moléculaire respectif de 55 kDa et 70 kDa. Ils sont constitués de 3 domaines (un domaine extracellulaire, un domaine transmembranaire et un domaine intracellulaire). Le domaine extracellulaire est N-glycosylé et riche en cystéine. Il possède un site de liaison du TGF- β . Cette partie extracellulaire est relativement courte: elle ne contient que 150 acides aminées. Le domaine intracellulaire de T β R-I et de T β R-II possède une activité sérine/thréonine kinase qui est responsable de la transduction du signal. Le domaine intracellulaire du T β R-I est aussi constitué d'une région riche en glycine et sérine (GS) impliqué dans le contrôle de l'activité kinase (Massague *et al.*, 2000) Le T β R-III est constitué d'endogline ou de betaglycan. Le T β R-III est un corécepteur du T β R-I. L'endogline et le bêtaglycane ont un poids moléculaire respectif de 180 KDa et 300 kDa. Ce sont des glycoprotéines qui forment une liaison avec T β R-I (Andres *et al.*, 1989; Andres *et al.*, 1992).

3.9. Signalisation du TGF- β

Le TGF- β bioactif se lie soit sur le récepteur T β R-II ou sur le co-récepteur T β R-III. L'endogline ou le bêtaglycane du corécepteur permet la fixation du TGF- β au T β R-II avec une meilleure affinité. Le T β R-II recrute et phosphoryle le domaine GS du récepteur T β R-I (Massague *et al.*, 1998). Après la transduction du signal du cytoplasme vers le noyau se fait par la phosphorylation des protéines de la famille des Smads (Massague *et al.*, 2000). Le T β R-I phosphoryle les Smads 2 et 3. Ensuite, les *receptor-regulated Smads* (R-Smads) s'associent avec Smad 4 pour former un complexe qui transloque dans le noyau où il agit comme facteur de transcription (Moustakas *et al.*, 2001). Le complexe protéique R-Smad/Smad 4 active des cibles spécifiques par deux mécanismes distincts. Soit par des interactions avec des protéines de liaison à l'ADN comme FAST1, Fos/Jun, ou soit par des interactions directes avec l'ADN sur des promoteurs tels les promoteurs des gènes p15 et p21 (Govinden *et coll.*, 2003; Massague *et al.*, 2000).

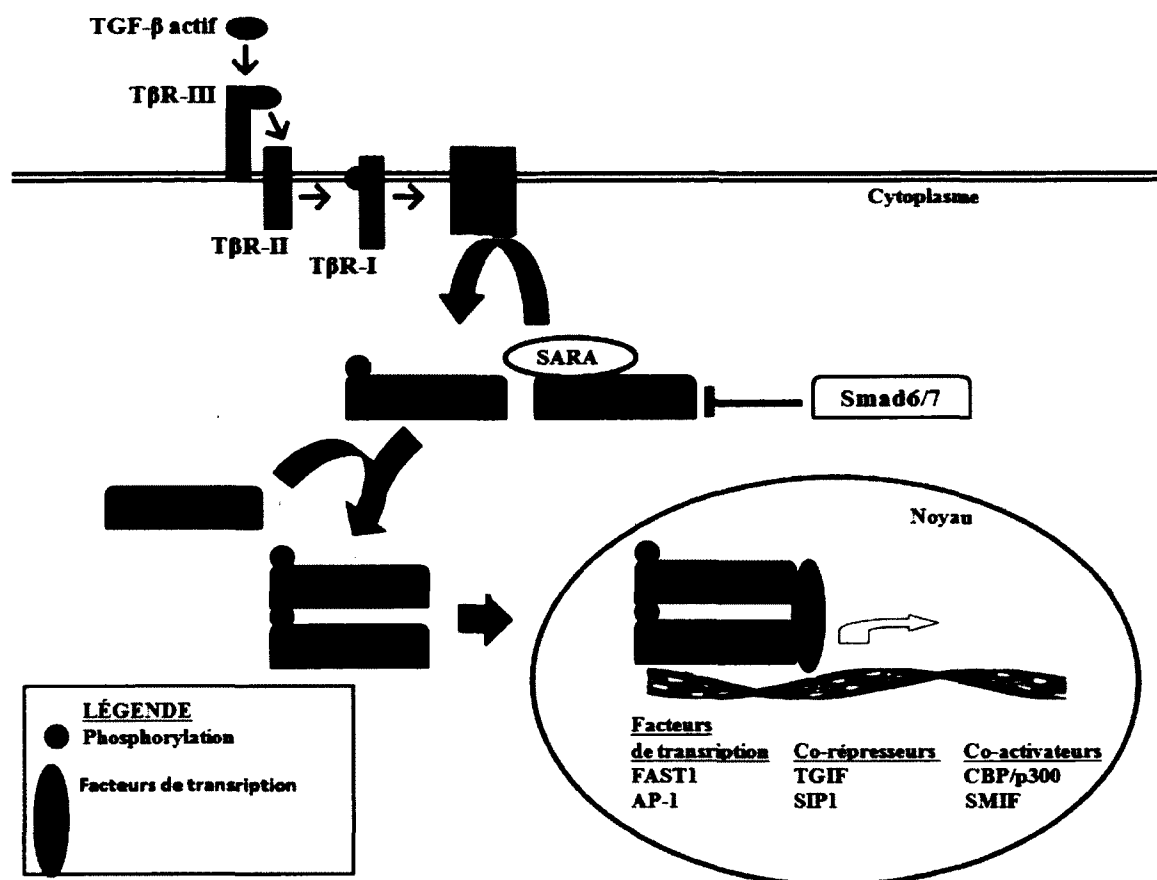


Figure 4. Représentation schématique de la voie de signalisation du TGF- β . Tiré et modifié de Pinzani *et al.*, 2001.

3.10. La famille des Smads

Les Smads sont des protéines cytoplasmiques. Elles sont réparties dans 3 groupes selon leurs fonctions: Les Smads régulés par le récepteur ou R-Smad (Smad 1, 2, 3, 5 et 8), les Smads communs ou Co-Smads (Smad 4 et 4 β) et les Smads inhibiteurs ou I-Smad (Smad 6 et 7). Les protéines Smads sont composées d'une région riche en résidus proline (linker) qui relie deux domaines d'homologie à Mad (MH). Ces domaines sont fortement conservés au cours de l'évolution. Le premier domaine (MH1) se situe dans la région N-terminal et le deuxième domaine (MH2) se retrouve dans la partie C-terminal de la protéine. Le récepteur T β R1 activé interagit avec une protéine adaptatrice *Smad-Anchor for Receptor Activation* (SARA). Elle permet d'ancrer les R-Smads dans la membrane

plasmique par des microtubules. De plus, SARA présente les Smads 2 et 3 au récepteur T β RI qui les recrute en interagissant avec leur domaine MH2 (Moustakas *et al.*, 2001).

4. LA CHLOROQUINE ET L'AVASIMIBETM : INHIBITEURS POTENTIELS DE LA VOIE DE SIGNALISATION DU TGF- β

Chaque étape de la biosynthèse jusqu'à la signalisation du TGF- β constitue des cibles thérapeutiques. Certains médicaments comme la chloroquine et l'AvasimibeTM peuvent être des candidats intéressants pour inhiber la voie du TGF- β dans les gliomes

4.1. Chloroquine

La chloroquine (ou 9-aminoquinoline) est connue depuis 1934. Elle est le premier médicament utilisée avec succès contre le paludisme. Cette molécule permet aussi de traiter des affections rhumatologiques. La chloroquine est un antipaludique de la famille des amino-4-quinoléines. Les membres de cette famille sont caractérisés par un noyau quinoléine. Ce noyau est une base faible qui peut être alkylé (Wiesner *et al.*, 2003). La chloroquine est donc un agent alkylant (Rutman *et al.*, 1961). En fait, un agent alkylant est un composé qui ajoute des groupements alkyles à des nucléophiles pour former de solides liaisons covalentes. L'ADN possède plusieurs groupes aux propriétés nucléophiles, dont en particulier, l'azote en position 7 de la guanine. La chloroquine provoque l'alkylation de la guanine de l'ADN, ce qui revient à rattacher les deux brins de l'ADN. Dans ces conditions, les deux brins d'ADN ne peuvent pas se dérouler. Il en résulte une inhibition de la réplication ou le blocage de la transcription de l'ADN du parasite *Plasmodium* qui est responsable du paludisme. La chloroquine agit aussi sur la forme érythrocytaire asexuée de tous les *Plasmodium* (schizonticide) (Graham, 2003).

4.1.1. Pharmacocinétique de la chloroquine

L'administration de la chloroquine se fait sous forme orale, intramusculaire ou rectale. Quand elle est administrée oralement, elle est rapidement absorbée dans le tube digestif. Des taux plasmatiques maximaux sont obtenus entre 1 h à 2 h après l'administration orale (Frisk *et* Gunnert, 1993; Tulpule, 1982). Elle se fixe surtout sur des protéines plasmatiques. Chez un patient atteint de malaria, la concentration plasmatique de chloroquine varie (20-240 μ g/L) avec un traitement standard comprenant 600 mg de

chloroquine, suivie de 3 doses de 300 mg après 6 h, 24 h et 48 h (pour une dose totale de 25 mg/kg). Cette molécule thérapeutique liposoluble pénètre dans la BHE pour atteindre des concentrations cérébrales élevées. La chloroquine a un grand volume de distribution (>100 L/kg) dans les tissus, ce qui fait que ses concentrations dans le cerveau peuvent être 10-30 fois plus élevées que dans le plasma (Telgt *et al.*, 2005). La longue demi-vie plasmatique de la chloroquine (1-2 mois) lui permet de s'accumuler dans le cerveau pendant une longue période (Hastings *et al.*, 2002; Krishna *et al.*, 1996). Donc, la capacité de la chloroquine de franchir la BHE peut constituer une action thérapeutique à long terme.

L'élimination de la chloroquine se fait par une lente excrétion rénale (Bray *et al.*, 1998; Slater, 1993). Les effets secondaires les plus fréquemment causés par la chloroquine sont des douleurs à l'estomac, des démangeaisons, des troubles de vision, de la diarrhée, des maux de tête, des nausées ou vomissements et une perte de l'appétit (SANTÉ CANADA, 2011).

La chloroquine, est aussi un agent alcalinisant lysosomotropique, c'est-à-dire qu'elle est capable de traverser la membrane cellulaire et de s'accumuler dans le milieu acide du TGN/endosome pour y augmenter le pH. Un traitement de 24 h des cellules de la lignée de gliomes humains (TG98G) avec la chloroquine diminue d'une manière dose-dépendante la maturation et la sécrétion du TGF- β 1 de (8 fois) par rapport aux cellules non traitées (Basque *et al.*, 2008). Donc, les modifications du pH par la chloroquine peuvent servir de stratégie pour inactiver la furine afin d'inhiber la maturation du TGF- β 1. De plus, la combinaison de la chloroquine à un traitement du GBM améliorerait la survie des patients (Briceno *et al.*, 2003; Sotelo *et al.*, 2006; Briceno *et al.*, 2007), ce qui semble indiquer que la chloroquine pourrait être utilisée dans les traitements des gliomes malins. Des investigations plus approfondies doivent être menées afin de savoir les effets de la chloroquine sur les gliomes malins.

4.2. Acyl-CoA-Acétyltransférase (ACAT)

Dans un autre ordre d'idée, l'Acyl-CoA-Acétyltransférase (ACAT) a été ciblée dans mon projet de recherche. Le cholestérol est le principal constituant des membranes cellulaires. Dans les cellules, une partie du cholestérol est présente sous forme d'esters de cholestérol dans les gouttelettes lipidiques. La majorité du cholestérol se retrouve sous forme de cholestérol libre à l'intérieur des membranes cellulaires. Le cholestérol libre stimule l'acyl-CoA:cholesterol acyltransférase (ACAT) qui est aussi appelé stérols O-acyltransférase (SOAT). Il s'agit d'une enzyme intracellulaire. L'ACAT, catalyse l'estérification du cholestérol libre à partir des acyl-CoA à longue chaîne de carbone, ce qui produit des esters de cholestérol dans le cytoplasme des cellules malignes de GBM (Jeng *et al.*, 1984). L'ACAT favorise aussi le stockage du cholestérol libre sous forme d'ester de cholestérol dans le foie (Chang *et al.*, 1997). L'estérification par l'ACAT est importante parce qu'elle garde constant le taux de cholestérol libre et évite une accumulation toxique de cholestérol libre. L'ACAT permet ainsi de maintenir l'homéostasie (Willner *et al.*, 2003).

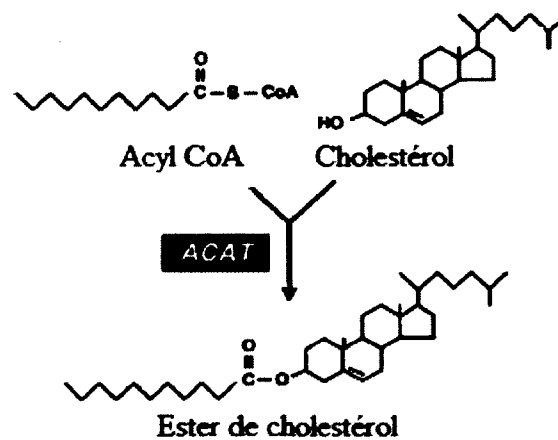


Figure 5. Biosynthèse de l'ester de cholestérol. L'Acyl CoA et le cholestérol libre sont le substrat de l'enzyme ACAT. Tiré et modifié de Chen, 2001.

Il existe 2 isomères de l'ACAT (ACAT-1 et ACAT-2) chez les mammifères (Chang *et al.*, 1993; Oelkers *et al.*, 1998). Leurs sites d'expression sont différents. L'ACAT-1 est ubiquitine et il s'exprime dans les neurones, les glandes surrénales, les

reins, les cellules de la peau et les macrophages (Chang *et al.*, 2001; LEE *et al.*, 1998; Uelmen *et al.*, 1995; Matsuda *et al.*, 1998; Sakashita *et al.*, 2000). Par contre, l'ACAT-2 est exclusivement exprimé dans les hépatocytes du foie et dans l'intestin où il est responsable de l'absorption du gras des aliments (Chang *et al.*, 2000; Yuan *et al.*, 1996). Les deux isoformes, ACAT-1 et ACAT-2, sont présents dans le fœtus humain et chez l'adulte, mais l'expression de ACAT-2 est 3 fois plus abondante (Smith *et al.*, 2004). L'accumulation des esters de cholestérol dans les tissus produisant les lipoprotéines (foie, intestin) est normale ainsi que dans les organes sécrétant les hormones stéroïdes. Dans le reste de l'organisme de l'humain, l'accumulation des esters de cholestérol produite par l'ACAT est reliée à des pathologies telles que l'athérosclérose (Bocan *et al.*, 2000), le cancer du sein (Boyd *et Mcguire*, 1990), le cancer des poumons (Umeki *et al.*, 1993) et les gliomes malins (Jeng *et al.*, 1984; Campanella *et al.*, 1992). Les esters de cholestérol permettent la prolifération vasculaire qui mène à la croissance des gliomes malins (Campanella *et al.*, 1992; Tosi *et al.*, 2003). Ce qui établit un lien entre l'activité de l'ACAT et la croissance des gliomes malins. Le TGF- β est surexprimé dans les gliomes malins (Kjellman *et al.*, 2000). Il est connu que le TGF- β augmente significativement l'expression de l'ACAT-1 de 2,9 fois et l'activité enzymatique de l'ACAT-1 de 1,8 fois durant la différenciation des monocytes en macrophages (Hori, 2004). Il peut exister une corrélation entre la surexpression du TGF- β et l'activité de l'ACAT.

Avant le début de ma maîtrise, les laboratoires des Prs David Fortin et André Cantin avaient été approchés par la compagnie pharmaceutique Chronogen Inc. Les résultats préliminaires de cette compagnie montraient qu'un inhibiteur de l'ACAT dénommée CHGN182 bloque la voie de signalisation du TGF- β 1. Ce qui laissait penser que les inhibiteurs de l'ACAT pourraient constituer une approche intéressante dans les traitements des gliomes malins.

4.2.1. Avasimibe™

L'Avasimibe™ (2,4,6-tris(1-méthylethyl)phényl]acetyl)sulfamic acid, 2,6-bis(1-méthylethyl) a été développé par Pfizer pour réduire le cholestérol dans le plasma et pour prévenir la progression de l'athérosclérose. L'Avasimibe™ est un inhibiteur spécifique de

l'ACAT-1 et de l'ACAT-2. Il a une très grande spécificité à l'ACAT-2 par rapport à l'ACAT-1 (Post *et al.*, 1999).

4.2.2. Pharmacocinétique de l'Avasimibe™

L'Avasimibe™ est administré oralement. Il est excrété principalement sous forme fécale et environ 2 % dans les urines chez le rat et chez le chien (Llaverias *et al.*, 2003; Insull *et al.*, 2001). La nourriture augmente la biodisponibilité de l'Avasimibe™ lorsqu'il est administré par la voie orale chez l'homme. La demi-vie de l'Avasimibe™ varie respectivement de 12,3 h à 24,1 h chez des sujets à jeun ou chez des sujets qui ont mangé de la nourriture (VORA *et al.*, 1997).

L'efficacité de l'Avasimibe™ a été étudiée dans des études précliniques chez les chiens et les rats (Robertson *et al.*, 2001; Llaverias *et al.*, 2003). Des doses élevées d'Avasimibe™ (≥ 300 mg/kg) provoquent des vomissements, des changements dans la consistance fécale, la salivation, la toxicité hépatique et dans la morphologie des globules rouges. La mortalité survient à partir d'une forte dose de 1000 mg/kg à cause de la toxicité hépatique chez les rats et les chiens (Sahi *et al.*, 2004). La compagnie Pfizer a arrêté le développement de l'Avasimibe™ à la phase II d'une étude clinique parce que l'Avasimibe™ interagit avec des médicaments utilisés dans le traitement des maladies cardio-vasculaires (Llaverias *et al.*, 2003; Nissen *et al.*, 2006). Ces interactions médicamenteuses se produisent par le fait que l'Avasimibe™ est le substrat de certains membres de la famille des cytochromes P450 (CYP). L'Avasimibe™ induit le cytochrome P450 3A4 (CYP3A4) du chien et de l'humain (Robertson *et al.*, 2001; Insull *et al.*, 2001). C'est dans le foie que l'Avasimibe™ est principalement métabolisé par le cytochrome CYP3A4 et dans une moindre mesure par le cytochrome P450C9 (CYP2C9) (Insull *et al.*, 2001). L'induction de CYP3A4 par l'Avasimibe™ se fait par l'activation des récepteurs impliqués dans les interactions médicamenteuses (*Pregnane X Receptor*, PXR). Le CYP3A4 participe à l'élimination du Lipitor® qui est un inhibiteur de l'HMG-CoA réductase (3-hydroxy-3-méthyl-glutaryl-CoA reductase). Le Lipitor® est utilisé pour soigner les patients qui ont des taux élevés de cholestérol. L'induction du

CYP3A4 par l'AvasimibeTM réduit l'efficacité du Lipitor® (Sahi *et al.*, 2003; Sahi *et al.*, 2004; Blumberg *et al.*, 1998; Lehmann *et al.*, 1998).

