

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

MÉMOIRE PRÉSENTÉ À
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE

PAR
SÉBASTIEN BARIBEAU

LE RESVÉRATROL, UN INHIBITEUR DE LA TRANSITION ÉPITHÉLIALE-
MÉSENCHYMALE INDUITE PAR LE CISPLATINE

FÉVRIER 2014

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

AVANT-PROPOS ET REMERCIEMENTS

Le chapitre I de cet ouvrage est une introduction du sujet d'étude de ma maîtrise et présente les principaux acteurs impliqués dans mon projet de recherche. Le chapitre II contient un article scientifique. Pour ce dernier, j'ai participé à la planification du projet, aux expériences, au traitement des résultats ainsi qu'à la rédaction de l'article; Parvesh Chaudhry, stagiaire postdoctorale, a supervisé le développement du projet et participé à l'analyse des résultats; Éric Asselin, mon directeur de recherche, a participé à la planification du projet et a révisé le manuscrit de l'article. Finalement, le chapitre III présente une discussion concernant les résultats obtenus ainsi que des perspectives pour des études futures.

Je voudrais remercier toutes les personnes qui m'ont soutenu et ont cru en moi au cours de ma maîtrise et qui m'ont permis de prendre part à un projet de recherche qui m'a fortement intéressé. Tout d'abord, un merci particulier à mon directeur de recherche, Éric Asselin, pour son support continu et pour sa grande disponibilité tout au long de mes études à la maîtrise ainsi que pour la confiance qu'il a témoignée à mon endroit. Je voudrais aussi remercier Sophie Parent et Valérie Leblanc qui m'ont supporté sur le plan technique et par leur expertise au cours de mes recherches. J'adresse également des remerciements particuliers à Parvesh Chaudhry et à Mohan Singh qui m'ont appris les rudiments du travail en laboratoire au cours de mes deux stages avant mon entrée à la maîtrise et qui m'ont encadré lorsque j'ai commencé mon cheminement aux cycles supérieurs. Je tiens également à remercier mes collègues du laboratoire, qui y sont encore ou qui y ont terminé leur cheminement, pour leur support et pour les discussions que nous avons eues concernant nos recherches. Je veux également remercier le Réseau québécois en reproduction, les Fonds de recherche du Québec – Santé ainsi que les Instituts de recherche en santé du Canada pour leur soutien financier au cours de mes études à la maîtrise. Ce support a été très précieux et apprécié et m'a permis de me concentrer pleinement sur la réalisation de mes travaux de recherche.

RÉSUMÉ

L'objectif de cette étude est d'étudier la relation existant entre le cisplatine et la transition épithéliale-mésenchymale (EMT) chez les cancers ovariens en utilisant un modèle de chimiorésistance au cisplatine : les cellules A2780 (sensibles) et les cellules A2780CP (résistantes). Pour ce faire, l'analyse de l'expression de différents marqueurs de l'EMT (Snail, Vimentine, ZEB1) a été effectuée par Western Blot ainsi que par RT-PCR. De plus, l'étude morphologique des cellules a été réalisée après un traitement de trois jours au cisplatine afin de déterminer si les cellules avaient adopté une morphologie mésenchymale. Un essai de migration cellulaire a aussi été effectué pour mesurer la capacité de migration cellulaire. Les résultats indiquent que le cisplatine induit la transition épithéliale-mésenchymale chez le cancer ovarien, autant chez les cellules sensibles, A2780, que chez les cellules résistantes, A2780CP. Le cisplatine a induit une augmentation des niveaux de Snail, de Vimentine et de ZEB1, et un changement morphologique vers un phénotype mésenchymal a été observé, mais la capacité de migration cellulaire n'a pas été augmentée.

En second lieu, le Resvératrol, une molécule naturelle reconnue pour son action protectrice contre le cancer et plusieurs autres maladies, a été utilisé afin de tenter de renverser les changements observés avec le cisplatine. À faible dose, le Resvératrol induit une légère augmentation de prolifération cellulaire et, chez les cellules sensibles au cisplatine, l'inhibition de croissance est synergique entre le cisplatine et le Resvératrol. Le Resvératrol a efficacement inhibé l'induction de l'EMT par le cisplatine chez les deux lignées cellulaires et a inhibé le changement morphologique et la capacité de migration des cellules. L'effet du Resvératrol pourrait se produire par inhibition de la MAPK Erk chez les deux lignées, confirmé par l'inhibiteur spécifique U0126, mais pourrait aussi impliquer un mécanisme posttraductionnel chez A2780CP pour diminuer l'expression de Snail. De plus, le Resvératrol induit la sénescence chez les deux lignées cellulaires.

En regard de ces aspects, le Resvératrol possède un potentiel intéressant dans la lutte contre le cancer. De plus, dans le cas d'un cancer chimiorésistant, le Resvératrol peut tout de même inhiber l'induction de l'EMT et induire la sénescence, ce qui renforce davantage l'intérêt pour cette molécule. Toutefois, contrairement à l'hypothèse initiale, le cisplatine induit l'EMT autant chez les cellules sensibles au cisplatine que chez les cellules résistantes. Parallèlement, nous avons déterminé que les mutations de p53 n'influencent pas l'induction de l'EMT par le cisplatine en utilisant quatre lignées cellulaires possédant différentes mutations pour cette protéine.

Mots-clés : cancer ovarien, cisplatine, transition épithéliale-mésenchymale (EMT), Resvératrol, sénescence, Snail, chimiorésistance, p53.

TABLE DES MATIÈRES

AVANT-PROPOS ET REMERCIEMENTS	II
RÉSUMÉ.....	III
LISTE DES FIGURES	VII
LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES	VIII
LISTE DES SYMBOLES.....	X
CHAPITRE I	1
INTRODUCTION.....	1
1.1 Le cancer en général	1
1.2 Le cancer ovarien.....	3
1.2.1 Physiologie de l'ovaire	4
1.2.2 Facteurs de risque et facteurs protecteurs.....	5
1.2.3 Symptômes du cancer ovarien	6
1.2.4 Classification des cancers ovariens.....	6
1.2.5 Traitements du cancer ovarien.....	6
1.2.5.1 La chirurgie.....	7
1.2.5.2 La chimiothérapie	7
1.3 Mort cellulaire	8
1.3.1 Apoptose	9
1.3.2 Nécrose	11
1.3.3 Autophagie.....	11
1.3.4 Sénescence	12
1.3.5 Catastrophe mitotique	13
1.3.6 Chimiorésistance.....	13
1.4 La transition épithéliale-mésenchymale	14
1.4.1 Importance de l'EMT dans le cancer	17
1.4.2 La chimiothérapie et l'EMT	17
1.4.3 La famille Snail.....	19
1.4.3.1 Snail	19

1.4.3.2 Slug.....	21
1.4.4 La famille ZEB	22
1.4.4.1 ZEB1.....	22
1.4.4.2 ZEB2.....	23
1.4.5 Les cadhérines.....	24
1.4.6 La β -caténine.....	25
1.4.7 La Vimentine	25
1.4.8 Erk.....	26
1.4.8.1 Erk et l'EMT.....	27
1.4.9 p53	27
1.4.9.1 p53 et l'EMT.....	29
1.4.10 Le facteur de croissance transformant β	30
1.4.10.1 Interactions entre le TGF- β et p53.....	31
1.5 Le Resvératrol.....	31
1.5.1 Mécanismes d'action	32
1.5.2 Le Resvératrol et l'EMT	34
1.5.3 Inconvénients du Resvératrol.....	35
1.6 Objectifs de l'étude.....	36
CHAPITRE II	37
RESVERATROL INHIBITS CISPLATIN-INDUCED EPITHELIAL-TO-MESENCHYMAL TRANSITION IN OVARIAN CANCER CELL LINES ..	37
2.1 Contribution des auteurs	37
2.2 Résumé de l'article	37
2.3 Article scientifique.....	38
Abstract	38
Introduction	39
Materials and methods	42
Reagents.....	42
Cell culture and treatment.....	42
Detection of cell death by flow cytometry	43
MTT assay	43

