



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la
Recherche Scientifique
جامعة البليدة 1
Université Blida 1

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie et Physiologie Cellulaire

Mémoire De Fin d'Etudes
En Vue de l'Obtention du Diplôme de Master II en Sciences Biologiques

Option
Biologie Moléculaire et Cellulaire

THEME

Rôle de l'Hème oxygénase dans l'agressivité du
cancer du sein

Présenté par :

BOUKHODEMI Saada Farah

IBRIR Meriem

Devant le jury :

Mr Boukhatem M.N.	Professeur	USDB1	Président
Pr. Kouchkar A.	Professeur	CPMC	Examinatrice
M^{me} Keskas S.	MAA	USDB1	Promotrice

Année universitaire : 2020/2021.

Remerciements

Tout d'abord, on remercie Dieu le tout puissant de nous avoir la santé, la volonté, le courage d'achever ce mémoire de fin d'étude.

*Nous tenons à remercier notre promotrice **Mme Keskas S.** Maître Assistante A au Département de Biologie à l'Université Blida1 pour ses précieux conseils, son aide et ses encouragements.*

*Nous tenons à exprimer toute notre reconnaissance à **Mme Saadi L.** Professeur au Département de Biologie à l'Université Blida1 et chef d'option du Master Biologie moléculaire et cellulaire, pour sa confiance et son soutien durant tous notre cursus d'études, merci pour la science que vous nous avez prodiguée, et le gout de s'avoir que vous nous avez transmis.*

*Pour l'honneur qu'ils nous font en faisant parti de ce jury, nous tenons à remercier **Mr Boukhatem M.N.** Professeur au Département de Biologie à l'Université Blida1 qui a accepté de le présider, à **Mme Kouchkar A.** Professeur au laboratoire d'anatomo-pathologies au CPMC, qui a accepté de l'examiner.*

Nous tenons à remercier tous nos enseignants actuels et passés qui nous ont donné leur temps, partagé leurs connaissances avec nous. Ainsi qu'au Département des Sciences Biologiques et à tous ses staffs et membres.

Merci à ma grande et belle famille. Merci à mes grands-parents, mes tantes, oncles et cousins, et évidemment, merci à mes parents et à mes frères et sœurs sur qui j'ai toujours pu compter et qui ont été et sont d'un soutien sans faille. Sans vous je n'en serai pas là.

Je dédie ce travail :

À, mes parents Mr IBRIR Omar et Mme Zahida, qui m'ont toujours soutenu pendant au long de mes études, qui m'ont toujours fait confiance et encouragée. Que dieu le tout puissant vous garde et vous accorde santé, longévité. J'espère être à la hauteur de vous souhait et que ce modeste travail soit le témoignage de mon affection.

À, mes frères et sœurs Hamza, Mohamed, Sarah, Hadjer et à ma belle-sœur Imene, merci pour votre présence, soutien, générosité, tendresse, merci pour tous les moments agréables qu'on a vécu ensemble. Je vous souhaite une vie pleine de bonheur et de succès, ainsi qu'à ma nièce adorée et à tous mes neveux.

À, mes beaux-frères Hamza et Hassen, vous avez participé d'une manière ou d'une autre à ma réussite. Merci.

À, toutes mes cousines, cousins vous êtes les meilleurs cousin(e)s du monde !

À, mes copines, vous n'êtes pas uniquement mes amies, mais mes sœurs, mes confidentes et mes proches. Tous mes vœux de bonheur, santé et de réussite...

À, mes amies, mon binôme et toutes personnes que j'ai rencontrées durant mes années d'études, merci pour tous ces moments de joie et de bonne humeur.

Et à tous ceux qui me sont chers.

*Un dédicace spécial de solidarité d'amour et d'encouragement à toutes les femmes braves qui luttent contre le cancer du sein, vous êtes fortes courageuses et une vraie source d'inspiration
Tout mon soutien et mes prières.*

Meriem

Je dédie ce travail à :

Mes parents, vous êtes toujours mes plus beaux repères et ma source de joie.

A ma mère Samia, mon point de départ, qui m'a soutenu, encouragé durant toute ma vie. Autant de phrases ne sauraient jamais montrer tout mon amour et affection que j'ai pour toi Que tu retrouves ici le témoignage de ma profonde reconnaissance. Longue vie maman.

A mon père Ahmed, je te remercie de m'avoir soutenu moralement et matériellement jusqu'à ce jour, merci pour tes encouragements, ton amour qu'ALLAH t'accorde santé, bonheur et te protège de tout mal.

A Abdou mon idole, mon bras droit je veux que tu saches que j'ai de la chance de t'avoir comme frère car tu m'as toujours inspiré de la bonne volonté à aller de l'avant.

A ma famille, mes amis, particulièrement mon binôme Meriem et à tous ceux qui j'aime, ceux qui me donnent de l'amour et qui ont partagé avec moi tous les moments d'émotions lors de la réalisation de ce travail. et à qui je souhaite plus de succès.

Farah

Résumé

L'hème oxygénase est une enzyme inductible et ubiquitaire qui catalyse la dégradation oxydative de l'hème, en produisant le monoxyde de carbone (CO), le fer ferreux (Fe²⁺) et la biliverdine (BV). Cette dernière est ensuite transformée par la biliverdine réductase en un puissant antioxydant, la bilirubine (BR). Son rôle protecteur au sein des cellules mammaires a été conforté par plusieurs études de recherches. Par ailleurs, la surexpression de l'hème oxygénase par les cellules tumorales, met en lumière son rôle sombre.

Les conditions sanitaires que vit le monde en ce moment (Covid19), nous ont obligés à réaliser une étude théorique en se basant sur l'analyse de douze articles de recherches. En effet, les résultats d'analyse des différentes études de recherche ont révélé que l'hème oxygénase puisse être impliquée dans plusieurs événements cellulaires et ce, en jouant un double rôle, rôle de cytoprotection, et un rôle d'agressivité du cancer du sein à travers la modulation de la transition épithélio-mésenchymateuse, de l'invasion et des métastases.

L'objectif de notre étude s'est basé sur la compréhension de l'éventuel rôle de HO-1 dans le déclenchement de certains processus tumoraux agressifs tels que la transition épithélio-mésenchymateuse ainsi que l'invasion cellulaire et les métastases.

Mots Clés : Cancer du sein, Hème oxygénase, Transition épithélio-mésenchymateuse, Invasion, Métastase, Stress oxydatif.

Abstract

Heme oxygenase is an inducible and ubiquitous enzyme that catalyzes the oxidative degradation of heme, producing carbon monoxide (CO), ferrous iron (Fe²⁺) and biliverdin (BV). This latest is then transformed by biliverdin reductase into a powerful antioxidant, bilirubin (BR). Its protective role within breast cells has been confirmed by several research studies. Moreover, the overexpression of heme oxygenase by tumor cells highlights its dark role.

The sanitary conditions that the world is experiencing at the moment (Covid19), forced us to carry out a theoretical study based on the analysis of twelve research articles. Indeed, the analysis results of various research studies have revealed that heme oxygenase can be involved in several cellular events and this, by playing a dual role, role of cytoprotection, and a role of aggressiveness of breast cancer through the modulation of epithelial-mesenchymal transition, invasion and metastasis.

The objective of our study was based on understanding the possible role of HO-1 in triggering certain aggressive tumor processes such as epithelial-mesenchymal transition as well as cell invasion and metastasis.

Keywords: Breast cancer, Heme oxygenase, Epithelial-mesenchymal transition, Invasion, Metastasis, Oxidative stress.

المخلص

الهيم أوكسجيناز هو إنزيم محفز في كل مكان يحفز التحلل التأكسدي للهيم، وينتج أول أكسيد الكربون (OC)، الحديد الحديدية (eF²⁺) والبيلفيردين (VB) ثم يتم تحويل هذه الأخيرة عن طريق البيلفيردين ريدوكتاز إلى مضاد أكسدة قوي البيليروبين (RB). تم تأكيد دوره الوقائي داخل خلايا الثدي من خلال العديد من الدراسات البحثية. بالإضافة الى ذلك، فإن الإفراط في التعبير عن أوكسجيناز الهيم بواسطة الخلايا السرطانية يسلب الضوء على دوره المظلم.

أجبرتنا الظروف الصحية التي يعيشها العالم حاليًا (كوفيد 19) على إجراء دراسة نظرية بناءً على تحليل اثني عشر مقالًا بحثيًا. في الواقع، كشفت نتائج التحليل للعديد من الدراسات البحثية أن أوكسجيناز الهيم يمكن أن يكون متورطًا في العديد من الأحداث الخلوية، وذلك من خلال لعب دور مزدوج، دور الحماية الخلوية، ودور عدوانية سرطان الثدي من خلال تعديل الانتقال الظهاري واللحمة المتوسطة والغزو والورم الخبيث.

استند الهدف من دراستنا إلى فهم الدور المحتمل ل-OH-1 في إثارة بعض عمليات الورم العدوانية مثل الانتقال الظهاري و اللحمة المتوسطة بالإضافة إلى غزو الخلايا والورم الخبيث.

الكلمات المفتاحية: سرطان الثدي، أوكسجيناز الهيم، الانتقال الظهاري واللحمة المتوسطة، غزو الخلايا، ورم خبيث، الاكسدة.

Sommaire

Introduction.....	1
-------------------	---

1^{ère} Partie : Partie bibliographique

Chapitre I : Cancer du sein

1 Rappels bibliographiques.....	3
1.1 Généralités sur le cancer du sein	3
1.1.1 Définition	3
1.1.2 Facteurs de risque.....	3
1.1.3 Classification du cancer du sein	4
1.1.3.1 Classification TNM	4
1.1.3.2 Classification histologique	5
1.1.3.3 Classification SBR : Scarff Bloom et Richardson.....	7
1.1.3.4 Classification moléculaire	7

Chapitre II : Stress oxydatif

1.2 Stress oxydatif	9
1.2.1 Les espèces réactives de l'oxygène	9
1.2.2 Défenses antioxydantes	13
1.2.2.1 Antioxydants non enzymatiques.....	14
1.2.2.2 Antioxydants enzymatique	15

Chapitre III : Hème oxygénase

1.3 L'hème oxygénase.....	16
1.3.1 Régulation transcriptionnelle de HO-1.....	18
1.3.2 Polymorphismes du promoteur HMOX1	22
1.3.3 Régulation de HO-1 par microARN.....	23

2^{ème} Partie : Résultats et discussion

2 Résultats et discussion	25
2.1 Transition épithelio-mésenchymateuse (EMT).....	25
2.1.1 Transition épithélio-mésenchymateuse et HMOX-1	26
2.2 L'invasion et les métastases	32
2.2.1 HO-1 dans l'invasion et les métastases	32
2.2.2 HO-1 et l'échappement immunitaire des tumeurs	39
2.3 Approches thérapeutiques.....	44
2.3.1 Inhibition pharmacologique de l'activité HO-1	44

2.3.2	Inhibition génétique de l'expression de HO-1	47
2.4	HO-1 comme biomarqueur possible.....	55
	Conclusion & Perspectives	59
	Références Bibliographiques.....	61
	Annexes.....	66

Liste des abréviations

α -SMA : α -Smooth Muscle Actin

15d-PGJ₂ : 15-désoxy- $\Delta^{12,14}$ prostaglandine J₂

ADN : Aide Désoxyribonucléique

AP-1 : Activator Protein-1

ARE : Element de Reponse Antioxydant

ARNm : Acide RiboNucléique messenger

ARNsh : Acide RiboNucléique en épingle à cheveux courts

Bach : BTB and CNC Homology

BAX : Bcl2-associated X protein

Bcl-2 : B-cell lymphoma 2

BMDM : Bone Marrow Derived Macrophage

BR : Bilirubine

BRCA1 : Breast Cancer 1

BRCA2 : Breast Cancer 2

BV : Biliverdine

CAS9 : CRISPR Associated Protein 9

CAT : Catalase

CBR1 : Carbonyl Reductase 1

CCI : Carcinome Canalaire Infiltrant

CCIS : Carcinome Canalaire In Situ

cGMP : cyclic Guanosine MonoPhosphate

CLI : Carcinome lobulaire infiltrant

CLIS : Carcinome lobulaire in situ

CnC : Cap'n'Collar

CO : monoxyde de Carbone

CoPP : Cobalt Protoporphyrin

COX-2 : Cyclooxygenase 2

CRISPR : Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats

CrPP : ProtoPorphyrine de Chrome

Cul3 : Cullin Ubiquitine Ligase3

DFX : Desferrioxamine

DMSO : Dimethylsulfoxyde

DTT : Dithiothreitol

EGFR : Récepteur de Facteur de croissance épidermique

EMT : Transition Epithélio-Mésenchymateuse

EMSA : Electrophoretic Mobility Shift Assay

ERBB2 : Erythroblastic Oncogene B

ERK : Extracellular signal-Regulated Kinase

ERO : Espèces Réactives d'Oxygène

GATA3 : Facteur de transcription spécifique aux cellules T à action trans

GPx : Glutathion Peroxydase

GSH : Glutathion

GSK-3 : Glycogen Synthase Kinase-3

GSTP1 : Glutathione S-transferase pi gene

HER2 : récepteur 2 du facteur de croissance épidermique humain / Human

HIF-1 : Hypoxia Inductible Factor

HO-1 : Hème oxygénase-1

HRAS : Harvey Rat Sarcoma viral oncogene homolog

ICAM-1 : Intracellular Adhesion Molecule 1

JNK : c-Jun N-terminal Kinase

Keap : Kelch-like ECH-associated Protein

MAPK : Mitogen-activated Protein Kinase

MCF7 : Michigan Cancer Fondation 7

MDA_MB_231 : M.D. Anderson- Metastatic Breast 231

MMP : MétalloProteinase Matricielle

NAC : *N*-Acetyl-L-cysteine

NGF : Nerve Growth Factor

Nrf2 : Facteur Nucleair Erythroide 2

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

P75 NTR : p75 Neurotrophin receptor

PARP : Poly diphosphate Ribose Polymerase

PCR : Polymerase Chain Reaction

PDGF : Platelet-Derived Growth Factor

Phen : Phenanthroline

PPAR γ : Proxisome Proliferator-Activated Receptor γ

PTX : Paclitaxel

RE α : Récepteur aux oestrogènes alpha

RE β : Récepteur aux oestrogène béta

RH : Récepteur Hormonaux

RNS : Reactive Nitrogen Species

SBR : Scarff Bloom et Richardson

SDF-1 : Stromal cell-Derived Factor 1

SER : Reticulum Endoplasmique Lisse

sGC : Guanylyl Cyclase soluble

SnPP : ProtoPorphyrine d'étain

SOD : Superoxyde Dismutase

TFN α : Tumor Necrosis Factor α

TGF- β : Transforming Growth Factor- β

TME : Microenvirenemment Tumoral

TNM : Tumor-Node-Metastasis

TPA : 12-*O*-TetradecanoylPhorbol-13-Acetate

TrCp : Transducin Repeat Conaining E3 Ubiquitin Protein ligase

TrKA : Tropomyosin-related Kinase A

UICC : Union International de lutte Contre le Cancer

VEGF : Vascular Ebdothelial Growth Factor

ZnPP : Zinc ProtoPorphyrin

Liste des figures

Figure 1 : Représentation schématique d'un cancer canalaire (gauche) et lobulaire (droite) infiltrant (Prunier.,2015).	6
Figure 2 : Voie de la formation des radicaux libres de l'oxygène (Garel et al.,2007).	9
Figure 3 : Production de l'anion superoxyde en condition physiologique par la fuite d'électrons de la chaîne respiratoire mitochondriale (AURROUSSEAU, 2002).	10
Figure 4 : Origine des espèces réactives de l'oxygène (Migdal & Serres, 2011)	11
Figure 5 : Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqués en biologie (Favier, 2003).	12
Figure 6 : Voie de dégradation de l'hème (Nitti et al., 2017).	16
Figure 7 : Localisation subcellulaire des enzymes métaboliques de l'hème (Ryter et al., 2006).	17
Figure 8 : Voie de l'hème oxygénase-1 (Loboda et al., 2016)	18
Figure 9: Voies de (figure7) signalisation menant à l'activation de HO-1 (Ryter et al., 2006).	20
Figure 10: Nrf2 dans les cellules stressées vs non stressées (Na & Surh, 2014).	21
Figure 11 : Représentation schématique de la voie Nrf2-Keap1 (Loboda et al., 2016).	22
Figure 12 : Expression de HMOX-1 dans la lignée cellulaire de cancer du sein MCF-7 (Zhu et al., 2017).	26
Figure 13 : Effet de l'hémine sur la migration et l'invasion des cellules MCF-7 traitées au TGF-B (Zhu et al., 2017).	27
Figure 14 : Effet de l'hémine sur l'EMT des cellules MCF-7 induite par le TGF-b1 (Zhu et al., 2017).	29
Figure 15 : Effet de l'hémine sur le taux ROS et l'expression de la E-cadhérine dans les cellules MCF- 7 (Zhu et al., 2017).	30
Figure 16 : Effet de l'hémine sur l'Hmox-1, l'EMT et la génération des ROS (Zhu et al., 2017).	31
Figure 17 : Induction de HO-1 dans les cellules malignes favorisant la croissance tumorale, l'invasion et le métastase (Nitti et al., 2017).	32
Figure 18: Représentation schématique des mécanismes sous-jacents à la phagocytose médiée par le TAM des débris cellulaires tumoraux dans le TME après chimiothérapie (Kim et al., 2020).	43
Figure 19 : HO-1 comme cible pour la thérapie anticancéreuse (Podkalicka et al., 2018).....	44
Figure 20 : Outils génétiques et pharmacologiques pour l'inhibition de HO-1 (Podkalicka et al., 2018).	45
Figure 21 : Effet de l'inhibition de HO-1 sur le développement tumoral et la sensibilité aux thérapies anticancéreuses. (Podkalicka et al., 2018)	49
Figure 22 : Mécanisme proposé sous-jacent à un effet destructeur sélectif des cellules cancéreuses de la piperlongumine (Lee et al., 2015).	55

Liste des tableaux

Tableau I : Classification des stades du cancer du sein, en fonction de la classification TNM (Verbeke,2010).	67
Tableau II : Classification moléculaire des cancers du sein (Verbeke,2010).	67

Introduction

Introduction

L'hème oxygénase (**HO-1**) est une enzyme inductible et ubiquitaire qui dégrade l'hème en fer ferreux (**Fe²⁺**), monoxyde de carbone (**CO**) et biliverdine (**BV**). Cette dernière est ensuite transformée par la biliverdine réductase en bilirubine (**BR**), puissant antioxydant. Le fer ferreux quant à lui entraîne la stimulation de la ferritine, protéine de stockage du fer (**Grochot-Przeczek et al.2012**).

HO-1 possède une activité anti-inflammatoire, antioxydante et anti-apoptotique (**Lyoumi et al.2007**). En cas de stress, de nombreux agents, comme les cytokines, les métaux lourds ou le peroxyde d'hydrogène peuvent induire **HO-1**, elle constitue donc un mécanisme de défense contre les dégâts tissulaires causés par le stress oxydant (**Grochot-Przeczek et al.2012 ; Wang et al.2010**).

Son rôle protecteur au sein des cellules mammaires a été conforté par plusieurs études de recherches. Par ailleurs, la surexpression de cette dernière par les cellules tumorales, met en lumière son rôle sombre (**Chiang et al., 2019**).

Jusqu'à présent le cancer reste un problème de santé publique, car il représente une forte mortalité. Selon l'OMS c'est la Deuxième cause de décès dans le monde, il fait environ 10 millions de morts par an. L'un des traits caractéristiques du cancer est la multiplication rapide de cellules anormales à la croissance inhabituelle, qui peuvent envahir des parties voisines de l'organisme, puis migrer vers d'autres organes. On parle alors de métastases, lesquelles constituent la principale cause de décès par le cancer (**WHO, 2021**).

L'objectif de cette étude était de déceler le rôle éventuel de **HO-1** dans le déclenchement de certains processus tumoraux agressifs, notamment, la transition épithélio-mésenchymateuse ainsi que l'invasion cellulaire et les métastases.

La transition épithélio-mésenchymateuse (**EMT**) est un processus fondamental indispensable lors de l'embryogenèse et de l'organogenèse. La conversion morphologique de cellules épithéliales en cellules mésenchymateuses est assurée par une diversité de voies de signalisation qui contrôlent le statut adhésif, la migration cellulaire, et coopèrent avec le programme de différenciation. L'implication de l'**EMT** dans l'invasion et la dissémination métastatique des carcinomes est désormais très documentée (**Thiery et Huang, 2013**).

Au cours de la progression tumorale, de nombreuses interactions s'établissent entre les cellules cancéreuses, le tissu environnant et la matrice extracellulaire. Les cellules tumorales peuvent ainsi altérer leur microenvironnement en le rendant permissif et propice à leur

Introduction

croissance ; en retour, le microenvironnement tumoral contribue à la migration de ces cellules et, de ce fait, à l'invasion tumorale. Une telle coopération joue un rôle fondamental dans l'évolution et le devenir métastatique de la tumeur (**Albregues et al., 2014**).

Les métastases sont la cause principale du taux élevé de mortalité liée aux cancers. Ainsi, la compréhension des étapes initiales des mécanismes permettant aux cellules tumorales d'envahir le stroma revêt un intérêt indéniable dans la mise en place de stratégies thérapeutiques efficaces. Les cellules tumorales peuvent s'échapper de la tumeur primaire par différents modes de migration et envahir les tissus adjacents (**Albregues et al., 2014**).

Malheureusement, la survenue de la pandémie au **COVID19** avec le confinement, ont contraint les structures sanitaires à annuler les stages pratiques des étudiants. Pour ces raisons, nous nous sommes limitées à une étude bibliographique des caractéristiques épidémiologiques, histopathologiques, moléculaires et du rôle de l'hème oxygénase dans le cancer mammaire, en se basant sur l'analyse de douze articles de recherche.

Pour pouvoir couvrir tous les aspects de notre thématique, ce travail a été structuré en trois parties :

- ✓ Après une introduction, une synthèse bibliographique concernant le cancer du sein et le rôle de l'hème oxygénase.
- ✓ La deuxième partie consiste à l'analyse et la discussion des différents résultats de recherche.
- ✓ Le troisième volet présente diverses stratégies thérapeutiques visant l'inhibition de l'expression de l'activité de l'hème oxygénase, et qui peuvent être appliquées dans le traitement du cancer mammaire.
- ✓ Et enfin, l'ensemble des résultats de recherches étudiés dans notre travail, est résumé dans la conclusion.

Rappels Bibliographiques

Chapitre I : Cancer du sein

1 Rappels bibliographiques

1.1 Généralités sur le cancer du sein

1.1.1 Définition

Le cancer est caractérisé par la formation ou la présence d'une ou plusieurs tumeurs malignes qui se forment et se développent généralement dans les tissus épithéliaux (**carcinome**) et rarement dans les tissus conjonctifs (**sarcome**). Certaines cellules cancéreuses migrent à travers les vaisseaux sanguins vers une ou différentes parties du corps, c'est ce qu'on appelle **métastase (Ruddon.,2007)**.

Le cancer du sein se définit comme une prolifération anarchique et incontrôlée des cellules épithéliales, qu'il s'agit des cellules des canaux galactophores 'carcinome canalaire' ou de cellules de lobules 'carcinome lobulaire'. En **2015**, l'incidence du cancer a atteint **99 cas** pour **105** hommes et **131,8 cas** pour **105** femmes. Il est le premier cancer de la femme avec une incidence de **62 cas** pour **105** femmes (**Hamdi-Chérif et al 2017**).

C'est l'un des cancers les plus fréquents chez la femme. Près de **2.3 millions** de nouveaux cas sont diagnostiqués à l'échelle mondiale dont **12536** nouveaux cas enregistrés en **Algérie en 2020 (Globocan, 2020)**.

La première cause de mortalité chez la femme en **Algérie** est le cancer du sein. Une femme sur **8** développera un cancer du sein, et à la ménopause sa fréquence est plus importante (**Belkacémi et al.,2010**).

La majorité des décès de cancer du sein survenaient dans les pays à revenu faible ou intermédiaire, où la plupart des femmes atteintes d'un cancer du sein sont diagnostiquées tardivement, du fait essentiellement de l'absence d'information sur le dépistage et de l'accès insuffisant aux services de santé (**WHO,2012**).

1.1.2 Facteurs de risque

Le cancer du sein est une maladie multifactorielle, ses facteurs de risques sont divers et nombreux, ils peuvent être d'origine environnementale, génétique ou épigénétique.

Le sexe, l'obésité, la contraception hormonale, le traitement hormonal substitutif, les grossesses tardives, la consommation d'alcool, de viande grasse, et de tabac, ainsi que le diabète

Rappels Bibliographiques

de type2 peuvent être incriminés avec l'âge qui est le facteur le plus important, mais la maladie est rare chez les femmes de moins de **30ans (Harbeck et al., 2019)**.

L'histoire familiale et les mutations génétiques sont associées avec deux gènes majeurs de prédisposition au cancer du sein ont été caractérisés : **BRCA1 et BRCA2 (Nkondjock & Ghadirian, 2005)**.

1.1.3 Classification du cancer du sein

1.1.3.1 Classification TNM

Le système de classification **TNM (Tumor-Node-Metastasis)** de l'**UICC (Union International de lutte Contre le Cancer)**, a pour but de permettre aux médecins d'établir un pronostic et de choisir le traitement adéquat pour les malades, (**Annexe1 : Tableau I : Classification des stades du cancer du sein, en fonction de la classification TNM**) (**Verbeke.,2010**).

T : correspond à la taille de la tumeur principale et à son degré d'extension,

N : représente le degré d'atteintes des ganglions lymphatiques situés à proximité de la tumeur,

M : désigne toutes les autres tumeurs induites par la propagation des cellules cancéreuses et le développement des métastases.

Cette classification regroupe :

- L'atteinte locale (**T0 à T4**), qui dépend du volume tumoral et l'extension à la cage thoracique.
- L'atteinte ganglionnaire (**N0 à N3**), qui dépend du territoire ganglionnaire s'il est proche ou pas de la tumeur.
- L'atteinte métastatique (**M0 à M1**), définit la présence ou l'absence de métastase, en se basant sur l'apparence des cellules, le degré d'évolution locale et métastatique. Ces tumeurs ainsi caractérisées sont ensuite regroupées par stade ; du stade **0** pour les cancers *in situ* au stade **IV** pour les cancers métastatiques.

T (extension locale dimension de la tumeur) :

- **Tx** : tumeur ne peut être évaluée
- **T1** : tumeur inférieure ou égale à 2 cm
- **T2** : tumeur entre 2 et 5 cm

Rappels Bibliographiques

- **T3** : tumeur supérieure à 5 cm
- **T4** : tumeur de toute taille avec extension directe à la paroi thoracique ou à la peau (**de Lafontan & Mery., 2002**).