Malgré ces interactions avec d'autres médicaments, l'AvasimibeTM a moins d'effets secondaires nuisibles par rapport aux autres inhibiteurs de l'ACAT (Dominick *et al.*, 1993; Wolfgang *et al.*, 1995). Une dose maximale de 500 mg d'AvasimibeTM par jour doit être utilisée chez des humains pour inhiber significativement l'ACAT-1 et l'ACAT-2 (Post *et al.*, 1999). L'inhibition de l'ACAT par l'AvasimibeTM empêche la production des esters de cholestérol à partir du cholestérol libre dans les macrophages de rats et des humains (Llaverias *et al.*, 2003; Cases *et al.*, 1998). Il faut se rappeler que les esters de cholestérol sont indispensables pour la croissance des gliomes malins. La concentration des esters de cholestérol dépend de la concentration de l'AvasimibeTM (Llaverias *et al.*, 2003; Cases *et al.*, 1998). L'AvasimibeTM inhibent l'activité enzymatique des MMP-1, MMP-3 et MMP-9 (Bocan *et al.*, 2000). Les MMPs (MMP-2 et MMP-9) digèrent la MEC, ce qui permet la libération du TGF- β mature. Cette dégradation de la MEC contribue à l'invasion des gliomes malins (Platten *et al.*, 2001). Ce qui suggère que L'AvasimibeTM pourrait empêcher la libération du TGF- β mature de MEC afin d'éviter la prolifération des gliomes malins.

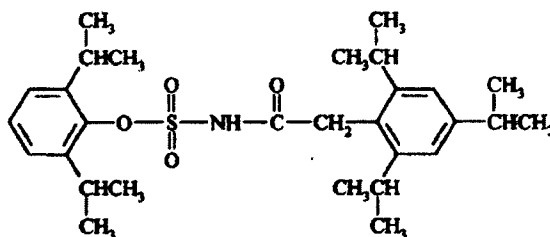


Figure 6. Structure de l'AvasimibeTM.

PROJET DE RECHERCHE

5. OBJECTIF DE L'ÉTUDE

Le TGF- β est un facteur de croissance qui contrôle le métabolisme, la prolifération, l'angiogenèse, l'invasion et la malignité des tumeurs cérébrales de haut grade. Dans les gliomes de grade 4, tels que le GBM, il se produit une surexpression du TGF- β . L'objectif principal est d'évaluer les effets de l'inhibition de la voie de signalisation du TGF- β sur le phénotype des gliomes malins. Pour atteindre l'objectif, deux molécules pharmacologiques, la chloroquine et l'AvasimibeTM ont été utilisées dans notre étude.

5.1. Hypothèses de travail

1) La chloroquine, est un agent alcalinisant lysosomotropique, qui module à la hausse le pH du TGN/endosome. La maturation du TGF- β par la furine et la dégradation de la MEC par la MMP-2 en vue de la sécrétion du TGF- β actif nécessite que le pH soit acide. Il a été établi que la chloroquine augmenterait le pH acide du TGN/endosome des lignées cellulaires de gliomes malins, ce qui inactiverait la furine et l'activité de la MMP-2 ne pourrait être optimale. Il en résulterait une inhibition de la maturation du TGF- β et de l'activité de la MMP-2. Ce qui concorderait avec une diminution du métabolisme et de la prolifération cellulaire.

2) Le TGF- β 1 augmente l'expression et l'activité de l'ACAT. Le CHGN182 est un inhibiteur de l'ACAT qui bloque la voie de signalisation du TGF- β 1. Il est connu que L'AvasimibeTM inhibe l'activité de l'ACAT et des MMPs de la MEC. Les MMP-2 et -9 sont essentielles à la sécrétion du TGF- β . L'inhibition de l'ACAT par l'AvasimibeTM inhiberait la voie de signalisation du TGF- β . Il en résulterait une inhibition du métabolisme et de la prolifération des lignées de gliomes malins.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

6. CULTURE CELLULAIRE

Des cellules malignes de gliomes murins non différenciés (F98) et humains (U-118 MG, U-87 MG, U-373 MG) de l'*American Type Culture Collection* (ATCC) étaient cultivées dans le milieu *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) ou *Eagle's Minimum Essential Medium* (EMEM) (Wisent) enrichi de 10 % *Fetal Bovine Serum* (FBS), 100 U/ml pénicilline et 100 µg/ml streptomycine (Wisent). Leur croissance était en monocouche dans l'incubateur à 37°C, 5 % CO₂, et 64 % humidité relative. Ensuite, ces cellules étaient lavées avec du *Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline* (D-PBS) 1X (Wisent) et placées dans le DMEM ou EMEM 0 % FBS, 100 U/ml pénicilline et 100 µg/ml streptomycine pendant 48 h. L'utilisation d'un milieu sans FBS est importante parce que le FBS contient des facteurs de croissance dont les isoformes du TGF-β qui pourraient biaiser les résultats.

Pour les traitements à la chloroquine et l'AvasimibeTM, les cellules de la lignée (F98) étaient placées dans les plaques de 96-puits qui contenaient le DMEM 0 % FBS, 100 U/ml pénicilline et 100 µg/ml streptomycine pendant 24 h-96 h. Les puits contrôles contenaient les cellules incubées en présence du véhicule de la chloroquine (D-PBS pH 5) ou du véhicule de l'AvasimibeTM (0,08 % Diméthylsulfoxyde DMSO).

Par la suite, le surnageant (milieu extracellulaire) a été récolté et concentré par centrifugation dans un filtre Amicon Ultra-4 (Millipore) à 7500 g pendant 15 minutes.

7. DOSAGE DE BRADFORD

La technique colorimétrique (*Quick Start Bradford Protein Assay*, Bio-Rad) a été utilisée pour doser la quantité de protéines totales retrouvées dans le surnageant des lignées (F98, U-118 MG, U-87 MG, U-373 MG). Le surnageant était dilué (v/v) dans le D-PBS. Le *Bovine serum albumin* (BSA) (Wisent) a été employé pour effectuer la courbe standard. Ensuite, 250 µL du réactif 1x de Bradford ont été ajoutés dans les puits (plaque de 96 puits) des échantillons. La densité optique a été mesurée à 495 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (PowerWave x 340, BioTek instruments Inc.) et du logiciel KC Junior v1.31.5 (BioTek instruments Inc.). Les données de la courbe standard provenaient de sa partie linéaire.

8. IMMUNOBUARDE DE TYPE WESTERN

8.1. Électrophorèse

L'appareil à électrophorèse a été assemblé en suivant le protocole de la compagnie (Bio-Rad). Les protéines sécrétées dans le surnageant de nos échantillons et dosées par Bradford ont été séparées par électrophorèse sur gel 1D de polyacrylamide (gel concentrateur 5 % acrylamide; 1,5 M Tris pH 6,8; gel séparateur 10 % acrylamide; 1,5 M Tris pH 8,8). Avant d'être chargés dans les puits, les échantillons ont été mélangés avec le tampon de chargement *Sodium dodecyl sulfate Loading Buffer* (Laemmli 6x) chauffés à 90°C pendant 10 minutes. Les échantillons ont migré pendant environ 90 minutes en imposant un potentiel de 100V dans le gel concentrateur et 120 V dans le gel séparateur. Le front de migration a été suivi avec le bleu de bromophénol jusqu'à ce que les bandes du marqueur se séparent bien au niveau des poids moléculaires (*PageRuler Prestained Protein Ladder*, Fermentas) des protéines d'intérêt (Pro-TGF-β1: 50-51 kDa et LAP du TGF-β1: 35-36 kDa) et qu'elles soient parfaitement définies.

8.2. Transfert

Après l'électrophorèse, le gel a été équilibré dans un tampon de transfert (25 mM Tris-base, 190 mM glycine, 20 % méthanol) pendant 20-30 minutes. Les protéines séparées dans le gel ont été transférées toute la nuit à 4°C et 10V sur une membrane PVDF (Roche).

8.3. Blocage

La membrane a été équilibrée dans une solution de *Tris buffered saline* (TBS) 1X. Pour visualiser les bandes et pour vérifier l'efficacité du transfert, la membrane a été colorée pendant 60 minutes avec une solution de coloration (0,1 % d'encre de Chine aussi appelée Fount India ink (Pellikan INC); 0,05 % tween 20; 0,1 % acide acétique et 99,85 % eau distillée). La membrane a été nettoyée 2 fois avec de l'eau distillée et 4 fois avec une solution de lavage (0,15 M NaCl; 10 mM Tris-base et 0,05 % tween 20). La membrane a été placée dans une solution de blocage (TBS Tween 0,1 % et 5 % lait) pendant 3 h à la température de la pièce et 4 lavages de la membrane ont été effectués avec la solution de lavage.

8.4. Immunobuvardage contre le LAP du TGF- β 1

La membrane a été scellée dans un sac en présence de l'anticorps primaire qui cible le LAP lié au TGF- β 1 (antihumain LAP provenant de la chèvre, AF-246-NA-R&D Systems, dilué 1:100 dans la solution de blocage). Le sac a été placé sur la plaque agitatrice dans une chambre froide dont la température était de 4°C. La membrane a été incubée à 4°C avec l'anticorps primaire durant toute la nuit. L'anticorps primaire reconnaît le LAP du TGF- β 1 humain et murin. Quatre lavages de 10 minutes sous agitation ont été effectués dans la solution de lavage. La membrane a été incubée avec l'anticorps secondaire anti-chèvre couplé au HRP (CLC50007-Cedarlane) dilué 1:2000 dans la solution de blocage pendant 1 h dans un sac scellé. Cette incubation s'est déroulée à la température ambiante. Après, la membrane a subi un autre lavage de 10 minutes. La révélation des bandes correspondantes au Pro-TGF- β 1 et au LAP du TGF- β 1 a été effectuée par la technique de chimiluminescence (ECL, Perkin Elmer Sciences) sur un film autoradiographique (Hyperfilm ECL, Amersham Biosciences) dans une chambre noire.

9. SPECTROMÉTRIE DE MASSE

9.1. Définition et principe

La spectrométrie de masse est une technique analytique qui permet de détecter, d'identifier et de quantifier des molécules d'intérêt et des composés inconnus par leur masse. La spectrométrie de masse est régulièrement utilisée dans l'étude des peptides et des protéines. Les analyses par cette technique exigent l'utilisation d'un spectromètre de masse. Ce dernier est un instrument qui sépare des atomes ou des molécules chargées selon le ratio masse/charge (m/z). La masse relative de peptides, de protéines, d'ARN et de molécules synthétisées chimiquement peut être mesurée de cette manière. La spectrométrie de masse peut être combinée à des digestions enzymatiques par des endopeptidases (trypsine, endopeptidase V8) ou des carboxypeptidases afin d'obtenir la cartographie par mesure de masses moléculaire d'un mélange peptidique. La combinaison de cette technique à la recherche sur les banques de données permet l'identification de protéines. Le spectromètre de masse est composé des parties suivantes (Hillenkamp *et al.*, 1990; Klarskov *et al.*, 2002):

- 1) Une source d'ions. Elle vaporise et ionise les molécules
- 2) Un analyseur. Il permet de séparer les ions en fonction du ratio m/z .
- 3) Un détecteur. Sa fonction est de compter les ions en leur attribuant leur ratio m/z .
- 4) Un enregistreur. Il traite le signal et génère les spectres de masse.
- 5) Un système de calibration. Il permet de donner la masse en fonction du rapport m/z .

9.2. Utilisation de la spectrométrie de masse dans notre étude

Cette technique permettrait de détecter et de caractériser les isoformes du TGF- β sécrétés dans le surnageant des lignées de gliomes malins. Nous avons d'abord mis au point à partir d'un standard BSA une méthode permettant le couplage de l'immunobuvardage de type Western contre la protéine LAP du TGF- β 1 avec la spectrométrie de masse.

9.3. Préparation du standard BSA et des échantillons de TGF- β

La solution standard de BSA (1 picomol/ μ L) diluée dans de l'eau HPLC (Sigma-Aldrich) a été préparée. Des échantillons de protéines sécrétées pendant 48 h dans le surnageant cellulaire de la lignée F98 en absence de FBS ont été utilisés. Pour l'électrophorèse sur gel 1D de polyacrylamide, les échantillons protéiques (standard BSA et le surnageant) ont été placés dans des puits différents d'un même gel. Un deuxième gel a été aussi utilisé et contenait seulement les protéines du surnageant. Les échantillons du deuxième gel (surnageant) ont été transférés sur une membrane PVDF dans les mêmes conditions que celles de la section 8.2. Ces échantillons du deuxième gel ont été réquisitionnés pour l'immunobuvardage de type Western blot contre le LAP du TGF- β 1 dans des conditions similaires aux sections 8.4. Il faut noter que le blocage par le lait masque les peptides des autres protéines, ce qui rend difficile leur identification par la spectrométrie de masse. Pour cette raison, les échantillons utilisés pour la spectrométrie de masse ont été bloqués avec une solution de blocage (0,1 % acide acétique; 0,5 % tween 20 et 99,4 % eau distillée). Le lavage de la membrane ainsi que l'incubation avec les anticorps primaires et secondaires étaient effectués dans une solution de lavage (0,15 M NaCl; 10 mM Tris-base et 0,05 % tween 20). Le film obtenu par autoradiographie a été superposé au premier gel afin de faciliter l'identification des bandes de LAP du TGF- β 1 en se basant sur les poids moléculaires. Les échantillons du premier gel (standard BSA et protéines du surnageant) avaient été colorés avec le sypro orange (*Protéin gel Stain*, Sigma-Aldrich). Les bandes protéiques (BSA et LAP du TGF- β 1) ont été bien identifiées sur le gel et découpées pour les digestions enzymatiques.

9.4. Digestion sur gel

Les bandes de protéines contenues dans le gel (BSA et LAP du TGF- β 1) ont été mis en morceau afin d'augmenter la surface de contact. Le gel a été par la suite incubé dans une solution de 100 mM NH_4HCO_3 pendant 15 minutes. Une deuxième incubation par l'acétonitrile a été faite pendant 15 minutes. Le reste de la procédure est semblable à l'étape de la digestion de la membrane. Par contre, les protéines contenues dans le gel ont été digérées par 100 ng/ μ L de trypsine diluée dans une solution composée de 40 % DMF et de 100 mM NH_4HCO_3 pendant 15 minutes. Par la suite, une solution contenant 50 mM

NH₄HCO₃ et 0,2 % DMF était ajouté pour une incubation toute la nuit. Les échantillons ont été centrifugés et placés au sonificateur pendant 10 minutes et recentrifugés une deuxième fois. L'acide formique 10 % était ajouté à l'échantillon qui a été mis au sonificateur et centrifugé de nouveau. Les échantillons ont été transférés dans des flacons. L'urée 5 M a été ajoutée et les échantillons ont été lyophilisés. Pour l'analyse par la spectrométrie de masse en tandem (LC/MS/MS), les échantillons ont été placés dans un sonificateur pendant 2 minutes et lyophilisés pendant au moins 45 minutes dans des flacons.

9.5. Acquisition des spectres par le LC/MS/MS

L'acquisition des spectres par le LC/MS/MS a été obtenue à partir d'un spectromètre de masse Q-TOF 2 (Micromass) couplé à un HPLC. Les étapes suivantes servent à décrire la procédure utilisée. Les échantillons lyophilisés dans les flacons ont été dissous dans une solution aqueuse contenant un solvant organique (acétonitrile ou méthanol) et un faible pourcentage d'acide (acétique ou formique). Les échantillons ont été injectés dans des colonnes C₁₈ du HPLC qui séparent les peptides des échantillons en fonction de leur hydrophobicité avant leur injection dans le capillaire du spectromètre de masse. Les échantillons sortent du capillaire dans un jet et s'évaporent sous l'effet du solvant organique, de la pression et de la tension électrique. C'est l'ionisation par la technique ESI. Il se forme des ions. L'acide a servi à la protonation des ions qui deviennent chargés. Les ions sont transportés jusqu'au premier analyseur MS1. Ce dernier tri les ions en fonction de leur masse et de leur charge. Le MS1 a choisi un ion parent qui est transporté dans la cellule de collision qui contient l'azote. L'ion parent entre en collision avec l'azote, ce qui génère d'autres ions qui sont captés par le deuxième analyseur MS2. Le deuxième analyseur fragmente les nouveaux ions en fonction de leur rapport m/z. Un détecteur compte les ions et un enregistreur traite le signal pour générer le spectre (Hillenkamp *et al.*, 1990; Klarskov *et al.*, 2002).

9.6. Recherche sur la banque de données

L'analyse par la spectrométrie de masse a permis d'obtenir les chromatogrammes et les spectres des peptides des échantillons testés. Ces paramètres ont été utilisés pour une identification sur la banque de données NCBI^{nr} du moteur de recherche Mascot (<http://www.matrixscience.com>). Les résultats obtenus par cette recherche ont permis de savoir si les peptides contenus dans les échantillons testés correspondent à la protéine d'intérêt (LAP du TGF- β 1). Les peptides du BSA servaient de standard pour s'assurer de la qualité de l'analyse.

10. ELISA

Afin de connaître les effets des molécules testées sur la maturation et la sécrétion du TGF- β 1, l'ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) a été effectuée avec la préparation commerciale Quantikine (R&D Systems). Cet essai ELISA permettait de doser la quantité de TGF- β 1 mature (actif et total) sécrétée dans le surnageant de la lignée de gliomes murins F98 après les traitements de 48 h et 72 h à la chloroquine (0 μ M, 25 μ M, 50 μ M) ainsi que 72 h et 96 h à l'AvasimibeTM (0 μ M, 25 μ M). Les cellules étaient incubées dans les plaques de 96-puits (2500 cellules/puits). Le surnageant a été récolté après les traitements et congelés à -20°C jusqu'au moment des essais. Les instructions contenues dans la trousse ELISA fournie par le fournisseur ont été suivies rigoureusement. La méthodologie utilisée va être brièvement décrite dans cette section. Chaque échantillon a été activé avec le HCl 1N pendant 10 minutes. Le HCl 1N permet de libérer le TGF- β 1 mature du LAP en brisant les liaisons non-covalentes (ponts disulfures, cystéine), ce qui mène à l'activation du TGF- β 1. Les échantillons ont été neutralisés avec le 1,2 N NaOH/0,5 M HEPES. La solution d'analyse (fournie par le fournisseur) a été mise dans chaque puits de la plaque ELISA. Après le standard et les échantillons activés ont été incubés pendant 2 h à la température ambiante. Les échantillons ont été lavés 4 fois avec un tampon de lavage (fournie par le fournisseur). Après les lavages, l'anticorps secondaire (anti-TGF- β 1 conjugué à la peroxydase) a été ajouté dans les puits et incubés pendant 2 h. Les échantillons ont été de nouveau lavés 4 fois et le substrat (également fourni par le fournisseur) a été ajouté dans les puits pour une incubation de 30 minutes à l'obscurité. La solution stop (HCl 1 N) a été ajoutée pour

arrêter la réaction. L'absorbance à 450 nm a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre (PowerWave x 340, BioTek instruments Inc.) et du logiciel KC Junior v1.31.5 (BioTek instruments Inc.). Les résultats obtenus ont été compilés. Les quantités de TGF- β 1 secrétées dans le surnageant ont été calculées à partir de la courbe standard représentant la densité optique en fonction des concentrations du TGF- β 1 (pg/mL).