Western Blot.....	43
Cell morphology	44
Wound healing assay	44
Reverse Transcriptase PCR (RT-PCR).....	45
Senescence-associated β -galactosidase staining.....	45
Densitometry and Statistical analysis	45
Results.....	46
Resveratrol induces cell death in ovarian cancer cells	46
Resveratrol potentiates Cisplatin-induced decrease in cell proliferation	47
Resveratrol inhibits Cisplatin-mediated EMT induction in ovarian cancer cell lines	47
Activation of the MAPK Erk is associated with Cisplatin-induced EMT	48
Resveratrol blocks Cisplatin-induced morphological changes.....	48
Resveratrol induces senescence.....	49
Resveratrol inhibits cell migration.....	49
Discussion	50
Figures.....	56
Figure legends	62
References	66
CHAPITRE III	70
RÉSULTATS SUPPLÉMENTAIRES	70
3.1 Étude p53 - EMT	70
3.2 Étude de la mort cellulaire avec le TGF- β , les mutations de p53 et le cisplatine	74
CHAPITRE IV	76
DISCUSSION	76
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	88

LISTE DES FIGURES

Figure	Page
Figure 1.1	Les caractéristiques du cancer (adaptée de [4]).....2
Figure 1.2	Progression du cancer vers la métastasie (adapté de [5])......3
Figure 1.3	Anatomie du système reproducteur féminin (adaptée de [12]).5
Figure 1.4	Représentation schématique du cisplatine (tirée de [20]).....8
Figure 1.5	Représentation schématique de l'apoptose (adaptée de [24]).9
Figure 1.6	Représentation schématique de l'autophagie (tiré de [30]).12
Figure 1.7	Processus de l'EMT et de la MET (tiré de [34]).15
Figure 1.8	Induction réciproque des facteurs de l'EMT (tiré de [42])......17
Figure 1.9	Répartition des mutations dans la protéine p53 (tiré de [116]).29
Figure 1.10	Structure chimique du Resvératrol.32
Figure 3.1	Le cisplatine induit l'EMT indépendamment des mutations de p53.71
Figure 3.2	Les cellules SKOV-3 possèdent un phénotype mésenchymal en conditions basales.....73
Figure 3.3	Étude de la mort cellulaire dans quatre lignées de cancer ovarien... 75

LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

ADN	Acide désoxyribonucléique
BMP	Bone morphogenetic protein
bp	Paires de bases
DMSO	Diméthylsulfoxyde
dT	Désoxythymidine
E-cadhérine	Cadhérine épithéliale
EGF	Facteur de croissance épidermique
EMT	Transition épithéliale-mésenchymale
ER α	Récepteur à l'œstrogène α
ER β	Récepteur à l'œstrogène β
Erk	Extracellular signal regulated kinase
FGF	Facteur de croissance fibroblastique
FSH	Hormone folliculostimulante
HCl	Acide chlorhydrique
HGF	Facteur de croissance hépatocytaire
Hif-1 α	Hypoxia inducible factor 1 α
HRP	Peroxydase de Raifort
IFG	Facteur de croissance insulin-like
LH	Hormone lutéinisante
MAPK	Mitogen activated protein kinase
Mdm2	Murine double minute 2
MET	Transition mésenchymale-épithéliale (opposé de l'EMT)
M-MLV	Virus de la leucémie murine de Moloney
MMP4	Métalloprotéinase de matrice 4
MMP9	Métalloprotéinase de matrice 9
MTT	Bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium
N-cadhérine	Cadhérine neurale
PBS	Tampon phosphate salin
PBS-T	Tampon phosphate salin + Tween 20

PDGF	Facteur de croissance dérivé des plaquettes
PI	Iodure de propidium
RNA	Acide ribonucléique
rpm	Rotations par minute
SDS	Dodécylsulfate de sodium
Smad	Small and mothers against decapentaplegic
TGF- β	Facteur de croissance transformant β
TNF α	Facteur de nécrose tumorale α
ZEB	Zinc finger E-box-binding homeobox

LISTE DES SYMBOLES

α	Alpha
β	Bêta
$^{\circ}\text{C}$	Degré Celsius
κ	Kappa
g	Gramme
h	Heure
L	Litre
m	Mètre
μ	Micro
M	Molaire
n	Nano

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1 Le cancer en général

Le cancer est une maladie qui touche de nombreuses personnes dans le monde et qui représente un problème de santé majeur. Au Canada, il s'agit de la cause de mortalité la plus importante tous âges et sexes confondus, avec près de 40 % de la mortalité [1]. En 2012, il a été estimé que 186 400 nouveaux cas de cancer ont été diagnostiqués et que 75 700 personnes sont décédées de cette maladie [2].

En conditions normales, l'organisme possède des mécanismes de régulation qui lui permettent de contrôler la croissance et l'état des cellules. Par exemple, lorsqu'un tissu a atteint la confluence, c'est-à-dire que les cellules recouvrent tout l'espace disponible, des signaux d'arrêt de croissance indiqueront aux cellules de cesser de proliférer. De plus, lorsque des cellules sont endommagées, elles procéderont à l'apoptose, une forme de mort cellulaire programmée, et seront éliminées afin d'éviter de devenir nuisibles pour l'organisme. De cette façon, l'organisme assure un équilibre entre croissance et mort cellulaire afin de maintenir un état fonctionnel normal. Cependant, au cours de leur vie, certaines cellules acquièrent divers défauts génétiques qui leur permettent de contrer les mécanismes de défense de l'organisme et de progresser vers un stade tumoral. Pour ce faire, les cellules doivent principalement acquérir six caractéristiques qui sont présentées dans la figure 1.1 [3, 4].

Afin d'acquérir ces caractéristiques, les cellules subiront divers dommages génétiques principalement dans deux catégories de gènes. D'une part, les proto-oncogènes, qui deviendront des oncogènes « activés » lorsque mutés, sont des protéines qui favorisent principalement la croissance et la survie cellulaire. Il est également

possible que des oncogènes soient surexprimés lorsqu'un gène est amplifié, c'est-à-dire présent en un plus grand nombre de copies, ce qui mène à une surexpression de l'oncogène et donc à une activité anormalement élevée de cette protéine. D'autre part, les suppresseurs de tumeur (responsables d'induire un arrêt du cycle cellulaire en cas de dommage à l'ADN, de réparer les dommages à l'ADN ou d'induire la mort cellulaire) perdront leurs fonctions lorsque mutés ou lorsque leur expression sera réprimée. Cela permet donc aux cellules de poursuivre leur croissance et d'accumuler davantage de défauts génétiques. L'un des suppresseurs de tumeurs les plus importants dans le cancer est la protéine p53, laquelle est mutée dans plus de 50 % des cas de cancer. Habituellement, plus d'une mutation est requise afin de mener à un stade tumoral, ce qui explique que le développement d'un cancer est un processus qui requiert du temps et que plusieurs cancers apparaissent à un âge plus avancé chez le patient [3].

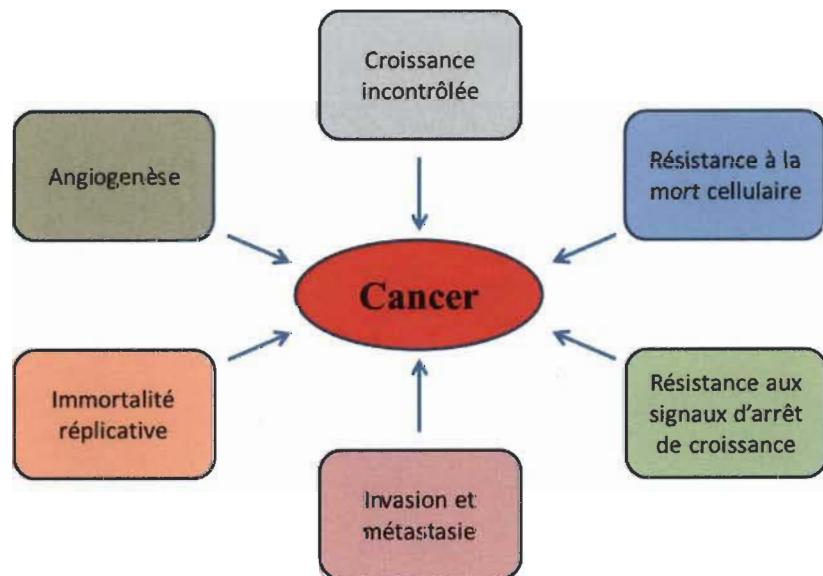


Figure 1.1 Les caractéristiques du cancer (adaptée de [4]).