N (anomalies des ganglions) :

- **Nx** : les ganglions lymphatiques régionaux ne peuvent être évalués
- **N0** : absence d'adénopathie régionale
- **N1** : ganglions axillaires homolatéraux suspects qui restent mobiles
- **N2** : ganglions axillaires homolatéraux suspects, fixés entre eux ou à d'autres structures
- **N3** : ganglions homolatéraux suspects (**de Lafontan & Mery., 2002**).

M (absence ou présence de métastases) :

- **Mx** : les métastases à distance ne peuvent être évaluées
- **M0** : absence de métastase
- **M1** : présence de métastase (**de Lafontan & Mery., 2002**).

Chaque critère est associé à un chiffre dont la valeur augmente avec la gravité. Lorsque la détermination est impossible, la lettre **x** est associée aux critères **TNM**.

1.1.3.2 Classification histologique

- **Cancer du sein in situ** : les cellules cancéreuses restent uniquement à l'intérieur des canaux (**carcinome canalaire in situ CCIS**) ou des lobules (**carcinome lobulaire in situ CLIS**).
- **Carcinome canalaire infiltrant (invasif) CCI** : il représente **70 à 80%** des cancers mammaires. Les cellules cancéreuses infiltrent les tissus voisins, en se développant dans les canaux, il peut être bien différencié avec des structures tubulaires prédominantes, moyennement différencié ou indifférencié avec absence de structure glandulaire (**figure1**) (**Lecomte.,2009**).
- **Carcinome lobulaire infiltrant (invasif) CLI** : il représente **5%** des cancers mammaires, les cellules cancéreuses infiltrent les tissus voisins, en se développant dans les lobules, il se caractérise par des cellules tumorales régulières qui ne désorganisent pas le tissu mammaire (**figure1**) (**Lecomte.,2009**).

Rappels Bibliographiques

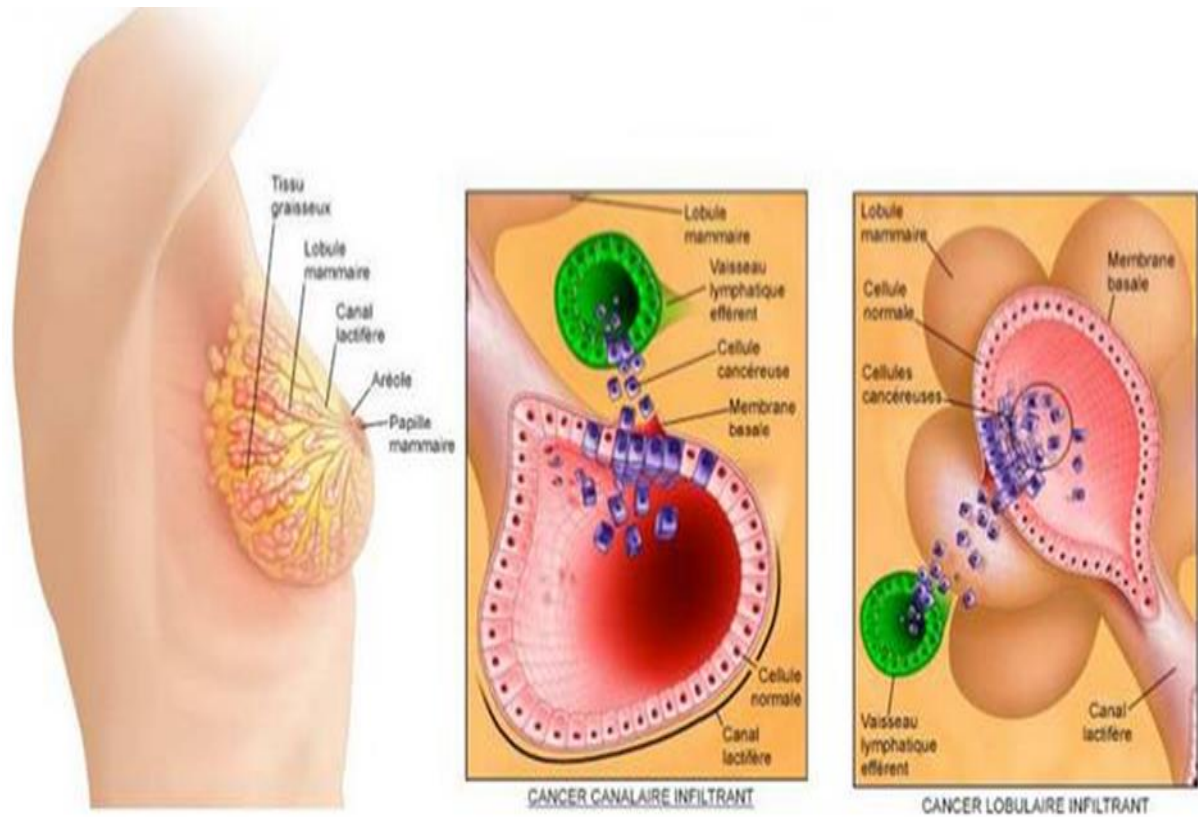


Figure 1 : Représentation schématique d'un cancer canalaire (gauche) et lobulaire (droite) infiltrant (Prunier.,2015).

- **Carcinome micropapillaire infiltrant** : c'est une variété rare de carcinome canalaire invasifs, caractérisée par un aspect histologique unique et une incidence élevée de métastases ganglionnaires lymphatiques (**95%**) (**Bekarsabein et al.,2010**).
- **Carcinome papillaire infiltrant** : le carcinome papillaire du sein représente **0.5 à 1%** de tous les cancers du sein. Il peut être localisé ou diffus (**Ingle et al.,2016**).
- **Carcinome apocrine** : c'est un cancer du sein primitif rare caractérisé par une morphologie apocrine, un profil de récepteur d'œstrogène négatif et un récepteur d'androgène positif (**Vranic et al.,2017**).
- **Carcinome métaplasique** : c'est un groupe hétérogène de tumeurs constitués, d'un seul ou deux contingents, qui peuvent être d'aspect fusiforme ou épidermoïde (**Marangoni et al.,2007**).
- **Autres tumeurs malignes** : représentent moins de **1%** de toutes les tumeurs malignes du sein, y compris les sarcomes phyllodes, méenchymateux, les angiosarcomes, les lymphomes malins non hodgkiniens primitifs du sein (**Lecomte.,2009**).

Rappels Bibliographiques

1.1.3.3 Classification SBR : Scarff Bloom et Richardson

Le grade **SBR (de Scarff Bloom et Richardson)** est un facteur histo-pronostique basé sur l'étude cotée de **1 à 3** résumer comme suit :

- L'architecture du tissu : la tumeur ne comprend que des tubes (**1**), est partiellement tubulaire (**2**), la tumeur ne comprend aucun tube (**3**) ;
- Atypies cytonucléaires : noyaux réguliers monomorphes (**1**), atypies modérées (**2**), noyaux pléomorphes avec atypies marquées (**3**) ;
- Index mitotique : le nombre de mitoses est recherché sur dix champs : **0 à 9 = 1 ; 10 à 19 = 2 ; plus de 19 = 3**.

Les trois critères sont additionnés pour obtenir le **grade I** (score **3, 4 ou 5**), **grade II** (score **6 ou 7**) et **grade III** (score **8 ou 9**). Plus le grade est élevé, plus le pronostic est péjoratif (**Lamy et al., 2010**).

L'activité mitotique est considérée comme un facteur prédictif de réponse. Il existe une corrélation entre un faible nombre de mitoses et l'hormono-sensibilité de la tumeur. À l'inverse, un nombre élevé de mitoses peut être prédictif d'une bonne chimio-sensibilité (**Spielmann et al., 2000**).

1.1.3.4 Classification moléculaire

De nouvelles techniques d'analyse moléculaire comme la technique des puces à ADN, ont permis d'ajouter une caractérisation moléculaire aux données histologiques et cliniques classiques, qui permet la classification des différents types de cancers du sein (**Annexe 2 : Tableau II : Classification moléculaire des cancers du sein**) (**Verbeke.,2010**). Ce qui a contribué à identifier différents sous-types moléculaire :

- **Profil luminal** : Ce type de cancers représente environ **70 %** des cancers du sein. Il concerne les patientes ayant une réceptivité hormonale importante et exprimant les cytokératines lumineales **8, 18 et 19** et le gène **GATA3**. Il existe deux sous types :

Sous-type lumineale A : correspond à des cancers de bas grade et donc de pronostic favorable. Ce sont des tumeurs exprimant les récepteurs hormonaux de type récepteurs aux oestrogènes ER, faiblement proliférantes et pouvant bénéficier d'une hormonothérapie seule (**Namer et al.,2011**).

Sous-type lumineale B : c'est des tumeurs exprimant les récepteurs hormonaux de positivité plus faible, plus prolifératif, et moins différencié que le A et donc moins bon

Rappels Bibliographiques

pronostic, et présentant des amplifications ou mutations de certains gènes comme **P53**. Ils doivent bénéficier d'une chimiothérapie en plus d'une hormonothérapie (**Namer et al., 2011**).

➤ **Profil HER2 :**

Il représente **15 à 20%** des cancers du sein, et dans ce profil, les tumeurs surexpriment HER en raison de son amplification génique, et ce type de tumeurs présentent une expression négative aux récepteurs hormonaux. Ici les patients bénéficient du traitement ciblé trastuzumab qui est un anticorps monoclonal humanisé recombinant, dirigé contre le récepteur HER2 (**Prunier.,2015**).

➤ **Profil basal :**

Les cellules cancéreuses appartenant à ce sous-type n'expriment pas de récepteurs hormonaux. On distingue les tumeurs triples négatives, **ER-/PR-/HER2-**. Ces tumeurs n'expriment ni les récepteurs aux œstrogènes (**ER**), aux progestérones (**PR**) et ni au facteur de croissance épidermique humain (**HER2**). Certains expriment une partie des marqueurs basaux, soit des cytokératines **5/6, 17 EGFR, C-kit** et sont en générale mutés pour **p53** (**Namer et al.,2011**). Cette catégorie de cancer représente moins de **15%** des cancers du sein, mais a un pronostic particulièrement mauvais et répond très mal aux traitements disponibles.

➤ **Profil normal :**

Il représente **5 à 10%** des cancers du sein, et comme son nom l'indique, ressemble à des cellules de tissu mammaire sain (**Verbeke,2010**).

Rappels Bibliographiques

Chapitre II : Stress oxydatif

1.2 Stress oxydatif

Le stress oxydatif est un déséquilibre profond de la balance entre les prooxydants (la production d'espèces radicalaires ou réactives de l'oxygène **ERO**) et les capacités cellulaires antioxydantes en faveur des premiers. Ce déséquilibre conduit à des dégâts structuraux et fonctionnels.

Dans des circonstances physiologiques normales la balance antioxydants/prooxydants est en équilibre. Le stress oxydatif est un déséquilibre de cette balance suite à un déficit en antioxydants et ou une surproduction excessive de radicaux libres (**Favier,2003**).

1.2.1 Les espèces réactives de l'oxygène

Lorsque les molécules sont oxydées par l'oxygène, celui-ci est réduit et forme des espèces réactives de l'oxygène (**ERO**) (**figure2**), mais dont la réactivité est supérieure à celle de la même molécule d'oxygène présent dans l'air (**Garel et al.,2007**).

Ce sont les molécules qui contiennent de l'oxygène, mais qui sont plus réactives que l' O_2 de l'air. Ces **ERO** incluent les radicaux libres tels que l'anion super oxyde ($O_2^{\bullet-}$), le radical hydroxyle (OH^{\bullet}), des composés réactifs oxydants non radicalaires comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), l'oxygène singulet (1O_2) et l'ozone (O_3) (**Mac laren.,2007**).

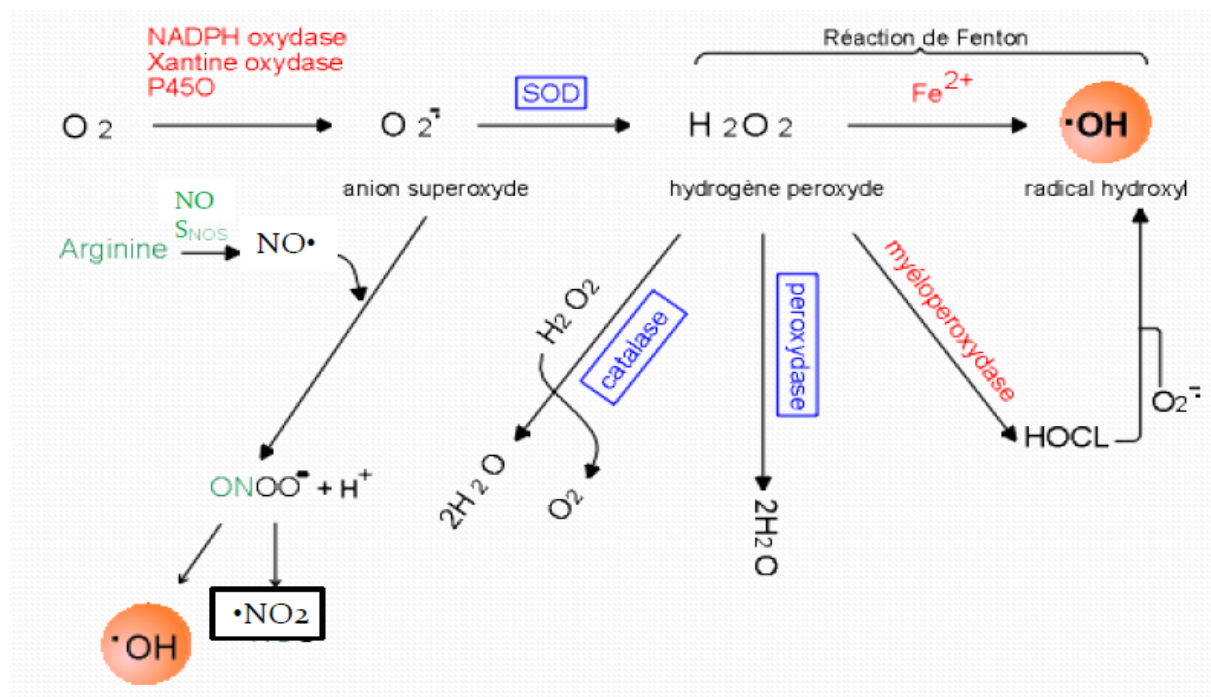


Figure 2 : Voie de la formation des radicaux libres de l'oxygène (Garel et al.,2007).

Rappels Bibliographiques

Les êtres vivants trouvent leur énergie dans la respiration mitochondriale (phosphorylation oxydative), qui se fait par l'intermédiaire de chaînes de transport d'électrons présentes dans la membrane interne des mitochondries (**figure3**) (Aurrousseau., 2002).

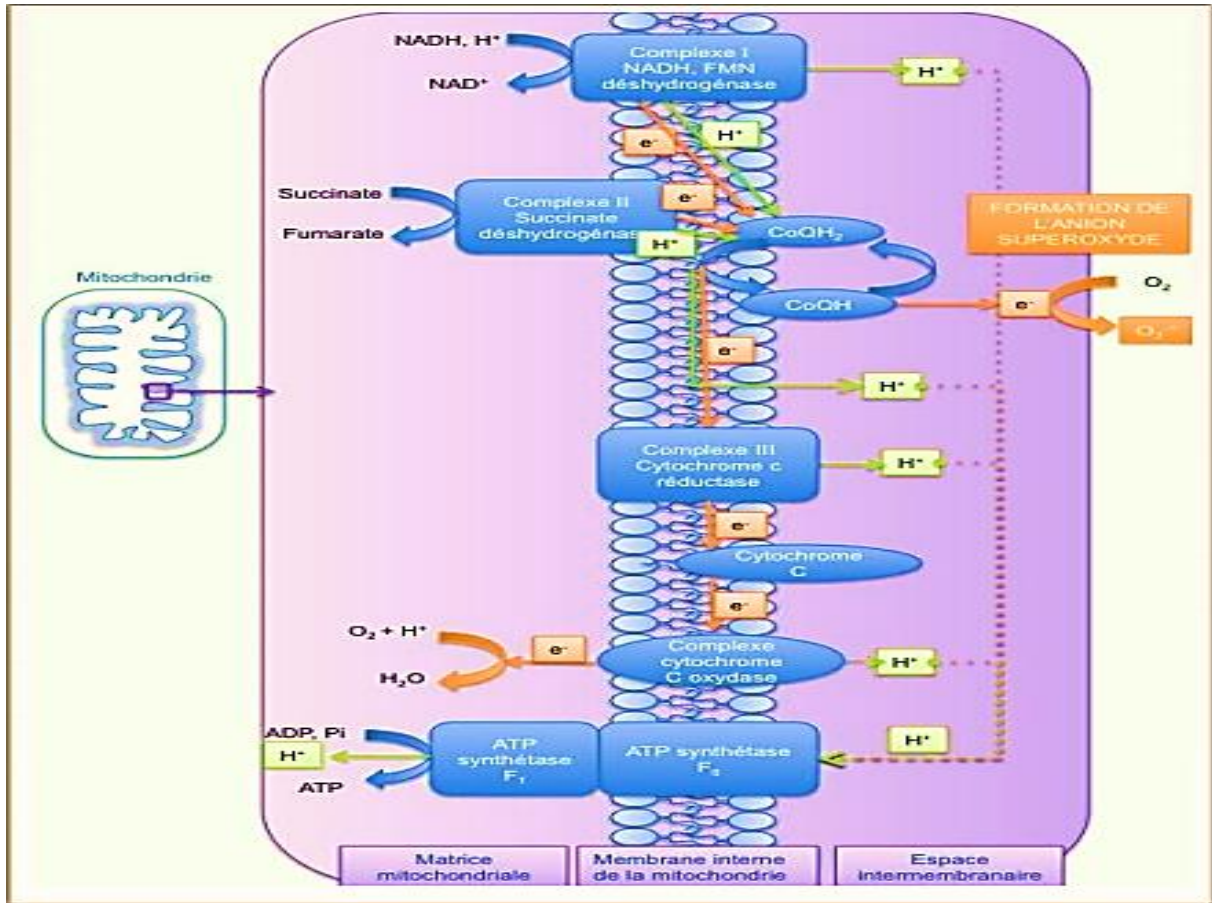


Figure 3 : Production de l'anion superoxyde en condition physiologique par la fuite d'électrons de la chaîne respiratoire mitochondriale (AURROUSSEAU, 2002).

Lors du métabolisme normal, la réduction tétravalente de l'oxygène en eau se fait en plusieurs étapes successives, qui donnent naissance à des intermédiaires potentiellement réduits, appelés radicaux primaires ou espèces réactives de l'oxygène (ERO). Ainsi, environ **2%** de l'oxygène consommé au niveau mitochondrial sont transformés en radicaux superoxydes $O_2^{\cdot-}$ (**figure4**) (Migdal & Serres, 2011).

Rappels Bibliographiques

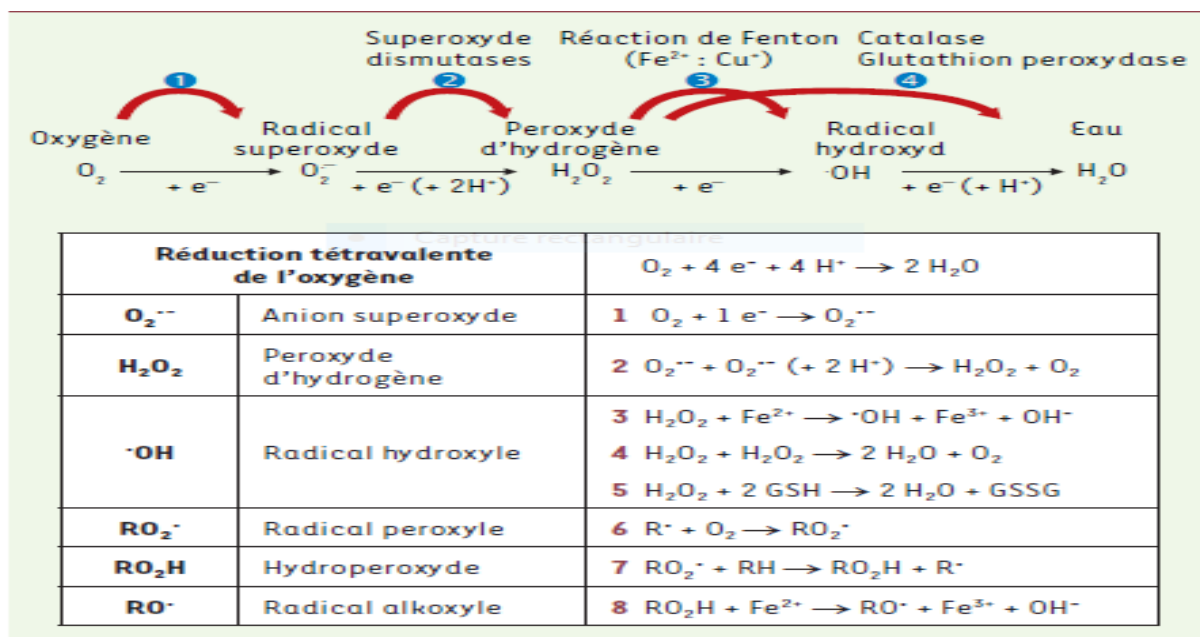


Figure 4 : Origine des espèces réactives de l'oxygène (Migdal & Serres, 2011).

Ainsi, la production des radicaux superoxydes est régulée par des métalloenzymes, notamment, les superoxydes dismutases (**SOD**), qui catalysent la dismutation d'**O2** en peroxyde d'hydrogène, **H2O2** (figure2).

Bien que le peroxyde d'hydrogène ne soit pas en soi un radical, mais il est lui-même toxique et capable de donner naissance, *via* des « **réactions de Fenton** » le radical hydroxyle $\cdot OH$, la plus délétère des espèces radicalaires du stress oxydant, sa réactivité est très élevée, car il réagit près de son site de formation. La quantité de peroxyde d'hydrogène est régulée par l'enzyme héminique catalase (**CAT**) qui accélère sa dismutation, et par le glutathion peroxydase (**GPx**), qui catalyse sa réduction par le glutathion. En effet, le glutathion (**GSH**) est un tripeptide formé de (l'acide glutamique-cystéine et glycine), qui représente le groupement thiol majoritaire au niveau intracellulaire. Il possède un fort pouvoir réducteur et peut également chélater les ions **Cu²⁺** et limiter leur participation à la génération d'**ERO** par les réactions de **Fenton** (Migdal & Serres, 2011).

Toutefois, il existe également d'autres **ERO**, dites secondaires, comme les radicaux peroxydes **RO₂•**, les hydroperoxydes **RO₂H** et les radicaux alkoxydes **RO•** (Migdal & Serres, 2011).

La production de radicaux superoxydes peut s'amplifier lorsque la respiration devient plus intense (effort physique, hyperoxie), ou lors des désordres inflammatoires (effet du **TNF α**) et nutritionnels (carence en ubiquinone), qui augmente avec l'âge (Vamecq et al., 2004).

Rappels Bibliographiques

Par ailleurs, l'inflammation est une source importante de radicaux oxygénés produits directement par les cellules phagocytaires activées, qui sont le siège d'un phénomène appelé *explosion oxydatif*. Ceci conduit à l'activation du complexe de la NADPH oxydase, enzyme qui utilise l'oxygène moléculaire pour produire de grandes quantités d'anions superoxydes au niveau de la membrane cellulaire (Vamecq et al., 2004).

Il existe deux types de radicaux primaires, ceux issus de la réduction de l'oxygène tels que l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) et le radical hydroxyle OH^{\bullet} .

D'autres espèces réactives provenant de l'azote (**Reactive Nitrogen Species ou RNS**) notamment, l'oxyde nitrique (NO^{\bullet}) relativement non réactif et son dérivé le peroxydinitrite ($ONOO^-$), un oxydant puissant capable d'endommager de nombreuses molécules biologiques.

Les autres radicaux libres dits secondaires se forment par réaction des radicaux primaires avec les composés biochimiques de la cellule. D'autres espèces dérivées de l'oxygène, notamment, l'oxygène singulet 1O_2 , le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 et le peroxydinitrite $ONOO^-$, qui ne sont pas des radicaux libres, mais ils sont aussi réactifs et peuvent être des précurseurs de radicaux (figure5) (Favier,2003).

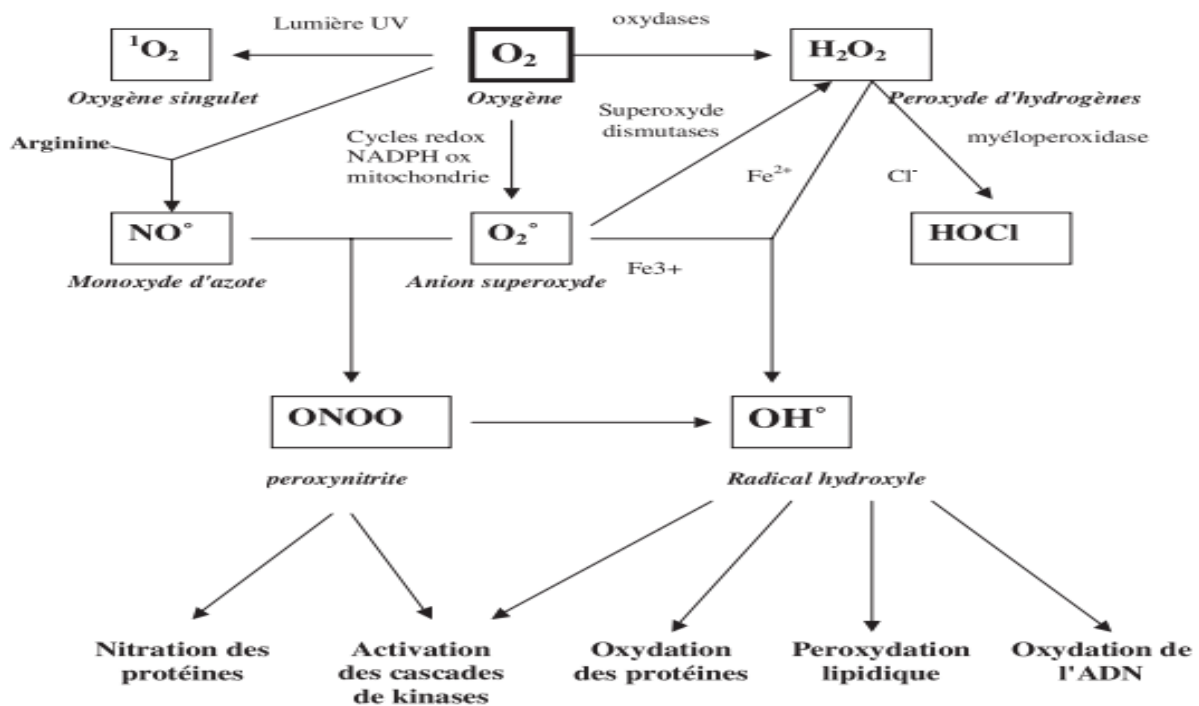


Figure 5 : Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqués en biologie (Favier, 2003).