11. TEST DU MÉTABOLISME CELLULAIRE

Les cellules de la lignée F98 qui ont subi un traitement avec l'AvasimibeTM (0 μ M, 0,025 μ M, 1 μ M, 10 μ M et 25 μ M) pendant 24 h et 48 h dans des plaques de 96 puits (9210 cellules/puits) ont été utilisées pour vérifier l'effet de l'AvasimibeTM sur le métabolisme cellulaire à l'aide du kit de *Cell Proliferation Reagent WST-1* (ROCHE). Les cellules ont été comptabilisées avant les traitements afin de s'assurer que chaque puits contient 9210 cellules. Après les traitements, un volume de 10 μ L du réactif WST-1 (dilution 1 : 10) a été ajouté dans chaque puits qui contenait les cellules. La plaque a été placée dans l'incubateur (37°C) et les cellules ont été incubées pendant 30, 60, 120, 180 et 240 minutes en présence du WST-1. Les mesures de l'absorbance avaient été prises à 460 nm et à 700 nm (absorbance de référence) à l'aide d'un spectrophotomètre (PowerWave x 340, BioTek instruments Inc.) et du logiciel KC Junior v1.31.5 (BioTek instruments Inc.). Les résultats ont été compilés à partir de 240 minutes d'incubation au réactif WST-1 parce que les absorbances étaient optimales à ce temps.

12. TEST DE LA PROLIFÉRATION CELLULAIRE

L'analyse de la prolifération des cellules F98 traitées avec l'AvasimibeTM (0 μ M, 0,025 μ M, 1 μ M, 10 μ M et 25 μ M) pendant 24 h et 48 h dans des plaques de 96 puits (2500 cellules/puits) a été effectuée par un essai qui mesure l'incorporation du 5-bromo-2'-désoxyuridine (BrdU) dans l'ADN cellulaire lors de la réplication (Roche). Les cellules ont été comptabilisées avant les traitements afin de s'assurer que chaque puits contient 2500 cellules. Pour réaliser ce test, les instructions détaillées du fabricant ont été respectées. En bref, 10 μ L de BrdU ([BrdU] final = 10 μ M) ont été ajoutés aux 100 μ L de milieu de culture et les cellules (F98) ont été incubées à 37°C. Les cellules ont été fixées avec la solution de Fix Denat (Roche) et l'ADN a été dénaturé à la température ambiante pendant 30 minutes. L'anticorps anti-BrdU couplé à une peroxydase (POD) a été ajouté

et incubé pendant 90 minutes à la température de la pièce. Après 3 lavages avec la solution de lavage, le substrat de la POD a été ajouté et l'absorbance à 370 nm ainsi que l'absorbance de référence à 492 nm ont été mesurées à l'aide d'un spectrophotomètre (PowerWave x 340, BioTek instruments Inc.) et du logiciel KC Junior v1.31.5 (BioTek instruments Inc.). Les résultats ont été compilés à partir de 30 minutes d'incubation du substrat. L'analyse de la prolifération cellulaire a été faite en soustrayant la DO à 370 nm à la DO à 490 nm des échantillons et du blanc. En effet, l'absorbance du blanc correspond aux interactions non spécifiques du BrdU et de l'anti-BrdU-POD dans le milieu. Cette densité optique doit être inférieure à 0,1. Après, les moyennes des DO normalisés à 100 % par rapport aux cellules contrôles non traitées à l'AvasimibeTM ont été calculées. Dans cet essai, l'absorbance mesurée par l'incorporation du BrdU dans l'ADN pendant la synthèse de l'ADN, est corrélée à la prolifération cellulaire.

13. ZYMOGRAPHIE

13.1. Principe général

La zymographie permet de mesurer l'activité des protéases (Overall *et al.*, 1988). C'est une technique d'électrophorèse particulière qui consiste à faire migrer des protéases dans un gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) contenant un substrat protéique. Plusieurs sortes de substrats tels que les protéoglycanes (Barrett *et al.*, 1966), la gélatine (Itoh *et al.*, 1998) et la caséine (Leber *et* Bakuil, 1997) sont utilisés pour la zymographie. Sous l'action du SDS, les protéases vont perdre leur conformation tridimensionnelle pour adopter une conformation linéaire. Ainsi, les protéases deviennent dénaturées. Le SDS empêche le repliement des protéases et leur confère une charge négative. L'imposition d'un voltage va permettre aux protéases de migrer dans le gel. La séparation des protéases se fait en fonction des modifications de leur structure tridimensionnelle et leur masse moléculaire. Après la migration, le SDS est éliminé, ce qui permet de renaturer les protéases dans le gel. Les protéases renaturées vont dégrader le substrat protéique. Le gel est ensuite coloré avec le bleu de Coomassie. Il apparaîtra une couleur bleue aux endroits où le substrat protéique n'a pas été dégradé dans le gel. Après la décoloration, les bandes blanches indiqueront la présence de protéinases. Pour une bande, l'intensité de migration

est proportionnelle à la quantité de protéinase qui a réussi à hydrolyser le substrat (Overall *et al.*, 1988).

13.2. Zymographie sur gel de gélatine

La zymographie sur gel de gélatine permet en général de révéler et de déterminer l'activité enzymatique des formes inactives de la gélatinase A (68-72 kDa pro-MMP-2) et B (92 kDa pro-MMP-9) ainsi que leurs formes actives respectives (62 kDa MMP-2) et (83-kDa, MMP-9) (Bourlier *et al.*, 2005; Baumann *et al.*, 2009). Ils dégradent la gélatine après avoir migré dans un gel SDS-PAGE.

Dans notre étude, l'évaluation de l'effet de la chloroquine sur l'activité des formes de MMP-2 sécrétées dans le surnageant des cellules F98 a été réalisé par la méthode décrite par Wang et son équipe (RASER *et al.*, 1995). Le surnageant utilisé provenait des cellules traitées avec la chloroquine (10 μ M, 25 μ M et 50 μ M) pendant 48 h et avec un contrôle (D-PBS) dans les plaques de 96 puits (2500 cellules/puits). Le gel de polyacrylamide (gel concentrateur 5 % acrylamide; 0,5 M Tris pH 6,8; gel séparateur 10 % acrylamide; 1,5 M Tris pH 8,8; gélatine) a été fabriqué. Après la polymérisation du gel de polyacrylamide, une pré-migration des échantillons a été réalisée pendant 15 minutes, à 120 V dans le froid (4°C). Les échantillons du surnageant ont été déposés dans les puits situés dans le gel concentrateur. L'électrophorèse des échantillons a été effectuée dans un tampon d'électrophorèse. La migration était faite sous un voltage constant de 150 V à 4 °C pendant environ 90 minutes. Après l'électrophorèse, le gel a été incubé dans une solution de 2,5 % Triton X-100 à la température de la pièce pendant 30 minutes afin d'éliminer le SDS et de permettre ainsi de renaturation des protéines. Le gel a été équilibré dans un tampon de développement (200 mM NaCl; 5 mM CaCl₂; 1 μ M ZnCl₂; 50 mM Tris; pH 7,6; 1 % Triton X-100) pendant 30 minutes et une incubation à 37°C a été faite toute la nuit. Pour révéler la présence des formes de MMP-2 (pro-MMP-2 et MMP-2), le gel a été coloré avec le bleu de Coomassie pendant 30 minutes puis décolorer dans un tampon de décoloration (40 % MeOH; 10 % CH₃COOH). Lorsqu'une coloration adéquate est obtenue, une photo du gel a été prise. Une analyse densitométrique des bandes correspondantes au pro-MMP-2 et MMP-2 a été effectuée

pour quantifier leur activité enzymatique.

14. ANALYSES STATISTIQUES

Les analyses statistiques des résultats de tests du métabolisme et de la prolifération cellulaire ont été réalisées par le test de Student t pour les échantillons appariés quand les expériences ont été réalisées 2 fois (n=2). Pour les résultats de l'activité de la pro-MMP-2 et celle de la MMP-2 (n=3), les analyses de la variance (ANOVA) avaient été effectuées. Pour les expériences réalisées une seule fois (n=1), l'écart-type a été calculé : les autres analyses statistiques ne pouvaient pas être réalisées afin de savoir si les résultats sont significatifs. Les barres d'erreur des graphiques représentent l'écart-type. Les essais ont été réalisés avec des échantillons en triplicata.

RÉSULTATS

15. DÉTERMINATION DU MODÈLE CELLULAIRE

Le TGF- β est impliqué dans le développement des gliomes malins. L'étude a commencé par la détermination du meilleur modèle cellulaire qui nous permettra d'évaluer les effets de l'inhibition de la voie de signalisation du TGF- β sur le phénotype des gliomes malins. À partir d'un anticorps anti-LAP qui reconnaît la région de LAP dans le TGF- β 1, l'immunobuvardage de type westrem blot a permis de détecter la présence du précurseur pro-TGF- β 1 (50 kDa-51 kDa) et du LAP (35 kDa-36 kDa) dans le surnageant des lignées des gliomes murins (F98) et humains (U-118 MG, U-87 MG et U-373 MG). Les poids moléculaires du LAP et du précurseur pro-TGF- β 1 varient légèrement entre les lignées (Figure 7). Ce qui est normal, les lignées des gliomes testées dans notre étude proviennent de sujets différents. Les lignées de gliomes humains U-118 MG et U-87 MG proviennent d'un homme caucasien de 50 ans et d'une femme caucasienne de 44 ans. L'ATCC ne fournissait pas toutes les informations sur l'origine des lignées de gliomes humains U-373 MG. Les lignées de gliomes murins F98 sont originaires du fœtus de rat âgé de 20 jours. L'anticorps primaire utilisé lors de l'immunobuvardage de type Western blot était dirigé contre le LAP du TGF- β 1 parce qu'il n'existe pas un anticorps qui permet de détecter à la fois le pro-TGF- β 1 et le TGF- β 1 mature. Dans la lignée F98, la quantité détectée de LAP est beaucoup plus forte que le pro-TGF- β 1, ce qui suggère que ces cellules de gliomes murines sécrèteraient une quantité importante de TGF- β 1 mature.

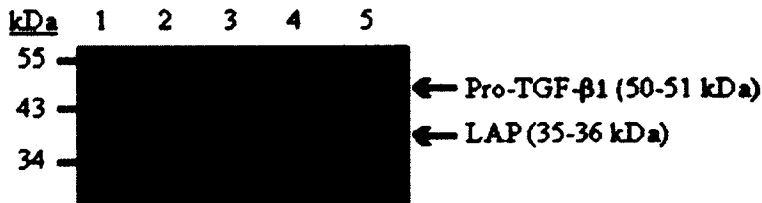


Figure 7. Détection par immunobuvardage de type Western des formes sécrétées de TGF- β 1 dans le surnageant des lignées de gliomes malins incubées dans leur milieu en présence ou en absence de FBS pendant 48 h (puits 1 : F98; puits 2 : Ctrl F98, 10 % FBS; puits 3 : U-118 MG; puits 4 : U-87 MG et puits 5 : U-373 MG). Les puits 1, 3, 4 et 5 ont reçu 15 μ g de protéines totales. Le puits 2 contenait 5 μ g de protéines totales

16. CARACTÉRISATION DU TGF- β PAR SPECTROMÉTRIE DE MASSE

Après l'électrophorèse sur gel 1D de polyacrylamide des protéines sécrétées dans le surnageant de la lignée de gliomes murins F98 pendant 48 h, des digestions trypsiques des bandes correspondantes au LAP du TGF- β 1 (35-36 kDa) ont été effectuées. Des tentatives d'identification des peptides de LAP du TGF- β 1 par chromatographie capillaire en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS) ont été réalisées. Les résultats obtenus montrent que le spectre du HPLC ne correspond pas à celui de LAP du TGF- β 1 (Figure 8).

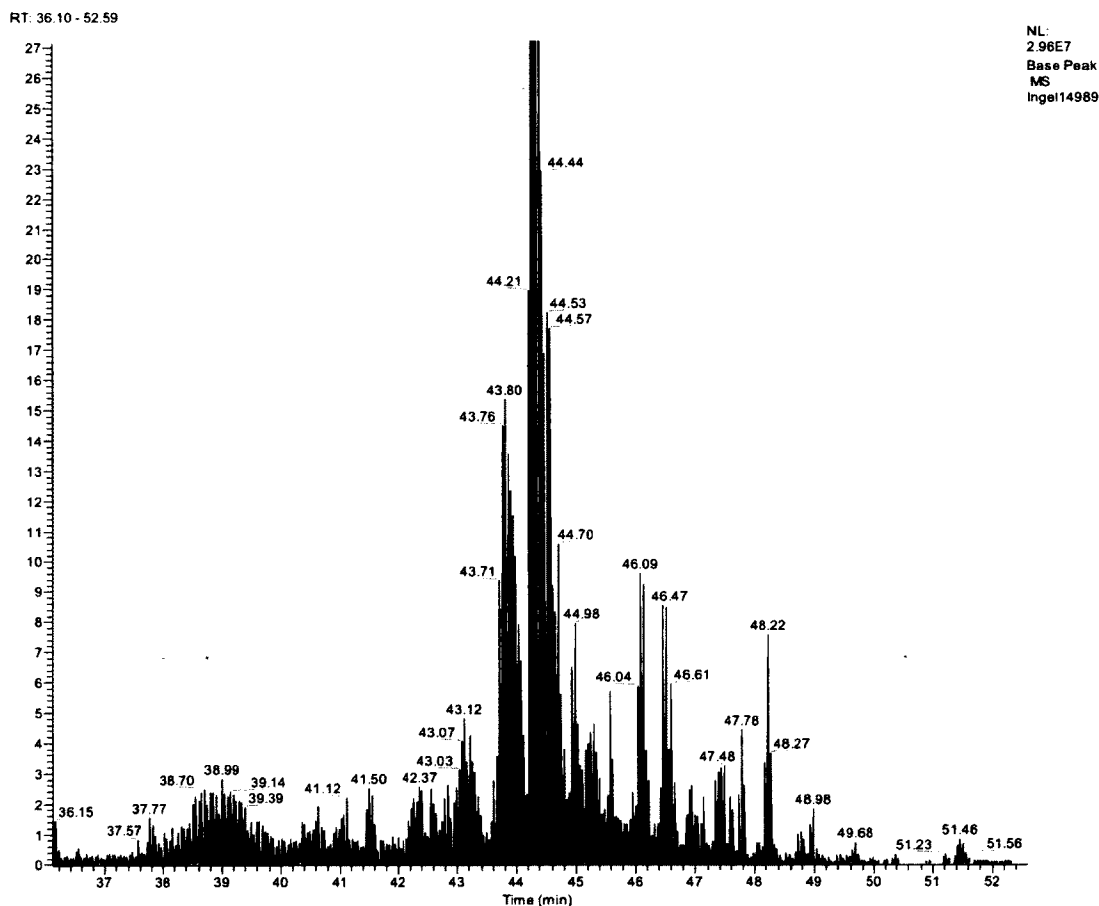


Figure 8. Les données obtenues par chromatographie capillaire en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS-MS). Ces peptides proviennent des clivages trypsiques de 120 μ g du LAP du TGF- β 1 de la lignée de gliomes murins F98 contenu dans des bandes d'un gel 1D de polyacrylamide (gel concentrateur 5 % acrylamide; 1,5 M pH 6,8; gel séparateur 10 % acrylamide; 1,5 M pH 8,8) suite à l'électrophorèse et la coloration avec le sypro orange. L'analyse des données dans la

banque NCBIInr a révélé que les peptides correspondaient à 50 protéines dont les plus probables sont: *phosphoglycerate kinase 1* (PGK1), *Pyruvate kinase*, *6-phosphogluconate dehydrogenase*, *Gamma-enolase*, *Ribonuclease inhibitor* (RI), *Protein disulfide-isomerase A6* (PDIA6) et *Heat shock protein 90* (HSP90).

17. EFFET DE LA CHLOROQUINE SUR LA MATURATION DU TGF- β 1

Pour explorer si la chloroquine pourrait avoir un effet sur la maturation du TGF- β , la quantification par ELISA du TGF- β 1 mature (actif et total) a été réalisée sur le surnageant de la lignée des gliomes murins F98 après les traitements de 48 h et 72 h avec 25 μ M et 50 μ M. Le contrôle était représenté par les cellules qui ont reçu le véhicule seul (D-PBS pH 5). L'essai ELISA semble indiquer que pour le traitement de 48 h avec 25 μ M de chloroquine, la concentration de TGF- β 1 mature actif et total sécrétée dans le surnageant cellulaire diminue respectivement de $41 \pm 4 \%$ et $30 \pm 6 \%$ par rapport au contrôle. Pour les traitements avec 50 μ M de chloroquine, la concentration de TGF- β 1 mature actif et total est réduite de $85 \pm 3 \%$ et $47 \pm 8 \%$ dans le surnageant cellulaire en 48 h (Figure 9 A). Les résultats obtenus lors des expositions de 72 h tendent à illustrer que la concentration de TGF- β 1 mature actif et total sécrétée diminue de $51 \pm 5 \%$ et $26 \pm 6 \%$ en présence de 25 μ M de chloroquine. Lors des traitements de 72 h avec 50 μ M de chloroquine, la concentration de TGF- β 1 mature actif et total diminue de $71 \pm 2 \%$ et $45 \pm 7 \%$ dans le surnageant cellulaire (Figure 9 B).