La progression vers un état cancéreux se déroule en plusieurs étapes présentées dans la figure 1.2. Tout d'abord, une cellule perdra le contrôle de son cycle cellulaire et des mécanismes de mort cellulaire, ce qui mènera à une prolifération excessive et désordonnée. Parmi ces cellules, certaines procéderont par le processus de transition épithéliale-mésenchymale (EMT, voir section 1.4) et acquerront une plus grande

capacité de migration et d'invasion. Ce potentiel nouvellement acquis leur permettra de rejoindre la circulation sanguine et, éventuellement, de coloniser des organes distants où, par le processus de transition mésenchymale-épithéliale (MET, voir section 1.4), elles retrouveront un phénotype davantage différencié qui leur permettra de former une nouvelle tumeur, ou métastase [5].

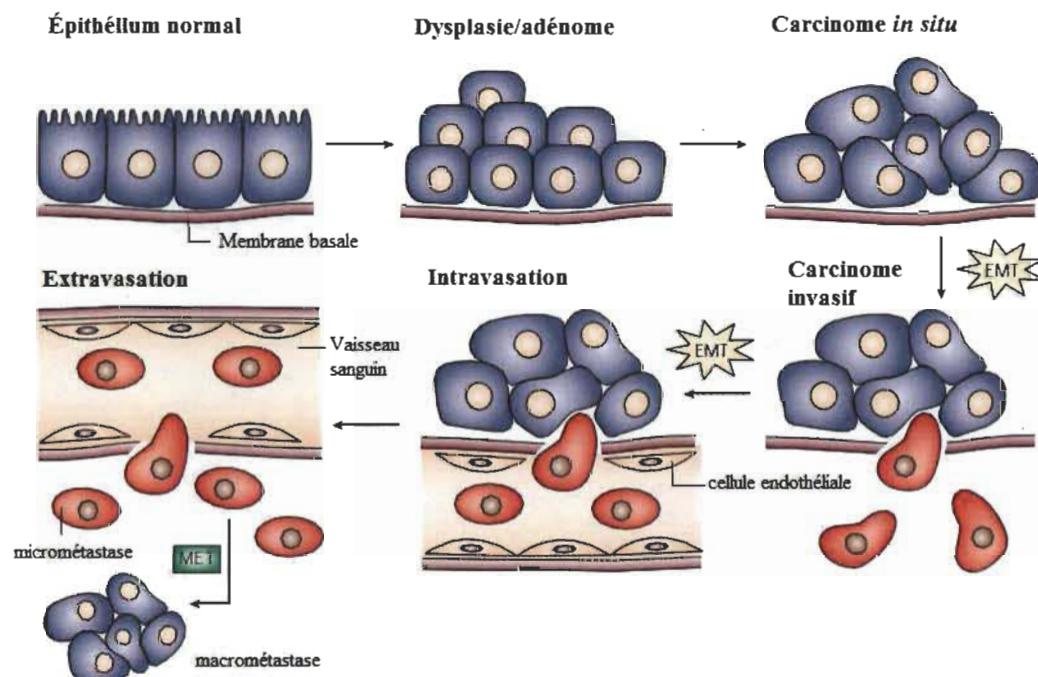


Figure 1.2 Progression du cancer vers la métastasie (adapté de [5]).

1.2 Le cancer ovarien

Le cancer ovarien représente un cancer gynécologique dévastateur chez la femme. En 2012, il a été estimé que 2600 nouveaux cas ont été diagnostiqués au Canada et que 1750 femmes sont décédées des suites de cette maladie, faisant de cette maladie celle avec le taux de mortalité le plus élevé parmi les cancers gynécologiques chez la femme [2]. Malgré son incidence relativement faible, le cancer ovarien est parmi les plus mortels puisque son diagnostic est souvent tardif en raison de l'absence de symptômes spécifiques [6]. De ce fait, au moment du diagnostic, plusieurs patientes présentent déjà un cancer avancé qui a progressé et a atteint d'autres organes par métastasie [7]. La

majorité des cas de cancer ovarien sont des carcinomes, c'est-à-dire des cancers issus des cellules épithéliales et stromales à la surface de l'ovaire, et environ 90 % des cancers malins sont dans cette catégorie. [8, 9]. Pour expliquer cela, il est suggéré que l'ovulation et la réparation de l'épithélium répétées entraîne une augmentation des risques d'accumuler des défauts génétiques. De plus, la présence d'un kyste ovarien pourrait produire un microenvironnement favorable à la prolifération [10]. Il est également possible que certains cancers ovariens proviennent des trompes de Fallope et soient difficilement distinguables d'un véritable cancer ovarien en raison, d'une part, de la proximité anatomique et, d'autre part, des fortes ressemblances histologiques entre les cellules de ces organes [11].

1.2.1 Physiologie de l'ovaire

Les ovaires sont deux petits organes situés de chaque côté de l'utérus et mesurant environ 3cm par 2cm par 1cm. Ils sont reliés à l'utérus et aux trompes de Fallope par le ligament large ainsi qu'à la cavité pelvienne par le ligament suspenseur de l'ovaire (Figure 1.3). Les ovaires sont responsables, lors de chaque cycle menstruel, de produire un ovule afin de permettre la reproduction. Cet ovule sera capté par les trompes de Fallope, endroit où l'ovule sera fécondé par un spermatozoïde, et acheminé jusqu'à l'utérus pour implantation s'il y a fécondation. Le cycle ovarien peut être divisé en trois principales phases : la phase folliculaire, l'ovulation et la phase lutéale. Au cours de la phase folliculaire, sous l'effet de la FSH, quelques follicules entreprendront une maturation, mais seulement un ovule mature sera formé. Ensuite, sous l'effet d'une augmentation des niveaux d'œstrogène, la glande pituitaire antérieure sécrètera la LH, une hormone qui provoquera l'ovulation, c'est-à-dire la sortie de l'ovule de l'ovaire et son entrée dans la trompe de Fallope pour être fécondée. Après l'ovulation, le follicule mature ayant libéré l'ovule se développe en une structure appelée le corps jaune qui sera responsable de sécréter d'importantes quantités d'œstrogène et de progestérone. Ces hormones auront pour effet d'une part de préparer l'utérus à recevoir un ovule fécondé et, d'autre part, d'inhiber la sécrétion de FSH et de LH afin d'empêcher un retour immédiat à la phase folliculaire. Si l'ovule est fécondé et parvient à s'implanter dans

l'utérus, il y aura grossesse. Dans le cas contraire, il y aura dégradation du corps jaune, menstruations et reprise du cycle menstruel [12-14].

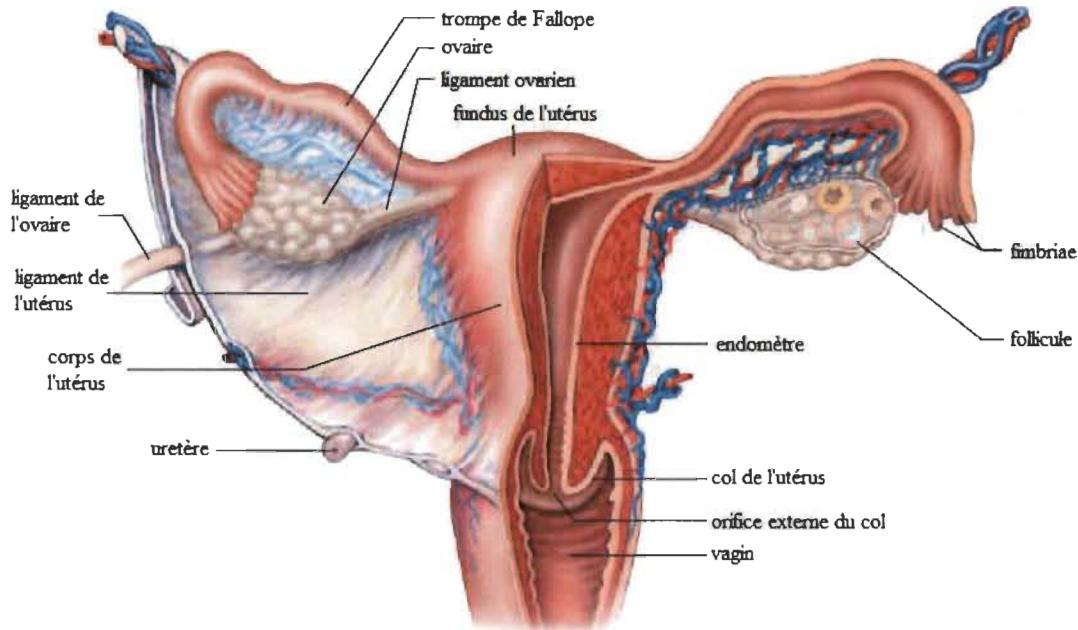


Figure 1.3 Anatomie du système reproducteur féminin (adaptée de [12]).