Rappels Bibliographiques

Toutes ces espèces sont potentiellement toxiques pour l'organisme, car elles peuvent inactiver des protéines, induire des cassures au sein de l'acide désoxyribonucléique (ADN) avec pour conséquence une altération du message génétique, dégrader les sucres, oxyder les lipoprotéines et initier des processus de peroxydation lipidique au sein de la membrane cellulaire en s'attaquant aux acides gras polyinsaturés (**Bensakhria, 2018**).

Dans les circonstances physiologiques normales, les radicaux libres sont produits en permanence en faible quantité par l'organisme et leurs rôles sont résumés comme suit :

- Prolifération, régulation et survie cellulaire,
- Modulation de l'expression des gènes,
- Fonctionnement des enzymes,
- Transmission des signaux cellulaire, c'est des seconds messagers, régulant plusieurs processus physiologiques, moléculaires, cellulaires et tissulaires,
- Effets activateurs/régulateurs des voies de signalisation, ils peuvent être générés par de nombreux ligands, tels que les facteurs de croissance (**PDGF, EGF**), des cytokines (**INF γ , TNF α**) et des peptides (**Angiotensine II**), après s'être fixés à leurs récepteurs et induisent une signalisation redox,
- Rôle dans l'immunité cellulaire, suite à la production d'anion superoxyde (**O $2^{\bullet-}$**) par les cellules phagocytaires,
- Contraction musculaire, régulation de tonus vasculaire, relaxation du muscle lisse, adhésion plaquettaire à travers la production du monoxyde d'azote (**NO**),
- Production de l'énergie,
- Destruction par apoptose des cellules tumorales,
- Processus de fécondation, au cours duquel les spermatozoïdes sécrètent de grandes quantités de ROS pour percer la paroi membranaire de l'ovule (**Migdal & Serres, 2011**).

1.2.2 Défenses antioxydantes

Les ROS sont présents dans la cellule à des doses raisonnables, leur concentration est régulée par l'équilibre entre leur taux de production et d'élimination par les systèmes antioxydants. Ces systèmes sont capables d'inhiber directement la production de ROS, de limiter leur propagation ou de les détruire en utilisant des mécanismes enzymatiques ou non enzymatiques.

Rappels Bibliographiques

Toutefois, la pollution, l'exposition prolongée au soleil et à différentes radiations, l'absorption d'alcool ou de médicaments, le tabagisme provoquent des réactions radicalaires et qui affaiblissent les défenses antioxydantes (**Pincemail & Meurisse, 1999**).

Plusieurs études épidémiologiques ont mis en évidence que de faibles taux sanguins en antioxydants notamment les oligoéléments (**zinc, sélénium et magnésium**) et les vitamines (**A, C et E**) sont étroitement associés à une incidence plus élevée de maladies cardiovasculaires et de cancers. De très nombreuses études expérimentales et épidémiologiques ont montré qu'un apport complémentaire en vitamines antioxydantes ou en sélénium spécifiquement, permet de réduire l'incidence du cancer, des maladies cardiovasculaires et de l'athérosclérose (**Pincemail & Meurisse, 1999**).

1.2.2.1 Antioxydants non enzymatiques

- **Vitamine E**: sous forme **d' α -tocophérol** (la plus active et la plus absorbée), antioxydant majeur des structures lipidiques, et elle possède la capacité de neutraliser l' **$^1\text{O}_2$** (**Bensakhria, 2018**).
- **Vitamine C** : acide ascorbique, c'est un agent réducteur et chélateur sous forme d'**acide déhydro-L-ascorbique (DHA)**, il réagit directement sur les radicaux libres et élimine **H_2O_2** (**Bensakhria, 2018**).
- **Provitamine A (caroténoïdes)** : β -carotène : précurseur de la vitamine **A**, elle interrompt le processus de la peroxydation lipidique (**Bensakhria, 2018**).
- **Autres vitamines** : Vitamine **P (flavonoïdes)**, **Coenzyme Q10** (**Bensakhria, 2018**).
- **Les oligoéléments** : **Se, Zn** comme cofacteurs de la **GPx, SOD1, SOD3** respectivement (**Bensakhria, 2018**).
- **Protéines transporteuses** : par séquestration des métaux impliqués dans la génération des **ERO**, par exemple : la **transferrine** et le **Fer** (**Bensakhria, 2018**).
- **Glutathion** : C'est un tripeptide naturel, la **L- γ -glutamyl-L-cystéine-ylglycine**, hydrosoluble qui existe dans le (cytoplasme, noyau et mitochondries) dont le **GSH** constitue **90%** de sa teneur totale. Le glutathion est le cofacteur de nombreuses enzymes antioxydant telles que la (**GPx**). Il permet la réduction des protéines oxydées par conjugaison aux espèces électrophiles selon les réactions suivantes :



Rappels Bibliographiques

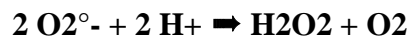
Le glutathion permet l'élimination des espèces OH° et $^1\text{O}_2$ par interaction directe. L'interaction **GSH - 4-HNE** conduit à la formation d'adduits non toxiques (**Bensakhria, 2018**).

Une alimentation saine et équilibrée à base de (légumes, fruits, poissons, huile de soja) doit théoriquement être suffisante pour apporter à l'organisme les antioxydants nécessaires afin d'éliminer au maximum l'effet nocif des **EOA**.

1.2.2.2 Antioxydants enzymatique

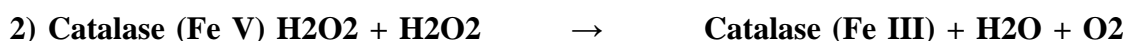
Les antioxydants enzymatiques sont considérés comme la **1ère** ligne de défense et ils sont principalement présentés par :

- **Superoxyde dismutase (SOD)** : métalloenzyme ubiquitaire, elle élimine l'anion superoxyde par dismutation selon la réaction suivante :



Cette réaction a pour conséquences la réduction de la disponibilité $\text{O}_2^{\circ-}$, limitation de la cascade radicalaire (OH° , ONOO^-) et le **H₂O₂** est pris en charge par des enzymes de relai (**Bensakhria, 2018**).

- **Catalase** : Enzyme héminique ubiquitaire située à l'intérieur des globules rouges, elle élimine le **H₂O₂** par dismutation qui se fait en deux étapes :



(**Bensakhria, 2018**).

- **Système Glutathion peroxydase / Glutathion réductase (GPx/GR)** : séléno-protéine ubiquitaire (7 isoformes) élimine **70%** des peroxydes organique et **94%** de **H₂O₂** par une réaction de réduction suivante :



- **Thioridoxine peroxydases (Trx)** : séléno-enzymes **NADPH** dépendantes qui élimine le **H₂O₂**, **ROOH**, **ONOO⁻** par la réaction de réduction suivante :



Rappels Bibliographiques

Chapitre III : Hème oxygénase

1.3 L'hème oxygénase

Elle catalyse la première étape de la dégradation oxydative de l'hème libre pour produire des quantités équivalentes de monoxyde de carbone (CO), de fer ferreux (Fe²⁺) et de la biliverdine (BV).



La BV est ensuite convertie en bilirubine (BR) par la BV réductase (figure6).

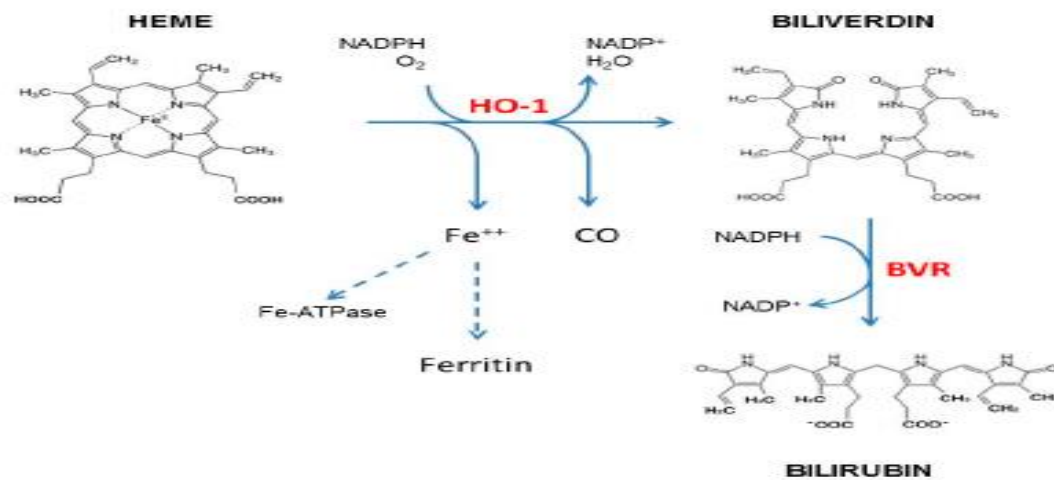


Figure 6 : Voie de dégradation de l'hème (Nitti et al., 2017).

Il existe trois isoformes de l'hème oxygénase :

L'hème oxygénase-1 c'est la forme inductible, connue pour être ancrée à la membrane du réticulum endoplasmique lisse (SER) et existe sous forme d'homodimère dans la plupart des organismes (Ryter et al., 2006).

Cependant, il existe des études qui suggèrent l'existence de **HO-1** en tant que protéine libre dans le cytoplasme, sa localisation dans le noyau, la membrane plasmique et même dans les mitochondries (figure7). Au niveau de l'organisme **HO-1** est plus abondante dans la rate, car c'est l'emplacement de la dégradation la plus élevée de l'hème, dans d'autres tissus qui dégradent les globules rouges sénescents, y compris les cellules réticuloendothéliales spécialisées du foie et de la moelle osseuse (Ryter et al., 2006).

En revanche, **l'hème oxygénase-2** est constitutive, elle est exprimée dans les conditions normales d'homéostasie, et **l'hème oxygénase-3** est catalytiquement inactive (Ryter et al., 2006).

Rappels Bibliographiques

La plus haute expression de **HO-2**, se produit dans les testicules, mais la protéine est également abondamment exprimée dans les autres tissus, y compris le cerveau, le système nerveux central, le foie, le rein et l'intestin (Ryter et al., 2006).

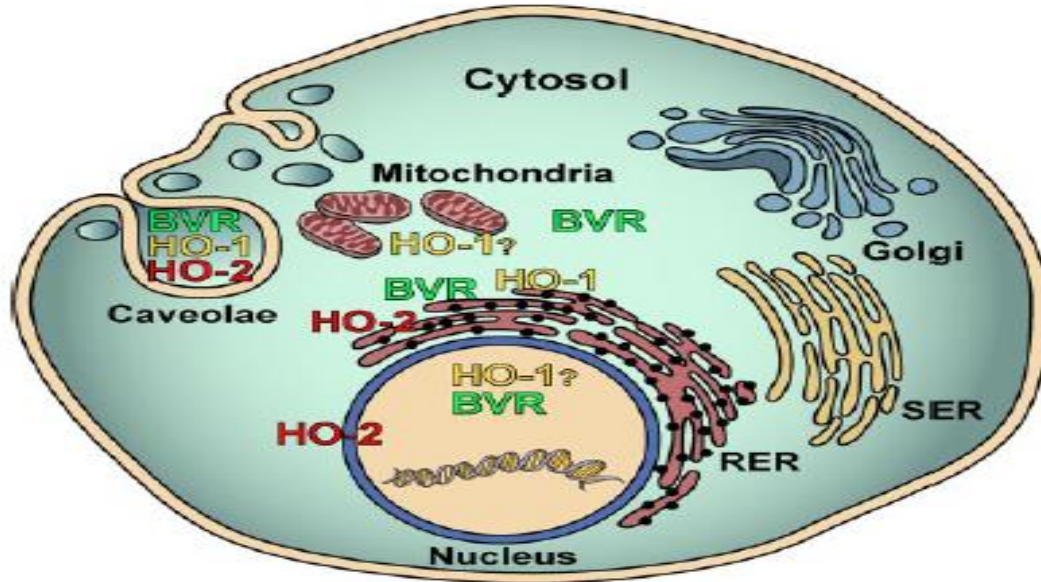


Figure 7 : Localisation subcellulaire des enzymes métaboliques de l'hème (Ryter et al., 2006).

Les trois isoformes sont transcrites par des gènes différents, situés sur des chromosomes distincts. **HMOX1** et **HMOX2** partagent 43% d'identité de séquence d'acides aminés, tandis que **HMOX1** et **HMOX3** partagent moins de 50% d'identité de séquence. Cependant, toutes les isoformes sont différentes dans leur structure d'acides aminés (Ryter et al., 2006).

HMOX1 est une protéine longue de 288 AA avec une masse moléculaire de 32 kDa. La structure de **HMOX1** est un domaine compact unique composé principalement d'hélices α avec un noyau conservé (Schuller et al., 1999). À l'intérieur du noyau, deux hélices, étiquetées proximale et distale, prennent en sandwich l'hème et créant une « poche d'hème » qui est le site actif de **HMOX1**.

La queue hydrophobe C-terminale de **HMOX1** s'étend à travers la membrane microsomale, ancrant l'enzyme sur la membrane sER (Yoshida & Sato, 1989).

HO-1 est une protéine de 32kDa identifiée en 1990 comme protéine de stress impliquée dans les réponses antioxydantes et anti-inflammatoires. Son activité cytoprotectrice est exercée

Rappels Bibliographiques

par ses métabolites, la libération de fer libre favorise la synthèse de la chaîne lourde de la ferritine, qui est une protéine chélatante de fer et l'activateur de transporteurs membranaires **Fe-ATPase**. Ce dernier permet des efflux de fer cytosolique, diminuant ainsi le contenu de **Fe²⁺** intracellulaire, ce qui empêche la génération de **ROS** à travers la réaction de Fenton (**figure8**) (**Nitti et al., 2017**).

De plus, le monoxyde de carbone exerce des effets anti-apoptotiques et anti-inflammatoires à travers l'induction de la **guanylyl cyclase soluble (sGC)**, l'élévation de la **cGMP**, et la modulation de la voie **MAPK**. En conséquence, le **CO** dérivé de **HO-1** stimule la formation des vaisseaux sanguins, induit la synthèse de la **VEGF** et favorise la prolifération des cellules endothéliales impliquées de manière cruciale dans la guérison des plaies (**Nitti et al., 2017**).

Par ailleurs, la bilirubine exerce une forte activité anti-antioxydante, anti-apoptotique et anti-inflammatoire, elle est capable de piéger le radical hydroxyle, l'oxygène singulet, les anions superoxydes, et empêche la peroxydation des protéines et des lipides (**Nitti et al., 2017**).

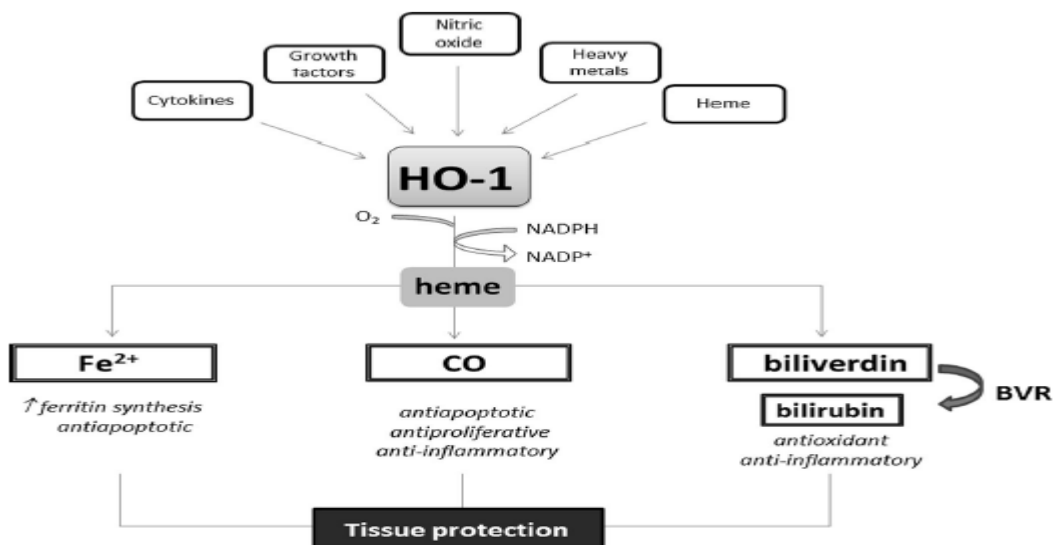


Figure 8 : Voie de l'hème oxygénase-1 (Loboda et al., 2016).

1.3.1 Régulation transcriptionnelle de HO-1

De nombreux stimuli cellulaires, tels que les cytokines pro-inflammatoires, les métaux lourds, l'oxyde nitrique, l'hypoxie, l'hyperoxie, le stress physique, le choc thermique, le rayonnement **UV**, les espèces réactives de l'oxygène (**ROS**) et d'autres oxydants peuvent induire une expression de **HO-1**, la molécule d'hème sert de substrat et cofacteur catalytique dans sa propre dégradation (**Ryter et al., 2006**).

Rappels Bibliographiques

D'autre part, de nombreux inducteurs de **HO-1** activent des cascades de signalisation dépendantes de la phosphorylation des protéines et leurs facteurs de transcription qui régulent le gène **HO-1**.

Parmi ces molécules de signalisation intracellulaire, les protéines kinases activées par les mitogènes (**MAPK**) ont un rôle majeur dans l'activation de **HO-1**. En effet, l'activation d'une ou plusieurs de ces **MAPK**, notamment les **tyrosines kinase**, la **phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K)** et les **protéines Kinases A, G et C** par des stimuli externes, déclenche l'expression du gène **HO-1** (Ryter et al., 2006).

Néanmoins, **HO-1** peut agir indépendamment de sa fonction enzymatique. En effet, il a été montré que **HO-1** peut se déplacer dans le noyau et réguler la transcription des gènes, favorisant spécifiquement la croissance des tumeurs (Nitti et al., 2017).

Dans la région promotrice de **HO-1**, en fait, plusieurs sites de liaison sont présents pour différents facteurs de transcription, qui peuvent être activés dans des conditions de stress oxydatif comme **AP-1, HIF-1, NFκB et Nrf2**. Ce dernier est considéré comme un régulateur clé de la transcription de **HO-1** (Nitti et al., 2017).

Le facteur nucléaire érythroïde 2 (**Nrf2**) joue un rôle central dans le maintien de la défense cellulaire contre le stress oxydatif. Il appartient à la famille **Cap 'n' collar (CnC)-bZIP** (basic leucine zipper) des facteurs de transcription avec **Nrf1 et Nrf3** ainsi que les répresseurs transcriptionnels **Bach1 et Bach2**. La protéine **Nrf2** a une structure à 7 domaines ce qui explique sa liaison aux répresseurs et à l'ADN (Nitti et al., 2017).

Le facteur nucléaire 2 lié à l'érythroïde 2 (**Nrf2**), reconnaît et se lie aux motifs de l'élément de réponse antioxydant (**ARE**) ou l'élément de réponse électrophile (**EpRE**) et représente le principal régulateur transcriptionnel du gène **Hmox1** (Ryter & Choi, 2016).

Le **Nrf2** est ancré dans le cytoplasme par l'**ECH** de type **Kelch (keap1)**, qui inhibe son activité transcriptionnelle, **keap1** facilite l'ubiquitination ciblée de **Nrf2** par le complexe **d'ubiquitine ligase E3** dépendante de **cullin3 (cul3)**, qui marque le **Nrf2** pour la dégradation protéosomale. Dans des conditions basales, **keap1** forme un complexe avec le **Nrf2** et empêche sa translocation nucléaire (Ryter & Choi, 2016).

Un mécanisme responsable de l'activation de **Nrf2** implique une modification oxydative réversible des résidus de cystéine de **keap1** par les **ROS** ou les électrophiles, ce qui perturbe l'interaction **keap1** avec le complexe **ubiquitin ligase cul3** et **Nrf2** (Ryter & Choi, 2016).

Rappels Bibliographiques

La protéine **p62** adaptatrice de cargo d'autophagie sélective, interagit avec **keap1** au site de liaison **Nrf2**, favorisant ainsi le déplacement de **keap1** de **Nrf2** pour améliorer l'activité transcriptionnelle de **Nrf2**. **Keap1** subi également une dégradation constitutive par la voie de l'autophagie dépendante des lysosomes (**figure9**) (**Ryter & Choi, 2016**).

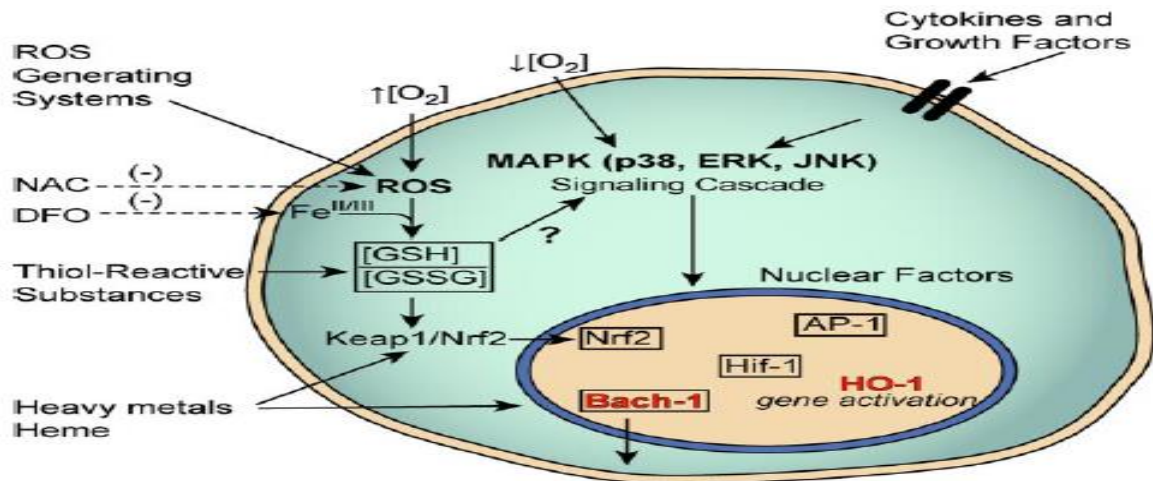


Figure 9: Voies de (figure7) signalisation menant à l'activation de HO-1 (Ryter et al., 2006).

Lorsque les cellules sont exposées à des stimuli inducteurs, tels que l'hème, les électrophiles et les oxydants, **Nrf2** se dissocie de **keap1**, puis se déplace vers le noyau où son activité de facteur de transcription nécessite la formation d'hétérodimères stables avec de petites protéines **Maf** (**MafF, MafG**). Le complexe résultant se lie à l'élément de réponse antioxydante (**ARE**) ou l'élément de réponse électrophiles (**EpRE**) transcrivant ainsi, l'expression des gènes codant pour des enzymes antioxydants et d'autres protéines (**Ryter et al., 2006**).

Bach1 représente un autre régulateur de la transcription des gènes cibles de **Nrf2** et de **HO-1** en particulier. Alors que **keap1** séquestre **Nrf2** dans le cytoplasme, **Nrf2** est réprimé par le facteur de transcription basique à glissière leucine1 **Bach1** (homologie **BTB** et **CNC1**) dans le noyau. En dehors des conditions de stress, il se dimérise avec les protéines **Maf** et entre en compétition avec **Nrf2** pour la liaison aux éléments de réponses antioxydants (**ARE**), agissant comme répresseur transcriptionnel des gènes **ARE-dépendants**. Le complexe hémique avec **Bach1** altère son activité de liaison à l'ADN et favorise son exportation nucléaire (**Ryter & Choi, 2016**). Dans ce contexte, **Bach1** agit comme un antagoniste de **Nrf2** (**figure10**) (**Na & Surh, 2014**).

Rappels Bibliographiques

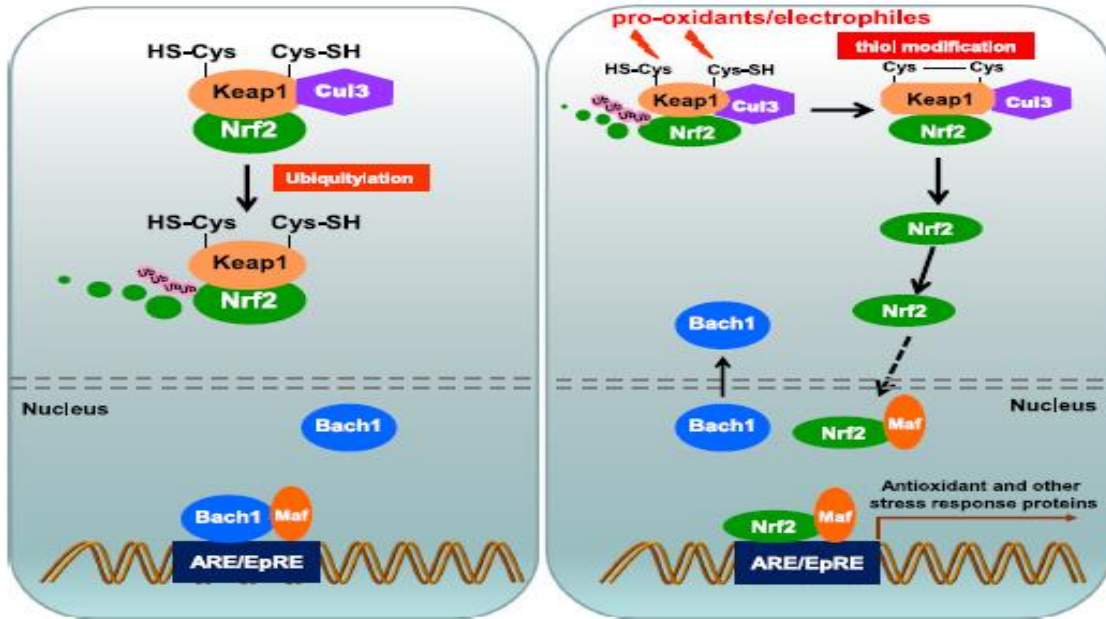


Figure 10: Nrf2 dans les cellules stressées vs non stressées (Na & Surh, 2014).

Dans des conditions de stress oxydatifs ou lorsque la concentration de groupes hèmes augmentent, un changement de conformation de **Bach1** favorise son déplacement des séquences **ARE** et sa dégradation permet au **Nrf2** de se lier. Ainsi, dans des conditions physiologiques, l'activation de l'axe **Nrf2/HO-1** est impliquée dans le maintien de l'homéostasie cellulaire et joue un rôle central dans la réponse adaptative au stress cellulaire, représentant un point important dans la cytoprotection, la survie cellulaire, et dans la prévention des cancérogènes. En revanche, dans les cellules cancéreuses, une activation prolongée de **Nrf3** et **HO-1** est ambiguë et délétère (Nitti et al., 2017).