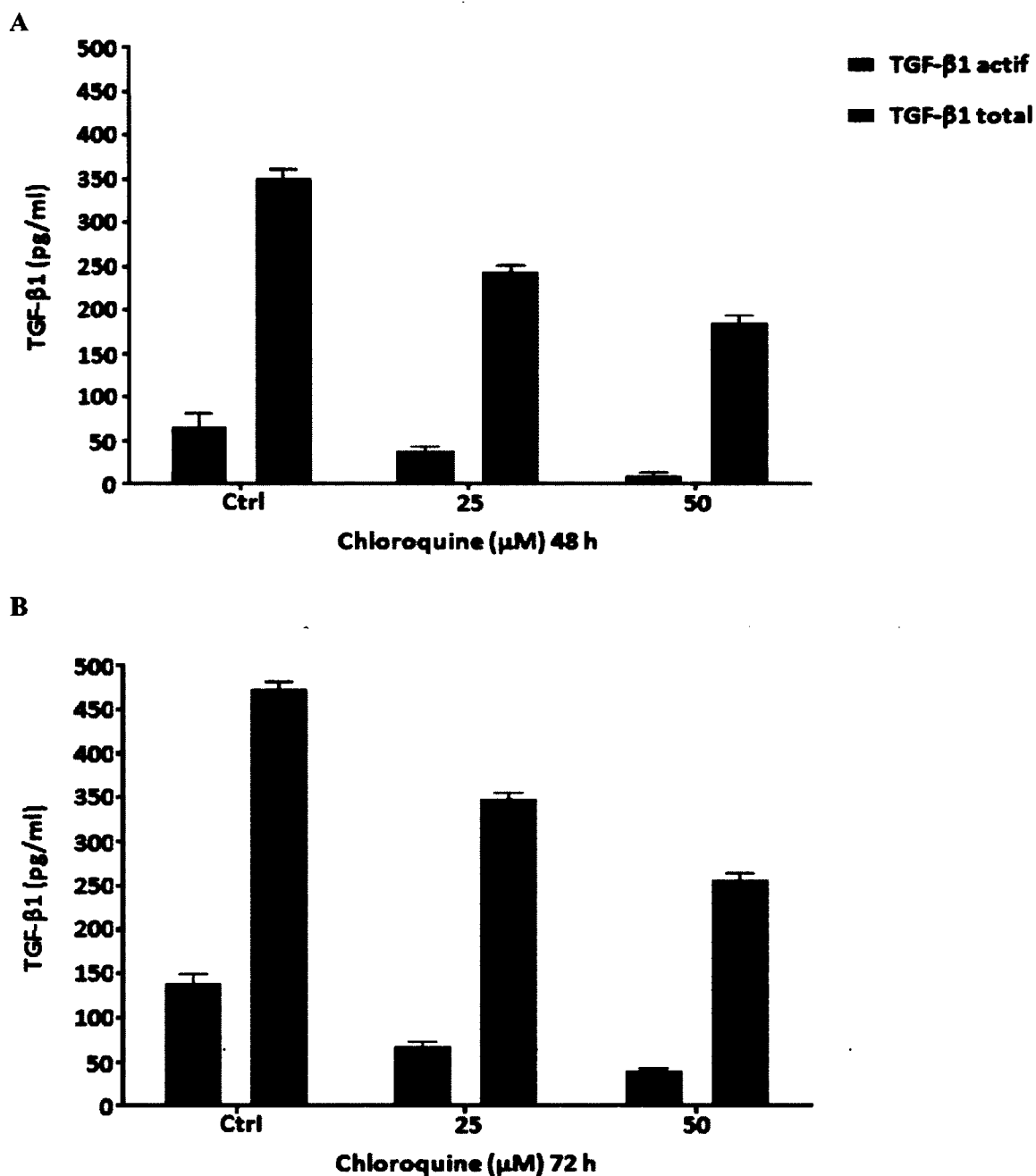


Figure 9. Diminution de la concentration du TGF- β 1 par la chloroquine. Mesure par ELISA de la quantité du TGF- β 1 mature actif et total retrouvée dans le surnageant (2500 cellules/puits) de la lignée de gliomes murins F98 après des traitements de 48 h et 72 h avec la chloroquine (A, B) $n=1$. Le contrôle était constitué des cellules traitées avec le véhicule seul (D-PBS pH 5).

18. EFFET DE LA CHLOROQUINE SUR LE MÉTABOLISME CELLULAIRE

Pour évaluer si la chloroquine a le potentiel d'inhiber le métabolisme cellulaire, l'essai colorimétrique WST-1 (Roche) a été utilisé. Lors de ce test, le réactif WST-1 est transformé en sel de Formazan dans la mitochondrie. La quantification de la production de Formazan donne une indication de l'activité du *succinate-réductase* mitochondriale correspondant au métabolisme cellulaire. Les résultats obtenus par l'essai WST-1 montrent que les traitements de 24 h avec 10 μM et 25 μM de chloroquine abaissent de $12 \pm 12 \%$ et $17 \pm 4 \%$, respectivement, le métabolisme des cellules de la lignée de gliomes murin F98 par rapport au métabolisme des cellules du contrôle (D-PBS pH 5) normalisé à 100 %. L'utilisation de la chloroquine à des concentrations de 50 μM et 100 μM pendant 24 h réduit significativement de $35 \pm 0,1 \%$ et $70 \pm 2 \%$ ($p < 0,05$) le métabolisme cellulaire (Figure 10 A).

Pour les traitements de 48 h, les doses de chloroquine de 10 μM , 25 μM , 50 et 100 μM semblent inhiber significativement de $38 \pm 5 \%$; $60 \pm 38 \%$; $72 \pm 45 \%$ et $83 \pm 14 \%$ ($p < 0,05$) le métabolisme cellulaire (Figure 10 B).

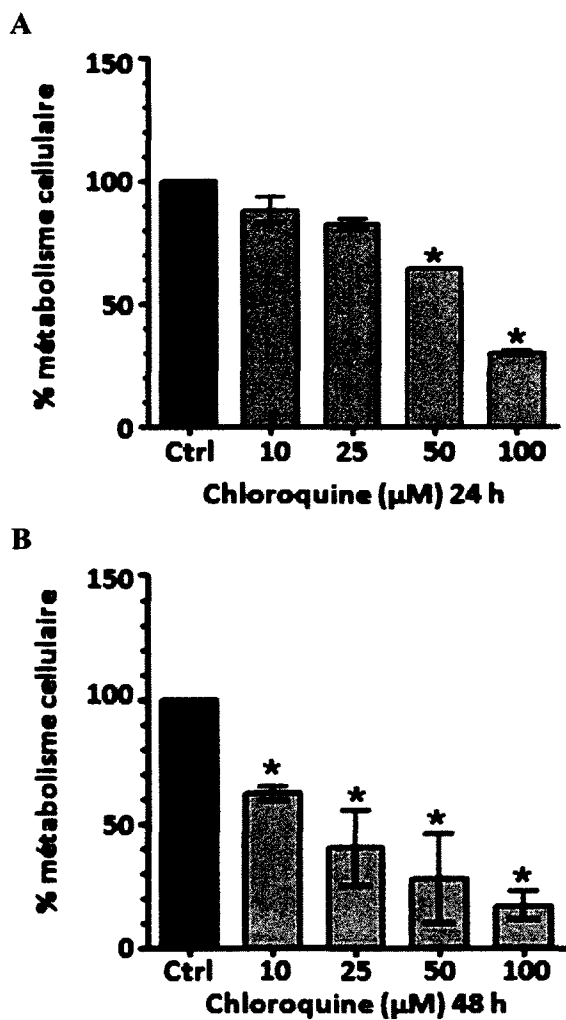


Figure 10. Test du métabolisme des cellules de la lignée de gliomes murins F98 suite à une exposition de 240 minutes au WST-1 (9210 cellules/puits) après des traitements de 24 h et 48 h à la chloroquine (A, B) n=2. Le contrôle représentait les cellules qui ont été incubées avec le véhicule seul (D-PBS pH5) * = $p < 0,05$.

19. EFFET DE LA CHLOROQUINE SUR LA PROLIFÉRATION CELLULAIRE

L'essai colorimétrique Bromodésoxyuridine (5-bromo-2'-désoxyuridine, BrdU) a été effectué afin de déterminer si la chloroquine a un effet quelconque sur la prolifération des cellules de la lignée de gliomes murins F98. Le BrdU est un analogue de la thymidine. L'essai BrdU (Roche) permet de mesurer la prolifération cellulaire par l'incorporation de la thymidine dans l'ADN lors de la phase de la synthèse (réplication) de l'ADN. Les résultats obtenus indiquent que les traitements de 24 h avec 10 μ M, 25 et 50 μ M de chloroquine empêchent l'incorporation du BrdU dans l'ADN, ce qui a pour conséquence de diminuer la prolifération cellulaire, respectivement de $22 \pm 25 \%$, $41 \pm 15 \%$ et $64 \pm 13 \%$ par rapport à celle du contrôle (D-PBS pH 5). L'inhibition de la prolifération cellulaire avec 100 μ M de chloroquine est significative de $86 \pm 5 \%$ ($p < 0,05$) lors des traitements de 24 h (Figure 11 A). L'incubation durant 48 h des cellules avec 10 μ M, 25 μ M, 50 μ M et 100 μ M de chloroquine réduit significativement de $40 \pm 40 \%$; $58 \pm 21 \%$; $86 \pm 4 \%$ et $93 \pm 5 \%$ la prolifération cellulaire des gliomes murins (Figure 11 B).

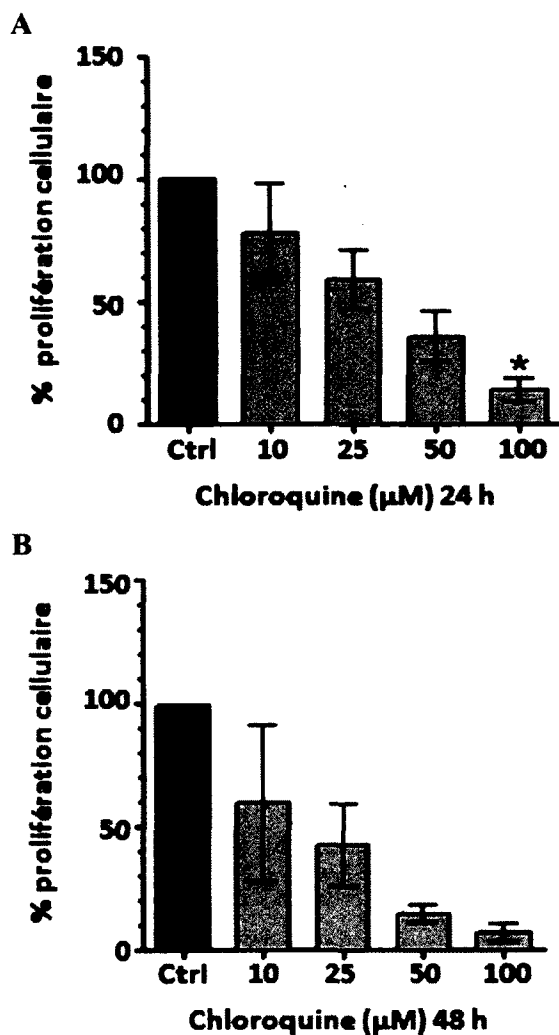


Figure 11. Test de la prolifération des cellules de gliomes murins F98 suite à une exposition de 30 minutes au BrdU (2500 cellules/puits) après des traitements de 24 h et 48 h à la chloroquine (A, B) n=2. Le contrôle représentait les cellules qui ont été incubées avec le véhicule seul (D-PBS) * = $p < 0,05$.

20. EFFET DE LA CHLOROQUINE SUR L'ACTIVITÉ DE LA MMP-2

Afin d'évaluer si la chloroquine pourrait inhiber l'activité des formes de MMP-2 sécrétées par la lignée de gliomes murins F98, la technique de zymographie sur gel de gélatine a été réalisée. Les résultats de la zymographie indiquent une présence de bandes correspondantes au pro-MMP-2 (68 KDa) et au MMP-2 (62 KDa) sécrétées dans le surnageant cellulaire suite aux traitements de 48 h à la chloroquine (10 µM, 25 µM et 50 µM). L'intensité des bandes diminue quand la concentration de la chloroquine

augmente dans les cellules gliales murines (Figure 12 A). En mesurant la densité des bandes situées à 62 KDa, les résultats recueillis montrent que 10 μM de chloroquine diminuent de $20 \pm 2 \%$ l'activité de la MMP-2 dans les cellules de la lignée F98 par rapport à celle du contrôle (D-PBS pH5) normalisé à 100 %. L'activité du MMP-2 est significativement diminuée de $40 \pm 3 \%$ ($p < 0,01$) et $75 \pm 1 \%$ ($p < 0,001$) dans les cellules incubées avec 25 μM et 50 μM de la chloroquine (Figure 12 B).

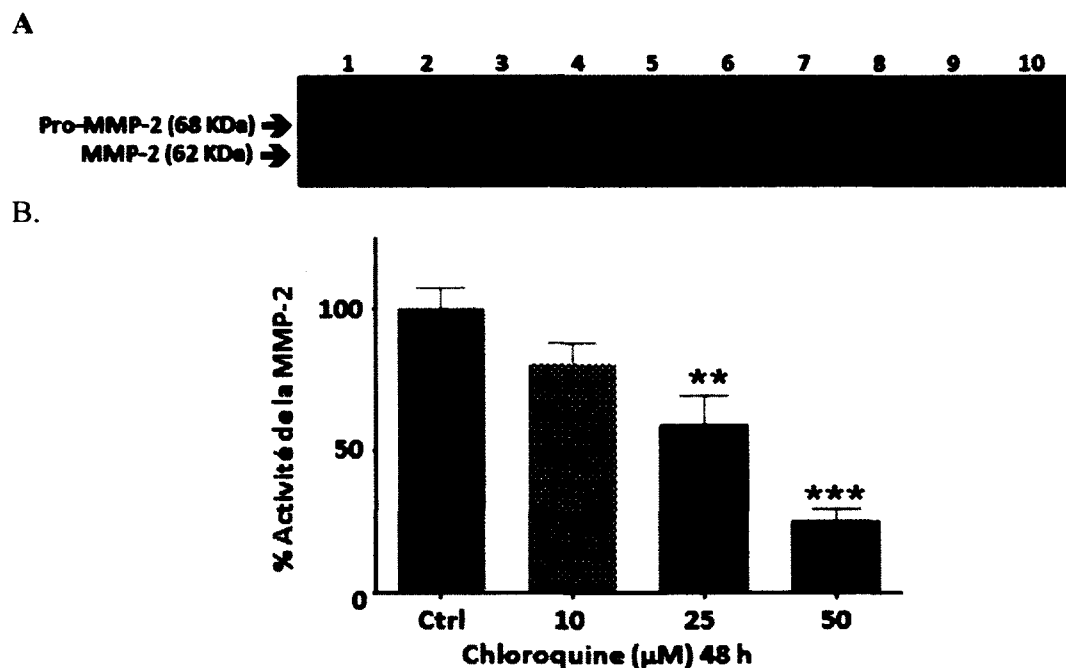


Figure 12. Zymographie des MMP-2.

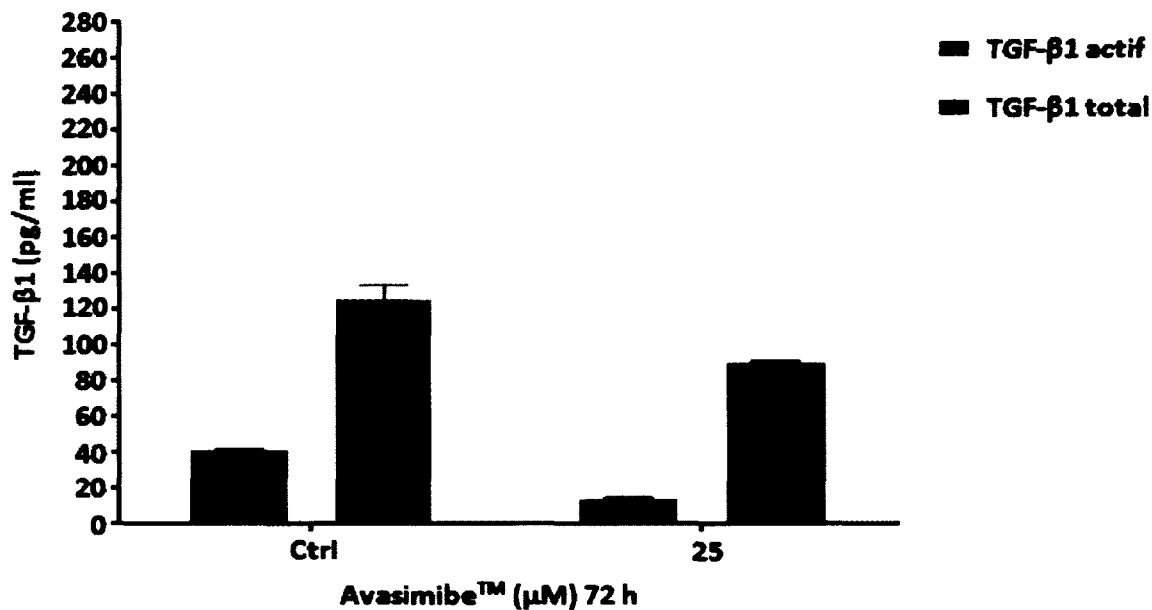
Détection par zymographie des formes de MMP-2 sécrété dans le surnageant de la lignée de gliomes murins F98 pendant 48 h (puits 1 et 2 : Ctrl D-PBS pH 5; puits 3 et 4 : 10 μM chloroquine; puits 5 et 6 : 25 μM chloroquine; puits 7 et 8 : 50 μM chloroquine; puits 9 : vide; puits 10 : rhMMP-2). Le rhMMP-2 (*recombinant human matrix metalloproteinases-2*) était un standard représentant les poids moléculaires de la MMP-2 et de la Pro-MMP-2 (A). Mesure de l'activité des MMP-2 par le densitomètre des bandes. L'activité de la MMP-2 a été calculée par le ratio de la forme active/pro-MMP-2 $n = 3$ ** = $p < 0,01$ et *** = $p < 0,001$ (B).

21. EFFET DE L'AVASIMIBETM SUR LA SÉCRÉTION DU TGF- β 1

Pour évaluer d'une manière exploratoire si l'AvasimibeTM pouvait avoir un effet sur la sécrétion du TGF- β 1, un essai ELISA a été réalisé. Les résultats semblent indiquer que suite à un traitement de 72 h des cellules de la lignée de gliomes murins F98 avec 25 μM d'AvasimibeTM, la concentration de TGF- β 1 mature actif et total diminue de $65 \pm 1 \%$ et $29 \pm 1 \%$, respectivement dans le surnageant par rapport au contrôle (0,08 %

DMSO) (Figure 13 A). Le traitement de 96 h avec 25 μM d'AvasimibeTM réduit de $40 \pm 2\%$ et $14 \pm 7\%$ la concentration de TGF- β 1 mature actif et total sécrété dans le surnageant cellulaire (Figure 13 B).