1.2.2 Facteurs de risque et facteurs protecteurs

En raison de leur implication dans le système reproducteur féminin, les ovaires sont soumis à d'importantes variations hormonales, en particulier les œstrogènes et la progestérone. En raison de leurs fonctions promitotiques, les œstrogènes représentent un facteur de risque pour le cancer ovarien, par exemple dans le cas d'une hormonothérapie substitutive avec œstrogène seule ou dans le cas de l'obésité, une situation qui augmente les niveaux d'estrogènes [15]. La nulliparité représente également un facteur de risque et, en contrepartie, une grossesse à terme a un effet protecteur contre le cancer ovarien [6]. Des défauts génétiques dans les gènes BRCA1 et BRCA2, codant pour des protéines importantes dans la réparation de l'ADN, ainsi que dans le gène codant pour la protéine p53, augmentent également le risque de développer un cancer ovarien. De plus, comme pour de nombreuses autres maladies, le tabagisme et l'amiante sont également des facteurs de risque [15].

1.2.3 Symptômes du cancer ovarien

Les principaux symptômes du cancer ovarien ne sont pas spécifiques qu'à cette maladie et apparaissent fréquemment tardivement dans la progression de ce cancer, ce qui explique que le diagnostic ait fréquemment lieu à un stade avancé. Un cancer ovarien peut être caractérisé par des changements digestifs (ballonnements, gaz, nausées, brûlures d'estomac), des troubles intestinaux et urinaires, des saignements vaginaux anormaux, une douleur au dos ou lors de rapports sexuels ainsi que de la fatigue et une perte de poids. Lorsque présent à un stade plus avancé, il peut également y avoir un épanchement pleural et une accumulation de liquide abdominal (ascites) [15].

1.2.4 Classification des cancers ovariens

La classification du cancer ovarien se fait par le chirurgien lorsque celui-ci procède à la cytoréduction. Pour ce faire, il note la progression de la tumeur ovarienne et la classe en fonction de son étendue. Un cancer de stade I est limité aux ovaires; au stade II, le cancer a atteint d'autres organes environnants dans le bassin; le stade III indique la présence de métastases abdominales et potentiellement de métastases hépatiques. Finalement, le stade IV indique la présence de métastases distantes avec possibilité d'épanchement pleural, des signes que le cancer ovarien a progressé et est désormais à un stade avancé. De plus, une indication de l'atteinte d'organes distants (M0 : sans atteinte, M1 : métastases distantes) ainsi qu'une évaluation des ganglions lymphatiques (Nx : impossible d'évaluer l'état des ganglions, N0 : ganglions sains, N1 : atteinte des ganglions lymphatiques proximaux) peuvent être fournies lors de l'intervention par le chirurgien [15-17].

1.2.5 Traitements du cancer ovarien

Le choix du traitement à employer pour traiter un cancer ovarien dépend entre autres de la progression de la tumeur ainsi que de l'âge de la patiente. Habituellement, 2 options principales sont envisagées pour traiter le cancer ovarien : la chirurgie et la

chimiothérapie. Dans le cas de ce cancer, la radiothérapie est très rarement utilisée et sert plutôt à traiter des métastases.

1.2.5.1 *La chirurgie*

La première étape du traitement d'un cancer ovarien consiste en une cytoréduction par chirurgie afin d'enlever un maximum de la tumeur visible, autant au niveau de l'ovaire qu'au niveau de la cavité abdominale et des organes avoisinants, s'il y a lieu [10]. Dans certains cas, lorsque le cancer est diagnostiqué chez une femme ayant atteint la ménopause, il est possible de complètement retirer l'utérus, les trompes de Fallope ainsi que les ovaires puisque cela ne supprime pas la fertilité de la femme. Cependant, chez une femme plus jeune un traitement moins drastique devra être employé afin de préserver au moins un ovaire fonctionnel [7].

1.2.5.2 *La chimiothérapie*

Après la chirurgie, un traitement adjuvant de chimiothérapie est fréquemment administré afin d'éliminer toute tumeur résiduelle ou métastase présente chez la patiente. L'objectif de ce traitement est d'attaquer les cellules tumorales avec des agents toxiques afin d'induire la mort cellulaire et, ainsi, éliminer la tumeur. Ce traitement est habituellement administré par voie intraveineuse. Une administration intrapéritonéale a démontré une efficacité supérieure de 20 à 30 % en ce qui concerne la survie globale et l'absence de progression tumorale. Cependant, cette voie d'administration est peu utilisée principalement en raison des complications qui peuvent s'en suivre telles qu'utilisation du cathéter, adhésion, infections et de la toxicité plus importante associée à ce mode de traitement [10, 18]. Un traitement couramment utilisé consiste en l'administration simultanée d'un taxane ainsi que d'un composé de platine afin d'agir sur les cellules cancéreuses par deux mécanismes différents et ainsi augmenter les chances de succès du traitement.

Les taxanes, par exemple le paclitaxel, une molécule naturelle initialement isolée de l'écorce de l'if de l'Ouest (*Taxus brevifolia*), sont des agents ayant pour fonction de stabiliser les microtubules et d'empêcher la dépolymérisation de ceux-ci. De ce fait, il y aura induction de l'arrêt de la croissance cellulaire lorsque les cellules voudront procéder à la mitose, ce qui causera éventuellement la mort cellulaire par apoptose [19].

Les composés de platine, par exemple le cisplatine qui est utilisé en clinique depuis 1978 et est encore couramment utilisé aujourd'hui pour traiter le cancer ovarien (Figure 1.4), et ses dérivés carboplatine et oxaliplatine, sont des agents s'intercalant dans l'ADN. Lorsque le cisplatine se retrouvera en milieu aqueux, il acquerra une charge positive qui lui permettra de se fixer sur l'ADN, en particulier sur l'azote en position 7 de la guanine et de former des ponts entre les nucléotides. Cela provoquera un encombrement qui entravera le travail d'enzymes cellulaires impliquées notamment dans la transcription des gènes ainsi que dans la réPLICATION de l'ADN. La cellule cessera alors son cycle cellulaire pour tenter de réparer les dommages et, si ceux-ci sont trop importants, la cellule entrera en mort cellulaire par apoptose (voir section 1.3.1) [20-23].

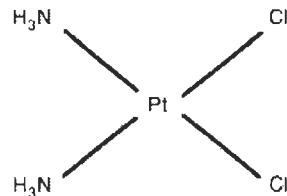


Figure 1.4 Représentation schématique du cisplatine (tirée de [20])

1.3 Mort cellulaire

Afin de maintenir un état physiologique, un organisme pluricellulaire doit constamment contrôler la croissance de ses cellules afin d'empêcher une prolifération excessive ou pallier à une diminution d'une certaine population cellulaire. De plus, l'organisme doit également veiller à ce que ses cellules soient en bon état en

fonctionnels afin de fonctionner normalement. Cependant, dans le cas du cancer, cet équilibre se retrouve brisé au profit d'une survie et d'une prolifération excessives.

1.3.1 Apoptose

La mort cellulaire programmée, ou apoptose, est un mécanisme de suicide cellulaire visant à éliminer les cellules trop âgées ou devenues nuisibles pour l'organisme. Outre cette fonction de protection, l'apoptose est également impliquée dans le développement embryonnaire. Par exemple, lors de la formation des mains et des pieds, certaines cellules entreront en apoptose afin de permettre la formation des doigts et des orteils. Dans le cas du cancer, la résistance aux stimuli apoptotiques représente un problème majeur puisque les traitements disponibles pour traiter cette maladie reposent majoritairement sur cette stratégie afin de tuer les cellules cancéreuses.

Morphologiquement, une cellule en apoptose présente des caractéristiques distinctes, et ce, à plusieurs niveaux dans la cellule. Il y aura bourgeonnement de la membrane cellulaire ainsi qu'une condensation et une fragmentation nucléaire. La formation de corps apoptotique suivra afin de permettre le maintien des composantes cellulaires dans une enveloppe qui évitera leur déversement dans le milieu extracellulaire, évitant une inflammation ainsi que des dommages aux autres cellules avoisinantes. Finalement, les corps apoptotiques seront phagocytés par des cellules immunitaires afin d'effacer toute trace de la cellule [3]. Une représentation schématique de l'apoptose est présentée à la figure 1.5.