La phosphorylation de la **tyrosine 486 de Bach1** s'est avérée essentielle pour l'exportation du noyau et la dégradation ultérieure de **Bach1** dans le cytoplasme. Cela permet à **Nrf2** d'occuper **ARE** et induit la transcription des gènes cibles. Après l'achèvement de l'activation du **Nrf2** en réponse à un stress, les cellules entreprennent de *nov*o la synthèse de **Bach1**, qui restaure ses niveaux nucléaires et limite l'accès de **Nrf2** à l'**ARE**. Une telle interaction compétitive entre **Nrf2** et **Bach1** permet aux cellules de répondre efficacement aux facteurs de stress, en activant et en mettant fin à la signalisation **Nrf2** (Na & Surh, 2014).

Dans les cellules cancéreuses, d'autres mécanismes d'amplification de la signalisation **Nrf2** ont été décrits. Modifications génétiques de **Nrf2/keap1**, principalement des mutations gain de fonction de **Nrf2** et des mutations de perte de fonction de **keap1**, conduisent à une activation constitutive de **Nrf2**. De plus, les altérations épigénétiques de **keap1**, telles que les

Rappels Bibliographiques

hyperméthylations **keap1/cul3**, sont responsables de l'accumulation et l'activation aberrante de **Nrf2** dans le cancer de poumon, prostate, tête, cou, colorectal et ovarien (Nitti et al., 2017).

En outre, la liaison **Nrf2-keap1** peut être modifiée par l'interaction avec d'autres protéines qui augmentent la stabilisation de **Nrf2**. Par exemple, **P21** ainsi que **DJ-1** sont capables de se lier à **keap1**, permettant à **Nrf2** de se déplacer dans le noyau. En effet, dans le cancer **DJ-1** est souvent régulé à la hausse et augmente l'expression des enzymes détoxifiantes, favorisant ainsi la survie (Nitti et al., 2017).

Par ailleurs, d'autres mécanismes peuvent induire l'activation de **Nrf2**, en raison de son interaction avec la protéine **sequestosome-1 (p62/SQSTM1)**, **keap1** est séquestré dans les autophagosomes. En conséquence, l'ubiquitination de **Nrf2** diminue conduisant ainsi son activation prolongée en réponse au stress oxydatif. Il a été démontré que, d'une manière indépendante de **keap1**, **Transducin Repeat Containing E3 Ubiquitin Protein Ligase (TrCP)** et **Glycogen Synthase Kinase3 (GSK-3)** peuvent induire l'ubiquitination et la dégradation proteosomale de **Nrf2** (figure11) (Nitti et al., 2017).

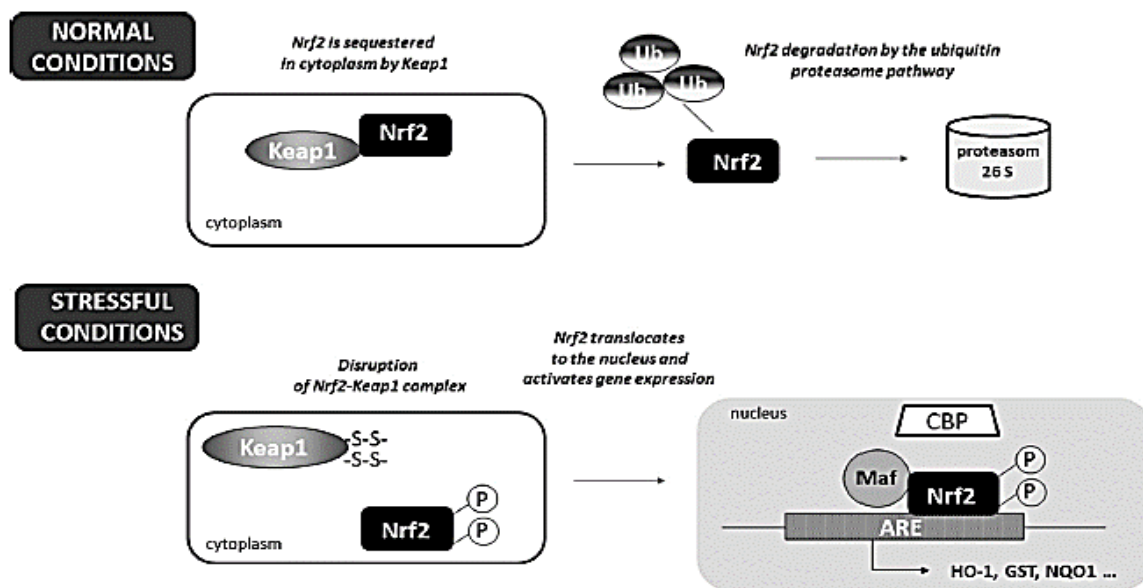


Figure 11 : Représentation schématique de la voie Nrf2-Keap1 (Loboda et al., 2016).

1.3.2 Polymorphismes du promoteur HMOX1

Des polymorphismes de longueur de dinucléotide de microsatellites **(GT)_n** ont été identifiés dans les régions régulatrices du gène **HMOX1** humain (situé sur le chromosome **22q13.1**), ce qui peut entraîner une altération de la régulation transcriptionnelle et la diminution de l'expression de **HO-1** chez les individus porteurs de l'allèle long (L) **[(GT)_n≥30]** de ce polymorphisme (Ryter & Choi, 2016).

Rappels Bibliographiques

Un certain nombre d'études ont décrit une corrélation positive entre l'incidence de **HMOX1** polymorphismes prometteurs avec gravité de la maladie, mortalité ou risque dans divers pathologies humaines (athérosclérose, maladie cardiovasculaires, rénales chroniques...) (**Ryter & Choi, 2016**).

Les polymorphismes des microsatellites peuvent affecter l'épissage alternatif dans la **région 5'** non traduite de **HMOX1**, fournissant ainsi, un mécanisme de régulation supplémentaire pour la traduction de **HMOX1** (**Ryter & Choi, 2016**).

D'autres polymorphismes de petits nucléotides (**SNP**) dans **HMOX1** ont été identifiés, y compris **rs2071746T/A**, qui a été associé à un risque accru de maladie de Parkinson et à une protection contre les maladies cardiovasculaires (**Ryter & Choi, 2016**).

1.3.3 Régulation de HO-1 par microARN

Les microARN (**miR**) sont de petits ARN non codants qui fonctionnent dans la régulation post-transcriptionnelle de l'expression des gènes. Des études émergentes, suggèrent l'implication critique des **miR** dans la régulation de l'expression du gène **HO-1**, soit directement en diminuant la stabilité et/ou la traduction de l'ARN messager ou indirectement, en modulant l'expression de facteurs régulateurs en amont (exemple : **Nrf2/keap1, Bach1...**) (**Ryter & Choi, 2016**).

Plusieurs **miR** identifiés dans la régulation traductionnelle directe de **HO-1** y compris : **miR-24, miR-200c, miR-204/miR-211, miR-155, miR-378, miR-377 et miR-217** (**Ryter & Choi, 2016**).

Des mécanismes indirects supplémentaires pour la régulation de **miR** dépendantes de **HO-1** ont été proposé, par exemple : plusieurs **miR** (exemple : **miR-155**) peuvent activer potentiellement l'expression de **HO-1** par la régulation négative du répresseur transcriptionnel **Bach1** (**Ryter & Choi, 2016**).

De plus, **miR-101** a favorisé l'expression de **HO-1** en ciblant la **cullin3, E3 ubiquitin ligase**, entraînant une stabilisation du **Nrf2**, tandis que **miR-200A** a favorisé l'activation de **Nrf2** en ciblant son ancre cytoplasmique **keap1** (**Ryter & Choi, 2016**).

L'expression de **HO-1** dans les cellules tumorales était associée à une régulation négative de **miR-378** (**Ryter & Choi, 2016**).

Résultats

&

Discussion

Résultats & Discussion

2 Résultats et discussion

2.1 Transition épithelio-mésenchymateuse (EMT)

La transition épithélio-mésenchymateuse (**EMT**) est un processus par lequel les cellules cancéreuses perdent leurs propriétés épithéliales pour acquérir un phénotype mésenchymateux et devenir mobiles et invasives, ceci est lié à la métastase, et l'expression de la molécule d'adhésion épithélio-intercellulaire (**Zhu et al., 2017**).

La E-cadhérine est diminuée et les marqueurs des cellules mésenchymateuses, tels que l'actine des muscles lisses (**α -SMA**), la N-cadhérine et la vimentine, sont régulés à la hausse pendant la transition épithélio-mésenchymateuse. Cette dernière est également liée à l'induction de cellules souches cancéreuses et à la résistance aux médicaments, ce qui suggère qu'elle pourrait sous-tendre de nombreux processus biologiques de développement du cancer (**Zhu et al., 2017**).

De plus, Le facteur de croissance transformant- **β** (**TGF- β**) est sécrété par de nombreux types de cellules et stimule directement la production de la matrice extracellulaire et du microenvironnement par les cellules normales et cancéreuses. Au fur et à mesure que les tumeurs progressent, le **TGF- β** induit une invasion des cellules néoplasiques et des métastases en favorisant l'**EMT** dans de nombreux types de cellules cancéreuses (**Zhu et al., 2017**).

L'étude de **Zhu et al., (2017)** a suggéré que les **ROS** jouent un rôle important dans l'**EMT** induite par le **TGF- β** . Ainsi, une augmentation significative des **ROS** intracellulaires est constatée lors de la stimulation du **TGF- β** . En effet, la libération des **ROS** dépendantes du **TGF- β** est responsable de la phosphorylation de **Smad2**, **p38 MAPK** et de la kinase régulée par le signal extracellulaire 1/2 (**ERK1/2**), ce qui explique la régulation positive de **α -SMA**, de la fibronectine et la répression de la E-Cadhérine.

Le **TGF- β** est un inducteur primaire d'**EMT** et joue un double rôle dans le cancer. Il inhibe la prolifération et induit l'apoptose des cellules cancéreuses aux stades précoces de la tumorigenèse. Cependant, cette protéine peut également favoriser l'invasion et la métastase au cours du développement tumoral ultérieur. Le **TGF- β** induit **EMT** en activant les répresseurs **E-cadhérine** et **Smad2/3**. En outre, il peut induire une **EMT** via des voies indépendantes de **Smad**, telles que les voies phosphatidylinositol 3-kinase (**PI3K**), **Akt**, la protéine kinase activée par les mitogènes (**MAPK**) et les voies **GTPase** de la famille **Rho** (**Zhu et al., 2017**).

Résultats & Discussion

2.1.1 Transition épithélio-mésenchymateuse et HMOX-1

Les espèces réactives de l'oxygène **ROS** ont un rôle important dans la transition épithéliale Mésenchymateuse (**EMT**) qui est un mécanisme clé dans le cancer du sein métastatique (**Zhu et al., 2017**).

Même si l'**HMOX-1** puisse réduire le stress oxydatif mais son effet sur le processus de l'**EMT** dans les cellules cancéreuses du sein reste toujours inconnu. C'est dans ce but qu'une étude de **Zhu et al., (2017)** a été réalisée sur une lignée cellulaire de cancer du sein **MCF-7** traitées avec de l'hème inducteur de l'**HMOX-1** et le facteur de croissance **TGF- β** . Le résultat de cette étude a démontré que l'hème favoriserait l'expression de l'**HMOX-1** et inhiberait l'invasion, la migration et la génération des **ROS** dans le modèle **MCF-7**.

Cette étude s'est basée sur plusieurs techniques comme : la **RT-q PCR quantitative**, le **Western blot** et les **tests de cicatrisation et d'invasion cellulaire**.

➤ L'hémine induit l'expression de HMOX-1 dans la lignée MCF-7 de cancer du sein

Pour évaluer l'effet de l'**HMOX-1** sur l'**EMT** induite par **TGF- β** , les cellules **MCF-7** ont été traitées avec l'hémine et la détection de l'expression de **HMOX-1** s'est faite par **western blot** et par **RT- q PCR** (figure 12A et B). Les résultats obtenus, ont confirmé que l'ARNSi**HMOX-1** inhiberait l'expression de l'**HMOX-1** induite par l'hème (figure 12C et D).

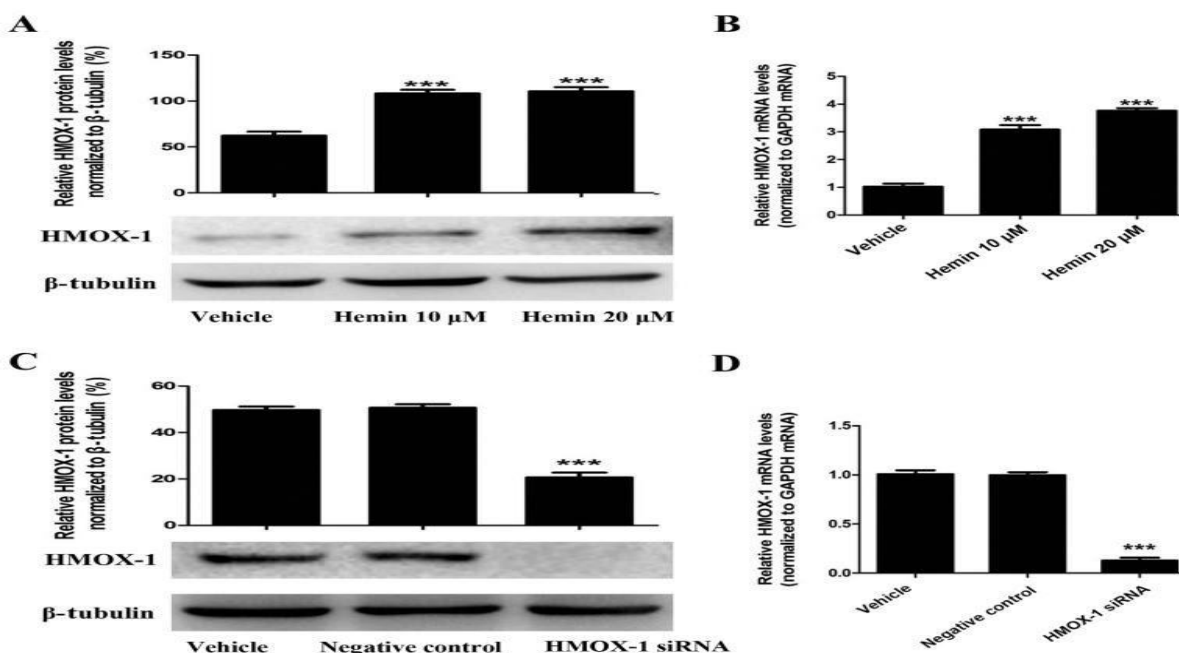


Figure 12 : Expression de HMOX-1 dans la lignée cellulaire de cancer du sein MCF-7 (Zhu et al., 2017).

Résultats & Discussion

Dans la lignée cellulaire **MCF-7**, l'hémine a induit l'expression de l'**HMOX-1**, le *western blot* a démontré une expression élevée de protéines dans les cellules traitées par l'hémine comparées aux cellules **témoins** (A). Chez ces mêmes cellules traitées, la *qRT-PCR*, a révélé l'expression de l'ARNm de l'**HMOX-1** dans les cellules **MCF-7** (B).

➤ L'hémine inhibe la migration et l'invasion des cellules **MCF-7** traitées au **TGF-β**

Pour étudier l'effet de l'**HMOX-1** sur la migration et l'invasion des cellules **MCF-7** traitées par **TGF-β1**, des tests d'invasion cellulaire et de cicatrisation ont été effectués. Il s'avère que l'hémine a inhibé la migration des cellules **MCF-7** (**figure 13A et B**) ainsi que leur caractère invasif (**figure 13C et D**).

Après traitement des cellules **MCF-7** à l'hémine pendant **72h** puis transfection par le **siARN HMOX-1**, la migration et l'invasion de ces cellules a été induite avec du **TGF-β1**. Il s'est avéré que le **siARN HMOX-1** ait favorisé la migration (**figure 13E et F**) et l'invasion (**figure 13G et H**), et il a atténué l'effet inhibiteur de l'hémine sur les cellules **MCF-7**.

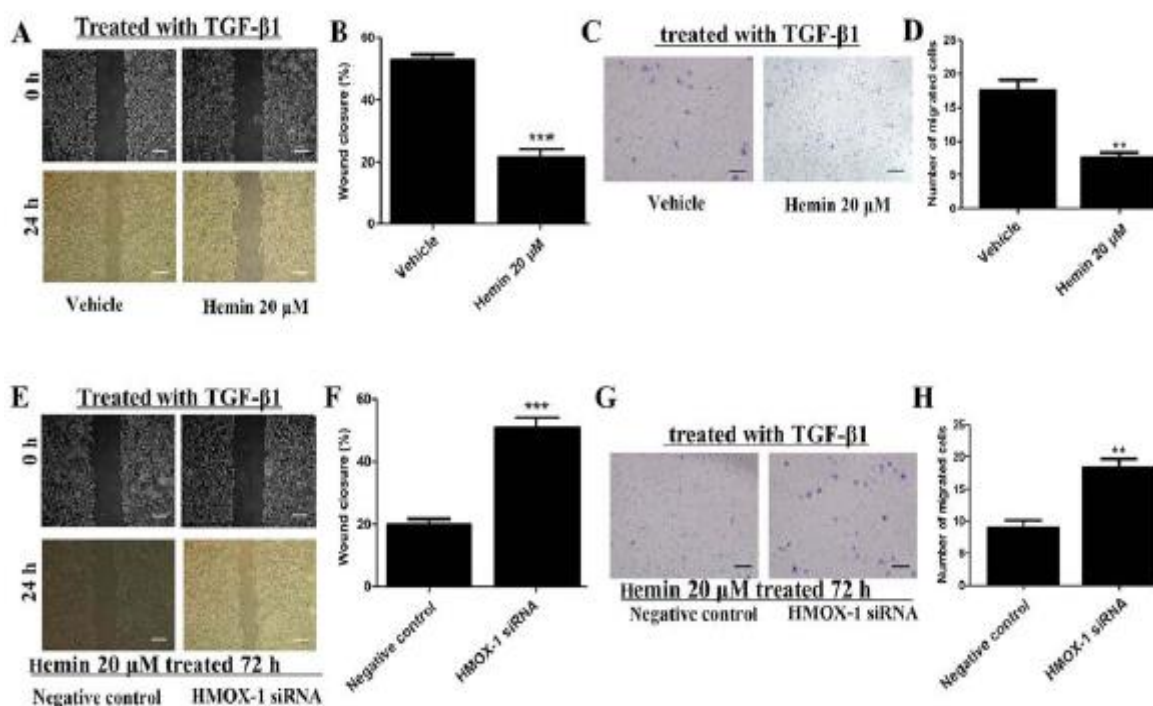


Figure 13 : Effet de l'hémine sur la migration et l'invasion des cellules **MCF-7 traitées au **TGF-β** (Zhu et al., 2017).**

D'après les résultats illustrés dans la **figure 13** (A et B), l'hémine diminue la migration des cellules **MCF-7** soumises au test de cicatrisation et traitées au **TGF-β**. Par ailleurs, le test d'invasion a montré que l'hémine réduit la capacité invasive des cellules **MCF-7** traitées par **TGF-β1** (C et D).

Résultats & Discussion

D'autre part, l'essai de cicatrisation a révélé que le **siARN HMOX-1** favorise la migration des cellules **MCF-7** induites par **TGF- β 1** et exposées à l'hémine (**E et F**). En outre, l'essai d'invasion cellulaire a confirmé que le **siARN HMOX-1** favorise l'invasion des cellules **MCF-7** induites par le **TGF- β 1** (**G et H**).

➤ **L'hémine inhibe l'EMT induite par le TGF- β 1 dans les cellules MCF-7**

Les changements morphologiques caractéristiques des cellules subissant une **EMT** s'accompagnent d'un changement dans l'expression des gènes d'un répertoire épithélial à un répertoire mésenchymateux. Et pour savoir si l'**HMOX-1** inhibe ce changement, l'expression aussi et la distribution cellulaire, des marqueurs **EMT** ont été sélectionnés et colorés par immunofluorescence et western Blot des cellules **MCF-7** traitées par le **TGF- β 1**, les cellules présentaient un taux diminué de la **E-cadhérine** et un taux plus élevé du marqueur mésenchymateux tel que la **vimentine** (**figure 14B et D**) (**Zhu et al., 2017**). En traitant séquentiellement ces cellules avec de l'hémine, les changements ont été inversés. Ces résultats indiquent que l'**HMOX-1** inhiberait la progression de l'**EMT** des cellules **MCF-7**.

Il a été démontré par *Western Blot* et *immunofluorescence* que l'hémine inhibait l'**EMT** induite par le **TGF- β 1** des cellules **MCF-7** et ce, par une régulation positive de la **E-cadhérine** et une régulation négative de la **vimentine**. Par contre, une augmentation de la **vimentine** et une diminution de la **E-cadhérine** était observée dans les cellules traitées par **SiARN HMOX-1** (**figure 14F et H**). Ces résultats affirment que le **siARN HMOX-1** atténuait l'effet inhibiteur de l'hémine sur l'**EMT** induite par le **TGF- β 1** dans les cellules **MCF-7**.

Résultats & Discussion

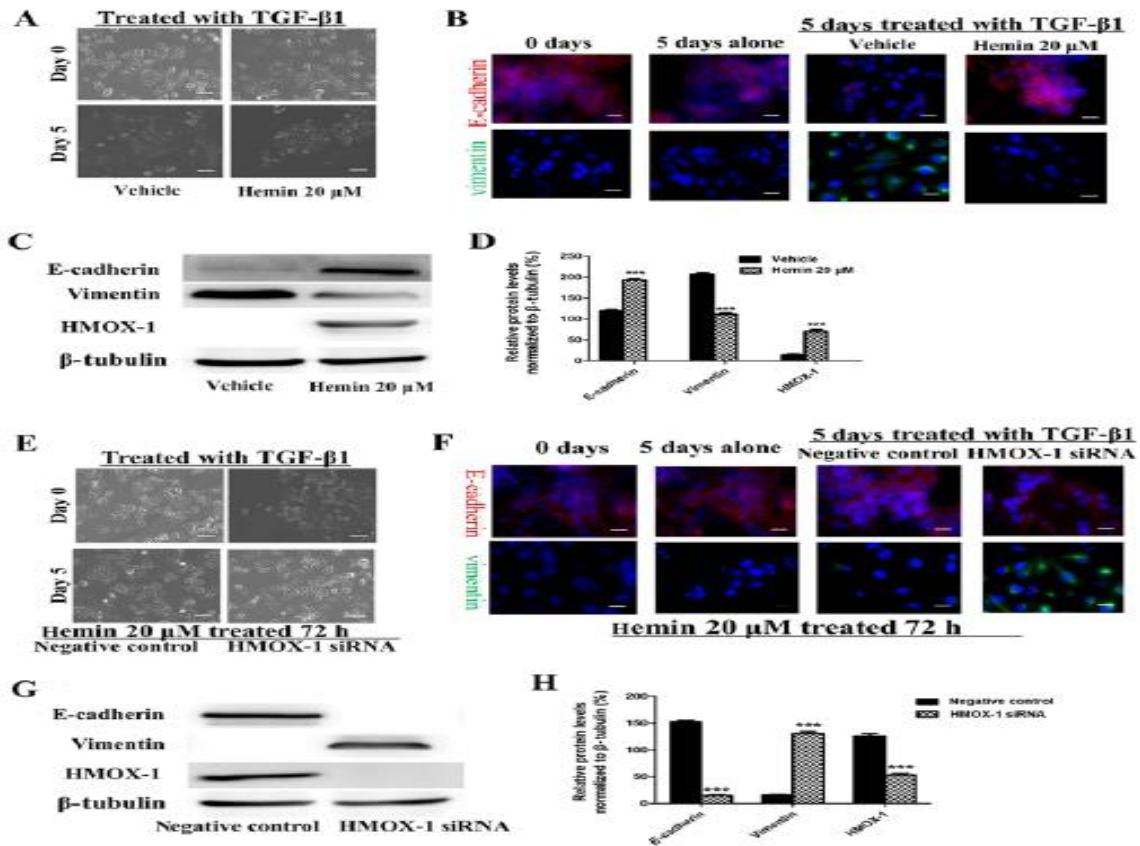


Figure 14 : Effet de l'hémine sur l'EMT des cellules MCF-7 induite par le TGF-β1 (Zhu et al., 2017).

L'immunofluorescence a permis de visualiser l'expression de la **E-cadhérine** (en rouge) et la **vimentine** (en vert) sur la photomicrographie (**B**). Par ailleurs, la photomicrographie (**E**) représente la morphologie cellulaire, tandis que la coloration par immunofluorescence illustrée par la photomicrographie (**F**) montre la coloration nucléaire. Les résultats révèlent l'expression de la **vimentine** (en vert), la **E-cadhérine** (en rouge) et le **DAPI** (bleu). Enfin, le **Western Blot** permis la mise en évidence de l'expression des protéines **E-cadhérine** et la **vimentine** (**G** et **H**).

➤ **L'hémine réduit la génération des ROS et induit l'expression de la E-cadhérine dans les cellules MCF-7**

Pour déterminer l'effet inhibiteur de l'**HMOX-1** sur les **ROS** sensibles au **TGF-β1**, les cellules ont été traitées avec le **TGF-β1** et à l'aide d'un spectromètre à fluorescence et du **DCFDA** la génération des **ROS** a été mesurée. Les cellules traitées à l'hémine avaient une production de **ROS** diminuée que les cellules témoins (**figure 15A**). Ce résultat a été confirmé en inhibant l'**HMOX-1** avec de le **siARN HMOX-1**, le groupe transfecté montre une

Résultats & Discussion

augmentation de production des **ROS** médiés par **TGF- β 1** par rapport au groupe témoin négatif (**figure 15B**). Il a été observé que l'hémine induisait l'expression de la protéine **E-cadhérine** dans les cellules **MCF-7** normales (**figure 15C et D**).