A



B

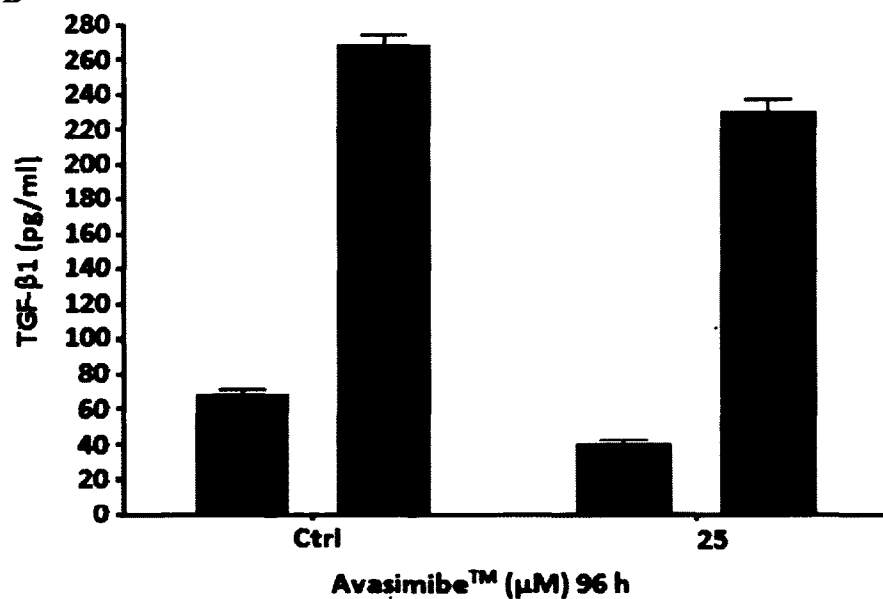


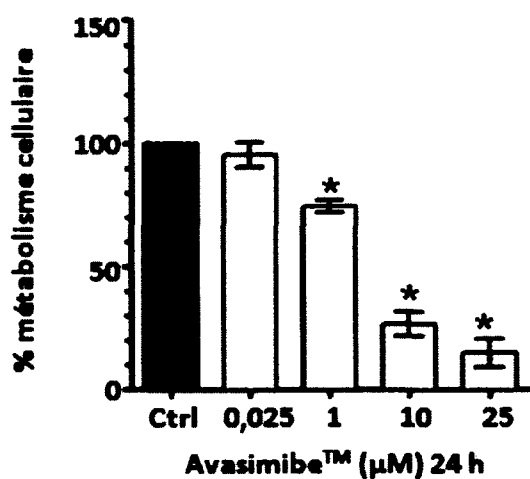
Figure 13. Diminution de la concentration du TGF- β 1 par l'AvasimibeTM.

Mesure par ELISA de la quantité du TGF- β 1 mature actif et total sécrété dans le surnageant (2500 cellules/puits) de la lignée de gliomes murins F98 après les traitements de 72 h et 96 h à l'AvasimibeTM (A, B) n=1. Le contrôle était constitué du véhicule seul (0,08 % DMSO).

22. EFFET DE L'AVASIMIBE™ SUR LE MÉTABOLISME CELLULAIRE

Les résultats du test WST-1 montrent que les traitements de 24 h et 48 h des cellules de la lignée de gliomes murins F98 avec 0,025 μM d'Avasimibe™ diminuent de $4 \pm 9 \%$ et $24 \pm 15 \%$ le métabolisme cellulaire (figure 14 A, B) par rapport à celui du contrôle normalisé à 100 %. Les doses de 1 μM , 10 μM et 25 μM d'Avasimibe™ semblent indiquer une inhibition significative du métabolisme cellulaire de $26 \pm 4 \%$; $74 \pm 9 \%$, $85 \pm 14 \%$ ($p < 0,05$) et $45 \pm 9 \%$; $84 \pm 11 \%$; $92 \pm 5 \%$ ($p < 0,05$) respectivement après les traitements de 24 h-48 h (Figure 14 A, B).

A



B

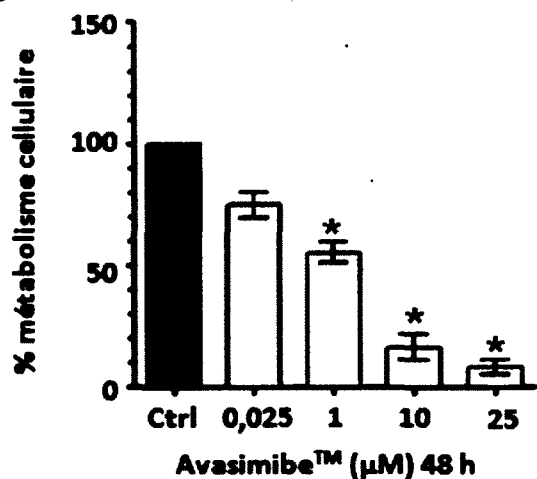


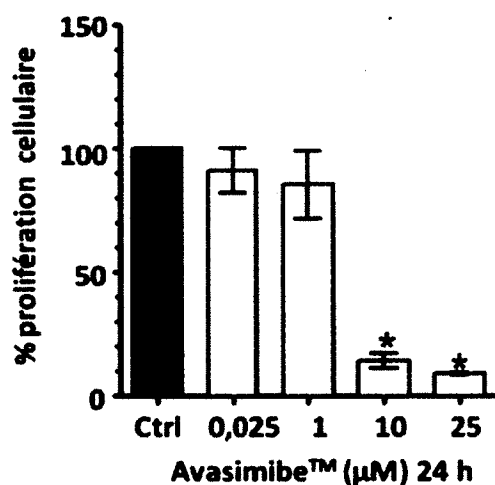
Figure 14. Test du métabolisme cellulaire de gliomes murins F98 suite à une exposition de 240 minutes au WST-1 des cellules F98 (9210 cellules/puits) après des traitements de 24 h et 48 h avec l'Avasimibe™ (A, B) $n=2$. Le contrôle était constitué du véhicule seul (0,08 % DMSO) * = $p < 0,05$.

Voir l'annexe 1 et 2 pour des résultats supplémentaires du test WST-1 réalisé sur les lignées de gliomes humains traitées avec la chloroquine et l'Avasimibe™.

23. EFFET DE L'AVASIMIBE™ SUR LA PROLIFÉRATION CELLULAIRE

Les résultats du test BrdU illustrent que 0,025 μM et 1 μM d'Avasimibe™ diminue la prolifération cellulaire des gliomes murins F98 de $9 \pm 9\%$ et $15 \pm 13\%$ ainsi que de $34 \pm 7\%$ et $37 \pm 9\%$ lors des traitements de 24 h et 48 h (figure 15 A, B). La présence d'une concentration de 10 μM et 25 μM d'Avasimibe™ provoque l'inhibition d'une manière significative de la prolifération cellulaire de ($86 \pm 2\%$ et $91 \pm 0,1\%$) et de ($94 \pm 2\%$ et $97 \pm 2\%$) après 24 h et 48 h (Figure 15 A, B).

A



B

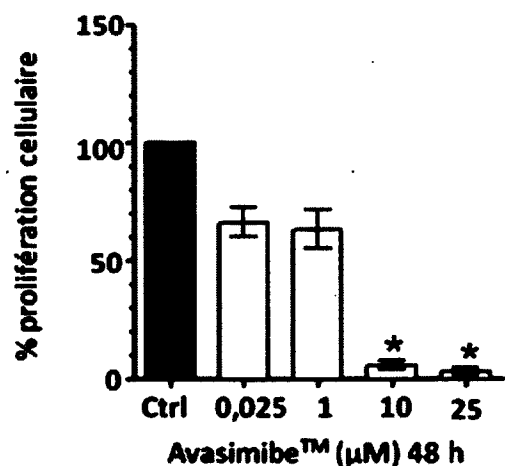


Figure 15. Test de la prolifération des cellules de gliomes murins F98 suite à une exposition de 30 minutes au BrdU (2500 cellules/puits) après des traitements de 24 h-48 h à l'Avasimibe™ (A, B) n=2. Le contrôle représentait les cellules qui ont été incubées avec le véhicule (0,08 % DMSO) * = $p < 0,05$.

DISCUSSION

24. DÉTERMINATION DU MODÈLE CELLULAIRE

Plusieurs facteurs de croissance dont le TGF- β se retrouvent dans le microenvironnement des cellules astrocytaires. Ces facteurs provoquent un dérèglement cellulaire qui mène au développement et au maintien d'une masse tumorale (Platten *et al.*, 2001). La surexpression du TGF- β est une caractéristique bien connue du GBM qui est un gliome malin de grade IV (Constam *et al.*, 1992; Schneider *et al.*, 2006). La voie de signalisation du TGF- β régule plusieurs fonctions biologiques comme le métabolisme et la prolifération cellulaire (Elliot *et Blobe*, 2005). Le TGF- β est synthétisé à partir d'un précurseur dénommé pro-TGF- β . Sa maturation nécessite d'abord un clivage du peptide. L'étape cruciale du processus de maturation est le clivage du précurseur par la furine dans les conditions acides du TGN/endosome (Leduc *et al.*, 1992; Feige *et al.*, 1996).

L'étude de Yee a prouvé que l'irradiation au cobalt ne modifie pas l'expression du TGF- β 1 dans les lignées de gliomes humains (U-118 MG, U-87 MG et U-373 MG). La production de TGF- β 1 dans les lignées de gliomes humains est associée à une résistance à la radiothérapie (Yee *et al.*, 2001). Dans notre étude, l'immunobuvardage de type Western blot a démontré la présence du précurseur pro-TGF- β 1 (50 kDa-51 kDa) et de LAP (35 kDa-36 kDa) du TGF- β 1 dans le surnageant des lignées des gliomes malins murins F98 et humains U-118 MG, U-87 MG et U-373 MG après des incubations de 48 h. Ce qui signifie que toutes ces lignées de gliomes malins pourraient constituer des modèles intéressants pour évaluer les effets de l'inhibition de la voie de signalisation du TGF- β sur le phénotype des gliomes malins. Les résultats de notre étude suivent la tendance de l'étude de Constam qui avait démontré que les formes de TGF- β se retrouvent dans le milieu des gliomes malins (Constam *et al.*, 1992). Les lignées des gliomes malins sécrètent des quantités différentes de TGF- β 1 (Pan *et al.*, 2006) dans le milieu extracellulaire. Le TGF- β régule la tumorigénicité des cellules souches de gliomes malins (Beier *et al.*, 2012). Une étude a prouvé que l'expression de TGF- β 1/2 est corrélée

au grade des gliomes malins. L'expression de l'ARNm de TGF- β 1/2 dans le tissu cérébral des patients atteints de GBM est 2 à 3 fois plus élevée que dans les tissus des patients qui ont les gliomes de grades inférieurs (Kjellman *et al.*, 2000). Ceci suggère que le TGF- β 1/2 est un facteur de croissance qui contribue à l'établissement du GBM.

25. CARACTÉRISATION DU TGF- β 1 PAR SPECTROMÉTRIE DE MASSE

Le but de l'utilisation de la spectrométrie de masse dans notre étude était de caractériser et de quantifier le TGF- β 1 sécrétés dans le surnageant des lignées de gliomes murins F98 après des incubations de 48 h en absence de FBS. Les échantillons utilisés contenaient des peptides de LAP du TGF- β 1 après des digestions trypsiques des bandes contenues dans le gel 1D de polyacrylamide. Pour s'assurer de la présence de LAP dans les échantillons, les bandes correspondantes au LAP du TGF- β 1 avaient bien été identifiées à partir de leur masse moléculaire (50 kDa-51 kDa) sur le gel coloré au sypro-orange avant la digestion. L'analyse de la banque protéine (Mascot) a montré que le spectre HPLC des peptides obtenus par chromatographie capillaire en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS) ne correspond pas à celui de LAP du TGF- β 1 de la lignée de gliomes murins F98. Ce qui s'expliquerait par le fait que le surnageant des gliomes malins est un mélange complexe qui contient plusieurs protéines abondantes (Constam *et al.*, 1992). La spectrométrie de masse détecte les peptides des protéines les plus abondantes dans un mélange de protéines. Il permet la quantification relative des protéines et la caractérisation des modifications post-traductionnelles dans les protéines (Van Oostveen *et al.*, 1997). Peut-être que la concentration de TGF- β 1 sécrété dans le surnageant des gliomes murins F98 était en quantité insuffisante pour être détecté par la spectrométrie de masse dans les conditions de notre étude. Au départ, le surnageant utilisé provenait de 12,5 millions de cellules de la lignée F98 qui avaient été incubées pendant 48 h et concentré par une centrifugation de 30 minutes à 7500 g. Pour augmenter la probabilité de détection par la technique de spectrométrie de masse, il serait souhaitable d'utiliser une très grande quantité de protéines provenant du surnageant. Pour cette raison, l'expérience a été optimisée en augmentant la quantité de cellules incubées à 50 millions et en concentrant au maximum le surnageant par 3 centrifugations de 30 minutes. Malgré ces modifications,

les spectres obtenus n'ont pas permis d'identifier et de quantifier les peptides de LAP du TGF- β 1 par la spectrométrie de masse (LC-MS/MS). La quantification des formes de TGF- β 1 mature (actif et total) sécrétée dans le surnageant de la lignée de gliomes murins F98 a plutôt été effectuée par ELISA. L'effet de la chloroquine et de l'AvasimibeTM a donc été étudié sur la maturation et la sécrétion du TGF- β 1 à l'aide de cette technique.

26. EFFET DE LA CHLOROQUINE SUR LA MATURATION DU TGF- β 1

La maturation du TGF- β 1 se déroule dans les conditions acides du TGN/endosome quand la furine clive le pro-TGF- β 1 (Feige *et al.*, 1996). Les résultats de notre étude indiquent qu'un traitement de 48 h avec des concentrations de 25 μ M et 50 μ M de chloroquine diminue de façon significative ($<41 \pm 4 \%$ et $>30 \pm 6 \%$) la quantité de TGF- β 1 mature actif et total sécrété dans le surnageant des cellules de la lignée de gliomes murins F98. Ce qui s'expliquerait par le fait que la chloroquine alcalinise le TGN/endosome et inactive la furine pour empêcher la maturation du TGF- β 1 (Basque *et al.*, 2008).

Après un traitement de 72 h, la chloroquine a un plus grand effet. La sécrétion du TGF- β 1 mature actif et total est diminuée à plus de $51 \pm 5 \%$ et $26 \pm 6 \%$. L'analyse des résultats suggère que plus la dose de la chloroquine est grande, plus elle peut diminuer fortement la maturation du TGF- β 1 dans le surnageant des gliomes murins F98. Ce qui est confirmé dans la littérature pour le cas de gliomes malins provenant de l'humain. Il a été démontré que le traitement de 24 h à la chloroquine diminue d'environ 8 fois d'une manière dose-dépendante le TGF- β 1 mature sécrété dans le surnageant de la lignée de gliomes humains T98G par rapport à des cellules contrôles non traitées (Basque *et al.*, 2008). La chloroquine semble donc être un candidat potentiel pour inhiber le phénotype de gliomes malins par la voie de signalisation du TGF- β 1.

27. EFFET DE LA CHLOROQUINE SUR LE MÉTABOLISME CELLULAIRE

L'effet d'une réduction de la maturation du TGF- β 1 par la chloroquine a été évalué sur le métabolisme des cellules de la lignée de gliomes malins F98. En mesurant la production de Formazan comme indication de l'activité de l'enzyme *succinate-réductase*

mitochondriale, l'analyse des résultats de l'essai WST-1 suggère que la chloroquine diminue le métabolisme cellulaire de la lignée F98. La présence de 50 μM et 100 μM de chloroquine a inhibé significativement le métabolisme cellulaire en 24 h. L'effet de la chloroquine s'est accru avec le temps. Toutes les doses de chloroquine (10 μM , 25 μM , 50 μM et 100 μM) testées ont inhibé significativement le métabolisme cellulaire en 48 h. Il semble avoir un effet dose-réponse entre la chloroquine et le métabolisme cellulaire de la lignée F98. Les doses ont été choisies en fonction de l'étude qui a prouvé que des doses de 50 μM et 100 μM de chloroquine provoquent l'apoptose des cellules de la lignée de gliomes humains A172 en 24 h (Park *et al.*, 2008). Une étude a démontré que le traitement de 24 h avec des doses de 2 μM et 5 μM de chloroquine diminue de façon dose-dépendante l'activité métabolique de la *succinate-déshydrogénase* mitochondriale de la lignée de gliomes malins U215 (Harhaji-Trajkovic *et al.*, 2012). La *succinate-déshydrogénase* est aussi appelé *succinate-réductase*. Les gliomes malins de grade IV ont une activité métabolique accélérée afin de maintenir l'approvisionnement des cellules en oxygène (Chinnaiyan *et al.*, 2002). Les résultats de notre étude font présager que l'altération du métabolisme cellulaire des gliomes par la chloroquine priverait les cellules gliales malignes d'un apport en métabolite qui est essentiel pour la croissance cellulaire. L'inhibition du métabolisme des cellules gliales malignes de la lignée F98 par la chloroquine corrèle avec la diminution de la concentration de TGF- β 1 mature qui était sécrétée dans le surnageant. Ce qui donne une indication selon laquelle la chloroquine peut agir sur la voie de signalisation du TGF- β afin d'affecter le phénotype des gliomes malins.

28. EFFET DE LA CHLOROQUINE SUR LA PROLIFÉRATION CELLULAIRE

L'analyse des résultats de l'essai colorimétrique BrdU a montré que les traitements de 24 h et 48 h à la chloroquine (10 μM , 25 μM , 50 μM , 100 μM) diminuent fortement (entre $20 \pm 25\%$ et $93 \pm 4\%$) la prolifération de la lignée de gliomes malins F98. Ces résultats suggèrent que l'effet de la chloroquine sur la prolifération cellulaire augmente avec la dose et le temps des traitements. La diminution de la prolifération cellulaire n'est pas significative lors des traitements de 48 h parce que $p > 0,05$. Notre étude a aussi démontré que la concentration de 100 μM de chloroquine a inhibé

significativement ($86 \pm 5\%$ $p < 0,05$) la prolifération cellulaire en 24 h. Ces résultats corrélaient avec l'inhibition du métabolisme cellulaire. La présence de la chloroquine diminue l'incorporation de la thymidine lors de la synthèse de l'ADN, due à une inhibition de la prolifération cellulaire. Pour que les cellules des gliomes malins prolifèrent, elles doivent être viables. Une étude a démontré que les traitements avec 2 μM -5 μM de chloroquine décroissent d'une manière dose-dépendante en 24 h la viabilité de la lignée de gliomes malins U215. Une étude a prouvé que la surexpression de TGF- β 1/2 dans le GBM est associée à une augmentation du grade de la tumeur, à la prolifération anarchique de ces cellules gliales malignes et à une diminution de la survie des patients (Kjellman *et al.*, 2000). Trois études cliniques (Briceno *et al.*, 2003; Sotelo *et al.*, 2006; Briceno *et al.*, 2007) semblent indiquer que la combinaison de la chloroquine au traitement du GBM améliorerait la survie médiane des patients. Le groupe contrôle comprenait des patients qui ont reçu un traitement constitué d'une résection chirurgicale, d'une radiothérapie et d'une chimiothérapie avec la carmustine. C'est un agent alkylant qui empêche la réplication de l'ADN dans les cellules du GBM. La chloroquine (150 mg/jour) a été ajoutée au traitement des patients du groupe chloroquine après la résection chirurgicale. Dans la première étude clinique, les patients étaient âgés en moyenne de 35 ans. La survie médiane était de 11 mois chez les 9 patients du groupe contrôle, alors qu'elle était de 33 mois chez les 9 patients traités avec la chloroquine (Briceno *et al.*, 2003). Dans la deuxième étude, les patients avaient un âge moyen de 47 ans. La survie médiane des 82 patients du groupe contrôle était de 8 mois. Elle a augmenté pour atteindre 18 mois chez les 41 patients qui ont reçus la chloroquine (Sotelo *et al.*, 2006). Dans la troisième étude, les patients avaient moins de 60 ans. La survie médiane étaient respectivement de 11 mois chez les 15 patients du groupe contrôle et de 24 mois chez les 15 patients traités avec la chloroquine (Briceno *et al.*, 2007). Ces études cliniques comportaient des limites. L'augmentation de la survie médiane des patients du groupe chloroquine était peut-être due au hasard à cause de la petite taille des échantillons. L'âge moyen des patients n'était pas représentatif. Malgré leurs limitations, ces études indiquent que la chloroquine pourrait avoir des effets bénéfiques chez les patients atteints par les gliomes malins de grade IV. Des études plus poussées devraient être réalisées avec de grandes tailles d'échantillons.