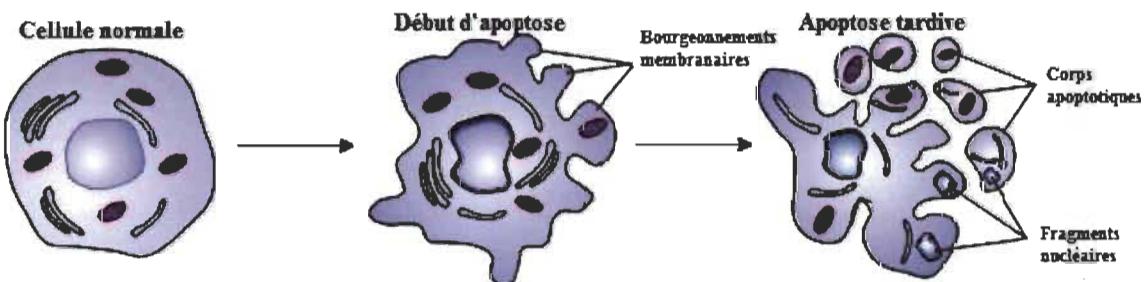


Figure 1.5 Représentation schématique de l'apoptose (adaptée de [24]).

Les protéines effectrices de l'apoptose sont les caspases, des cystéine-protéases qui reconnaissent plusieurs substrats différents qui sont impliqués entre autres dans la survie cellulaire, la réparation de l'ADN et le maintien de la structure cellulaire [25]. Ces protéines sont strictement régulées et sont présentes sous forme de procapsases qui doivent être clivées pour devenir actives. Un système de régulation similaire est également présent dans le cas des facteurs sanguins ou des enzymes digestives [3].

Il existe principalement deux mécanismes pour déclencher l'apoptose. D'une part, l'apoptose peut être induite par la voie intrinsèque, c'est-à-dire que le stimulus est intracellulaire et impliquera la mitochondrie. Cette voie peut notamment être activée en réponse à d'importants dommages à l'ADN, à une hypoxie prolongée ou encore à un manque de facteurs de croissance nécessaires à la survie cellulaire. Lors de ce processus apoptotique, le cytochrome C sera relâché de la mitochondrie et se retrouvera dans le cytoplasme, ce qui entraînera le recrutement d'Apaf-1 et de la pro-caspase-9. Au sein de ce complexe, la pro-caspase-9 sera clivée en caspase-9 active et pourra cliver d'autres caspases pour induire l'apoptose [3, 26, 27]. D'autre part, l'apoptose peut être activée par la voie extrinsèque qui implique la liaison d'un ligand à un récepteur de mort cellulaire. Par exemple, les cellules avoisinantes enverront un ligand (par exemple, le ligand Fas) à une cellule devenue nuisible pour lui indiquer d'entrer en apoptose lorsque ledit ligand liera son récepteur (FasR). Le récepteur se retrouvera alors activé en entraînera une cascade intracellulaire, par son motif intracellulaire de mort cellulaire, à l'activation de la caspase-8. Une fois activée, cette caspase entraînera l'activation des caspases effectrices et, par conséquent, à la mort cellulaire par apoptose [3, 26]. Il existe également la mort par apoptose induite par les cellules immunitaires. Dans cette situation, par exemple, un lymphocyte T cytotoxique larguera des perforines pour former des pores dans la membrane de la cellule cible ainsi que les granzymes, lesquelles seront responsables de cliver divers substrats cellulaires et d'induire directement l'apoptose [28].

1.3.2 Nécrose

Contrairement à l'apoptose, la nécrose est une mort cellulaire accidentelle de la cellule lorsque celle-ci est brisée par un impact mécanique ou une infection par un microorganisme. Lors de l'éclatement de la cellule, son contenu cytoplasmique sera déversé dans le milieu extracellulaire et entraînera une inflammation ainsi que des dommages aux cellules avoisinantes [3, 26]. Il s'agit donc d'une mort non contrôlée nuisible pour l'organisme.

1.3.3 Autophagie

L'autophagie est un processus cellulaire normal qui, un peu comme le protéasome pour les protéines, permet à la cellule de recycler ses protéines et organelles usées ou défectueuses. Au cours de ce procédé, les protéines et organelles à recycler seront isolées dans une double membrane, laquelle fusionnera ensuite avec des lysosomes afin de permettre la dégradation de son contenu. Il s'agit d'un mécanisme normal qui peut agir comme contrôle de qualité et qui augmente la résistance au stress, par exemple en offrant une source supplémentaire d'énergie et de matériaux de base. Toutefois, si la voie autophagique est suractivée, la cellule dégradera une trop grande quantité de matériel et, le cas échéant, sera dirigée vers une mort cellulaire indépendante de l'apoptose [29]. Une représentation de ce processus cellulaire est présentée à la figure 1.6. Contrairement à l'apoptose, une cellule qui procède à l'autophagie n'adopte pas de changements morphologiques particuliers.

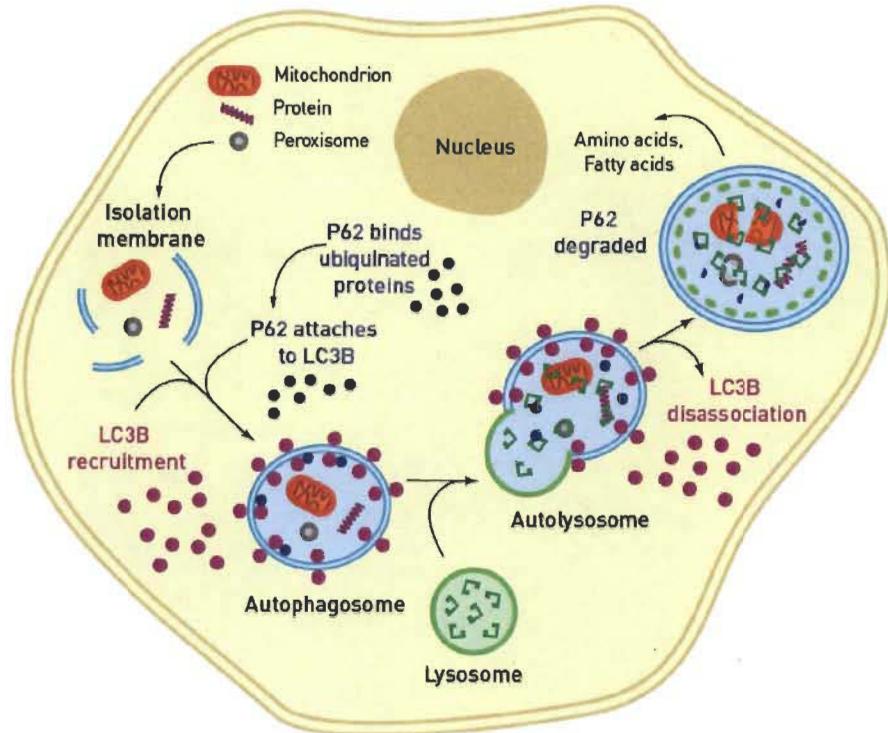


Figure 1.6 Représentation schématique de l'autophagie (tiré de [30]).

1.3.4 Sénescence

Malgré que la sénescence ne représente pas véritablement un processus de mort cellulaire, elle représente tout de même un équivalent. La sénescence est un processus qui garde la cellule en vie, mais qui arrête définitivement la croissance de celle-ci. Ainsi, l'organisme peut empêcher la prolifération excessive d'une cellule endommagée ou potentiellement nuisible [29]. Il s'agit donc d'un mécanisme protecteur entre autres contre le développement tumoral. Ce phénomène est important *in vivo*, lors de l'activation d'un oncogène par exemple. Dans cette situation, la cellule peut entrer en sénescence pour empêcher la progression vers le cancer. Ce phénomène a tout d'abord été remarqué dans des fibroblastes où l'oncogène Ras était activé, impliquant notamment l'accumulation de p53 [31]. La sénescence implique des changements au niveau du métabolisme cellulaire dont une expression et une activation de la β -galactosidase, ce qui en fait un marqueur pour étudier ce phénomène. Un changement morphologique sera également observé au cours duquel les cellules deviennent davantage aplaties et granulaires [29].