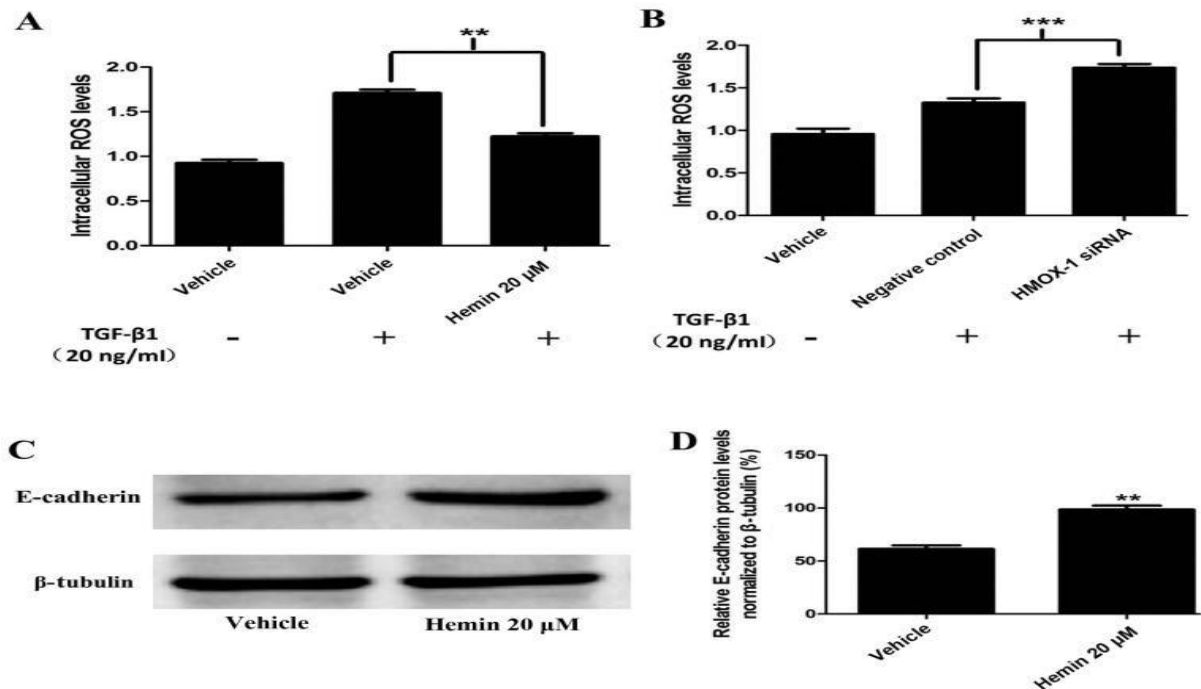


Figure 15 : Effet de l'hémine sur le taux ROS et l'expression de la E-cadhérine dans les cellules MCF- 7 (Zhu et al., 2017).

Les résultats obtenus dans la **figure 15 (A)**, montre que l'**HMOX-1** réduit la génération des **ROS** et induit l'expression de **E-cadhérine** dans les cellules **MCF-7**.

Le traitement des cellules **MCF-7** avec de l'hémine pendant **72h**, puis transfection avec le **siARNHMOX-1** et incubation avec ou sans **TGF- β** pendant **24h**, est représenté par la **figure 15B**.

Le **Western blot** montre que les cellules **MCF-7** traitées avec l'hémine, exprimaient un taux de protéines **E-cadhérine** élevé comparativement à celui des cellules témoins.

L'hème oxygénase est une enzyme microsomale et une protéine antioxydante qui joue un rôle important dans le système de défense cellulaire à l'encontre des conditions de stress oxydatif, elle peut réduire la génération des **ROS**, inhiber la migration des cellules cancéreuses et diminuer le taux d'apoptose (**Jozkowicz et al., 2007**). Ces caractéristiques sont corroborées par l'étude de **Zhu et al., (2017)**, qui ont mis en exergue le rôle de **HMOX-1** dans l'inhibition de la production des **ROS** dans la lignée cellulaire **MCF-7**.

Résultats & Discussion

L'étude de **Krstic et al., (2015)** suggère que les **ROS** ont un rôle très important dans l'EMT induite par le **TFG- β** , qui lors de sa stimulation, une augmentation significative des **ROS** est constatée (**figure 16**). De plus, la libération de ces **ROS** est responsable de la phosphorylation de plusieurs voies de signalisation notamment, la **SMAD2**, **p38 MAPK** et **ERK1/2**.

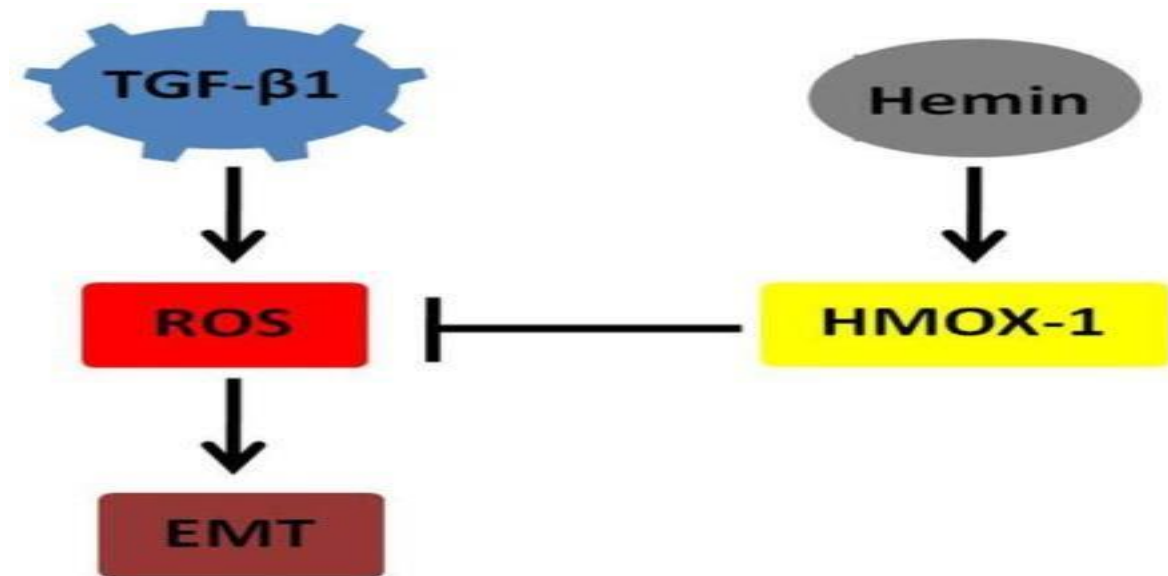


Figure 16 : Effet de l'hémine sur l'Hmox-1, l'EMT et la génération des ROS (Zhu et al., 2017)

L'implication de l'EMT dans l'invasion et la dissémination métastatique des carcinomes est désormais très documentée (**Thiery et Huang, 2013**).

Il a été démontré que dans les cellules cancéreuses du côlon, la protéine 78 régulée par le glucose (**GRP78**) favorise la capacité de migration et le caractère invasif par l'induction de l'expression de la **vimentine**, la réduction du niveau de **E-cadhérine** et l'activation de la voie de signal **Nrf2/HO-1** (**Chang et al., 2015**). De plus, dans les cellules cancéreuses de l'ovaire, il a été démontré que l'inhibition de l'autophagie favorise l'EMT par l'augmentation des **ROS** intracellulaires et de l'expression de **HO-1** et que le traitement par inhibition de **HO-1** altère la migration et l'invasion en inversant l'EMT (**Zhao et al., 2016**).

Résultats & Discussion

2.2 L'invasion et les métastases

Le gain d'un phénotype métastatique est une étape clé dans la progression du cancer. Il implique l'acquisition de caractéristiques encore plus agressives qui augmentent la capacité des cellules à se déplacer, à envahir les tissus environnants et à favoriser la croissance de nouveaux vaisseaux sanguins afin d'augmenter la masse tumorale et d'atteindre le sang (Nitti et al., 2017).

2.2.1 HO-1 dans l'invasion et les métastases

De nombreuses preuves soutiennent le rôle de **HO-1** dans la cytoprotection contre le stress oxydatif et d'autres agressions. Cependant, plusieurs études ont également démontré l'implication de la surexpression de **HO-1** dans la pathogenèse et la progression de plusieurs types de malignités (Figure 17).

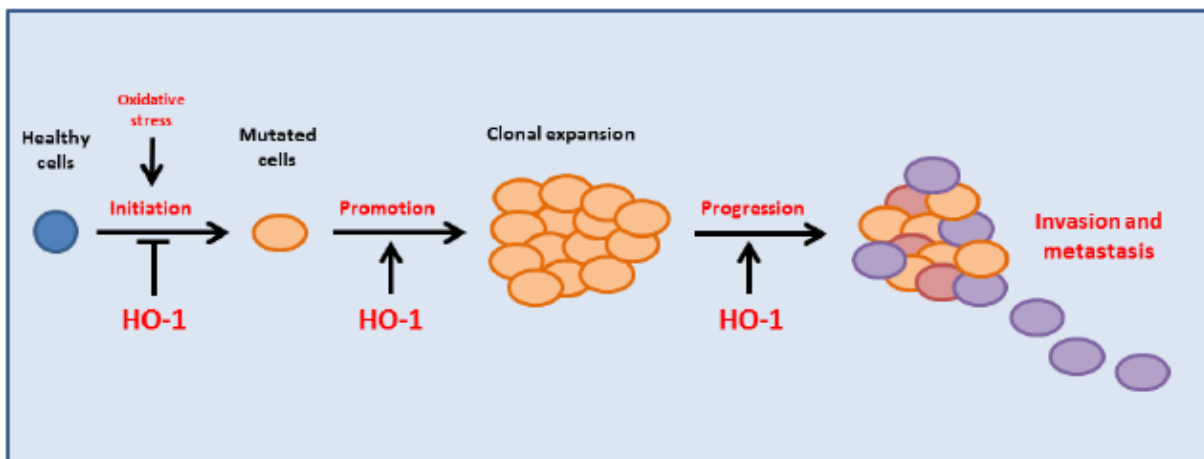


Figure 17 : Induction de HO-1 dans les cellules malignes favorisant la croissance tumorale, l'invasion et la métastase (Nitti et al., 2017).

L'un des produits terminaux de la voie de l'acide arachidonique médiée par la **COX-2** est la **15-désoxy- $\Delta^{12,14}$ prostaglandine J₂ (15d-PGJ₂)**. Celle-ci est connue comme un ligand endogène du récepteur gamma activé par les proliférateurs de peroxydases (**PPAR γ**) et exerce des effets bifonctionnels sur la prolifération cellulaire et d'autres processus physiologiques. Bien que la **15-PGJ₂** exerce principalement des fonctions cytoprotectrices dans les cellules normales, elle est également impliquée dans la tumorigenèse. En effet, la **15d-PGJ₂** potentialise la formation de tumeurs cutanées chez la souris, accélère la prolifération des cellules cancéreuses colorectales, sanguines et l'induction de l'angiogenèse (Kim et al., 2009).

La **PPAR γ** fait partie de la sous-famille des récepteurs nucléaires qui comprend les récepteurs des hormones thyroïdiennes, stéroïdiennes et rétinoïdes. La **PPAR γ** s'hétérodimérise avec des récepteurs rétinoïdes et ces dimères régulent divers gènes.

Résultats & Discussion

De nombreux travaux récents ont rapporté que les modulations de **PPAR γ** contrôlent la croissance des cancers humains, tels que le cancer du sein. L'un des premiers événements dans la métastase des cellules cancéreuses est l'expression de l'isoforme γ du **PPAR**, le contrôle de celui-ci est très prometteur pour la prévention du cancer du sein. Ainsi, les signaux qui modulent l'activité de **PPAR γ** peuvent jouer un rôle principal dans la régulation des métastases et des cibles majeurs pour le traitement du cancer du sein (**Jang et al., 2020**).

Par ailleurs, les métalloprotéinases matricielles (**MMP**) sont des protéases qui jouent un rôle important dans la dégradation de la matrice extracellulaire (**ECM**), le remodelage, la migration cellulaire, l'angiogenèse et la cicatrisation des plaies. En effet, la **MMP-1** est connue comme un marqueur prédictif de la progression du cancer mammaire où elle est souvent régulée à la hausse. Cette collagénase interstitielle est considérée comme conférant des propriétés invasives des cellules cancéreuses du sein, via des mécanismes impliquant la dégradation de la matrice et l'angiogenèse (**Kim et al., 2009**).

L'expression de la **MMP-1** humaine est détectée dans une variété de processus physiologiques, y compris le développement embryonnaire et la cicatrisation des plaies, ainsi que dans un certain nombre d'états pathologiques, tels que les ulcères cutanés chroniques et différents types de tumeurs malignes, notamment le cancer du sein avec une capacité élevée de métastases osseuses (**Kim et al., 2009**).

Une étude réalisée par **Jang et al., (2020)** a mis en exergue le rôle de **HO-1** dans l'action de la **15d-PGJ₂** sur l'invasion et l'expression des **MMP** des cellules cancéreuses mammaires. Ainsi, leurs résultats n'ont rapporté aucune modification dans la viabilité des cellules **MCF-7** une fois traité par la **15d-PGJ₂** à (**0.5 M**) pendant **24 h**.

La zymographie sur gélatine a montré que la **15d-PGJ₂** supprime la sécrétion de la **MMP-9**, induite par le **TPA** de manière dose-dépendante.

De même, le Western blot et la **PCR** en temps réel ont révélé que la **15d-PGJ₂** supprime l'expression de la **MMP-9** induite par le **TPA** aux niveaux de l'**ARNm** et des protéines.

Le dosage de la luciférase a montré que la **15d-PGJ₂**, supprime l'activité du promoteur **MMP-9** induit par le **TPA** dans les cellules **MCF-7**.

Ces chercheurs ont ensuite examiné l'effet dépendant entre l'inhibition de l'expression de **MMP-9** et la **PPAR γ** au niveau des cellules **MCF-7** traitées avec **15d-PGJ₂**. Leurs résultats ont démontré que l'inhibition de l'expression de **MMP-9** induite par le **TPA** est récupérée par

Résultats & Discussion

l'antagoniste **PPAR γ GW9662**. Ceci confirme que l'inhibition de l'expression de la **MMP-9** induite par le **TPA** par la **15d-PGJ₂** dépend de la **PPAR γ** .

Pour étudier les facteurs de signalisation et de transcription par lesquels la **15d-PGJ₂** inhibe l'expression de **MMP-9**. Ces auteurs ont utilisé la zymographie sur gélatine (**zymo**) et le Western blot pour évaluer les effets de la **15d-PGJ₂** sur l'activation induite par le **TPA** de **NF- κ B** et **AP-1**. En effet, l'expression de la **MMP-9** induite par le **TPA** a été bloqué par les inhibiteurs de **NF- κ B** (**Baie 11-7082**) et **AP-1** (**SR 11302**) de manière dose-dépendante. Le prétraitement avec la **15d-PGJ₂** a inhibé le transfert de **p50**, **p65** et **pc-Fos** vers le noyau par le **TPA**, et la phosphorylation d'**IKK α/β** et **I κ B α** .

De plus, le test **EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay)** a montré que le traitement avec la **15d-PGJ₂** supprime l'activité de liaison de **NF- κ B** et **AP-1** induite par le **TPA** à l'**ADN**. Ces résultats indiquent que la **15d-PGJ₂** inhibe l'expression de **MMP-9** induite par le **TPA** en régulant l'activation de **NF- κ B/AP-1** dans les cellules **MCF-7**.

Par ailleurs, ils ont étudié le rôle de **HO-1** dans l'inhibition de l'expression de **MMP-9** induite par le **TPA** par **15d-PGJ₂**. Ainsi, le Western blot et la **PCR** en temps réel, ont révélé que la **15d-PGJ₂** élève l'expression de **HO-1** aux niveaux des protéines et d'ARNm de façon dose-dépendante. Afin de vérifier l'implication de **HO-1** dans l'inhibition de l'expression de **MMP-9**, ils ont utilisé l'**ARNsi HO-1** pour supprimer l'expression de **HO-1**. Les effets inhibiteurs de la **15d-PGJ₂** sur l'expression de la **MMP-9** induite par le **TPA** étaient significativement diminués dans les cellules transfectées avec l'**ARNsi HO-1**.

D'autre part, le traitement avec la **15d-PGJ₂** à **5 M** a efficacement inhibé l'invasion des cellules **MCF-7** d'environ **65 %** par rapport aux cellules témoins non traitées. Pour vérifier l'implication de **HO-1** dans l'inhibition de l'invasion cellulaire, ils ont employé des **siRNA** afin d'inhiber l'expression du gène **HO-1**. Le traitement des cellules transfectées avec l'**ARNsi HO-1** avec la **15d-PGJ₂** a révélé une inhibition de **50 %**, ce qui indique que la **15d-PGJ₂** inhibe l'invasion des cellules **MCF-7** au moyen de l'activation de **HO-1**.

Ces résultats suggèrent que la **15d-PGJ₂** inhibe l'expression de la **MMP-9** induite par le **TPA** et l'invasion cellulaire au moyen de la voie **HO-1** dans les cellules **MCF-7**.

En outre, ces auteurs ont cherché l'implication de **HO-1** dans l'expression de **PPAR γ** induite par la **15d-PGJ₂**. Leurs résultats ont rapporté que les cellules traitées avec la **15d-**

Résultats & Discussion

PGJ₂ pendant **0,5, 1, 2, 3 et 4 h**, la **15d-PGJ₂** induisent une translocation nucléaire de la **PPAR γ** dépendante du temps et la translocation nucléaire de **Nrf2**.

Quant au prétraitement avec le **ZnPP** (un inhibiteur de **HO-1**), a inhibé l'augmentation de l'expression de la **PPAR γ** par la **15d-PGJ₂**. Pour confirmer plus clairement ce résultat, le Western blot des cellules transfectées par le **siRNA Nrf2** et le **siRNA HO-1** pendant **24h**, a démontré que l'augmentation de l'expression de **PPAR γ** par **15d-PGJ₂** est inhibée par **Nrf2** et **HO-1** knockdown. Lorsque les cellules ont été traitées avec la **15d-PGJ₂** pendant **3, 6, 12 et 24 h**, l'**ARNsi HO-1** a également inhibé les niveaux d'**ARNm** de **PPAR γ** induits par la **15d-PGJ₂**. L'inhibition de **Nrf2** et **HO-1** a également diminué les niveaux d'**ARNm** de la **PPAR γ** induits par la **15d-PGJ₂**.

D'après ces résultats, il ressort que la **15-Deoxy-D12, 14-prostaglandine J₂ (15d-PGJ₂)** est un ligand endogène de la **PPAR γ** , qui bloque l'expression de la **MMP-9** induite par le **TPA** et l'invasion cellulaire à travers un mécanisme de signalisation **PPAR γ** médié par **HO-1** dans les cellules **MCF-7**. Cela suggère que **HO-1** pourrait être un nouveau membre de la cascade de signalisation **PPAR γ** à cibler pour la prévention et le traitement du cancer du sein (**Jang et al., 2020**).

La région promotrice du gène de la métalloprotéinase matricielle-9 (**MMP-9**) possède des sites de liaison pour le facteur nucléaire kappa B (**NF- κ B**) et la protéine activatrice-1 (**AP-1**), et le **TPA** est connu pour induire la **MMP-9** en des moyens de signalisation **NF- κ B** et **AP-1**.

Cette étude a confirmé que la **MMP-9** induite par le **TPA** est inhibée par le traitement aux inhibiteurs de **NF- κ B** **BAY11-7082** et **AP-1** **SR11302**. De plus, la **15d-PGJ₂** inhibe les protéines de signal **NF- κ B** induites par le **TPA** et **pc-fos** (**AP-1** sous-unité) et les activités du promoteur **NF- κ B** et **AP-1** induites par le **TPA**. Ces résultats indiquent que **15d-PGJ₂** inhibe la **MMP-9** au moyen d'inhibition de signal **NF- κ B** / **AP-1** induite par le **TPA** (**Jang et al., 2020**).

A l'issue de cette étude, il ressort que :

- L'expression et l'invasion de **MMP-9** des cellules cancéreuses du sein ER-positives, peuvent être régulées à travers un mécanisme de signalisation **PPAR γ** induit par **HO-1**.
- **HO-1** pourrait être ciblée comme un nouveau membre de la cascade de signalisation **PPAR γ** , afin de prévenir et de traiter le cancer du sein. Cependant, des expériences

Résultats & Discussion

supplémentaires sont nécessaires pour confirmer la relation **HO-1** et **PPAR γ** au niveau du facteur de transcription et pour mieux délimiter sa base moléculaire (**Jang et al., 2020**).

Kim et al., (2009) ont prouvé que la **15d-PGJ₂** induit l'expression de **MMP-1** et **HO-1** dans les cellules cancéreuses mammaires humaines. A un stade précoce de l'angiogenèse ou de la métastase, l'activité protéolytique de la **MMP-1** dans les cellules endothéliales est essentielle. Ainsi, ils ont noté que le traitement par la **15d-PGJ₂** à (**3, 10 ou 30 M**) pendant **24 h**, a induit une induction de l'expression de **MMP-1** dans les cellules **MCF-7**.

Une étude cinétique a révélé que l'expression de la protéine **MMP-1** et de son transcrite d'ARN messager (**ARNm**) est également induite par la **15d-PGJ₂** à (**30M**).

Pour déterminer si l'induction de **MMP-1** dépend du statut **ER**, ils ont examiné l'effet de la **15d-PGJ₂** sur l'expression de **MMP-1** dans une lignée cellulaire **ER- α -négative**. Une régulation à la hausse de **MMP-1** a été observée après un traitement au **15d-PGJ₂** dans des cellules **MDA-MB-231** dépourvues d'**ER- α** . De plus, la **15d-PGJ₂** induit l'activité transcriptionnelle de **MMP-1** dans les cellules **MCF-7** et **MDA-MB-231**, transitoirement transfectées avec le gène rapporteur de la luciférase de **MMP-1**. Dans les mêmes conditions expérimentales, les cellules **MCF-7** et **MDA-MB 231** traitées avec la **15d-PGJ₂** présentent une expression élevée de **HO-1**. Ces chercheurs ont déterminé que l'expression de **HO-1** et **MMP-1** induite par la **15d-PGJ₂** n'est pas affectée par l'antagoniste **PPAR GW9662**. Ceci laisse conclure que la régulation à la hausse induite par la **15d-PGJ₂** pour la **MMP-1** et l'**HO-1** est indépendante d'**ER** et de **PPAR γ** . De plus, ils ont démontré que l'expression de **MMP-1** induite par la **15d-PGJ₂** est causalement liée à l'induction de **HO-1** ; celle-ci est associée à l'angiogenèse et à la résistance à l'apoptose dans certaines cellules cancéreuses. De même, ils ont évalué le rôle possible de **HO-1** dans la médiation de l'expression induite par la **15d-PGJ₂** de **MMP-1**. La régulation à la hausse de l'expression de **MMP-1** par la **15d-PGJ₂** est significativement réduite par l'inhibiteur pharmacologique de **HO-1 ZnPP** aux niveaux des protéines et d'ARNm. Aussi, le **ZnPP** a atténué le caractère invasif des cellules **MCF-7** traitées au **15d-PGJ₂** tel que déterminé par la capacité des cellules **MCF-7** à migrer. Pour vérifier davantage l'implication de **HO-1** dans l'induction de l'expression de **MMP-1**, ces auteurs ont utilisé des oligonucléotides **siRNA**, pour abattre l'expression du gène **HO-1**. L'expression induite par la **15d-PGJ₂** de **MMP-1**, **HO-1** et de leurs transcrits d'ARNm est inhibée après l'introduction de l'ARNsi **HO-1** dans les cellules **MCF-7**. L'expression induite par la **15d-PGJ₂** pour **MMP-1** et **HO-1** à la fois est abrogée dans les cellules **MCF-7** transfectées avec

Résultats & Discussion

l'oligonucléotide **Nrf2-siRNA**. Par ailleurs, le traitement des cellules **MCF-7** avec de l'hémine (un inducteur connu de **HO-1**) a induit une expression élevée de **MMP-1** et de **HO-1** en fonction du temps et de la dose.

Un autre inducteur de **HO-1** le **CoPP (Cobalt protoporphyrin)** a également exercé un effet similaire sur l'expression de **HO-1** et **MMP-1** dans les cellules **MCF-7**. Lorsque ces dernières sont transfectées avec le plasmide **HO-1**, l'expression de **HO-1** et de **MMP-1** est nettement améliorée au niveau de l'**ARNm** et des protéines. Ces résultats suggèrent que l'induction de **MMP-1** et le caractère invasif dans les cellules **MCF-7** traitées avec la **15d-PGJ₂** sont principalement médiées par **HO-1**.

Ces résultats montrent que l'expression de la **MMP-1** induite par la **15d-PGJ₂** est facilitée par le fer libéré lors de la dégradation de l'hème, suite à l'activation de la **HO-1**. Ce fer est mesuré à l'aide d'une **calcéine-AM**, qui est une sonde sensible à ce métal et dont la fluorescence est éteinte lors de la liaison au fer « libre ». Le pool de fer cellulaire est augmenté après un traitement au **15d-PGJ₂** qui est réduit par le chélateur de fer **DFX** et l'inhibiteur de **HO-1** **ZnPP**. La Régulation positive de l'expression de **MMP-1** au niveau de l'**ARNm** et des protéines par la **15d-PGJ₂** est abrogée par le **DFX** dans des cellules **MCF-7**. De même le **DFX** inhibe l'expression de **MMP-1** dans les cellules **MDA-MB-231** traitées avec la **15d-PGJ₂**. En outre, le chélateur de fer **DFX** atténue la récupération de la cicatrisation des plaies médiée par la **15d-PGJ₂** et la migration cellulaire. Tous ces résultats confirment l'implication du fer dans le caractère invasif induit des cellules **MCF-7** exposées à la **15d-PGJ₂**.

L'implication du fer ferreux dans l'induction de l'expression de **MMP-1**, la migration et l'invasion des cellules cancéreuses du sein a été prouvée par l'utilisation de **Phen** (un chélateur spécifique des ions ferreux). Lorsque les cellules **MCF-7** sont traitées avec **Phen**, la **15d-PGJ₂** induite par l'expression de **MMP-1** est abrogée. La migration et le caractère invasif des cellules **MCF-7** induites par la **15d-PGJ₂** ont également été atténuées par **Phen**. Ces résultats suggèrent que le fer libéré par l'hème joue un rôle dans l'expression de la **MMP-1** et l'invasion subséquente des cellules **MCF-7** induite par la **15d-PGJ₂**.

Cette étude a rapporté que l'expression de **MMP-1** induite par la **15d-PGJ₂**, est liée à la génération de **ROS** dépendant du fer. La **15d-PGJ₂** augmente le niveau de **ROS** cellulaire, sans que l'inhibiteur de **HO-1** **ZnPP** et les chélateurs de fer le réduisent. La génération de **ROS** par la **15d-PGJ₂** est abolie dans les cellules **MCF-7** transfectées par des oligonucléides **siRNA HO-1**. Ces données, prises ensemble, suggèrent que l'accumulation intracellulaire de

Résultats & Discussion

ROS induite par la **15d-PGJ₂** est principalement déclenchée par le fer dérivé de l'activité **HO-1**. Ce qui confirme le rôle crucial du fer produit par **HO-1** dans la médiation de l'expression et des métastases de la **MMP-1** induite par la **15d-PGJ₂** suite à la génération de **ROS** dans les cellules cancéreuses du sein humaines.