29. EFFET DE LA CHLOROQUINE SUR L'ACTIVITÉ DE LA MMP-2

Les résultats de la zymographie ont confirmé la présence du Pro-MMP-2 et du MMP-2 dans le milieu extracellulaire. Ce qui signifie que les cellules gliales murines de la lignée F98 ont sécrété les deux formes de MMP-2 dans le surnageant après une incubation de 48 h. Les traitements avec 25 et 50 μM de chloroquine ont significativement inhibé (>40 %) l'activité enzymatique de la MMP-2 en 48 h. L'analyse des résultats montre que l'inhibition de la MMP-2 par la chloroquine corrèle avec la diminution de la maturation du TGF- β 1, avec les inhibitions du métabolisme et de la prolifération cellulaire. Des études ont démontré que la MMP-2 joue un rôle important dans la voie de signalisation du TGF- β . La MMP-2 digère la membrane basale et le collagène de type IV de la MEC (Merzak *et al.*, 1994; Feige *et al.*, 1996). Cette action de la MMP-2 entraîne la libération du TGF- β mature qui se détache du LAP. Ce qui provoque l'activation du TGF- β mature qui aboutit à la prolifération cellulaire, à la migration et à l'invasion des cellules gliales malignes (Merzak *et al.*, 1994; Platten *et al.*, 2001). Il est prouvé que la chloroquine inhibe la furine par son action alcalinisant (Basque *et al.*, 2008). Notre étude semble montrer que la chloroquine diminue la maturation du TGF- β 1 et l'activité de la MMP-2, ce qui se traduit par une diminution du métabolisme et de la prolifération cellulaire de la lignée de gliomes malins F98.

30. EFFET DE L'AVASIMIBETM SUR LA SÉCRÉTION DU TGF- β 1

La présence de 25 μM d'AvasimibeTM diminue la sécrétion du TGF- β 1 actif et total sécrété dans le surnageant de la lignée de gliomes murins F98 en 72 h et 96 h. Ce qui signifierait qu'en réduisant la sécrétion du TGF- β , l'AvasimibeTM aurait la capacité d'alterner le phénotype des gliomes malins. L'AvasimibeTM, étant un inhibiteur de l'ACAT, inhibe l'activité des MMPs de la MEC (Bocan *et al.*, 2000), ce qui s'est probablement traduit par une diminution de la sécrétion du TGF- β 1 qui se reflète dans nos résultats. Des études *in vitro* et *in vivo* chez les macrophages ont démontré que l'AvasimibeTM a tendance à stabiliser les plaques de cholestérol lors de l'athérosclérose (Bocan *et al.*, 2000; Rival *et al.*, 2004). Cette maladie est caractérisée par une accumulation des esters de cholestérol catalysé par l'ACAT dans la paroi des artères. Ces esters de cholestérol forment des plaques instables. Il se produit une infiltration des

monocytes qui se transforment en macrophages. L'enrichissement des macrophages par des esters de cholestérol augmente l'expression des MMPs de la matrice (MMP-1, MMP-3, MMP-7 et MMP-9). Les MMPs dégradent la membrane basale et la matrice extracellulaire, ce qui provoque l'apparition des lésions de l'athérosclérose. L'Avasimibe™ inhibe l'activité catalytique des MMP-1, MMP-3 et MMP-9 chez le lapin, ce qui réduit les lésions (BOCAN *et al.*, 2000). La MMP-2 et la MMP-9 sont impliquées dans la sécrétion du TGF-β. Puisque l'action inhibitrice de l'Avasimibe™ sur les MMPs est connue, notre expérience exploratrice porte à croire que l'Avasimibe™ pourrait être un agent pharmacologique pour éventuellement réduire la sécrétion du TGF-β1 mature actif et total dans le surnageant de la lignée de gliomes murins F98.

31. EFFET DE L'AVASIMIBE™ SUR LE MÉTABOLISME CELLULAIRE

Notre étude a démontré que des concentrations de 1 μM, 10 μM et 25 μM d'Avasimibe™ inhibent significativement le métabolisme cellulaire des gliomes malins F98 suite à des traitements de 24 h et de 48 h. La transformation du réactif WST-1 en sel de Formazan dans la mitochondrie des cellules gliales malignes a indiqué que la diminution du métabolisme cellulaire semble dépendre de la dose de l'Avasimibe™ et du temps des traitements. L'Avasimibe™ est métabolisé dans le foie et cause une augmentation de la synthèse des acides biliaires. L'Avasimibe™ active l'enzyme 7α-hydroxylase qui transforme une partie du cholestérol libre en acides biliaires qui sont éliminés dans le tube digestif. Ce qui permet d'éviter les effets secondaires du cholestérol libre (Post *et al.*, 1999). Des études ont démontré que les tumeurs sont souvent accompagnées par des changements du métabolisme du cholestérol. Il y a une accumulation d'esters de cholestérol et une augmentation de l'activité de l'ACAT dans les cellules tumorales (Boyd *et McGuire*, 1990; Umeki *et al.*, 1993). Les tissus des patients atteints de gliomes malins ont une concentration d'esters de cholestérol 100 fois supérieure à la normale. Les modifications des membranes cellulaires et la production des esters de cholestérol augmentent la malignité des gliomes malins, surtout du GBM (Campanella, 1992). Des études indiquent que des esters de cholestérol produits par l'ACAT sont essentiels pour le métabolisme et la croissance des gliomes de haut grade (Jeng *et al.*, 1984; Campanella, *et al.*, 1992). En augmentant l'expression et l'activité de

l'ACAT-1, le TGF- β 1 favorise la production des esters de cholestérol (Hori *et al.*, 2004). Notre étude suggère que l'AvasimibeTM, un inhibiteur de l'ACAT, diminue la sécrétion du TGF- β 1 mature actif et total, ce qui pourrait contribuer à diminuer le métabolisme cellulaire de la lignée de gliomes murins F98.

32. EFFET DE L'AVASIMIBETM SUR LA PROLIFÉRATION CELLULAIRE

L'essai BrdU a montré que les concentrations de 10 μ M et 25 μ M d'AvasimibeTM inhibent significativement la prolifération cellulaire de la lignée F98 suite à des traitements de 24 h et de 48 h. Les esters de cholestérol provenant de l'activité de l'ACAT sont reliés à la prolifération cellulaires (Boyd *et McGuire*, 1990; Umeki *et al.*, 1993). Le profil lipidique des gliomes malins varie selon le grade. Des esters de cholestérols se trouvent dans le GBM. L'augmentation des triglycérides et de la phosphatidylcholine corrént avec la prolifération vasculaire et le grade des tumeurs astrocytaires (Tugnoli *et al.*, 2001). L'utilisation d'un inhibiteur de l'ACAT-1 dénommé Sah58035 inhibe significativement l'invasion et la prolifération de la lignée de gliomes humains U-87 MG après des traitements respectifs de 24 h, 48 h et 72 h (Paillasse *et al.*, 2009). Ce qui suggère que l'utilisation des inhibiteurs de l'ACAT pourrait être une stratégie dans le traitement des gliomes humains. La voie de signalisation du TGF- β joue un rôle primordial dans la prolifération des gliomes malins. L'étude de Bocan a prouvé que l'AvasimibeTM a la capacité d'inhiber l'activité des MMPs de la MEC (Bocan *et al.*, 2000). Ce qui sous-entend que l'AvasimibeTM peut réduire la prolifération cellulaire, puisque la sécrétion du TGF- β , la prolifération et l'invasion des cellules gliales malignes sont reliées à la dégradation de la MEC par la MMP-2 et la MMP-9 (Feige *et al.*, 1996; Platten *et al.*, 2001). Les résultats de notre étude viennent apporter de nouvelles informations indiquant que des traitements à l'AvasimibeTM pourraient être associés à une diminution de la sécrétion du TGF- β 1 dans le surnageant de gliomes murins F98, ce qui pourrait contribuer à diminuer le métabolisme et la prolifération cellulaire.

33. ANALYSES ALTERNATIVES

Les essais (WST-1 et BrdU) utilisés pour évaluer l'effet de la chloroquine et l'AvasimibeTM sur le métabolisme et la prolifération des lignées de gliomes possèdent des limitations. Les cellules doivent être viables et capables de se multiplier afin

d'incorporer le BrdU lors de la réplication de l'ADN. Le réactif WST-1 contient des sels de Tétrazolium qui peuvent être réduits de façon non spécifique par des enzymes cytosoliques qui se trouvent à l'extérieur de la mitochondrie (Konsoula *et al.*, 2005). Les résultats obtenus peuvent être sous-estimés (Bernas *et al.*, 2000). Il serait possible que la diminution du niveau de TGF- β 1 sécrété dans le milieu extracellulaire et la réduction du métabolisme soient le reflet d'une diminution du nombre de cellules. Il faudrait valider les résultats de notre étude par des analyses alternatives. L'essai *Pyruvate kinase activity assay* (Biovision) pourrait confirmer que la chloroquine et l'AvasimibeTM diminuent le métabolisme cellulaire des gliomes malins. Cet essai permet de mesurer l'activité de la pyruvate kinase lors de la glycolyse. La pyruvate kinase est une enzyme qui catalyse la phosphorylation de l'adénosine diphosphate (ADP) en adénosine triphosphate (ATP) à partir de la phosphoénolpyruvate (PEP). L'activité de la pyruvate kinase donne une indication du métabolisme cellulaire de GBM (Chinnaiyan *et al.*, 2002).

Des études démontrent que les traitements avec la chloroquine et l'AvasimibeTM induisent non seulement un arrêt de la prolifération des lignées de gliomes malins, mais également la mort cellulaire (Bemlih *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2010). Il serait possible d'évaluer si la chloroquine et l'AvasimibeTM affectent la prolifération par les essais au crystal violet et au bleu de trypan (Sigma-Aldrich). Le crystal violet colore l'ADN, ce qui permet de déterminer le nombre des cellules de GBM et la croissance cellulaire (Kim *et al.*, 2010). Le bleu de trypan colore les cellules mortes de GBM. La membrane des cellules vivantes empêche l'entrée du bleu de trypan dans le cytoplasme. La membrane endommagée des cellules mortes laisse passer le bleu de trypan. Les cellules mortes deviennent colorées en bleu. La coloration au bleu de trypan permet de comptabiliser les cellules afin d'évaluer la viabilité et la prolifération cellulaire (Vega-Avila *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2010). Il serait aussi possible d'évaluer si la chloroquine et l'AvasimibeTM affectent l'apoptose des lignées de gliomes malins par la cytofluométrie en utilisant l'*Annexin V* couplé à la *fluorescein isothiocyanate* (FITC). L'essai *Annexin V-FITC Apoptosis Detection* (BD Biosciences Pharmingen) permet de détecter les cellules de GBM qui sont en processus d'apoptose. Il faudrait aussi détecter par la cytofluométrie

l'activation des facteurs apoptotiques (caspase-8 et caspase-3) en utilisant des anticorps spécifiques contre la caspase-8 et caspase-9 (Bemlih *et al.*, 2010).

Les effets de la chloroquine et de l'AvasimibeTM sur le métabolisme et la prolifération des cellules de gliomes malins F98 pourraient être indépendants de la voie de signalisation du TGF- β . Les cellules F98 sont reconnues d'exprimer des récepteurs du TGF- β (Mathieu *et al.*, 2007). Le TGF- β agit sur des récepteurs de types sérine/thréonine kinase couplés à la voie des Smad, il serait possible de tester que ces deux molécules affectent la voie du TGF- β dans les cellules F98 par l'immunobuvardage de type Western blot contre la Smad 2 phosphorylée. Il serait aussi intéressant de valider que les effets de la chloroquine et de l'AvasimibeTM sont effectivement liés à une diminution de la sécrétion de la forme active du TGF- β 1 par l'immunobuvardage de type Western blot contre le TGF- β 1 actif. Une autre approche expérimentale serait d'évaluer par l'essai *Reverse transcription polymerase chain reaction* (RT-PCR) si les effets de la chloroquine et de l'AvasimibeTM diminuent l'expression de l'ARNm du TGF- β 1 dans la lignée de gliomes murins F98.

CONCLUSION

Le projet de maîtrise en pharmacologie m'a permis d'approfondir mes connaissances dans plusieurs techniques (culture cellulaire, dosages protéiques Bradford, immunobuvardage de type Western blot, WST-1, BrdU, ELISA, zymographie et spectrométrie de masse, etc.) Mes travaux de recherche ont démontré que les lignées de gliomes murins F98 et humains U-118 MG, U-373 MG et U-87 MG sécrètent le pro-TGF- β 1 et le LAP du TGF- β 1. Les traitements à la chloroquine et l'AvasimibeTM inhibent fortement la maturation et la sécrétion du TGF- β 1 actif et total dans le surnageant de la lignée F98. La chloroquine réduit significativement l'activité de la MMP-2 des cellules gliales malignes de la lignée F98. L'AvasimibeTM est plus efficace que la chloroquine pour inhiber considérablement le métabolisme et la prolifération cellulaire de la lignée F98. Notre étude fait présager que l'utilisation de la chloroquine et l'AvasimibeTM pourrait être une avenue thérapeutique pertinente en vue d'atténuer le phénotype des gliomes malins par la voie de signalisation du TGF- β .

En perspective, il serait enrichissant de valider les effets des molécules testées sur les lignées des gliomes malins ainsi que sur les spécimens humains. Il serait aussi envisageable de tester les effets de l'AvasimibeTM sur l'activité des MMP-2 et MMP-9 de la lignée F98.

Pour augmenter les probabilités de caractériser les formes de TGF- β sécrétées dans les lignées de gliomes malins par la spectrométrie de masse, il serait recommandé d'augmenter énormément la quantité de cellules incubées à plus de 100 millions. Il serait aussi intéressant de déterminer les effets de la chloroquine et l'AvasimibeTM sur la maturation et la sécrétion du TGF- β 2.

Pour terminer, dans le but futur de tester chez les patients atteints de GBM, il serait souhaitable d'évaluer d'abord *in vivo* les effets de la chloroquine et de l'AvasimibeTM sur l'efficacité des traitements chez des rats du modèle Fischer/F98. Ce modèle syngénique est reproductible. Il est caractérisé par l'implantation dans le cerveau des rats Fischer des cellules de gliomes murins F98 qui expriment la protéine TGF- β 1. Ces analyses pourraient mener à l'usage de la chloroquine et de l'AvasimibeTM concomitamment aux traitements standards contre les GBMs.

REMERCIEMENTS

Je remercie énormément mes directeurs de recherche le Pr David Fortin et le Pr Klaus Klarskov pour m'avoir donnés l'opportunité de faire ma maîtrise dans leurs laboratoires. Je remercie également tous les membres de leurs laboratoires pour leur soutien et toutes les personnes que j'ai côtoyées au Département de pharmacologie à l'Université de Sherbrooke.

Un merci tout spécial à mes parents, ma copine, mes amis et à toute ma famille pour leur support et leur amour tout au long de ma maîtrise.

Enfin, je remercie infiniment les membres du jury qui ont évalué ce mémoire : Pr David Fortin, Pr Klaus Klarskov, Pre Christine Lavoie et Pre Caroline Saucier.

LISTES DES PUBLICATIONS

Abbott, N. J.; Ronnback, L.; Hansson, E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat. Rev. Neurosci.* 2006, 7, 41-53.

Andres, J. L.; DeFalcis, D.; Noda, M.; Massague, J. Binding of two growth factor families to separate domains of the proteoglycan betaglycan. *J. Biol. Chem.* 1992, 267, 5927-5930.

Andres, J. L.; Stanley, K.; Cheifetz, S.; Massague, J. Membrane-anchored and soluble forms of betaglycan, a polymorphic proteoglycan that binds transforming growth factor-beta. *J. Cell Biol.* 1989, 109, 3137-3145.

Attisano, L.; Wrana, J. L. Mads and Smads in TGF beta signalling. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1998, 10, 188-194.

Bababeygy, S. R.; Polevaya, N. V.; Youssef, S.; Sun, A.; Xiong, A.; Prugpichailers, T.; Veeravagu, A.; Hou, L. C.; Steinman, L.; Tse, V. HMG-CoA reductase inhibition causes increased necrosis and apoptosis in an in vivo mouse glioblastoma multiforme model. *Anticancer Res.* 2009, 29, 4901-4908.

Baldi, I.; Huchet, A.; Bauchet, L.; Loiseau, H. Epidemiology of glioblastoma. *Neurochirurgie* 2010, 56, 433-440.

Barcellos-Hoff, M. H. Latency and activation in the control of TGF-beta. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 1996, 1, 353-363.

Barrett, A. J. Chondromucoprotein-degrading enzymes. *Nature* 1966, 211, 1188-1189.

Basque, J.; Martel, M.; Leduc, R.; Cantin, A. M. Lysosomotropic drugs inhibit maturation of transforming growth factor-beta. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 2008, 86, 606-612.

Baumann, F.; Leukel, P.; Doerfelt, A.; Beier, C. P.; Dettmer, K.; Oefner, P. J.; Kastenberger, M.; Kreutz, M.; Nickl-Jockschat, T.; Bogdahn, U.; Bosserhoff, A. K.; Hau, P. Lactate promotes glioma migration by TGF-beta2-dependent regulation of matrix metalloproteinase-2. *Neuro Oncol.* 2009, 11, 368-380.