1.3.5 Catastrophe mitotique

La catastrophe mitotique est une autre forme de mort cellulaire indépendante de l'apoptose qui survient lorsque la mitose est démarrée alors que la cellule n'est pas prête, par exemple lorsque la chromatine n'est pas condensée ou que d'importants dommages à l'ADN sont présents. Une stabilisation excessive des microtubules, comme avec un taxane, peut également entraîner la mort par catastrophe mitotique. Ce phénomène est caractérisé par la présence de grosses cellules multinucléées [29].

1.3.6 Chimiorésistance

La chimiorésistance est un problème important pour les patients atteints de cancer, et le cancer ovarien ne fait pas exception. En effet, dans plusieurs cas de cancer, les patients perdront éventuellement leur combat contre la maladie en raison de la rechute de leur cancer qui sera résistant aux traitements de chimiothérapie. Plusieurs facteurs peuvent influencer l'efficacité d'un agent chimiothérapeutique; ici, l'exemple du cisplatine sera utilisé. Tout d'abord, le cisplatine doit pouvoir pénétrer dans la cellule et dans son noyau afin d'avoir accès à l'ADN et induire des dommages. La surexpression de pompes à efflux, qui ont pour fonction de sortir le cisplatine de la cellule, empêche ce dernier de pouvoir attaquer sa cible [21]. Une fois dans la cellule, le cisplatine peut également être neutralisé par des protéines cellulaires contenant des cystéines (et donc du soufre) telles que le glutathion, un court peptide [32]. La résistance peut aussi être causée par une augmentation de la capacité de réparation des dommages à l'ADN, permettant à la cellule de contrer les effets du cisplatine, ou une tolérance des polymérases aux dommages à l'ADN qui permet à la cellule de poursuivre ses activités au détriment de la fidélité de réPLICATION, ce qui donnera lieu à des erreurs plus fréquentes et à l'apparition de mutations. Finalement, un dérèglement des signaux de survie et de mort cellulaire peut également favoriser la survie cellulaire et donc la résistance à la chimiothérapie [21]. Malgré que la résistance à la mort cellulaire par apoptose induite par les agents chimiothérapeutiques représente un problème de taille, il est important de considérer les autres voies de mortalité cellulaire. Par exemple, parvenir

à induire une mort cellulaire par autophagie ou un arrêt définitif de croissance par sénescence représente également des avenues qu'il est important de considérer afin de freiner le développement tumoral.

1.4 La transition épithéliale-mésenchymale

La transition épithéliale-mésenchymale (EMT) est un phénomène normal au cours du développement embryonnaire ou encore lors de la guérison de blessures. Lors du développement embryonnaire, l'EMT est importante afin de permettre aux cellules de migrer et de coloniser un nouvel emplacement afin de former une nouvelle structure ou un nouvel organe. Par exemple, ce processus cellulaire est impliqué dans la formation de la crête neurale, la gastrulation, la formation du crâne et du cœur ainsi que le développement du système musculo-squelettique et du système nerveux périphérique [5, 33]. Le processus inverse, la transition mésenchymale-épithéliale (MET), existe également et permet aux cellules ayant atteint un nouvel emplacement de retrouver leurs caractéristiques épithéliales et ainsi de retrouver des fonctions spécialisées [5].

Les cellules qui passent par l'EMT perdent leurs caractéristiques différencierées afin d'acquérir des propriétés similaires aux cellules embryonnaires. Les cellules épithéliales sont caractérisées par des jonctions cellulaires spécialisées (adhérentes, serrées, desmosomes) qui permettent une organisation tissulaire bien structurée, une polarité cellulaire, une adhérence continue à leurs voisines ainsi qu'à la membrane basale et expriment des marqueurs épithéliaux tels que la E-cadhérine et les cytokératines. Pour leur part, les cellules mésenchymales ne possèdent pas de structures de jonctions intercellulaires spécialisées et établissent leurs contacts par adhésion focale, produisent une plus grande quantité de matrice extracellulaire (dont de la fibronectine), possèdent une grande capacité de migration et d'invasion et expriment des marqueurs mésenchymaux tels que la N-cadhérine et la vimentine [34, 35]. Une représentation schématique de l'EMT et du processus inverse, la MET, est montrée à la figure 1.7. L'une des principales caractéristiques de l'EMT est la perte du marqueur épithéial E-cadhérine [36], le plus souvent par répression génétique plutôt que par mutation [37].

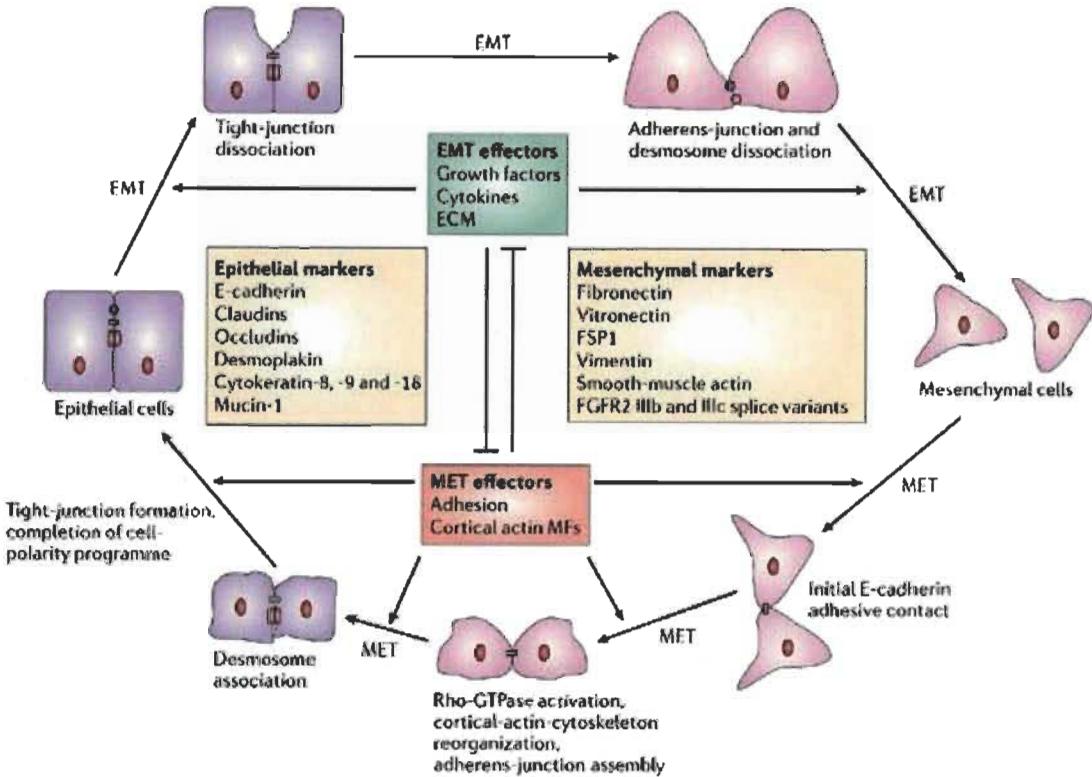


Figure 1.7 Processus de l'EMT et de la MET (tiré de [34]).

Certains auteurs divisent l'EMT en trois catégories. L'EMT de type I est principalement associée au développement embryonnaire, au développement des organes ainsi qu'à l'implantation de l'embryon. Une fois que les cellules auront atteint leur destination, elles procéderont à la MET afin de retrouver leurs caractéristiques épithéliales. L'EMT de type 2 concerne davantage la réparation de blessures, la régénération tissulaire et la fibrose. Elle est notamment induite par l'inflammation et cessera lorsque le processus inflammatoire prendra fin. Toutefois, dans le cas de fibroses, l'inflammation continue favorisera le maintien de l'EMT. Finalement, l'EMT de type 3 implique une transformation cancéreuse et favorise entre autres la formation de métastases [35].

Malgré qu'il s'agisse d'un phénomène cellulaire bénéfique et bien contrôlé, il arrive que l'EMT soit induite dans des conditions anormales. Par exemple, ce

phénomène cellulaire peut être impliqué dans le développement de fibroses dans certains organes tels que les reins et les poumons [38]. Dans le cas de la fibrose rénale, une quantité importante de fibroblastes impliqués dans ce processus proviennent des cellules épithéliales, démontrant l'importance de l'EMT dans l'évolution de cette maladie [39]. Les cellules impliquées dans ce processus produiront une grande quantité de matrice extracellulaire, ce qui mènera éventuellement, si la fibrose devient trop importante, à une perte fonctionnelle de l'organe puisque le tissu cicatriciel aura remplacé les cellules fonctionnelles de l'organe.