Cette étude a également démontré que la **15d-PGJ₂** induit l'expression de la **MMP-9**, une autre protéinase jouant un rôle dans les métastases du cancer du sein. D'autre part, le traitement des cellules **MCF-7** avec un inducteur pharmacologique de **HO-1** a entraîné une amélioration de l'expression de **MMP-9**. Contrairement à la **MMP-1**, l'expression de **MMP-9** induite par la **15d-PGJ₂** n'est pas réprimée dans les cellules **MCF-7** transfectées avec l'**ARNsiHO-1**. Ceci prouve qu'il existe qu'un mécanisme indépendant de **HO-1** impliqué. Des études plus approfondies concernant l'effet de la **15d-PGJ₂** sur l'expression d'autres **MMP** s'avèrent nécessaires.

Bien que la majorité des travaux sur **HO-1** sont concentrées sur son rôle cytoprotecteur dans les cellules normales, cette étude a démontré que l'induction de **HO-1** par la **15d-PGJ₂** dans le cancer du sein humain (**MCF-7** et **MDA-MB-231**) est compatible avec plusieurs études antérieures, impliquant le potentiel cancérigène d'une **HO-1** élevée dans les cellules néoplasiques.

Chez les souris porteuses de tumeurs, la surexpression de **HO-1** augmente la viabilité, la prolifération et le potentiel angiogénique des cellules de mélanome épidermique, favorisant ainsi la formation de métastases et réduit la survie (**Nitti et al., 2017**).

Chez les patients atteints de cancer du poumon non à petites cellules l'expression élevée de **HO-1** est associée à une invasion tumorale et à de mauvais résultats cliniques (**Nitti et al., 2017**).

Dans le cancer du pancréas, la surexpression des gènes **HO-1** a potentialisé le caractère invasif en augmentant la croissance tumorale, l'angiogenèse et les métastases (**Kim et al., 2009**).

Pour les cellules cancéreuses gastriques, des niveaux élevés de **HO-1** et de **p21** confèrent une résistance à l'apoptose via la signalisation du facteur nucléaire- κ B à médiation, à travers la protéine kinase activée par un mitogène (**Kim et al., 2009**).

De plus, la régulation à la hausse de **HO-1** a amélioré la synthèse de **VEGF** dans les cellules musculaires lisses vasculaires. En tant que puissant médiateur de la perméabilité vasculaire, le

Résultats & Discussion

VEGF est un facteur angiogénique important qui induit la migration et la prolifération des cellules endothéliales (**Kim et al., 2009**).

Par ailleurs, la surexpression de **HO-1** est positivement corrélée à la thymidine phosphorylase (**TP**), une enzyme pro angiogénique surexprimée dans différentes tumeurs humaines telles que sein. Elle contribue à une densité plus élevée de micro vaisseaux, de métastases, un stade tumoral plus avancé et un mauvais pronostic (**Nitti et al., 2017**). Dans ce sens, il a été démontré que la **TP** induit un stress oxydatif dans les cellules tumorales, et la libération de facteurs angiogéniques, tels que le **VEGF**, **IL-8** et la **MMP-1** (**Was et al., 2010**).

L'envahissement tumoral et les métastases sont strictement liés à la stimulation de l'angiogenèse. Le **CO** dérivé de **HO-1** stimule la formation de vaisseaux sanguins, induit le **VEGF** et le facteur **1** dérivé des cellules stromales (**SDF-1**) conduisant à l'angiogenèse. En outre, la surexpression de **HO-1** favorise l'angiogenèse dans les cellules de carcinome urothélial et dans le cancer du pancréas humain. Dans un modèle de xénotransgreffe de souris, l'inhibition de **HO-1** supprime l'expression de **HIF-1**, de **VEGF** et diminue le degré d'angiogenèse au niveau des cellules cancéreuses colorectales (**Nitti et al., 2017**).

Chez les souris porteuses de tumeurs gastrique, l'utilisation de **ZnPPIX** inhibiteur de **HO-1** prévient les métastases péritonéales de ce type de cancer en réduisant l'angiogenèse (**Nitti et al., 2017**).

2.2.2 HO-1 et l'échappement immunitaire des tumeurs

La croissance, le caractère invasif et la capacité métastatique des tumeurs sont médiés par les interactions cellulaires dans le microenvironnement tumoral. Les cellules malignes ont développé différents mécanismes pour échapper au système immunitaire. De nombreux types de leucocytes tels que les lymphocytes **B** et **T**, les neutrophiles, les macrophages, les cellules dendritiques (**DC**) et les cellules tueuses naturelles (**NK**) peuvent infiltrer les tumeurs. Même si les lymphocytes T cytotoxiques spécifiques de la tumeur (**TIL**) et les **NK** peuvent éliminer les cellules tumorales (**Nitti et al., 2017**).

Plusieurs preuves, stipulent qu'au niveau des tumeurs solides et les hémopathies malignes, le nombre élevé de T régulateurs « **Treg** » (une sous-population spécialisée de cellules **T**), supprime la réponse immunitaire. En effet, dans le cancer du sein, le recrutement des **Tregs** est augmenté de manière dépendante de **HO-1** dont l'expression est liée à la génération accrue d'**IL-10** responsable du maintien de l'immunité des **DC** (**Nitti et al., 2017**).

Résultats & Discussion

Plusieurs études ont rapporté que les **Tregs** jouent un rôle pathologique dans la progression des tumeurs cérébrales. Ils infiltrent progressivement les gliomes malins humains et la surexpression de **HO-1** est associée à l'augmentation du grade tumoral et à la suppression immunitaire. En conséquence, l'expression de **HO-1** favorise la survie des **Tregs** dans l'environnement hypoxique mais son inhibition par la **SnPPIX** réduit le nombre de **Tregs**, ce qui confère un avantage de survie chez les souris porteuses de gliomes. De plus, la régulation positive de **HO-1** dans les cellules dendritiques (**DC**) favorise le recrutement des **Tregs** dans le compartiment stromal tumoral (**Nitti et al., 2017**).

De nombreux rapport ont révélé que la voie de dégradation des groupes d'hèmes est impliquée dans la régulation du système immunitaire et **HO-1** joue un rôle important dans la modulation de réactions immunitaires au sein d'une tumeur, notamment dans le recrutement de cellules immunitaires. Au sein des tumeurs, **HO-1** peut être exprimé à la fois dans les cellules cancéreuses et/ou dans les leucocytes infiltrants (**Nitti et al., 2017**).

Il a été démontré que dans les cellules cancéreuses colorectales (**CRC**), l'expression de **HO-1** régule directement l'immunité antitumorale en réduisant l'expression d'**ICAM-1** et de **CXCL10**. Ce dernier inhibe l'adhésion et le recrutement des cellules effectrices **T (Teff)** induisant ainsi, l'arrêt de la cytotoxicité à médiation cellulaire (**Nitti et al., 2017**).

De plus, dans le microenvironnement tumoral, la présence de macrophages influence considérablement la progression du cancer. En effet, les macrophages avec un phénotype de polarisation spécifique peuvent moduler de manière différentielle la croissance et le caractère invasif des cellules cancéreuses, régulant ainsi, la réponse immunitaire des cellules **T**, l'angiogenèse et la croissance métastatique. Selon leur état de polarisation, les macrophages (**M1**) sont capables de tuer les cellules tumorales et de présenter des antigènes associés à la tumeur ou d'exercer des activités de soutien de la tumeur (**M2**), en favorisant l'invasion et la métastase (**Nitti et al., 2017**).

L'expression de **HO-1** dans les macrophages du stroma dans différents tissus cancéreux notamment, les gliomes et les mélanomes, a été observée au début des années **2000**. **HO-1** est impliqué dans la polarisation des macrophages vers un phénotype **M2** pro-angiogénique produisant de l'**IL-10**. Il a été prouvé que les macrophages **HO-1** positifs induisent une suppression de la réponse immunitaire et sont associés à un mauvais pronostic des patients cancéreux. Dans le cas du cancer du sein, les macrophages associés à la tumeur (**TAM**) positifs pour **HO-1**, la croissance tumorale est accélérée (**Nitti et al., 2017**).

Résultats & Discussion

Le principal effecteur de **HO-1** dans la régulation du système immunitaire est son produit métabolique **CO**, qui exerce des effets pléiotropes dans la plupart des types de cellules immunitaires. Le **CO** bloque la maturation des **DC** et module leur sécrétion de cytokines, induisant un phénotype tolérogène. D'autre part, il inhibe la prolifération et l'activation de **Teff**, ce qui entraîne l'expansion des **Tregs**, en plus il est impliqué dans l'expansion précoce, la différenciation et la maturation des cellules myéloïdes en macrophages (**Nitti et al., 2017**).

Dans l'étude de **Kim et al., (2020)**, il a été démontré que les débris de cellules tumorales mammaires, stimulent l'expression de **HO-1** dans les macrophages et inhibent ainsi la polarisation des macrophages de type **M1**. Inversement, l'inactivation de **HO-1** dans les macrophages améliore l'efficacité thérapeutique en les polarisant vers le phénotype de type **M1**.

L'expression de **HO-1** dans les macrophages des échantillons de patientes atteintes de cancer du sein prélevés avant et après la chimiothérapie a été mesurée, afin de déterminer l'expression de **HO-1** des **TAM**. La surexpression de **HO-1** a été confirmée dans les macrophages des patients après chimiothérapie. Chez les souris porteuses de tumeurs **4T1** injectées de **PTX**, l'expression élevée de **HO-1** dans les **TAM** dérivés été confirmée par immunofluorescence.

HO-1 est considérée comme un facteur important pour la polarisation des macrophages, et pourrait être une cible prometteuse en immunothérapie anticancéreuse.

Kim et al., (2020) ont utilisé des **BMDM** déficientes en **HO-1** provenant de souris knock-out **HO-1 (HO-1 KO)**, afin d'examiner si l'ablation de **HO-1** pouvait affecter l'activation de macrophages polarisés de type **M1** traités avec des débris de cellules tumorales. Leurs résultats ont révélé une proportion de macrophages type **M1** évaluée par l'expression régulée à la hausse du **TNF- α** et **l'IL-12p40** significativement basse dans les cellules de type sauvage (**WT**) co-cultivées avec des débris de cellules tumorales **4T1**. Cependant, les macrophages **HO-1 KO** n'étaient pas affectés par ce traitement. Pour explorer davantage le rôle de l'activité de **HO-1** dans la polarisation des macrophages, ils ont employé la **protoporphyrine de zinc IX (ZnPP)**, un inhibiteur pharmacologique de **HO-1**. Ils ont constaté que l'inhibition de l'activité **HO-1** médiée par le **ZnPP**, restaure les niveaux d'ARNm de **TNF** et **IL12b** dans des macrophages polarisés de type **M1** co-cultivés avec des débris de cellules tumorales **4T1**.

Ensuite, ces auteurs ont étudié l'effet de l'inhibition de l'activité **HO-1** sur la polarisation de type **M2**. Ils ont trouvé que l'expression de **CD206** dans les macrophages déficients en **HO-**

Résultats & Discussion

1 traités avec des débris de cellules tumorales était inférieure à celle des macrophages **WT**. Les macrophages déficients en **HO-1** traités avec des débris de cellules tumorales ont montré une réduction des niveaux d'ARNm d'**IL10** par rapport aux macrophages **WT**. Ces résultats suggèrent que la signalisation **HO-1** induite par les débris de cellules tumorales réprime la polarisation de type **M1** des macrophages dans le **TME** après une chimiothérapie.

Dans le but de déterminer l'effet de l'inactivation de **HO-1** dans l'amélioration de l'efficacité thérapeutique de la **PTX**, ces chercheurs ont utilisé des souris **HO-1 KO** implantées avec des cellules de cancer du sein **4T1**. Ils ont injecté de la **PTX** aux souris après **10jrs** d'apparition de tumeurs. L'efficacité thérapeutique de la **PTX** est augmentée chez les souris **HO-1 KO** par rapport aux souris **WT**.

Pour confirmer davantage le rôle de **HO-1** dans la réponse à la **PTX**, des souris implantées dans des cellules tumorales **4T1** ont reçu une injection de **PTX** et de l'inhibiteur de **HO-1**, **ZnPP**. Les résultats ont montré que le co-traitement des souris avec du **ZnPP** et du **PTX** supprime la croissance tumorale de façon plus efficace que le traitement par **PTX** seul. L'inhibition pharmacologique de **HO-1** a induit une diminution supplémentaire de la taille tumorale par rapport au traitement par **PTX** seul.

Il a été démontré que les débris de cellules tumorales produits au cours de la chimiothérapie stimulent la croissance tumorale, ce qui constitue un problème critique pour le traitement du cancer. Une génération induite par la chimiothérapie d'un **TME** immunosuppresseur influence la polarisation des macrophages, ce qui peut expliquer la faible réponse thérapeutique. Ces résultats suggèrent que les débris de cellules tumorales générés pendant la chimiothérapie subissent une phagocytose par les macrophages, ce qui inhibe la manifestation du phénotype des macrophages de type **M1**, amortissant ainsi la réponse immunitaire anti-tumorale. Par conséquent, les stratégies chimiothérapeutiques qui se concentrent sur la destruction des cellules cancéreuses peuvent agir comme une arme à double tranchant (**Kim et al., 2020**).

La phagocytose des débris de cellules tumorales régule positivement l'expression de **HO-1** des macrophages lors de la chimiothérapie. Cette surexpression de **HO-1** régule la polarisation des **TAM** dans le **TME**. Par conséquent, la reprogrammation des **TAM** par inactivation de **HO-1** est une stratégie potentielle pour améliorer la réponse à la chimiothérapie via l'activation de l'immunité anti-tumorale, (**figure18**) (**Kim et al., 2020**).

Résultats & Discussion

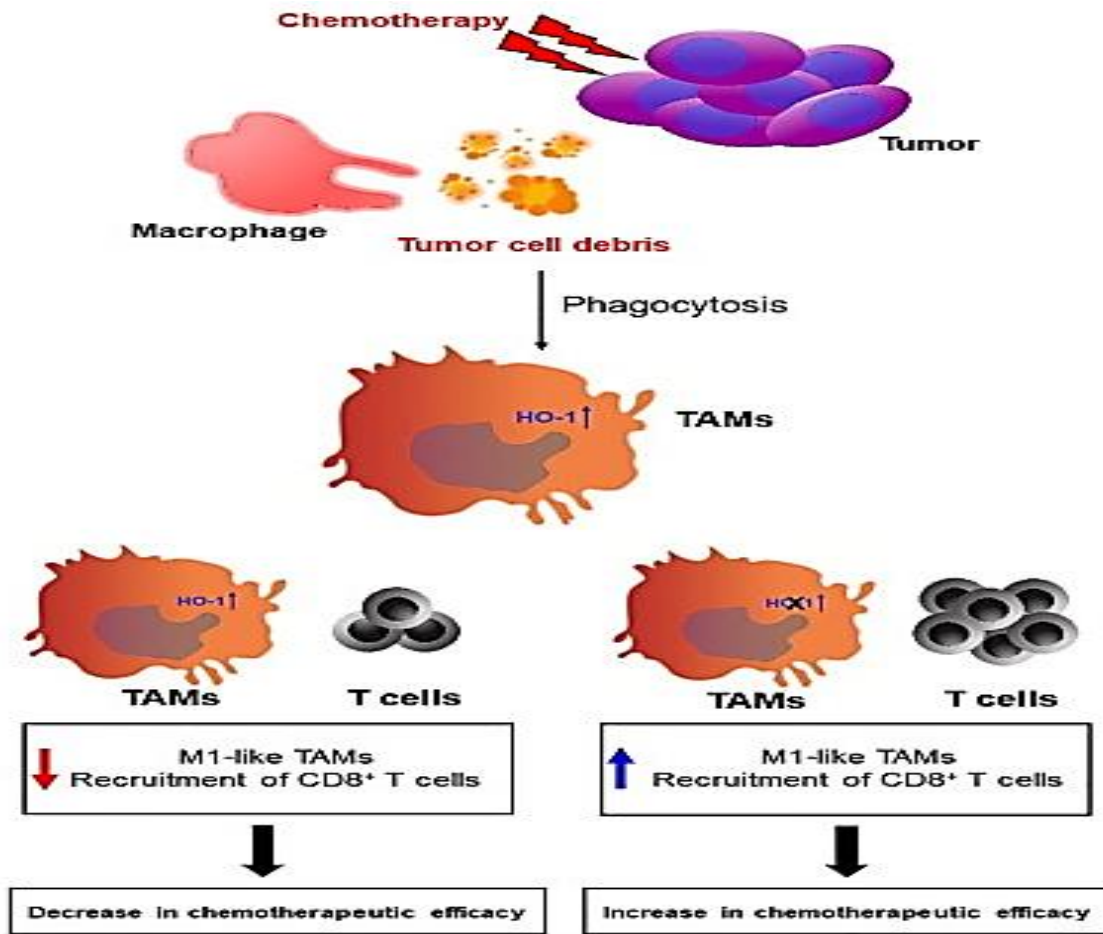


Figure 18: Représentation schématique des mécanismes sous-jacents à la phagocytose médiée par le TAM des débris cellulaires tumoraux dans le TME après chimiothérapie (Kim et al., 2020).

Résultats & Discussion

2.3 Approches thérapeutiques

Diverses stratégies thérapeutiques visant à l'inhibition de l'expression/activité de **HO-1** peuvent être potentiellement appliquées pour le traitement du cancer. L'inhibition de **HO-1** par des voies génétiques ou pharmacologiques peut être considérée comme un mode de traitement anticancéreux. Cependant, il ne peut pas être assez efficace en monothérapie, mais très probablement en tant que stratégie thérapeutique supplémentaire qui pourrait augmenter la sensibilité des cellules cancéreuses à la chimiothérapie ou à la radiothérapie (**Podkalicka et al., 2018**).

L'expression de **HO-1** dans les tissus tumoraux est augmentée en raison de la transformation oncogène, modifiée par le polymorphisme du promoteur **HO-1**. Généralement, **HO-1** exerce des effets pro-tumorigènes par une augmentation de la prolifération, de la survie et de l'angiogénèse. Cependant, des effets inhibiteurs sur la progression tumorale ont été rapportés dans certains types de tumeurs (**figure19**) (**Podkalicka et al., 2018**).

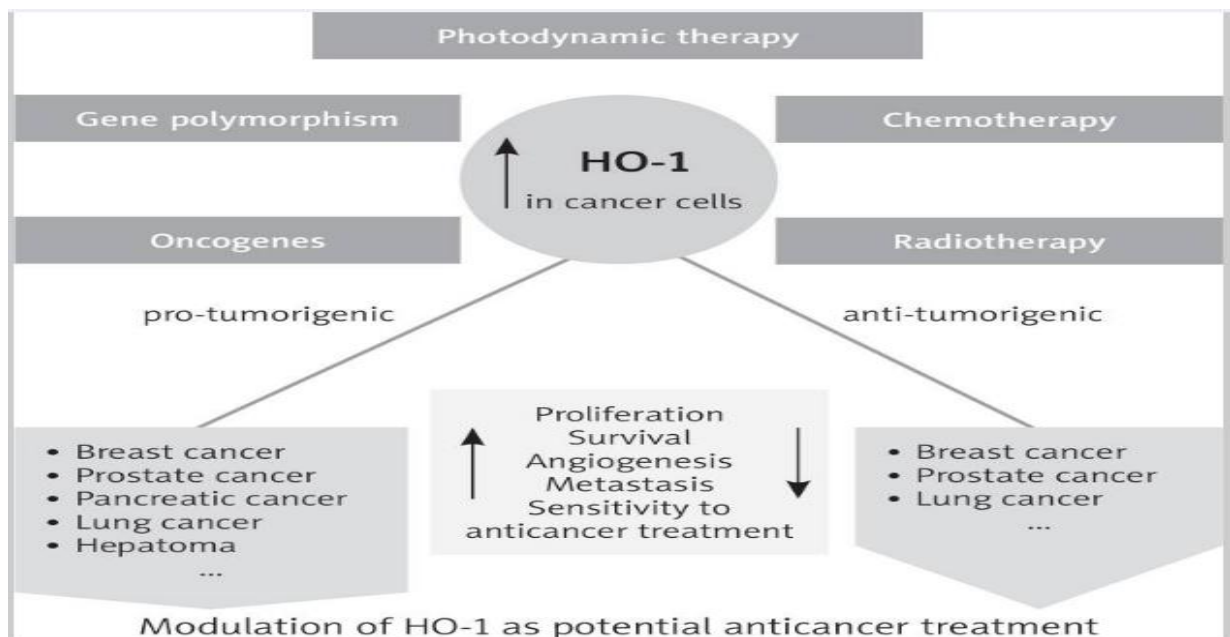


Figure 19 : HO-1 comme cible pour la thérapie anticancéreuse (Podkalicka et al., 2018)

2.3.1 Inhibition pharmacologique de l'activité HO-1

Les métalloporphyrines englobent la protoporphyrine de zinc (**ZnPPIX**), la protoporphyrine d'étain (**SnPPIX**) ou la protoporphyrine de chrome (**CrPPIX**) et des composés à base d'imidazole.

Les métalloporphyrines (**MP**) sont des analogues de l'hème composés de protoporphyrine IX, dans lesquels l'atome de fer est échangé par un autre composant. La structure de ces

Résultats & Discussion

molécules leur permet de se lier dans la poche de liaison à l'hème de **HO** et au lieu d'activer l'enzyme, elles inhibent de manière compétitive. Les MP ont une affinité de liaison beaucoup plus élevée que l'hème pour les isoformes **HO** et ne sont pas dégradées par oxydation car elles n'ont pas de capacité de liaison à l'oxygène. Il a été démontré que la majorité des **MP** inhibent l'activité **HO** *in vitro* et *in vivo*, mais les protoporphyrines avec le nickel (**Ni**), le cuivre (**Cu**) et le magnésium (**Mg**) comme atomes centraux, n'affectent pas l'activité **HO** (Podkalicka et al., 2018).

De nombreuses études expérimentales ont confirmé l'utilité des **MPs** dans la diminution de l'activité **HO**. Par exemple, le traitement d'une tumeur de mélanome en culture avec **SnPPIX** a nettement amélioré l'efficacité de la thérapie photo-dynamique et atténué la croissance du sarcome de **Kaposi** *in vivo*. De plus, le **ZnPPIX** a significativement augmenté la cytotoxicité induite par la thérapie photodynamique vis-à-vis du carcinome du côlon et de l'ovaire. L'inhibition de **HO-1** par **ZnPPIX** a élevé la sensibilité des cellules de carcinome du nasopharynx à la radiothérapie et a intensifié l'efficacité du cisplatine dans le cancer du foie à la fois *in vitro* et *in vivo* (figure20) (Podkalicka et al., 2018).

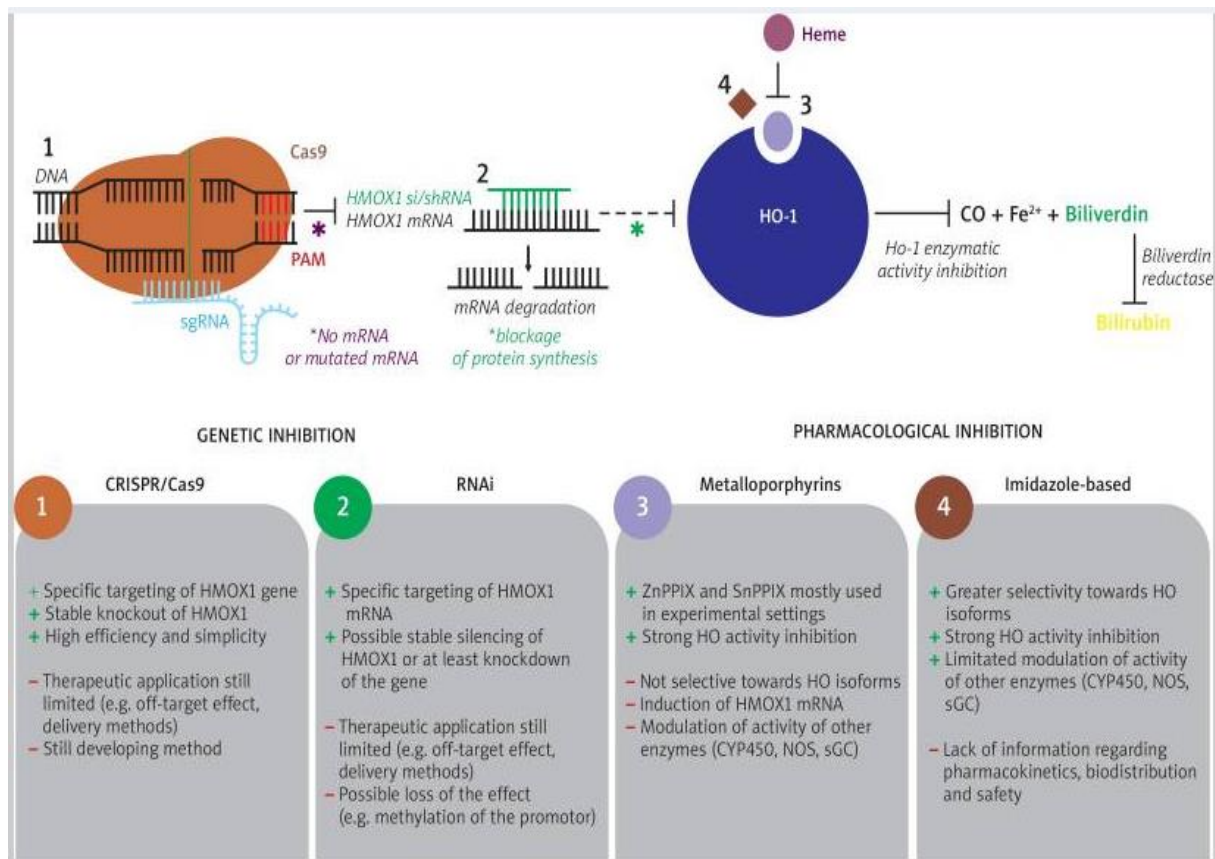


Figure 20 : Outils génétiques et pharmacologiques pour l'inhibition de HO-1 (Podkalicka et al., 2018).

Résultats & Discussion

Il a été rapporté que la **ZnPPIX** inhibe la prolifération des cellules leucémiques et supprime la résistance contre le panobinostat. Le traitement avec le **pégylé-ZnPPIX** a significativement atténué la croissance tumorale avec augmentation de la sensibilité à la chimiothérapie dans le modèle de souris xénotransgreffe **SW480** de cancer du côlon humain. En outre, le **ZnPPIX** a significativement augmenté la réponse chimio-thérapeutique du cisplatine dans les cellules cancéreuses squameuses du larynx et d'hépatome, ainsi que l'efficacité de la thérapie photodynamique dans les cellules tumorales de mélanome en culture.

L'étude de **Loboda et al., (2015)** in vivo, a rapporté une réduction de la croissance tumorale du cancer du poumon **LL/2** chez les souris **C57BL** après traitement à la **ZnPPIX**, en supprimant la concentration du facteur de croissance endothélial vasculaire dans les tumeurs. De plus, le **ZnPPIX** a amélioré la survie des souris porteuses de tumeurs gastriques, suite à l'inhibition des métastases péritonéales via l'anti-angiogénèse ceci est liée à la suppression de la production de **ROS** et à l'activation d'**ERK**.