Behin, A.; Hoang-Xuan, K.; Carpentier, A. F.; Delattre, J. Y. Primary brain tumours in adults. *Lancet* 2003, 361, 323-331.

- Beier, C. P.; Kumar, P.; Meyer, K.; Leukel, P.; Bruttel, V.; Aschenbrenner, I.; Riemenschneider, M. J.; Fragoulis, A.; Rummele, P.; Lamszus, K. The cancer stem cell subtype determines immune infiltration of glioblastoma. *Stem Cells Dev.* 2012, *15*, 2753-2761.
- Bell, G. I.; Kayano, T.; Buse, J. B.; Burant, C. F.; Takeda, J.; Lin, D.; Fukumoto, H.; Seino, S. Molecular biology of mammalian glucose transporters. *Diabetes Care* 1990, *13*, 198-208.
- Bemlih, S., Poirier M. D.; El, A. A. Acyl-coenzyme A : cholesterol acyltransferase inhibitor Avasimibe affect survival and proliferation of glioma tumor cell lines. *Cancer Biol. Ther.* 2010, *9*, 1025-1032.
- Bernas, T.; Dobrucki, J. W.; The role of plasma membrane in bio-reduction of two tetrazolium salts, MTT, and CTC. *Arch. Biochem. Biophys.* 2000, *380*, 108-116.
- Blobe, G. C.; Schiemann, W. P.; Lodish, H. F. Role of transforming growth factor beta in human disease. *N. Engl. J. Med.* 2000, *342*, 1350-1358.
- Blumberg, B.; Sabbagh, W., Jr.; Juguilon, H.; Bolado, J., Jr; van Meter, C. M.; Ong, E. S.; Evans, R. M. SXR, a novel steroid and xenobiotic-sensing nuclear receptor. *Genes Dev.* 1998, *12*, 3195-3205.
- Bocan, T. M.; Krause, B. R.; Rosebury, W. S.; Mueller, S. B.; Lu, X.; Dagle, C.; Major, T.; Lathia, C.; Lee, H. The ACAT inhibitor avasimibe reduces macrophages and matrix metalloproteinase expression in atherosclerotic lesions of hypercholesterolemic rabbits. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2000, *20*, 70-79.
- Bodmer, S.; Strommer, K.; Frei, K.; Siepl, C.; de Tribolet, N.; Heid, I.; Fontana, A. Immunosuppression and transforming growth factor-beta in glioblastoma. Preferential production of transforming growth factor-beta 2. *J. Immunol.* 1989, *143*, 3222-3229.
- Bodmer, S.; Strommer, K.; Frei, K.; Siepl, C.; de Tribolet, N.; Heid, I.; Fontana, A. Immunosuppression and transforming growth factor-beta in glioblastoma. Preferential production of transforming growth factor-beta 2. *J. Immunol.* 1989, *143*, 3222-3229.
- Bourlier, V.; Zakaroff-Girard, A.; De Barros, S.; Pizzacalla, C.; de Saint Front, V. D.; Lafontan, M.; Bouloumie, A.; Galitzky, J. Protease inhibitor treatments reveal specific involvement of matrix metalloproteinase-9 in human adipocyte differentiation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2005, *312*, 1272-1279.
- Bray, P. G.; Mungthin, M.; Ridley, R. G.; Ward, S. A. Access to heme: the basis of chloroquine resistance. *Mol. Pharmacol.* 1998, *54*, 170-179.
- Bredel, M.; Scholtens, D. M.; Yadav, A. K.; Alvarez, A. A.; Renfrow, J. J.; Chandler, J. P.; Yu, I. L.; Carro, M. S.; Dai, F.; Tagge, M. J.; Ferrarese, R.; Bredel, C.; Phillips, H. S.;

Lukac, P. J.; Robe, P. A.; Weyerbrock, A.; Vogel, H.; Dubner, S.; Mobley, B.; He, X.; Scheck, A. C.; Sikic, B. I.; Aldape, K. D.; Chakravarti, A.; Harsh, G. R., 4th NFKBIA deletion in glioblastomas. *N. Engl. J. Med.* 2011, *364*, 627-637.

Briceno, E.; Calderon, A.; Sotelo, J. Institutional experience with chloroquine as an adjuvant to the therapy for glioblastoma multiforme. *Surg. Neurol.* 2007, *67*, 388-391.

Briceno, E.; Reyes, S.; Sotelo, J. Therapy of glioblastoma multiforme improved by the antimutagenic chloroquine. *Neurosurg. Focus.* 2003, *14*, e3.

Campanella, R. Membrane lipids modifications in human gliomas of different degree of malignancy. *J. Neurosurg. Sci.* 1992, *36*, 11-25.

Cases, S.; Novak, S.; Zheng, Y. W.; Myers, H. M.; Lear, S. R.; Sande, E.; Welch, C. B.; Lusis, A. J.; Spencer, T. A.; Krause, B. R.; Erickson, S. K.; Farese, R. V., Jr ACAT-2, a second mammalian acyl-CoA:cholesterol acyltransferase. Its cloning, expression, and characterization. *J. Biol. Chem.* 1998, *273*, 26755-26764.

Cecchelli, R.; Berezowski, V.; Lundquist, S.; Culot, M.; Renftel, M.; Dehouck, M. P.; Fenart, L. Modelling of the blood-brain barrier in drug discovery and development. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2007, *6*, 650-661.

Chang, C. C.; Huh, H. Y.; Cadigan, K. M.; Chang, T. Y. Molecular cloning and functional expression of human acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase cDNA in mutant Chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.* 1993, *268*, 20747-20755.

Chang, C. C.; Sakashita, N.; Ornvold, K.; Lee, O.; Chang, E. T.; Dong, R.; Lin, S.; Lee, C. Y.; Strom, S. C.; Kashyap, R.; Fung, J. J.; Farese, R. V., Jr; Patoiseau, J. F.; Delhon, A.; Chang, T. Y. Immunological quantitation and localization of ACAT-1 and ACAT-2 in human liver and small intestine. *J. Biol. Chem.* 2000, *275*, 28083-28092.

Chang, T. Y.; Chang, C. C.; Cheng, D. Acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase. *Annu. Rev. Biochem.* 1997, *66*, 613-638.

Chang, T. Y.; Chang, C. C.; Lin, S.; Yu, C.; Li, B. L.; Miyazaki, A. Roles of acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase-1 and -2. *Curr. Opin. Lipidol.* 2001, *12*, 289-296. (30) Chen, H. C. Molecular mechanisms of sterol absorption. *J. Nutr.* 2001, *131*, 2603-2605.

Chen, W.; Wahl, S. M. TGF-beta: receptors, signaling pathways and autoimmunity. *Curr. Dir. Autoimmun.* 2002, *5*, 62-91.

Chinnaiyan, P.; Kensicki, E.; Bloom, G.; Prabhu, A.; Sarcar, B.; Kahali, S.; Eschrich, S.; Qu, X.; Forsyth, P.; Gillies, R. The metabolomic signature of malignant glioma reflects accelerated anabolic metabolism. *Cancer Res.* 2012, *72*, 5878-5888.

- Chintala, S. K.; Tonn, J. C.; Rao, J. S. Matrix metalloproteinases and their biological function in human gliomas. *Int. J. Dev. Neurosci.* 1999, *17*, 495-502.
- Claes, A.; Idema, A. J.; Wesseling, P. Diffuse glioma growth: a guerilla war. *Acta Neuropathol.* 2007, *114*, 443-458.
- Constam, D. B.; Philipp, J.; Malipiero, U. V.; ten Dijke, P.; Schachner, M.; Fontana, A. Differential expression of transforming growth factor-beta 1, -beta 2, and -beta 3 by glioblastoma cells, astrocytes, and microglia. *J. Immunol.* 1992, *148*, 1404-1410.
- Cordon-Cardo, C.; O'Brien, J. P.; Casals, D.; Rittman-Grauer, L.; Biedler, J. L.; Melamed, M. R.; Bertino, J. R. Multidrug-resistance gene (P-glycoprotein) is expressed by endothelial cells at blood-brain barrier sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1989, *86*, 695-698.
- De Larco, J. E.; Todaro, G. J. Growth factors from murine sarcoma virus-transformed cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1978, *75*, 4001-4005.
- Deeken, J. F.; Loscher, W. The blood-brain barrier and cancer: transporters, treatment, and Trojan horses. *Clin. Cancer Res.* 2007, *13*, 1663-1674.
- Demeule, M.; Regina, A.; Annabi, B.; Bertrand, Y.; Bojanowski, M. W.; Beliveau, R. Brain endothelial cells as pharmacological targets in brain tumors. *Mol. Neurobiol.* 2004, *30*, 157-183.
- Djedid, R.; Tomasi, O.; Haidara, A.; Rynkowski, M.; Lefranc, F. Glioblastoma treatment in 2010. *Rev. Med. Brux.* 2009, *30*, 496-505.
- Dominick, M. A.; McGuire, E. J.; Reindel, J. F.; Bobrowski, W. F.; Bocan, T. M.; Gough, A. W. Subacute toxicity of a novel inhibitor of acyl-CoA: cholesterol acyltransferase in beagle dogs. *Fundam. Appl. Toxicol.* 1993, *20*, 217-224.
- Dudas, M.; Nagy, A.; Laping, N. J.; Moustakas, A.; Kaartinen, V. Tgf-beta3-induced palatal fusion is mediated by Alk-5/Smad pathway. *Dev. Biol.* 2004, *266*, 96-108.
- Dunker, N.; Schuster, N.; Krieglstein, K. TGF-beta modulates programmed cell death in the retina of the developing chick embryo. *Development* 2001, *128*, 1933-1942.
- Dunn, I. F.; Heese, O.; Black, P. M. Growth factors in glioma angiogenesis: FGFs, PDGF, EGF, and TGFs. *J. Neurooncol.* 2000, *50*, 121-137.
- Egeblad, M.; Werb, Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat. Rev. Cancer.* 2002, *2*, 161-174.
- Elliott, R. L.; Blobel, G. C. Role of transforming growth factor Beta in human cancer. *J. Clin. Oncol.* 2005, *23*, 2078-2093.

Fanjul-Fernandez, M.; Folgueras, A. R.; Cabrera, S.; Lopez-Otin, C. Matrix metalloproteinases: evolution, gene regulation and functional analysis in mouse models. *Biochim. Biophys. Acta* 2010, 1803, 3-19.

Feige, J. J.; Quirin, N.; Souchelnitsky, S. TGF- β , un peptide biologique sous contrôle: formes latentes et mécanismes d'activation.. *Médecine/Sciences* 1996, 12, 929-939.

Frisk, M.; Gunnert, G. Chloroquine in malaria. Isn't it time for revision of prophylaxis schedules? *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 1993, 44, 271-2; discussion 273-4.

Govinden, R.; Bhoola, K. D. Genealogy, expression, and cellular function of transforming growth factor-beta. *Pharmacol. Ther.* 2003, 98, 257-265.

Graham, L. P. Chimie Pharmaceutique. *De Boeck* 2003, 2, 128-129.

Harhaji-Trajkovic, L.; Arsin, K.; Kravic-Stevovic, T.; Petricevic, S.; Tovilovic, G.; Pantovic, A.; Zogovic, N.; Ristic, B.; Janjetovic, K.; Bumbasirevic, V.; Trajkovic, V. Chloroquine-mediated lysosomal dysfunction enhances the anticancer effect of nutrient deprivation. *Pharm. Res.* 2012, 29, 2249-2263.

Hastings, I. M.; Watkins, W. M.; White, N. J. The evolution of drug-resistant malaria: the role of drug elimination half-life. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 2002, 357, 505-519.

Herpin, A.; Lelong, C.; Favrel, P. Transforming growth factor-beta-related proteins: an ancestral and widespread superfamily of cytokines in metazoans. *Dev. Comp. Immunol.* 2004, 28, 461-485.

Hillenkamp, F.; Karas, M. Mass spectrometry of peptides and proteins by matrix-assisted ultraviolet laser desorption/ionization. *Methods Enzymol.* 1990, 193, 280-295.

Hori, M.; Miyazaki, A.; Tamagawa, H.; Satoh, M.; Furukawa, K.; Hakamata, H.; Sasaki, Y.; Horiuchi, S. Up-regulation of acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase-1 by transforming growth factor-beta1 during differentiation of human monocytes into macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004, 320, 501-505.

Hsieh, C. H.; Chang, H. T.; Shen, W. C.; Shyu, W. C.; Liu, R. S. Imaging the impact of Nox4 in cycling hypoxia-mediated U87 glioblastoma invasion and infiltration. *Mol. Imaging Biol.* 2012, 14, 489-499.

Insull, W., Jr; Koren, M.; Davignon, J.; Sprecher, D.; Schrott, H.; Keilson, L. M.; Brown, A. S.; Dujovne, C. A.; Davidson, M. H.; McLain, R.; Heinonen, T. Efficacy and short-term safety of a new ACAT inhibitor, avasimibe, on lipids, lipoproteins, and apolipoproteins, in patients with combined hyperlipidemia. *Atherosclerosis* 2001, 157, 137-144.

Itoh, Y.; Ito, A.; Iwata, K.; Tanzawa, K.; Mori, Y.; Nagase, H. Plasma membrane-bound tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-2 specifically inhibits matrix metalloproteinase 2 (gelatinase A) activated on the cell surface. *J. Biol. Chem.* 1998, 273, 24360-24367.

Jachimczak, P.; Hessdorfer, B.; Fabel-Schulte, K.; Wismeth, C.; Brysch, W.; Schlingensiepen, K. H.; Bauer, A.; Blesch, A.; Bogdahn, U. Transforming growth factor-beta-mediated autocrine growth regulation of gliomas as detected with phosphorothioate antisense oligonucleotides. *Int. J. Cancer* 1996, 65, 332-337.

Jeng, I.; Klemm, N. Acyl-CoA cholesterol acyltransferase in cultured glioblastoma cells. *Neurochem. Res.* 1984, 9, 1193-1210.

Kaartinen, V.; Voncken, J.; Shuler, C.; Warburton, D.; Bu, D.; Heisterkamp, N.; Groffen, J. Abnormal lung development and cleft palate in mice lacking TGF-beta 3 indicates defects of epithelial-mesenchymal interaction. *Nat. Genet.* 1995, 11, 415-421.

Kemper, E. M.; Boogerd, W.; Thuis, I.; Beijnen, J. H.; van Tellingen, O. Modulation of the blood-brain barrier in oncology: therapeutic opportunities for the treatment of brain tumours? *Cancer Treat. Rev.* 2004, 30, 415-423.

Kishida, Y.; Natsume, A.; Toda, H.; Toi, Y.; Motomura, K.; Koyama, H.; Matsuda, K.; Nakayama, O.; Sato, M.; Suzuki, M.; Kondo, Y.; Wakabayashi, T. Correlation between quantified promoter methylation and enzymatic activity of O6-methylguanine-DNA methyltransferase in glioblastomas. *Tumour Biol.* 2012, 33, 373-381.

Kim, E. L.; Wüstenberg, R.; Rübsam, A.; Schmitz-Salue, C.; Warnecke, G.; Bücken, E. M.; Pettkus, N.; Speidel, D.; Rohde, V.; Schulz-Schaeffer, W.; Deppert, W.; Giese, A. E. Chloroquine activates p53 pathway and induces apoptosis in human glioma cells. *Neuro Oncol.* 2010, 4, 389-400.

Kjellman, C.; Olofsson, S. P.; Hansson, O.; Von Schantz, T.; Lindvall, M.; Nilsson, I.; Salford, L. G.; Sjögren, H. O.; Widegren, B. Expression of TGF-beta isoforms, TGF-beta receptors, and SMAD molecules at different stages of human glioma. *Int. J. Cancer* 2000, 89, 251-258.

Klarskov, K.; Naylor, S. India ink staining after sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis and in conjunction with Western blots for peptide mapping by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2002, 16, 35-42.

Konsoula, R.; Barile, F. A. Correlation of in vitro cytotoxicity with paracellular permeability in Caco-2 cells. *Toxicol. In Vitro.* 2005, 19, 675-684.

Krishna, S.; White, N. J. Pharmacokinetics of quinine, chloroquine and amodiaquine. Clinical implications. *Clin. Pharmacokinet.* 1996, 30, 263-299.

Leber, T. M.; Balkwill, F. R. Zymography: a single-step staining method for quantitation of proteolytic activity on substrate gels. *Anal. Biochem.* 1997, *249*, 24-28.

Leduc, R.; Molloy, S. S.; Thorne, B. A.; Thomas, G. Activation of human furin precursor processing endoprotease occurs by an intramolecular autoproteolytic cleavage. *J. Biol. Chem.* 1992, *267*, 14304-14308.

Lefranc, F.; Brotchi, J.; Kiss, R. Possible future issues in the treatment of glioblastomas: special emphasis on cell migration and the resistance of migrating glioblastoma cells to apoptosis. *J. Clin. Oncol.* 2005, *23*, 2411-2422.

Lefranc, F.; Sadeghi, N.; Camby, I.; Metens, T.; Dewitte, O.; Kiss, R. Present and potential future issues in glioblastoma treatment. *Expert Rev. Anticancer Ther.* 2006, *6*, 719-732.

Lehmann, J. M.; McKee, D. D.; Watson, M. A.; Willson, T. M.; Moore, J. T.; Kliewer, S. A. The human orphan nuclear receptor PXR is activated by compounds that regulate CYP3A4 gene expression and cause drug interactions. *J. Clin. Invest.* 1998, *102*, 1016-1023.

Liotta, L. A.; Stetler-Stevenson, W. Metalloproteinases and malignant conversion: does correlation imply causality? *J. Natl. Cancer Inst.* 1989, *81*, 556-557.

Llaverias, G.; Laguna, J. C.; Alegret, M. Pharmacology of the ACAT inhibitor avasimibe (CI-1011). *Cardiovasc. Drug Rev.* 2003, *21*, 33-50.

Louis, D. N.; Ohgaki, H.; Wiestler, O. D.; Cavenee, W. K.; Burger, P. C.; Jouvett, A.; Scheithauer, B. W.; Kleihues, P. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol.* 2007, *114*, 97-109.

Malipiero, U.; Holler, M.; Werner, U.; Fontana, A. Sequence analysis of the promoter region of the glioblastoma derived T cell suppressor factor/transforming growth factor (TGF)-beta 2 gene reveals striking differences to the TGF-beta 1 and -beta 3 genes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1990, *171*, 1145-1151.

Malipiero, U.; Holler, M.; Werner, U.; Fontana, A. Sequence analysis of the promoter region of the glioblastoma derived T cell suppressor factor/transforming growth factor (TGF)-beta 2 gene reveals striking differences to the TGF-beta 1 and -beta 3 genes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1990, *171*, 1145-1151.

Massague, J. TGF-beta signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* 1998, *67*, 753-791.

Massague, J. The TGF-beta family of growth and differentiation factors. *Cell* 1987, *49*, 437-438.