Une cellule peut s'engager dans l'EMT en réponse à divers stimuli extracellulaires dont des facteurs de croissance et des cytokines : HGF, EGF, PDGF, FGF2, TNF α , IGF, TGF- β ainsi que Wnt. De plus, plusieurs voies de signalisation intracellulaire peuvent être impliquées dans l'induction de l'EMT. Parmi celles-ci, se retrouvent les voies de la MAPK Erk, de la PI3K, la voie Wnt/ β -caténine ainsi que celle de NF- κ B [40]. Dans une étude effectuée sur des lignées cellulaires de cancer ovarien, l'implication d'un récepteur aux œstrogènes, le récepteur ER α , a été démontrée pour favoriser le développement de l'EMT. À l'opposé, le récepteur aux œstrogènes β (ER β) exerçait l'effet contraire en inhibant l'EMT [41].

Afin de permettre la progression de l'EMT, plusieurs protéines doivent intervenir. Ces protéines sont majoritairement des facteurs de transcription qui influencent directement l'expression génétique, soit en réprimant ou en activant l'expression de leurs cibles afin de diminuer l'expression des protéines spécifiques aux cellules épithéliales et d'augmenter l'expression des protéines spécifiques aux cellules mésenchymales. Ces protéines sont principalement regroupées en trois familles : Snail, ZEB et Twist [42]. Une courte présentation de ces facteurs ainsi que de leur régulation et de leurs fonctions est présentée à la section 1.4. D'autres facteurs moins connus tels que E12/E47 peuvent également être impliqués dans l'induction de l'EMT. Habituellement, plusieurs de ces facteurs seront exprimés afin de collaborer dans l'induction de l'EMT. De plus, ces facteurs sont capables de s'induire les uns les autres dans diverses conditions afin de renforcer l'induction de l'EMT (figure 1.8).

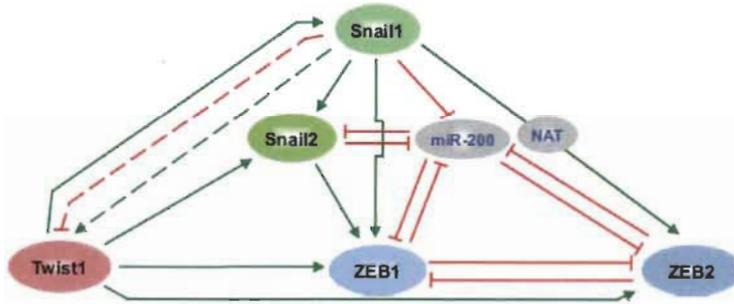


Figure 1.8 Induction réciproque des facteurs de l'EMT (tiré de [42]).

Les flèches en pointillés indiquent que des effets contraires ont été observés dans différents modèles.

1.4.1 Importance de l'EMT dans le cancer

La progression d'une cellule vers un stade cancéreux implique l'acquisition de plusieurs caractéristiques qui ont été présentées à la figure 1.1. Ces dernières peuvent être acquises de diverses manières, le plus souvent par des modifications dans les voies de signalisation impliquées dans ces divers aspects de la vie d'une cellule. Toutefois, il est de plus en plus évident que l'EMT joue un rôle plus important que seulement l'acquisition du phénotype métastatique et que ce phénomène contribue de manière beaucoup plus significative à la progression du cancer. En plus de la résistance à la mort par apoptose, l'EMT peut contribuer à la résistance à l'anoïkose, une forme d'apoptose qui survient spécifiquement lorsqu'une cellule perd contact avec la matrice extracellulaire et qu'elle se retrouve sans point d'attache [43]. Cela pourrait impliquer entre autres l'activation de la voie PI3K/Akt [40]. L'implication de quelques facteurs clés de l'EMT est résumée dans le tableau 1.1.

1.4.2 La chimiothérapie et l'EMT

En plus des signaux inducteurs de l'EMT classique, plusieurs études démontrent que la chimiothérapie pourrait également favoriser le développement de ce processus.

Une étude effectuée sur le cancer ovarien, chez la lignée OVCA 433, rapporte l’induction de l’EMT par le cisplatine, et ce, par la voie de la MAPK Erk. Ce traitement a augmenté la migration et l’invasion des cellules en plus de favoriser l’apparition de marqueurs de cellules souches, un phénomène de plus en plus associé à l’EMT [36]. Dans un autre modèle cellulaire de cancer ovarien, le traitement de cellules A4 avec le paclitaxel, une molécule qui favorise la polymérisation des microtubules, a provoqué une augmentation des niveaux de Snail et de Slug. Parallèlement, dans ce même modèle, la lignée cellulaire résistante AC (dérivée de A4 et résistante au paclitaxel), possède des niveaux d’expression basaux supérieurs de Snail et de Slug [44]. Ces résultats ont été confirmés dans une autre étude dans laquelle trois lignées cellulaire de cancer ovarien, NOS-2, TAOV et SKOV-3 qui ont été rendues résistantes au paclitaxel, présentaient une morphologie mésenchymale avec une plus grande capacité d’invasion et de migration [45].

Une autre étude effectuée chez la lignée cellulaire de cancer du sein MCF-7 rapporte une augmentation de l’EMT après un traitement à l’Adriamycine, un agent intercalant de l’ADN. Ce changement requiert une augmentation de l’expression de Twist1, mais n’impliquerait pas Snail ou Slug, et survient majoritairement dans la population de cellules en phase G1/S du cycle cellulaire. De plus, ces cellules présentaient une résistance accrue à d’autres traitements chimiothérapeutiques tels que le paclitaxel et la vincristine [46]. Des changements similaires ont été observés chez des lignées cellulaires de cancer colorectal, KM12L4 et HT29, exposées de manière chronique à l’oxaliplatin et qui y sont devenues résistantes. Ces cellules possèdent des caractéristiques morphologiques de l’EMT ainsi qu’une plus grande localisation nucléaire de β -caténine et de Snail ainsi qu’une plus forte expression de Vimentine [47].

Tableau 1.1
L'EMT et l'acquisition des caractéristiques du cancer (adapté de [42])

Caractéristiques du cancer	ZEB1	ZEB2	Snail	Slug	Twist1	Twist2
Invasion et métastasie	+	+	+	+	+	
Angiogenèse	-	+	+	+	+	
Prolifération					+	+
Résistance à l'arrêt de croissance					+	+
Résistance à la mort cellulaire	+	+	+	+	+	+
Immortalité réplicative	+	+/-	+	+	+	+

+ : activation, - : inhibition

1.4.3 La famille Snail

Snail et Slug sont les membres les plus connus de la famille des facteurs de transcription Snail. Ces protéines font partie des facteurs de transcription à doigt de zinc. Ils sont considérés comme des « régulateurs-clés » du phénomène d'EMT; il s'agit d'ailleurs de la principale fonction pour laquelle ils sont connus [48]. Leur fixation à l'ADN requiert la séquence consensus CANNTG. En plus de leur implication dans l'EMT, Snail et Slug sont de plus en plus reconnus en tant que facteurs contribuant à la radiorésistance et à la chimiorésistance [44]. Par exemple, des cellules de cancer ovarien résistantes au cisplatine exprimaient des niveaux d'expression de Snail et de Slug supérieurs comparativement aux cellules sensibles [49].

1.4.3.1 *Snail*

La protéine Snail est encodée par le gène SNAI1 qui se trouve sur le chromosome 20q13, une région fréquemment amplifiée dans les cellules cancéreuses du sein [50]. La fonction principale connue de cette protéine est dans la répression génétique qui favorise l'induction de l'EMT. La principale cible transcriptionnelle de Snail dans l'EMT est l'E-cadherine [51, 52]. Ce facteur de transcription peut également entraîner la répression de

l'expression de la kératine 18 et favoriser l'expression de la Vimentine, une protéine de filaments intermédiaires, de la Fibronectine, une glycoprotéine de matrice extracellulaire produite par les cellules mésenchymales, ainsi que de la MMP-9 [50, 53]. ZEB1 est une autre cible transcriptionnelle activée lors de la liaison de Snail à son promoteur et nécessitant également l'implication de la protéine Twist [54].