L'un des inconvénients majeurs de la plupart des **MP** est la photoréactivité qui peut provoquer une phototoxicité conduisant à des lésions tissulaires et même organiques. Aussi, ils sont très lipophiles, donc insolubles dans les solutions aqueuses. Il est important de noter que l'efficacité anti-tumorale de ces composés a été confirmée à la fois *in vitro* et *in vivo*, et sans aucun effet secondaire apparent. Néanmoins, plusieurs inconvénients sont difficiles à surmonter notamment le manque de sélectivité. Les **MP** inhibent l'activité des deux isoenzymes de **HO** et d'autres enzymes dépendantes de l'hème comme les synthases d'oxyde nitrique (**NOS**), la guanylyl cyclase soluble (**sGC**) et les cytochromes **P450 (CYP)**. Paradoxalement, ils induisent également **HO-1** au niveau de l'**ARNm** et des protéines (**Podkalicka et al., 2018**).

Les composés à base d'azole sont structurellement distincts des métalloporphyrines et hautement sélectifs pour l'inhibition de **HO-1**. Ils présentent une activité inhibitrice faible ou nulle sur la **NOS**, les **sGC** et le **CYP450**. Ils se lient à la face distale de l'hème par une ancre azolée qui coordonne avec le fer hémique. Les inhibiteurs de **HO-1** dérivés de l'imidazole, ont montré un meilleur profil d'inhibition de **HO-1** dans les lignées cellulaires de cancer de la prostate et du sein. Une série de composés hybrides d'inhibiteurs de **HO-1** à base d'imatinib et d'imidazole ont été capables d'inhiber à la fois les activités de la tyrosine kinase et de **HO-1/HO-2** et de réduire la viabilité des cellules de leucémie myéloïde chronique résistantes à l'imatinib (**Chiang et al., 2019**).

Résultats & Discussion

La plupart des inhibiteurs à base d'azole, sont caractérisés par un noyau azole et une partie hydrophobe, reliés par un espaceur alkyle ou hétéroalkyle. La classe des aryléthanolimidazoles se distingue par ses propriétés inhibitrices, c'est des inhibiteurs **HO-1** très puissants et sélectifs (Ciaffaglione et al., 2020).

Ciaffaglione et al., (2020) ont conçu et synthétisé une nouvelle série d'inhibiteurs de **HO-1** à base d'imidazole structurellement liés à des aryléthanolimidazoles. Le cycle imidazole n'étant pas facilement remplaçable sans perte d'activité, les deux autres parties de la molécule, notamment l'espaceur central et la fraction hydrophobe, sont modifiées. Leurs résultats ont montré que la présence d'un groupe hydroxyle dans l'espaceur central est cruciale pour une inhibition optimale de **HO-1**. Toutefois, la partie hydrophobe peut être modifiée, mais avec une certaine restriction. Ces données confirment que la partie hydrophobe de ces nouveaux aryléthanolimidazoles influence fortement la puissance, tant en termes d'encombrement stérique que de distribution électronique. Ces résultats suggèrent que la structure idéale doit inclure à la fois le groupe hydroxyle et le substituant bromobenzoyloxy en *para* ou en *méta* du cycle phényle central.

Un composant résultant en l'analogue le plus puissant et le plus sélectif de cette série, a été sélectionné pour évaluer son activité cytotoxique sur des lignées cellulaires de cancer du sein hormono-sensibles (**MCF-7**) et hormono-résistantes (**MDA-MB-231**). Les deux lignées cellulaires ont été traitées avec **10 à 100 µM** du composé pendant **48 h**. La survie cellulaire à différentes concentrations a été calculée par rapport aux témoins non traités. A la fin du traitement, le nombre de cellules a été déterminé par un dosage colorimétrique à la sulforhodamine **B (SRB)** basé sur la mesure de la teneur en protéines cellulaires. Le composé testé n'a exercé que des effets cytotoxiques modérés envers les cellules sensibles au **MCF-7**, alors qu'aucune cytotoxicité contre les cellules résistantes au **MDA-MB-231** n'a été observée.

L'évaluation des inhibiteurs de **HO-1** dans d'autres lignées cellulaires cancéreuses dans lesquelles **HO-1** est surexprimé, ainsi que leur combinaison avec des médicaments chimiothérapeutiques, est actuellement en cours (Ciaffaglione et al., 2020).

2.3.2 Inhibition génétique de l'expression de HO-1

L'ARN interférence (**ARNi**) permet une inhibition sélective des gènes souhaités au niveau post-transcriptionnel de l'**ARNm**. Les petits **ARN interférents (ARNsi)** et les **ARN en épingle à cheveux courts (ARNsh)** sont les formes d'**ARNi** les plus couramment utilisées pour l'extinction du gène par clivage de l'**ARNm** ciblé, le remodelage de la chromatine ou le blocage

Résultats & Discussion

de la synthèse des protéines. L'utilité de l'approche **ARNi** dans l'étude des fonctions des gènes a été largement rapportée dans de nombreux domaines de recherche, y compris la cancérogenèse (**Podkalicka et al., 2018**).

Il est important de noter qu'un nombre substantiel d'études évaluant le rôle de l'inhibition de **HO-1** dans le cancer, en utilisant des séquences d'**ARNsi** ou d'**ARNsh** ciblant spécifiquement le transcrit **HO-1**. L'application de **siRNA HO-1** *in vitro* a entraîné une augmentation bénéfique de l'apoptose des cellules cancéreuses du poumon, des carcinomes épidermoïdes, de l'œsophage, du côlon et des cellules leucémiques. De plus, une sensibilité accrue à la chimiothérapie des cellules cancéreuses du pancréas, des cellules de leucémie myéloïde et d'autres types de cellules cancéreuses a également été rapportée (**Podkalicka et al., 2018**).

L'application *in vivo* de séquences d'**ARNsi/ARNsh HO-1** ou de cellules cancéreuses modifiées par l'**ARNi** a également été démontrée. L'injection intrapéritonéale directe de **siRNA HO-1** a entraîné une diminution de la croissance des tumeurs dans un modèle orthotopique de carcinome hépatocellulaire. D'autre part, l'injection sous-cutanée d'une lignée cellulaire de cancer du côlon humain résistante au **5-fluorouracile (5-FU)**, transduite avec du **shRNA** contre **HO-1**, a réduit significativement la taille de la tumeur et a augmenté remarquablement la sensibilité des souris nude au traitement au **5-FU** (**Podkalicka et al., 2018**).

Il a été démontré qu'une intervention de l'expression de **HO-1** par **shRNA** induit l'apoptose dans les cellules cancéreuses épidermoïdes, mammaires, l'œsophage, et du poumon, du côlon, et des cellules leucémiques. Les **siRNA/shRNA** de **HO-1** ont également amélioré la sensibilité à la chimiothérapie dans les cancers mammaires, pancréas et poumon (**Chiang et al., 2019**).

Plus récemment, un nouvel outil génétique extrêmement puissant - **CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeat)** - le système **Cas9 (CRISPR-associated nuclease 9)**, adopté à partir du mécanisme de défense des bactéries contre les infections virales, a ouvert de nouvelles possibilités pour éliminer spécifiquement tout élément souhaité, gène au niveau génomique. La nucléase **Cas9** est guidée vers un locus génomique spécifique par une séquence d'**ARN** guide unique (**sgRNA**) où elle induit des cassures double brin (**DSB**), réparées par la voie de réparation de l'**ADN** non homologue (**NHEJ**). Comme le mécanisme de réparation est sujet aux erreurs, des insertions et des suppressions se produisent, ce qui conduit

Résultats & Discussion

par conséquent à un knock-out du gène, par des changements dans la lecture de l'ARNm et l'introduction du codon stop prématuré.

Bien que les outils de genèse d'un knock-out **HO-1** sont disponibles dans le commerce, les études évaluant le rôle de **HO-1** dans le cancer à l'aide de la technologie **CRISPR/Cas9** sont insuffisantes. à l'exception des avantages indéniables de la technologie **CRISPR/Cas9**, certains inconvénients, tels que les méthodes d'administration, les effets hors cible possibles et autres doivent également être pris en compte lors de l'examen de l'application expérimentale ou thérapeutique de Système **CRISPR/Cas9** (Chiang et al., 2019).

Dans les cellules cancéreuses, l'inhibition de **HO-1** à l'aide de métalloporphyrines (MP), de composés à base d'imidazole, d'ARNi ou du système **CRISPR/Cas9**, peut affecter le développement tumoral de diverses manières, directement et indirectement. La voie directe entraîne une augmentation de l'apoptose, une prolifération, et un caractère invasif diminués et une réduction de la taille de la tumeur. L'effet indirect est associé à une sensibilité accrue aux traitements anticancéreux, comme la photo-, la chimio- et la radiothérapie par stimulation du système immunitaire et amélioration de l'angiogenèse (figure21) (Podkalicka et al., 2018).

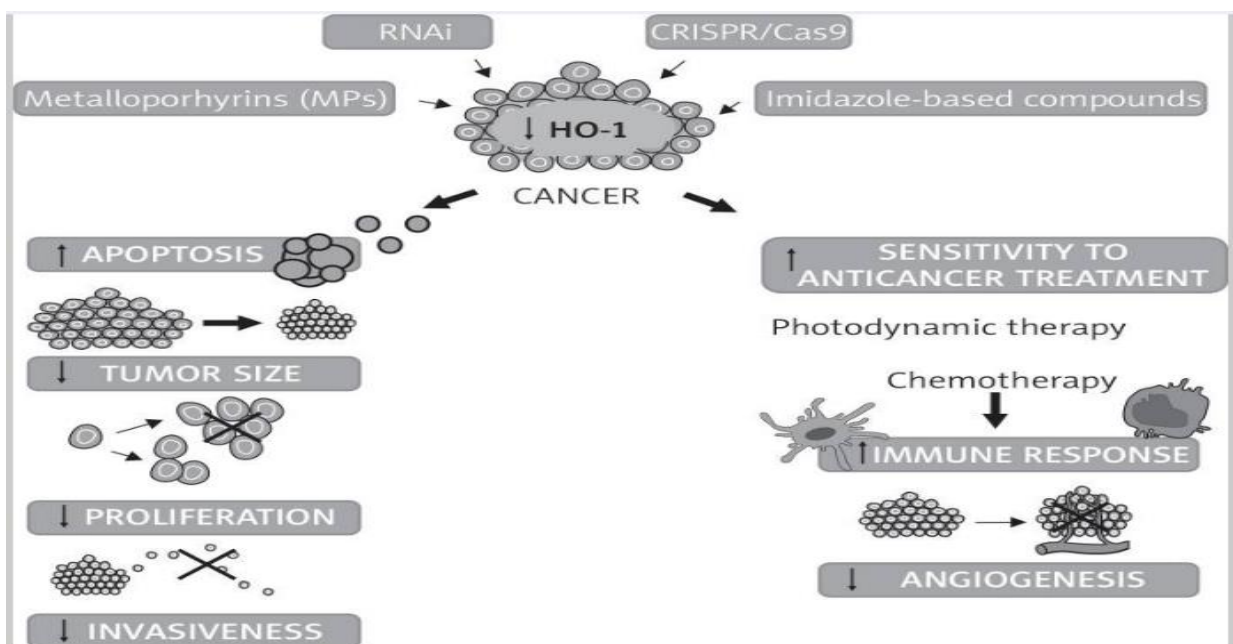


Figure 21 : Effet de l'inhibition de HO-1 sur le développement tumoral et la sensibilité aux thérapies anticancéreuses (Podkalicka et al., 2018).

Zhu et al., (2015) ont trouvé une surexpression d'**HMOX-1** était surexprimé dans les lignées cellulaires du cancer mammaire, l'analyse **RT-qPCR** a indiqué que l'expression de **HMOX-1** est :

Résultats & Discussion

- ✓ **3,3** fois plus élevée dans les cellules **MDA-MB-231**,
- ✓ **12,4** fois plus élevée dans les cellules **BT549**,
- ✓ **10,5** fois plus élevée dans les cellules **HS578T**,
- ✓ **18,6** fois plus élevé dans les cellules **MDA-MB-468**,
- ✓ **1,6** fois plus élevé dans les cellules **MCF-7** et
- ✓ **3,4** fois plus élevé dans les cellules **ZR751**.

Parallèlement, le traitement à la doxorubicine a considérablement augmenté l'expression de la protéine **HMOX-1** dans les cellules **MDA-MB-231** et **BT549**.

En outre, le Knockdown de **HMOX-1** a significativement amélioré la cytotoxicité de la doxorubicine dans les cellules **MDA-MB-231** et **BT549**.

Des cellules mammaires ont été transfectées avec **50 nM** d'ARNsi **HMOX-1** ou l'ARNsi témoin négatif. Après **48h** de transfection, l'expression de l'ARN messager (m) **HMOX-1** est significativement inhibée dans les lignées cellulaires **MDA-MB-231** et **BT549**. Les cellules transfectées ont été exposées à **0,02, 0,05, 0,1, 0,15** ou **0,2 µg/ml** de doxorubicine pendant **48 h**. Le test **CCK-8** a révélé une augmentation significative de la cytotoxicité de la doxorubicine dans les cellules **MDA-MB-231** et **BT549**, suite à la précipitation de **HMOX-1**.

Par conséquent, le mécanisme sous-jacent aux effets du knockdown de **HMOX-1** sur la cytotoxicité de la doxorubicine a été étudié. Les cellules **MDA-MB-231** et **BT549** ont été transfectées avec des **siRNA HMOX-1** ou des **siRNA** témoins, traitées avec **0,2 µg/ml** de doxorubicine pendant **48 h**, puis colorées à l'**Annexine V** et **PI** et soumises à une analyse cytométrique en flux pour quantifier les cellules apoptotiques. L'extinction de **HMOX-1** a significativement augmenté le taux d'apoptose dans les cellules **MDA-MB-231** et **BT549** traitées à la doxorubicine. De plus, l'analyse par transfert western blot, a indiqué une réduction de l'expression de **Bcl-xL** et **Bcl-2**, par le knockdown de **HMOX-1** sans effet sur l'expression de **Bax**.

Ces résultats indiquent que le knockdown de **HMOX-1** améliore de manière significative l'apoptose induite par la doxorubicine, régulé à la baisse l'expression de **Bcl-2** et **Bcl-xL** et module ainsi, la survie des cellules cancéreuses mammaires.

Résultats & Discussion

Par ailleurs, le knockdown de **HMOX-1** améliore l'autophagie induite par la doxorubicine, sans altérer l'expression du régulateur autophagique Beclin-1 dans les cellules **MDA-MB-231 et BT549**. L'inactivation de **HMOX-1** augmente nettement l'accumulation des vacuoles autophagiques dans les cellules **MDA-MB-231 et BT549** traitées à la doxorubicine.

Ces résultats laissent conclure que le knockdown de **HMOX-1** améliore les effets cytotoxiques de la doxorubicine, induit l'apoptose et l'autophagie dans les cellules cancéreuses du sein. Ceci indique que **HMOX-1** pourrait jouer un rôle dans la survie des cellules tumorales et la chimiorésistance du cancer mammaire. Ainsi, **HMOX-1** représente une cible thérapeutique potentielle, car son ciblage peut améliorer l'efficacité thérapeutique de la chimiothérapie.

Lee et al., (2015) ont exploré la destruction sélective induite par la piperlongumine des cellules cancéreuses avec un accent particulier sur **HO-1**. Ils ont déterminé le mécanisme possible qui pourrait être impliqué dans l'activation de **Nrf2**, induit par la piperlongumine et l'induction de **HO-1**.

La piperlongumine est un alcaloïde naturel isolé du poivre long (*Piper longum L.*), connue par ces effets insecticides, bactéricides, antidiabétiques et anti-athéroscléreux, ainsi que des effets cytotoxiques et antitumoraux. Il a été rapporté que la piperlongumine peut tuer sélectivement diverses cellules cancéreuses et transformées surexprimant les oncogènes (**p. ex. ERBB2 et/ou HRAS**), mais sans effet sur les cellules normales. De plus, cette molécule a considérablement supprimé la croissance tumorale, l'angiogenèse et les métastases dans les tissus tumoraux de la vessie, du sein et du poumon sans affecter les tissus normaux dans les modèles murins de xénogreffe tumorale. La réponse différentielle des cellules cancéreuses et normales à la piperlongumine semble être médiée en ciblant la dépendance plus élevée des cellules cancéreuses sur la voie de réponse au stress oxydatif par rapport aux cellules normales. La piperlongumine améliore l'accumulation d'espèces réactives de l'oxygène (**ROS**) dans les cellules cancéreuses, en interférant avec les régulateurs homéostatiques redox et **ROS** tels que la glutathion *S*-transférase pi 1 (**GSTP1**) et la carbonyl réductase 1 (**CBR1**). Il a également été démontré que la génération de **ROS** induite par la piperlongumine dépend de l'activation des protéines kinases activées par les mitogènes (**MAPK**), y compris la kinase c-Jun-N-terminal (**JNK**) et **p38**. La piperlongumine porte également deux groupes carbonyle électro, α -insaturés électrophiles et devrait donc réguler positivement l'expression de **HO-1** par l'activation de la signalisation **Nrf2** (**Lee et al., 2015**).

Résultats & Discussion

Ces auteurs ont démontré que la piperlongumine tue sélectivement les cellules **MCF-7** du cancer du sein humain, mais pas les cellules épithéliales **MCF-10A**. Ces deux types cellulaires ont été stimulées avec des concentrations variables de pipérlongumine pendant **24 h**. La pipérlongumine a augmenté la mort des cellules **MCF-7** d'une manière dépendante de la concentration, mais elle a à peine affecté la viabilité des cellules **MCF-10A**. Ensuite, ils ont évalué l'apoptose dans les cellules **MCF-10A** et **MCF-7** après traitement à la piperlongumine à **5 M**. Grâce à la double coloration à l'annexine V et PI, il a été révélé que les cellules **MCF-7** traitées à la piperlongumine subissaient une apoptose alors que les cellules **MCF-10A** étaient moins sensibles. Les indices d'apoptose étaient de **21,9%** dans les cellules **MCF-7** et de **6,7%** dans les cellules **MCF-10A**, respectivement, après un traitement de **36h** à la piperlongumine. De plus, la piperlongumine a significativement augmenté la proportion de cellules **MCF-7** au stade sub-G1, ce qui n'est pas observé avec les cellules **MCF-10A**.

Après le traitement à la piperlongumine, les niveaux de **PARP** clivée ont augmenté en fonction du temps- et de dose-dépendante dans les cellules **MCF-7**, mais pas dans les cellules **MCF-10A**. Ces données montrent clairement que la pipérlongumine a un effet destructeur sélectif sur les cellules cancéreuses.

L'examen du niveau de protéines cytoprotectrices, notamment **HO-1** et **Nrf2** après un traitement à la pipérlongumine, a montré un niveau d'expression de **HO-1** et **Nrf2** élevé par la pipérlongumine dans les cellules **MCF-10A** et **MCF-7**. La piperlongumine a régulé positivement l'expression de **HO-1** et **Nrf2** dans les cellules **MCF-10A** plus tôt que les cellules **MCF-7**. Parallèlement, au niveau élevé de protéines de **HO-1**, l'expression de son transcrite d'**ARNm** a également augmenté dans les cellules **MCF-10A** et **MCF-7** après traitement à la piperlongumine.

Afin de confirmer si **HO-1** joue un rôle dans la détermination des effets différentiels de la piperlongumine, ces chercheurs ont utilisé l'**ARNsi** contre **HO-1**. La piperlongumine a élevé le niveau de **PARP** clivée dans les cellules **MCF-10A** transfectées avec l'**ARNsi HO-1**. Ceci indique que **HO-1** protège les cellules **MCF-10A** de l'apoptose induite par la piperlongumine. Contrairement aux cellules **MCF-10A**, les cellules **MCF-7** sont devenues moins sensibles à l'apoptose induite par la piperlongumine lorsque **HO-1** a été réduit au silence, suggérant que la piperlongumine déclenche l'apoptose des cellules **MCF-7** via l'induction de **HO-1**.

Résultats & Discussion

Le rôle différent de **HO-1** dans les cellules **MCF-10A** et **MCF-7** traitées à la piperlongumine a également été confirmé par un traitement au **ZnPP** (un inhibiteur pharmacologique de l'activité de **HO-1**). Semblable à l'ARNsi **HO-1**, le **ZnPP** a abrogé l'apoptose induite par la piperlongumine dans les cellules **MCF-7**, mais il a stimulé l'apoptose des cellules **MCF-10A** en réponse à la piperlongumine. Ces résultats suggèrent que **HO-1** est la protéine clé impliquée dans la détermination de l'effet sélectif de la piperlongumine sur l'apoptose des cellules cancéreuses. **HO-1** protège les cellules **MCF-10A** de l'apoptose induite par la piperlongumine tout en amplifiant la cytotoxicité de la piperlongumine dans les cellules **MCF-7**.

Après un traitement à la piperlongumine, **Nrf2** est transloqué dans le noyau des cellules **MCF-10A** et **MCF-7**. Pour déterminer si la régulation positive de **HO-1** par la piperlongumine est médiée par l'activation de **Nrf2**, les cellules ont été transitoirement transfectées avec des **siRNA** contre **Nrf2**. La piperlongumine n'a pas réussi à réguler positivement l'expression de **HO-1** dans les cellules knockdown **Nrf2**, ce qui confirme que l'activation de la signalisation **Nrf2** est importante pour l'expression de **HO-1**.

Lee et al., (2015) ont rapporté que la piperlongumine module la signalisation redox, augmentant ainsi la production de **ROS** dans les cellules cancéreuses contrairement aux cellules normales.

Ces auteurs ont également observé que le traitement à la piperlongumine abaisse le niveau de **GSH**, tout en augmentant le taux de **GSSG** dans les cellules **MCF-7**.

Cependant, aucun changement significatif dans le taux de **GSH** total et le rapport **GSH/GSSG** dans les cellules **MCF-10A** traitées à la piperlongumine par rapport aux celles traitées au **DMSO**. Outre l'épuisement du **GSH**, le traitement à la piperlongumine a induit une accumulation intracellulaire de **ROS** au niveau des cellules **MCF-7**, bien que ces radicaux sont abrogée par un prétraitement de **NAC** ou de **trolox**.

L'implication possible des **ROS** dans l'activation de **Nrf2** induite par la piperlongumine et l'expression de **HO-1**, est vérifiée par ces chercheurs. En effet, la translocation nucléaire induite par la piperlongumine de **Nrf2** et la régulation à la hausse de l'expression de **HO-1**, sont nettement supprimées par le traitement **NAC** dans les cellules **MCF-7**. Malgré que la piperlongumine n'a pas augmenté les niveaux de **ROS** dans les cellules **MCF-10A**, la **NAC** a également aboli l'activation de **Nrf2** induite par la piperlongumine et la surexpression de **HO-**

Résultats & Discussion

1 dans ces cellules. Ceci montre que la **NAC**, qui est un agent réducteur de thiol, agit comme un inhibiteur de la stimulation de la voie **Nrf2/HO-1** par piperlongumine, plutôt qu'un capteur de **ROS**.

Pour confirmer le rôle des **ROS** dans les effets induits par la piperlongumine, les cellules ont été traitées par cette dernière en absence ou en présence de trolox (piégeur de **ROS**).

Les résultats obtenus, ont rapporté que **Trolox** n'a pas inversé l'effet de la pipérlongumine sur l'activation de **Nrf2** et l'expression de **HO-1** à la fois dans les cellules **MCF-10A** et **MCF-7**. De plus, l'effet destructeur sélectif de la pipérlongumine sur les cellules **MCF-7** n'est pas inhibé par le traitement au trolox. Ces résultats suggèrent que l'activation de **Nrf2** induite par la piperlongumine, l'expression de **HO-1** et la mort des cellules cancéreuses ne reposent pas sur la génération de **ROS**.

Considérant que la piperlongumine contient la fraction carbonyle α,β -insaturée, les effets de la pipérlongumine sur la translocation nucléaire de **Nrf2** et l'expression de **HO-1** ont été abrogés lorsque les cellules sont prétraitées avec du **DTT**, un agent réducteur de thiol. Dans le but de déterminer si la piperlongumine induit une modification du thiol par liaison directe au **Keap1**, des tests de pull-down sont effectués, en utilisant des billes **Sepharose 4B** conjuguées à la piperlongumine avec des lysats cellulaires **MCF-10A** et **MCF-7**. Les résultats ont démontré une liaison directe de la piperlongumine au **Keap1**, à la fois dans les cellules **MCF-10A** et **MCF-7**. Ces données impliquent que la piperlongumine induit l'activation de **Nrf2** et l'expression de **HO-1** par la modification des résidus de cystéine **Keap1**.

Les résultats de cette étude démontrent un nouveau mécanisme sous-jacent à un effet destructeur sélectif des cellules cancéreuses de la pipérlongumine (**figure 22**). Ainsi, **HO-1** peut être un facteur clé, déterminant la réponse différentielle à la pipérlongumine chez les cellules mammaires normales et cancéreuses, d'autre part, la modification thiol de **Keap1** est responsable de l'activation induite par la pipérlongumine, de la signalisation **Nrf2** et de l'expression de **HO-1**.

Résultats & Discussion

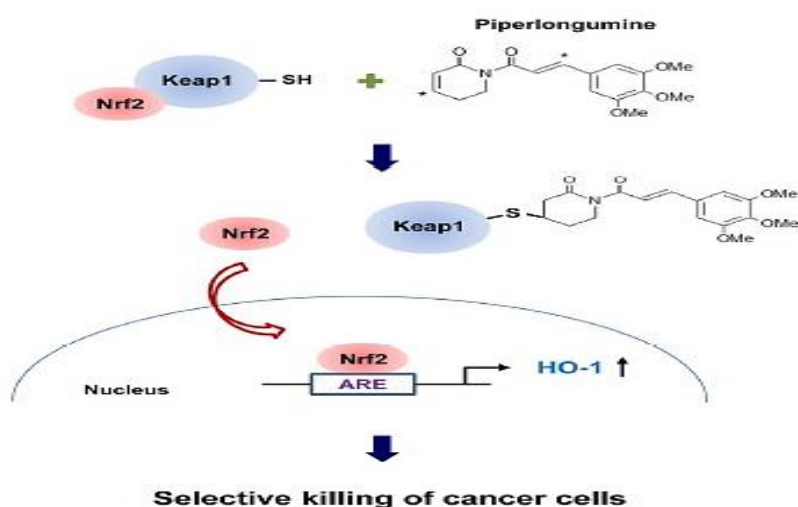


Figure 22 : Mécanisme proposé sous-jacent à un effet destructeur sélectif des cellules cancéreuses de la piperlongumine (Lee et al., 2015).