Massague, J.; Chen, Y. G. Controlling TGF-beta signaling. *Genes Dev.* 2000, *14*, 627-644.

- Mathieu, D.; Lecompte, R.; Tsanaclis, A. M.; Larouche, A.; Fortin, D.) Standardization and detailed characterization of the syngeneic Fischer/F98 glioma model. *Can. J. Neurol. Sci.* 2007, *34*, 296-306.
- Matsuda, H.; Hakamata, H.; Kawasaki, T.; Sakashita, N.; Miyazaki, A.; Takahashi, K.; Shichiri, M.; Horiuchi, S. Molecular cloning, functional expression and tissue distribution of rat acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase. *Biochim. Biophys. Acta* 1998, *1391*, 193-203.
- Merzak, A.; McCrea, S.; Koocheckpour, S.; Pilkington, G. J. Control of human glioma cell growth, migration and invasion in vitro by transforming growth factor beta 1. *Br. J. Cancer* 1994, *70*, 199-203.
- Mignatti, P.; Rifkin, D. B. Plasminogen activators and matrix metalloproteinases in angiogenesis. *Enzyme Protein* 1996, *49*, 117-137.
- Miyazono, K.; Thyberg, J.; Heldin, C. H. Retention of the transforming growth factor-beta 1 precursor in the Golgi complex in a latent endoglycosidase H-sensitive form. *J. Biol. Chem.* 1992, *267*, 5668-5675.
- Moustakas, A.; Souchelnytskyi, S.; Heldin, C. H. Smad regulation in TGF-beta signal transduction. *J. Cell. Sci.* 2001, *114*, 4359-4369.
- Nagase, H.; Woessner, J. F. Jr. Matrix metalloproteinases. *J. Biol. Chem.* 1999, *274*, 21491-21494.
- Nakada, M.; Nakada, S.; Demuth, T.; Tran, N. L.; Hoelzinger, D. B.; Berens, M. E. Molecular targets of glioma invasion. *Cell. Mol. Life Sci.* 2007, *64*, 458-478.
- Nakano, A.; Tani, E.; Miyazaki, K.; Yamamoto, Y.; Furuyama, J. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in human gliomas. *J. Neurosurg.* 1995, *83*, 298-307.
- Nieder, C.; Mehta, M. P.; Jalali, R. Combined radio- and chemotherapy of brain tumours in adult patients. *Clin. Oncol. (R. Coll. Radiol)* 2009, *21*, 515-524.
- Nissen, S. E.; Tuzcu, E. M.; Brewer, H. B.; Sipahi, I.; Nicholls, S. J.; Ganz, P.; Schoenhagen, P.; Waters, D. D.; Pepine, C. J.; Crowe, T. D.; Davidson, M. H.; Deanfield, J. E.; Wisniewski, L. M.; Hanyok, J. J.; Kassalow, L. M.; ACAT Intravascular Atherosclerosis Treatment Evaluation (ACTIVATE) Investigators Effect of ACAT inhibition on the progression of coronary atherosclerosis. *N. Engl. J. Med.* 2006, *354*, 1253-1263.
- Nygren, C.; von Holst, H.; Mansson, J. E.; Fredman, P. Increased levels of cholesterol esters in glioma tissue and surrounding areas of human brain. *Br. J. Neurosurg.* 1997, *11*, 216-220.

Oelkers, P.; Behari, A.; Cromley, D.; Billheimer, J. T.; Sturley, S. L. Characterization of two human genes encoding acyl coenzyme A:cholesterol acyltransferase-related enzymes. *J. Biol. Chem.* 1998, 273, 26765-26771.

Okralgy, A.; Balwit, J.; Haak-Frendscho, M. Transforming growth factor beta-1 (TGF- β 1) : a biological paradox. *Prom Notes Mag.* 1994, 47, 10-16.

Overall, C. M.; Limeback, H. Identification and characterization of enamel proteinases isolated from developing enamel. Amelogeninolytic serine proteinases are associated with enamel maturation in pig. *Biochem. J.* 1988, 256, 965-972.

Paillassé, M. R.; De Medina, P.; Amouroux, G.; Mhamdi, L.; Poirot, M.; Silvente-Poirot, S. Signaling through cholesterol esterification: a new pathway for the cholecystokinin 2 receptor involved in cell growth and invasion. *J. Lipid Res.* 2009, 50, 2203-2211.

Pan, J. J.; Chang, W. J.; Barone, T. A.; Plunkett, R. J.; Ostrow, P. T.; Greenberg, S. J. Increased expression of TGF- β 1 reduces tumor growth of human U-87 glioblastoma cells in vivo. *Cancer Immunol. Immunother.* 2006, 55, 918-92734.

Papetti, M.; Herman, I. M. Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 2002, 282, C947-70.

Pardridge, W. M. Drug targeting to the brain. *Pharm. Res.* 2007, 24, 1733-1744.

Park, B. C.; Park, S. H.; Paek, S.H.; Park, S. Y.; Kwak, M. K.; Choi, H. G.; Yong, C.S.; Yoo, B. K.; Kim, J. A. Chloroquine-induced nitric oxide increase and cell death is dependent on cellular GSH depletion in A172 human glioblastoma cells. *Toxicol. Lett.* 2008, 178, 52-60.

Pinzani, M.; Marra, F. Cytokine receptors and signaling in hepatic stellate cells. *Semin. Liver Dis.* 2001, 21, 397-416.

Platten, M.; Wick, W.; Weller, M. Malignant glioma biology: role for TGF- β in growth, motility, angiogenesis, and immune escape. *Microsc. Res. Tech.* 2001, 52, 401-410.

Post, S. M.; Zoetewij, J. P.; Bos, M. H.; de Wit, E. C.; Havinga, R.; Kuipers, F.; Princen, H. M. Acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase inhibitor, avasimibe, stimulates bile acid synthesis and cholesterol 7 α -hydroxylase in cultured rat hepatocytes and in vivo in the rat. *Hepatology* 1999, 30, 491-500.

Raser, K. J.; Posner, A.; Wang, K. K. Casein zymography: a method to study mu-calpain, m-calpain, and their inhibitory agents. *Arch. Biochem. Biophys.* 1995, 319, 211-216.

Rich, J. N. The role of transforming growth factor- β in primary brain tumors. *Front. Biosci.* 2003, 8, e245-60.

Rich, J. N.; Bigner, D. D. Development of novel targeted therapies in the treatment of malignant glioma. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2004, 3, 430-446.

Rich, J. N.; Bigner, D. D. Development of novel targeted therapies in the treatment of malignant glioma. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2004, 3, 430-446.

Rival, Y.; Beneteau, N.; Chapuis, V.; Taillandier, T.; Lestienne, F.; Dupont-Passelaigue, E.; Patoiseau, J. F.; Colpaert, F. C.; Junquero, D. Cardiovascular drugs inhibit MMP-9 activity from human THP-1 macrophages. *DNA Cell Biol.* 2004, 23, 283-292.

Roberts, A. B. Molecular and cell biology of TGF-beta. *Miner. Electrolyte Metab.* 1998, 24, 111-119.

Robertson, D. G.; Breider, M. A.; Milad, M. A. Preclinical safety evaluation of avasimibe in beagle dogs: an ACAT inhibitor with minimal adrenal effects. *Toxicol. Sci.* 2001, 59, 324-334.

Rooprai, H. K.; McCormick, D. Proteases and their inhibitors in human brain tumours: a review. *Anticancer Res.* 1997, 17, 4151-4162.

Roszman, T.; Elliott, L.; Brooks, W. Modulation of T-cell function by gliomas. *Immunol. Today* 1991, 12, 370-374.

Rutman, R. J.; Steele, W. J.; Price, C. C. Experimental Chemotherapy Studies. II. The Reaction of Chloroquin Mustard (COM) and Nitrogen Mustard (HN2) with Ehrlich Cells. *Cancer Res.* 1961, 27, 1134-1140.

Sahi, J.; Milad, M. A.; Zheng, X.; Rose, K. A.; Wang, H.; Stilgenbauer, L.; Gilbert, D.; Jolley, S.; Stern, R. H.; LeCluyse, E. L. Avasimibe induces CYP3A4 and multiple drug resistance protein 1 gene expression through activation of the pregnane X receptor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2003, 306, 1027-1034.

Sahi, J.; Stern, R. H.; Milad, M. A.; Rose, K. A.; Gibson, G.; Zheng, X.; Stilgenbauer, L.; Sadagopan, N.; Jolley, S.; Gilbert, D.; LeCluyse, E. L. Effects of avasimibe on cytochrome P450 2C9 expression in vitro and in vivo. *Drug Metab. Dispos.* 2004, 32, 1370-1376.

Sakashita, N.; Miyazaki, A.; Takeya, M.; Horiuchi, S.; Chang, C. C.; Chang, T. Y.; Takahashi, K. Localization of human acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferase-1 (ACAT-1) in macrophages and in various tissues. *Am. J. Pathol.* 2000, 156, 227-236.

(115) Savarino, A.; Boelaert, J. R.; Cassone, A.; Majori, G.; Cauda, R. Effects of chloroquine on viral infections: an old drug against today's diseases? *Lancet Infect. Dis.* 2003, 3, 722-727.

- Sawaya, R.; Go, Y.; Kyritsis, A. P.; Uhm, J.; Venkaiah, B.; Mohanam, S.; Gokaslan, Z. L.; Rao, J. S. Elevated levels of Mr 92,000 type IV collagenase during tumor growth in vivo. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1998, *251*, 632-636.
- Schneider, T.; Sailer, M.; Ansorge, S.; Firsching, R.; Reinhold, D. Increased concentrations of transforming growth factor beta1 and beta2 in the plasma of patients with glioblastoma. *J. Neurooncol.* 2006, *79*, 61-65.
- Shaw, E. G.; Robbins, M. E. The management of radiation-induced brain injury. *Cancer Treat. Res.* 2006, *128*, 7-22.
- Slater, A. F. Chloroquine: mechanism of drug action and resistance in *Plasmodium falciparum*. *Pharmacol. Ther.* 1993, *57*, 203-235.
- Smith, J. L.; Rangaraj, K.; Simpson, R.; Maclean, D. J.; Nathanson, L. K.; Stuart, K. A.; Scott, S. P.; Ramm, G. A.; de Jersey, J. Quantitative analysis of the expression of ACAT genes in human tissues by real-time PCR. *J. Lipid Res.* 2004, *45*, 686-696.
- Sotelo, J.; Briceno, E.; Lopez-Gonzalez, M. A. Adding chloroquine to conventional treatment for glioblastoma multiforme: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Ann. Intern. Med.* 2006, *144*, 337-343.
- Springman, E. B.; Angleton, E. L.; Birkedal-Hansen, H.; Van Wart, H. E. Multiple modes of activation of latent human fibroblast collagenase: evidence for the role of a Cys73 active-site zinc complex in latency and a "cysteine switch" mechanism for activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1990, *87*, 364-368.
- Stamenkovic, I. Extracellular matrix remodelling: the role of matrix metalloproteinases. *J. Pathol.* 2003, *200*, 448-464.
- Sternlicht, M. D.; Werb, Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2001, *17*, 463-516.
- Stupp, R.; Mason, W. P.; van den Bent, M. J.; Weller, M.; Fisher, B.; Taphoorn, M. J.; Belanger, K.; Brandes, A. A.; Marosi, C.; Bogdahn, U.; Curschmann, J.; Janzer, R. C.; Ludwin, S. K.; Gorlia, T.; Allgeier, A.; Lacombe, D.; Cairncross, J. G.; Eisenhauer, E.; Mirimanoff, R. O.; European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor and Radiotherapy Groups; National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* 2005, *352*, 987-996.
- Taya, Y.; O'Kane, S.; Ferguson, M. W. Pathogenesis of cleft palate in TGF-beta3 knockout mice. *Development* 1999, *126*, 3869-3879.

Telgt, D. S.; Van der Ven, A. J.; Schimmer, B.; Droogleever-Fortuyn, H. A.; Sauerwein, R. W. Serious psychiatric symptoms after Chloroquine treatment following experimental malaria infection. *Ann. Pharmacother* 2005, 39, 551-554.

Ten Dijke, P.; Iwata, K. K.; Thorikay, M.; Schwedes, J.; Stewart, A.; Pieler, C. Molecular characterization of transforming growth factor type beta 3. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1990, 593, 26-42.

Tosi, M. R.; Bottura, G.; Lucchi, P.; Reggiani, A.; Trincherò, A.; Tugnoli, V. Cholesteryl esters in human malignant neoplasms. *Int. J. Mol. Med.* 2003, 11, 95-98.

Tugnoli, V.; Tosi, M. R.; Tinti, A.; Trincherò, A.; Bottura, G.; Fini, G. Characterization of lipids from human brain tissues by multinuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biopolymers* 2001, 62, 297-306.

Tulpule, A.; Krishnaswamy, K. Effect of food on bioavailability of chloroquine. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 1982, 23, 271-273.

Uelmen, P. J.; Oka, K.; Sullivan, M.; Chang, C. C.; Chang, T. Y.; Chan, L. Tissue-specific expression and cholesterol regulation of acylcoenzyme A:cholesterol acyltransferase (ACAT) in mice. Molecular cloning of mouse ACAT cDNA, chromosomal localization, and regulation of ACAT in vivo and in vitro. *J. Biol. Chem.* 1995, 270, 26192-26201.

Umeki, S. Decreases in serum cholesterol levels in advanced lung cancer. *Respiration* 1993, 60, 178-181.

Van Oostveen, I.; Ducret, A.; Aebersold, R. Colloidal silver staining of electroblotted proteins for high sensitivity peptide mapping by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Anal. Biochem.* 1997, 247, 310-318.

Van Wart, H. E.; Birkedal-Hansen, H. The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1990, 87, 5578-5582.

Vega-Avila, E.; Pugsley, M.K. An overview of colorimetric assay methods used to assess survival or proliferation of mammalian cells. *Proc. West. Pharmacol. Soc.* 2011, 54, 10-14.

Vescovi, A. L.; Galli, R.; Reynolds, B. A. Brain tumour stem cells. *Nat. Rev. Cancer.* 2006, 6, 425-436.

(Vora, J.; Stern, R.; Lathia, C. Clinical pharmacokinetics of CI-1011, an ACAT inhibitor. *Pharm. Res.* 1997, 14, S505.

Wen, P. Y.; Kesari, S. Malignant gliomas in adults. *N. Engl. J. Med.* 2008, 359, 492-507.

(139) Wiesner, J.; Ortmann, R.; Jomaa, H.; Schlitzer, M. New antimalarial drugs. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* 2003, 42, 5274-5293.

Willner, E. L.; Tow, B.; Buhman, K. K.; Wilson, M.; Sanan, D. A.; Rudel, L. L.; Farese, R. V., Jr Deficiency of acyl CoA:cholesterol acyltransferase 2 prevents atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2003, 100, 1262-1267.

(141) Wolburg, H.; Lippoldt, A. Tight junctions of the blood-brain barrier: development, composition and regulation. *Vascul Pharmacol.* 2002, 38, 323-337.

Wolfgang, G. H.; Robertson, D. G.; Welty, D. F.; Metz, A. L. Hepatic and adrenal toxicity of a novel lipid regulator in beagle dogs. *Fundam. Appl. Toxicol.* 1995, 26, 272-281.

Yamada, M.; Shimizu, K.; Miyao, Y.; Hayakawa, T.; Nakajima, K.; Nakahira, K.; Nakagawa, H.; Mikoshiba, K.; Ikenaka, K. Migration of genetically labeled glioma cells after implantation into murine brain. *J. Neurosci. Res.* 1994, 38, 415-423.

Yance, D. R., Jr; Sagar, S. M. Targeting angiogenesis with integrative cancer therapies. *Integr. Cancer. Ther.* 2006, 5, 9-29.

Yee, D.; Hao, C.; Cheung, H. C.; Chen, H.T.; Dabbagh, L.; Hanson, J.; Coupland, R.; Petruk, K. C.; Fulton, D.; Roa, W. H. Effect of radiation on cytokine and cytokine receptor messenger-RNA profiles in p53 wild and mutated human glioblastoma cell lines. *Clin Invest Med.* 2001, 2, 76-83.

Yuan, J. Evolutionary conservation of a genetic pathway of programmed cell death. *J. Cell. Biochem.* 1996, 60, 4-11.

ANNEXE 1

Les résultats supplémentaires du test WST-1 semblent indiquer que le métabolisme cellulaire de la lignée de gliomes humains U-373 MG diminuent en fonction des concentrations de la chloroquine et de l'AvasimibeTM après des traitements de 24 h et 48 h (Tableaux 2-3).

Tableau 2. Les données obtenues lors du test de métabolisme des cellules de la lignée de gliomes humains U-373 MG suite à une exposition de 240 minutes au WST-1 (9210 cellules/puits) après des traitements de 24 h et 48 h à la chloroquine n=1. Le contrôle représentait les cellules qui ont été incubées avec le véhicule seul (D-PBS pH5).

Chloroquine (μ M)	% métabolisme cellulaire de la lignée U-373 MG	
	24 h	48 h
Ctrl	100 \pm 3	100 \pm 3
10	98 \pm 2	86 \pm 2
25	93 \pm 0,4	76 \pm 0,2
50	62 \pm 3	43 \pm 3
100	54 \pm 2	40 \pm 2

Tableau 3. Les données obtenues lors du test de métabolisme cellulaire de la lignée de gliomes humains U-373 MG suite à une exposition de 240 minutes au WST-1 (9210 cellules/puits) après des traitements de 24 h et 48 h avec l'AvasimibeTM n=1. Le contrôle représentait les cellules qui ont été incubées avec le véhicule (0,08 % DMSO).

Avasimibe TM (μ M)	% métabolisme cellulaire de la lignée U-373 MG	
	24 h	48 h
Ctrl	100 \pm 3	100 \pm 3
0,025	97 \pm 0,7	85 \pm 1
1	96 \pm 2	80 \pm 3
10	90 \pm 2	68 \pm 3
25	87 \pm 1	58 \pm 5

ANNEXE 2

La chloroquine diminue le métabolisme cellulaire de la lignée de gliomes humains U-118 MG après des traitements de 24 h et 48 h (Tableau 4).

Tableau 4. Les données obtenues lors du test de métabolisme des cellules de la lignée de gliomes humains U-118 MG suite à une exposition de 240 minutes au WST-1 (9210 cellules/puits) après des traitements de 24 h et 48 h à la chloroquine n=1. Le contrôle représentait les cellules qui ont été incubées avec le véhicule seul (D-PBS pH5).

Chloroquine (μ M)	% métabolisme cellulaire de la lignée U-118 MG	
	24 h	48 h
Ctrl	100 \pm 9	100 \pm 7
10	96 \pm 8	84 \pm 3
25	85 \pm 2	80 \pm 4
50	80 \pm 9	54 \pm 1
100	65 \pm 3	40 \pm 3