Par liaison directe, la piperlongumine induit une modification thiol de **Keap1**, permettant ainsi la translocation nucléaire de **Nrf2** et une régulation positive ultérieure de l'expression de **HO-1** dans les cellules normales et cancéreuses. **HO-1** détermine la réponse différentielle des cellules normales du sein et des cellules cancéreuses à la piperlongumine, entraînant la destruction sélective des cellules cancéreuses (Lee et al., 2015).

2.4 HO-1 comme biomarqueur possible

Récemment, certaines études ont exploré la signification pronostique de la surexpression de **HO-1** dans les cancers humains ainsi que la corrélation possible avec les caractéristiques cliniques de la tumeur.

Noh et al., (2013), ont étudié l'expression immunohistochimique du **NGF** et du **HO1** chez les patients atteints de **BRCA**. Ils ont démontré que l'expression du **NGF** et du **HO1** sont significativement associées l'une à l'autre, et les deux sont significativement liés à l'expression de **HER2**, le grade histologique et la métastase latente à distance.

Le modèle d'expression **NGF/HO1** est également un indicateur pronostique significatif de la survie globale et de rechute libre des patients **BRCA**, par analyse univariée et multivariée. En particulier, les patients atteints de tumeurs exprimant le **NGF** ont la survie la plus courte. Ce résultat suggère que le **NGF** et le **HO1** pourraient être des indicateurs pronostiques et des cibles thérapeutiques potentielles pour les patients atteints de **BRCA**.

Résultats & Discussion

Le **NGF** est une neurotrophine qui contrôle le développement et la survie des cellules neuronales. En plus de son effet neurotrophique, le **NGF** est régulé à la hausse dans plusieurs tumeurs malignes. Il est exprimé dans les cellules **BRCA**, stimule leur croissance, et inhibe leur apoptose. Le rôle pro-prolifératif du **NGF** dans **BRCA** est médié par l'activation des voies **TrkA**, **p75 NTR** et **NFkB**. Aussi, le **NGF** est impliqué dans l'angiogenèse **BRCA** et augmente les niveaux de facteur de croissance endothélial vasculaire sécrété dans les cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine et les lignées cellulaires **BRCA**. Le précurseur du **NGF** est surproduit dans le **BRCA** par rapport au tissu mammaire bénin et impliqué dans la stimulation de l'invasion des cellules **BRCA** (Noh et al.,2013).

La surexpression de **TrkA** favorise la croissance, la migration, l'invasion, la survie d'une lignée cellulaire **BRCA**, améliore l'angiogenèse et favorise la métastase des cellules **BRCA** chez la souris (Noh et al.,2013).

Le blocage du **NGF** avec des anticorps **anti-NGF** ou de petits **ARN** interférents contre le **NGF**, inhibe la croissance, les métastases et des inhibiteurs de **TrkA** ou **p75 NTR**, cibles de signalisation en aval du **NGF**, ont des effets pro-apoptotiques et anti-prolifératifs sur les cellules **BRCA**. L'inhibition du précurseur du **NGF** par de petits **ARN** interférents inhibe l'activité d'invasion des cellules **BRCA**. Par conséquent, le **NGF** est suggéré comme cible thérapeutique potentielle pour le traitement des tumeurs malignes, en particulier dans le **BRCA** (Noh et al., 2013).

Dans l'étude de Noh et al., (2013), une expression élevée du **NGF** est associée à un grade histologique élevé, à la présence de métastases à distance et prédisait une survie plus faible des patients atteints de **BRCA**. Le mauvais pronostic des patients atteints d'une tumeur exprimant le **NGF** pourrait être lié à la capacité de la signalisation **NGF-TrkA** à induire une chimiorésistance. Dans cette vaste étude de cohorte dans le **BRCA**, l'expression du **NGFR** est négativement corrélée avec l'expression du **RE** et indicative des sous-types **BRCA** basal-like ou luminal B. Le résultat a montré une corrélation négative entre l'expression du **NGF** et l'expression du **RE**.

De plus, l'expression du **NGF** est significativement corrélée avec le statut **HER2-positif** et la positivité du **NGF** et du **HER2** prédisait une faible survie des patients **BRCA**. Néanmoins, lorsqu'ils ont analysé séparément l'impact pronostique, l'expression du **NGF** a prédit une faible survie des patients **BRCA** quelle que soit la positivité de **HER2**. L'expression du **NGF** prédisait une mauvaise survie globale à la fois chez les **HER2-négatifs** (Log-rank, $P = 0,011$) et les

Résultats & Discussion

sous-populations **HER2-positives** (**Log-rank, $P = 0,005$**). Ces résultats suggèrent la possibilité que le **NGF** ait des mécanismes impliqués dans la progression de **BRCA** qui sont indépendants des mécanismes liés à **HER2**. Par conséquent, la thérapie ciblée sur le **NGF** peut être bénéfique pour les patients atteints de **BRCA** en plus de la thérapie conventionnelle basée sur **HER2**.

Dans la voie de signalisation **NGF-TrkA**, le **NGF** est également connu comme un inducteur de **HO1**. Il augmente l'expression de **HO1** par la voie de phosphorylation de la tyrosine du récepteur, puis **HO1** provoque l'effet anti-apoptotique du **NGF**. Dans les modèles de maladies neurodégénératives, le **NGF** protège les cellules contre le stress oxydatif, en induisant l'expression de **HO1** de manière dépendante de la phosphatidylinositol 3-kinase. Ces résultats suggèrent qu'il existe un rôle coopératif entre **NGF** et **HO1** dans l'adaptation cellulaire au stress et l'induction d'une résistance à la mort. Lorsque l'on considère le rôle du **NGF** dans la progression tumorale, il est possible que **HO1** soit également impliqué dans la progression des cancers. Cette étude a également déterminé une corrélation significative entre l'expression de **HO1** et du **NGF**. **89 % (40/45)** des **BRCA** exprimant le **NGF** co-exprimaient **HO1**. Ces résultats suggèrent la possibilité que les voies médiées par **NGF** et **HO1** sont impliquées dans la progression de **BRCA**. En revanche, il est intéressant de noter que l'expression de **HO1** est liée à une survie globale et sans rechute plus courtes dans le groupe **NGF-négatif**, contrairement au groupe **NGF-positif**. Suggérant la possibilité que **HO1** puisse avoir son propre rôle dans la progression de **BRCA**, indépendamment d'un mécanisme lié au **NGF**.

Une autre découverte intéressante de cette étude est que le modèle d'expression combiné de **NGF** et **HO1** est utile pour la prédiction du pronostic des patients **BRCA**. Les patients avec des tumeurs exprimant le **NGF** ont la survie globale et sans rechute les plus courtes. Les patients avec une tumeur qui n'exprime pas le **NGF** ou **HO1** présentent le temps de survie le plus long. L'analyse multivariée a révélé l'expression de **NGF/HO1** en tant qu'indicateur pronostique indépendant de la survie globale et sans rechute.

Les résultats contradictoires peuvent être liés aux divers rôles de **HO1** dans diverses conditions ou au statut des cellules au cours de la tumorigenèse. **HO1** peut être protecteur pour les cellules saines dans les lésions tumorales ; cependant, il pourrait être tumoral progressif dans les tumeurs déjà développées. Par conséquent, des études plus approfondies sont nécessaires pour explorer le(s) rôle(s) exact(s) de **HO1**.

Conclusion

&

Perspectives

Conclusion & Perspectives

Le cancer du sein représente la première cause de mortalité féminine en **Algérie** et dans le monde.

De multiples thérapies ont été développées afin de lutter contre ce type de cancer. Cependant, la toxicité de certains traitements, notamment la chimiothérapie, peut augmenter les dommages oxydatifs et contribue à l'évolution du cancer vers le stade métastase et à la résistance médicamenteuse. C'est pourquoi l'évaluation des facteurs pronostics, une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires et le rôle de certaines enzymes de la batterie antioxydante notamment l'hème oxygénase peuvent être nécessaires pour une décision thérapeutique adéquate.

L'effet de l'hème oxygénase (**HO-1**) est complexe, en raison de son activité, de ses multiples produits, des actions non canoniques de la protéine, de la pléthore d'interactions des produits et de la protéine avec d'autres voies.

D'autres travaux devraient être lancés afin d'élucider le rôle de **HO-1** et de ses produits dans l'initiation de la transformation tumorigène.

A l'issue de cette étude, plusieurs orientations peuvent être envisagées et pourront faire l'objet de travaux futurs :

- Démontrer le rôle de **HO-1** dans les cellules initiatrices de cancer.
- Etudier les interactions avec la machinerie des microARN, et les autres ARN non-codants, ainsi que le métabolisme dérégulé des cellules tumorales, endothéliales, immunitaires et d'autres cellules stromales, afin de développer des anticancéreux plus efficaces.
- Utilisation de meilleurs modèles génétiques pour une meilleure compréhension du rôle de **HO-1** dans la biologie du cancer.
- Des essais cliniques avec les approches **anti-HO-1** sont nécessaires pour déterminer l'effet direct de cette thérapie sur les cellules normales, et leur application est justifiée dans les tumeurs où l'implication de **HO-1** est convaincante.

L'hème oxygénase joue un rôle protecteur dans les cellules normales et son expression est également requise pour une réparation appropriée de l'ADN. Cela indique que le niveau

Conclusion & Perspectives

approprié d'expression de **HO-1** empêche les dommages d'ADN et cela peut inhiber l'initiation de la carcinogenèse dans les cellules normales. Comme la thérapie à base d'ARNsi ou l'inhibition pharmacologique de **HO-1** peut exercer des effets systémiques, l'inhibition de **HO-1** dans des conditions normales n'est pas bénéfique.

Par conséquent, des manipulations *in vivo* d'une manière ciblée uniquement sur les cellules cancéreuses, pourraient être nécessaires. Un tel exemple a été démontré par **Zhang et al.,(2013)** qui ont conçu des « **lenti-viraux** » vecteurs avec des séquences de miARN ciblant **HO-1** contrôlée par la cadhérine de l'endothélium vasculaire (VE-cad), afin d'étudier le rôle du silence **HO-1** dans le tissu pulmonaire uniquement.

Une partie importante des connaissances actuelles et par conséquent l'hypothèse du rôle de l'hème oxygénase (**HO-1**) dans les tumeurs mammaires, provient d'études dans lesquelles la stimulation avec divers petits composés moléculaires est étudiée. Cela soulève la question de la spécificité des interactions décrites et de nouveaux modèles génétiques offrent de meilleures compréhensions de ce problème complexe.

Références Bibliographiques

1. **Albregues, J., Meneguzzi, G., & Gaggioli, C. (2014).** L'invasion des cellules tumorales—Quand les fibroblastes s'en mêlent.
médecine/sciences, 30(4), P: 391-397.
2. **Aurousseau, B. (2002).** Les radicaux libres dans l'organisme des animaux d'élevage : conséquences sur la reproduction, la physiologie et la qualité de leurs produits.
INRAE Productions Animales, 15(1), P : 67–82.
3. **Bensakhria, A. (2018)** « Toxicologie Générale - Le Stress Oxydatif ». *Toxicologie Générale*,
ResearchGate,
4. **Bekarsabein, S., El khannoussi, B., Harakat, A., Albouzydy, A., Eimani, M., & Labraimi, A. (2002).** Adénocarcinome micropapillaire invasif du sein : entité agressive peu connue. Invasive micropapillary carcinoma of the breast : an under-recognized aggressive entity.
Oncologie, 12, P : 54-57.
5. **Belkacémi, Y., Gligorov, J., Chauvet, M.-P., Tsoutsou, P. G., Boussem, H., & Bourgier, C. (2010).** Radiothérapie et associations thérapeutiques dans le cancer du sein : actualités et innovations en situation adjuvante.
Journal de Gynécologie Obstétrique et Biologie de La Reproduction, 39(8), P : F63–F69.
6. **Chang, Y.-J., Chen, W.-Y., Huang, C.-Y., Liu, H.-H., & Wei, P.-L. (2015).** Glucose-regulated protein 78 (GRP78) regulates colon cancer metastasis through EMT biomarkers and the NRF-2/HO-1 pathway.
Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine, 36(3), P: 1859-1869.
7. **Chiang, S.K., Chen, S.E., & Chang, L.C. (2019).** A Dual Role of Heme Oxygenase-1 in Cancer Cells.
International Journal of Molecular Sciences, 20(1).
8. **Ciaffaglione, V., Intagliata, S., Pittalà, V., Marrazzo, A., Sorrenti, V., Vanella, L., Rescifina, A., Floresta, G., Sultan, A., Greish, K., & Salerno, L. (2020).** New Arylethanolidazole Derivatives as HO-1 Inhibitors with Cytotoxicity against MCF-7 Breast Cancer Cells.
International Journal of Molecular Sciences, 21(6), P:1923.
9. **de Lafontan, B., & Mery, E. (2002).** *Nouvelle classification TNM pour le cancer du sein applicable au 1er janvier 2003.*
Fiche technique, 13, P: 4
10. **Favier, A. (2003).** *Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique.*
L'actualité chimique, P: 8.
11. **Garrel, C., Ceballos-Picot, I., Germain, G et Al-Gubory, K.H. (2007).** Oxidative stress inductible antioxydant adaptive response during prostaglandin F2alpha-induced luteal cell death in vivo.
Free Rad Res. 41, P :251-9.

Références Bibliographiques

- 12. Globocan (2020).** Number of new cases in Algeria 2020, females, all ages.
The Global Cancer Observatory.
- 13. Grochot-Przeczek, A., Dulak, J. and Jozkowicz, A. (2012).** Haem oxygenase-1 : non-canonical roles in physiology and pathology .
Clin Sci (Lond) 122(3) P :93-103.
- 14. Hamdi-Chérif, M., Fouatih, Z et Hamouda, D. (2017).** Rapport du réseau national des registres de cancer Algérie Année 2015. Communication à la réunion nationale d'évaluation des registres de cancer. 24 Octobre 2017. Document du ministère de la santé de la population et de la réforme hospitalière Algérie.
- 15. Harbeck, N., Penault-Llorca, F. Cortes, J. Gnaut, M., Houssami, N., Poortmans, P., Ruddy, K., Tsang, J et Cardoso, F. (2019).** Breast cancer.
Nature Reviews. Disease Primers, 5(1), P: 66.
- 16. Ingle, S.B., Murdeshwar, H. G, & Siddiqui, S. (2016).** Papillary carcinoma of breast :
Minireview. World Journal of clinical cases,4 ,P:20.
- 17. Jang, H.-Y., Hong, O.-Y., Youn, H. J., Kim, M.-G., Kim, C.-H., Jung, S. H., & Kim, J.-S. (2020).** 15d-PGJ2 inhibits NF- κ B and AP-1-mediated MMP-9 expression and invasion of breast cancer cell by means of a heme oxygenase-1-dependent mechanism.
BMB Reports, 53(4), P: 212-217.
- 18. Jozkowicz A, Was H, Dulak J (2007).** Heme oxygenase-1 in tumors: Is it a false friend?
Antioxid Redox Signal. 2007;9:2099–2117.
- 19. Kim, D.-H., Kim, J.-H., Kim, E.-H., Na, H.-K., Cha, Y.-N., Chung, J. H., & Surh, Y.-J. (2009).** 15-Deoxy- Δ 12,14 -prostaglandin J 2 upregulates the expression of heme oxygenase-1 and subsequently matrix metalloproteinase-1 in human breast cancer cells : Possible roles of iron and ROS.
Carcinogenesis, 30(4), P: 645-654.
- 20. Kim, S. H., Saeidi, S., Zhong, X., Gwak, S.-Y., Muna, I. A., Park, S.-A., Kim, S. H., Na, H.-K., Joe, Y., Chung, H. T., Kim, K.-E., Han, W., & Surh, Y.-J. (2020).** Breast cancer cell debris diminishes therapeutic efficacy through heme oxygenase-1-mediated inactivation of M1-like tumor-associated macrophages.
Neoplasia, 22(11), P: 606-616.
- 21. Krstić J, Trivanović D, Mojsilović S, Santibanez JF (2015).** Transforming growth factor-beta and oxidative stress interplay: Implications in tumorigenesis and cancer progression.
Oxid Med Cell Longev. 2015;2015:654594.
- 22. Lamy, P.-J., Romieu, G., Rouanet, P., & Jacot, W. (2010).** Classification moléculaire des cancers du sein : Utilité en clinique.
Médecine Nucléaire, 34(1), P : 32-43.
- 23. Lecomte, J. (2009).** Effets des ligands de PPAR sur la voie de signalisation des œstrogènes dans les cellules cancéreuses mammaires.
Médecine humaine et pathologie. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 2009. Français.
ffNNT : 2009NAN10009ff. fftel-01748492f

Références Bibliographiques

24. Lee, H.-N., Jin, H.-O., Park, J.-A., Kim, J.-H., Kim, J.-Y., Kim, B., Kim, W., Hong, S.-E., Lee, Y.-H., Chang, Y. H., Hong, S.-I., Hong, Y. J., Park, I.-C., Surh, Y.-J., & Lee, J. K. (2015). Heme Oxygenase-1 Determines the Differential Response of Breast Cancer and Normal Cells to Piperlongumine.
Molecules and Cells, 38(4), P: 327-335.
25. Loboda, A., Jozkowicz, A., & Dulak, J. (2015). HO-1/CO system in tumor growth, angiogenesis and metabolism—Targeting HO-1 as an anti-tumor therapy.
Vascular Pharmacology, 74, P: 11-22.
26. Loboda, A., Damulewicz, M., Pyza, E., Jozkowicz, A., & Dulak, J. (2016). Role of Nrf2/HO-1 system in development, oxidative stress response and diseases: An evolutionarily conserved mechanism.
Cellular and Molecular Life Sciences, 73(17), P : 3221-3247.
27. Lyoumi, S., Tamion, F., Leplingard, A., Beaumont, C., Puy, H. and Lebreton, J.P. (2007). Rôles protecteurs de l'hème oxygénase et des catabolites de l'hème.
Hématologie 13(4) P : 251-265.
28. Mac Laren, D. (2007). Advances in sports and exercise science series. Nutrition and sport. 8. Antioxydants and free radicals by close GL and Mc Ardle F.Elsevier.
29. Migdal, C., & Serres, M. (2011). Espèces réactives de l'oxygène et stress oxydant.
médecine/sciences, 27(4), P : 405-412.
30. Na, H.-K., & Surh, Y.-J. (2014). Oncogenic potential of Nrf2 and its principal target protein heme oxygenase-1.
Free Radical Biology and Medicine, 67, P : 353-365.
31. Namer, Héry, M., Spielmann, M., & Gligorov, J. (2011). Cancer du sein en situation métastatique : compte-rendu du 1^{er} cours supérieur francophone de cancérologie Saint-paul de vence-nice ; 07-09 Janvier 2010.
Spinger Science & Business Media.
32. Nitti, M., Piras, S., Marinari, U., Moretta, L., Pronzato, M., & Furfaro, A. (2017). HO-1 Induction in Cancer Progression : A Matter of Cell Adaptation.
Antioxydants, 6(2), P: 29.
33. Nkondjock, A., & Ghadirian, P. (2005). Facteurs de risque du cancer du sein.
médecine/sciences, 21(2), P : 175-180.
34. Noh, S. J., Bae, J. S., Jamiyandorj, U., Park, H. S., Kwon, K. S., Jung, S. H., Youn, H. J., Lee, H., Park, B.-H., Chung, M. J., Moon, W. S., Kang, M. J., & Jang, K. Y. (2013). Expression of nerve growth factor and heme oxygenase-1 predict poor survival of breast carcinoma patients.
BMC Cancer, 13(1), P: 516.
35. Pincemail, J., & Meurisse, M. (1999). *Méthodes d'évaluation du stress oxydatif chez l'homme : Importance en matière de prévention.*

Références Bibliographiques

Cancerologie, P: 4

- 36. Podkalicka, P., Mucha, O., Józkwicz, A., Dulak, J., & Łoboda, A. (2018).** Heme oxygenase inhibition in cancers : Possible tools and targets.
Contemporary Oncology, 22(1A), P: 23-32.
- 37. Prunier, C. (2015).** *Evaluation de l'efficacité thérapeutique d'un nouvel inhibiteur des LIM Kinases ``Pyr1 '' dans le cancer du sein.*
ResearchGate, P: 261.
- 38. Ruddon, R.W. (2007).** Cancer biology.
Oxford university press , p: 4.
- 39. Ryter, S. W., Alam, J., & Choi, A. M. K. (2006).** Heme Oxygenase-1/Carbon Monoxide : From Basic Science to Therapeutic Applications.
Physiological Reviews, 86(2), P : 583-650.
- 40. Ryter, S. W., & Choi, A. M. K. (2016).** Targeting heme oxygenase-1 and carbon monoxide for therapeutic modulation of inflammation.
Translational Research, 167(1), P : 7-34.
- 41. Schuller, D. J., Wilks, A., Ortiz de Montellano, P. R., & Poulos, T. L. (1999).** Crystal structure of human heme oxygenase-1.
Nature Structural Biology, 6(9), P : 860-867.
- 42. Spielmann, M., Riofrio, M., & Zelek, L. (2000).** *Facteurs pronostiques du cancer du sein et facteurs prédictifs de la réponse au traitement.*
Mise au point, 1, P: 7.
- 43. Thiery, J.-P., & Huang, R. Y.-J. (2013).** La transition épithélio-mésenchymateuse dans le développement et les pathologies.
Correspondances en Onco-Théranostic, 2(3), P: 7
- 44. Vamecq, J., Vallée, L., Storme, L., Gelé, P., & Bordet, R. (2004).** Les acteurs immédiats du stress oxydatif—Key players in oxidative stress.
P HARMACOLOGIE, 18, P: 8.
- 45. Vanic, S., Feldman, R., & Gatalica, Z. (2017).** Apocrine carcinoma of the breast : A brief update on the molecular features ant targetable biomarkers.
Bosnian Journal of Basic Medical Sciences, 17, P: 9.
- 46. Verbeke S. (2010).** Etude des voies de signalisation du récepteur p75NTR impliquées dans la croissance des cellules de cancer du sein. Université des sciences et technologie de Lille.
- 47. Was, H., Dulak, J., & Jozkwicz, A. (2010).** Heme Oxygenase-1 in Tumor Biology and Therapy.

Références Bibliographiques

- Current Drug Targets*, 11(12), P: 1551-1570.
- 48. Wang, C. Y. and Chau, L. Y. (2010).** Heme oxygenase-1 in cardiovascular diseases : molecular mechanisms and clinical perspectives.
Chang Gung Med J 33(1)
- 49. World Health Organisation (2021, mars 3).** *Cancer*. <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
- 50. World Health Organization and International Agency for Research on Cancer. Globocan (2012)** Estimated cancer incidence, mortality a prevalence worldwide in 2012
- 51. Yoshida, T., & Sato, M. (1989).** Posttranslational and direct integration of heme oxygenase into microsomes.
Biochemical and Biophysical Research Communications, 163(2), P : 1086-1092.
- 52. Zhang, Y., et al.,(2013).** *Lung endothelial HO-1 targeting in vivo using lentiviral miRNA regulates apoptosis and autophagy during oxidant injury.*
FASEB J, 27(10) P :4041-58.
- 53. Zhao, Z., Zhao, J., Xue, J., Zhao, X., & Liu, P. (2016).** Autophagy inhibition promotes epithelial-mesenchymal transition through ROS/HO-1 pathway in ovarian cancer cells.
American Journal of Cancer Research, 6(10), 2162-2177.
- 54. Zhu, X.-F., Li, W., Ma, J.-Y., Shao, N., Zhang, Y.-J., Liu, R.-M., Wu, W.-B., Lin, Y., & Wang, S.-M. (2015).** Knockdown of heme oxygenase-1 promotes apoptosis and autophagy and enhances the cytotoxicity of doxorubicin in breast cancer cells.
Oncology Letters, 10(5), P: 2974-2980.
- 55. Zhu, X., Huang, S., Zeng, L., Ma, J., Sun, S., Zeng, F., Kong, F., & Cheng, X. (2017).** HMOX-1 inhibits TGF- β -induced epithelial-mesenchymal transition in the MCF-7 breast cancer cell line.
International Journal of Molecular Medicine, 40(2), P:411-417.

Annexes

Annexe 1 : Tableau I : Classification des stades du cancer du sein, en fonction de la classification TNM (Verbeke,2010).

Stade	Tumeur (T)	Ganglion (N)	Métastase (M)	Description
0	Tis (in situ)	N0	M0	Cancer non invasif
I	T1	N0	M0	Tumeur < 2 cm, pas de propagation à l'extérieure du sein
II	T0/1 T2 T3	N1 N0/1 N0	M0	Tumeur de 2 à 5 cm et/ou atteinte ganglionnaire satellite mineure
III	T0/1/2 T4 Tout T	N2 N0/1/2 N3	M0	Atteinte locale importante et/ou atteinte ganglionnaire satellite majeure
IV	Tout T	Tout N	M1	Tumeur avancée localement et métastases à distance

Annexe 2 : Tableau II : Classification moléculaire des cancers du sein (Verbeke,2010).

Sous-type	Description
Luminal A	Cancers de bas grade, représentant une réceptivité hormonale importante (ERα++) et une faible prolifération. Expression des cytokératines luminales 8, 18 et du gène <i>GATA3</i> impliqué dans le contrôle de la croissance et le maintien de la différenciation des tumeurs ER+. Généralement traités par hormonothérapie et de bon pronostic. P53 muté dans moins de 15% des cas.
Luminal B/C	Expression du ERα moins importante et prolifération plus forte que les cancers de type « Luminal A ». De pronostics moins bons et donc généralement traités par hormonothérapie + chimiothérapie. P53 muté dans 40 à 80% des cas.
HER2	Surexpression de HER2 mais également d'autres gènes situés dans l'amplicon <i>ErbB2</i> comme <i>GRB7</i> . Tumeurs négatives pour les récepteurs hormonaux et généralement de grade III. Associé à une surexpression de c-myc et à une forte prolifération. Pronostic défavorable mais bonne réponse aux traitements de type anthracycline, taxane et Trastuzumab (Herceptin®). P53 muté dans environ 70% des cas.
Basal-like	Tumeurs dites « triples négatives » c'est à dire n'exprimant pas les récepteurs hormonaux (ER et PgR) et ne surexprimant pas le récepteur HER2. Expression des cytokératines basales 5/6, 14 et 17, des caveolines 1 et 2, de l'EGFR et de c-kit. P53 muté dans 80% des cas et tumeurs souvent associées à une mutation de BRCA1. Pronostic le plus défavorable. Ne répondent pas aux traitements hormonaux et au Trastuzumab mais les chimiothérapies classiques peuvent aider. Présente un intérêt pour les essais cliniques d'anti-EGFR ou d'anti-angiogène.
Normal-like	Sous-type assez mal défini. Exprime des gènes connus pour être exprimé dans les cellules non-épithéliales et le tissu adipeux. Pronostic intermédiaire