Plusieurs facteurs peuvent réguler l'expression de Snail, une protéine ayant une demi-vie courte d'environ 25 minutes [55]. La voie PI3K/Akt peut mener à la stabilisation de Snail en réduisant l'activité de GSK-3 β , une protéine impliquée dans l'exportation nucléaire et la dégradation de Snail par le protéasome [56]. La dégradation de Snail peut également survenir après ubiquitination par Mdm2 lorsque p53 n'est pas muté [57]. Une activation constitutive de la kinase Akt entraîne également une augmentation de l'expression de Snail [58]. L'induction de l'expression de Snail peut être favorisée en conditions hypoxiques où l'activation de Notch entraînera l'expression génétique de Snail. De plus, Hif-1 α entraînera la production de lysyl oxydase qui stabilisera la protéine Snail produite [59]. NF- κ B peut également entraîner l'expression de Snail, soit directement ou en coopération avec le TGF- β [40]. Cette cytokine peut aussi induire Snail par la voie Smad3 ou par la voie non canonique de la MAPK Erk [60]. Il a récemment été démontré que la voie K-Ras/ATR permet la stabilisation de Snail par phosphorylation, une fonction non exercée par les autres membres de la famille Ras (N-Ras et H-Ras) [61]. Le micro-ARN miR-34a inhibe l'expression de Snail en liant son ARNm [62].

Outre ses fonctions dans l'EMT, Snail peut également être impliqué dans la résistance à la thérapie. Pour ce faire, ce facteur de transcription peut diminuer l'expression de la protéine p53 soit en liant son promoteur ou en entraînant la dégradation de la protéine p53. Snail possède une plus grande affinité pour le promoteur du gène *TP53* que Slug et serait de ce fait davantage impliqué dans sa répression [44]. L'interaction directe entre Snail et p53 implique la partie centrale de Snail (acides aminés 91 à 112) ainsi que le domaine de liaison à l'ADN de p53 (acides aminés 93 à 292) [61]. L'implication de Snail auprès de p53 est également remarquée dans un

traitement par irradiation chez des cellules RWP-1 d'une métastase de cancer pancréatique humain. Dans cette situation, l'expression ectopique de Snail permet à ce dernier de lier le promoteur du gène *PTEN* et d'empêcher la liaison de p53 à ce dernier, empêchant ainsi sa transcription [63].

1.4.3.2 *Slug*

La protéine Slug est encodée par le gène SNAI2 retrouvé sur le chromosome 8q11.21 [64]. Cette protéine se lie au site consensus CANNTG sur l'ADN afin d'exercer son action sur ses cibles [44]. Parmi les protéines réprimées par Slug afin de favoriser l'EMT se retrouvent la Claudine-1, une protéine des jonctions serrées, ainsi que l'E-cadhéchine [65]. Cependant, contrairement à Snail, Slug ne serait pas impliqué dans l'initiation de la répression de l'E-cadhéchine au cours de l'EMT, mais plutôt dans son maintien afin que le phénotype mésenchymal persiste et permette aux cellules de maintenir leur comportement métastatique [66]. Slug peut également induire l'expression de gènes favorables à l'EMT dont MMP4 et ZEB1 dans un modèle de mélanome [65] ainsi que MMP2 dans un modèle de cancer du sein [67].

Tout comme dans le cas de Snail, l'expression de Slug peut être régulée par plusieurs facteurs. Le récepteur aux œstrogènes Er α peut induire l'expression de Slug; le phénomène inverse est observé dans le cas du récepteur Er β [41]. Twist induit l'expression de Slug par liaison directe à son promoteur. De plus, l'activité de Slug est essentielle à l'induction de l'EMT par Twist tel que démontré en empêchant l'expression de Slug, ce qui diminue l'invasion et la motilité des cellules [68]. Une interaction entre Mdm2 et Slug (acides aminés 21-66), qui requiert également p53, mène à la dégradation de ce dernier par le protéasome [69].

En plus de son implication dans l'EMT, Slug peut également favoriser la survie cellulaire. Dans le modèle MCF-7 de cancer du sein, une expression de Slug par transduction a entraîné une augmentation des niveaux de Mdm2 avec ou sans traitement avec l'Adriamycine [70]. Slug est également connue pour son activité de protection

contre les dommages causés par les radiations dans les cellules progénitrices où elle active la voie SCF/cKit [44]. Un phénomène similaire a été observé chez des cellules progénitrices hématopoïétiques exposées à des doses fatales de radiation. Dans ces cellules, p53 induit l'expression de Slug, lequel pourra alors réprimer la transcription de PUMA, une cible de p53 menant à l'apoptose [71].

1.4.4 La famille ZEB

La famille ZEB (*zinc finger E-box-binding homeobox*) comprend principalement deux protéines : ZEB1, aussi connue sous le nom de TCF8 ou de δ EF1, et ZEB2, aussi appelée *Smad interacting protein 1* (SIP1). ZEB1 et ZEB2 ont la particularité de pouvoir coopérer avec les Smads, des facteurs de transcription de la voie canonique du TGF- β et de la voie du BMP, afin d'exercer leurs fonctions [33, 72]. ZEB1 et ZEB2 peuvent agir en aval de Snail et de Twist [40] et seraient impliquées dans la répression de E-cadhérine induite par Hif-1 α [72].

Il existe une boucle d'inhibition réciproque entre la famille des micro-ARNs miR-200 et les facteurs de transcription ZEB1 et ZEB2 où ces deux groupes répriment réciproquement l'expression de l'autre [40].

1.4.4.1 ZEB1

ZEB1 est une protéine de 1125 acides aminés présentant quelques variantes d'épissage et située sur le chromosome 10p11.2 (NCBI, NC_000010.10). Cette protéine réprime l'expression de ZO-1 [73] et de E-cadhérine en liant directement leurs promoteurs [74]. L'expression de ZEB1 peut être augmentée par le TGF- β , NF- κ B, Hif-1 α , les oestrogènes ainsi que Snail et Slug, ce dernier induisant ZEB1 en liant les E-box contenues dans son promoteur [65]. L'activation de la MAPK Erk en réponse au cisplatine peut également entraîner une augmentation de ZEB1 [36]. Twist peut également induire l'expression de ZEB1 et son affinité pour son promoteur est

augmentée par Snail [54]. En contrepartie, p63, un homologue de p53, peut réprimer l'expression de ZEB1 [75].

En plus de son implication dans l'EMT, ZEB1 favorise la prolifération dans le cancer du sein, notamment en diminuant l'expression de p21 [76]. Dans le cas de la signalisation des oestrogènes, ZEB1 peut activer la transcription du gène de l'ovalbumine. Chez des fibroblastes embryonnaires, l'ablation de ZEB1 provoque la sénescence [72]. Dans des lignées cellulaires de cancer pancréatique, une forte expression des niveaux de ZEB1 corrèle avec une plus grande chimiorésistance [77].

1.4.4.2 ZEB2

ZEB2, aussi appelée Sip1, est une protéine de 1214 acides aminés présentant deux variantes d'épissage et codée sur le chromosome 2q22.3 (NCBI, NC_000002.11). Cette protéine, en plus de réprimer l'expression de l'E-cadhérine, réprime l'expression de nombreuses protéines impliquées dans la formation des jonctions cellulaires serrées et communicantes ainsi que dans les desmosomes chez des cellules épithéliales [78]. De plus, ZEB2 peut entraîner une augmentation de l'expression de Vimentine, de N-cadhérine, de MMP2 et de MT1-MMP et réprimer l'expression de la phosphatase alcaline dans le rein, les os et le foie [72].

Une surexpression de ZEB2 a été trouvée chez plusieurs cancers dont les cancers ovarien, hépatocellulaire, gastrique et du sein et peut être induite par NF-κB [73]. Outre ses fonctions dans l'EMT, ZEB2 peut favoriser la survie des cellules cancéreuses et la progression tumorale. Dans les cellules de cancer de la vessie, ZEB2 de la mort induite par la chimiothérapie [79] et, dans les cellules épithéliales pulmonaires, une forte expression de ZEB2 augmente la quantité de TGF-β requise pour induire l'arrêt de croissance [40]. La protéine Smad4 est requise pour l'induction de l'expression de ZEB2 par le TGF-β [80].

1.4.5 Les cadhérines

Dans l'EMT, deux types de cadhérines sont impliquées : l'E-cadhérine et la N-cadhérine. Lors de l'EMT, il est fréquent d'assister à un changement dans les cadhérines : la E-cadhérine (épithéliale) sera remplacée par la N-cadhérine (mésenchymale) [81]. L'E-cadhérine est une protéine de 822 acides aminés (UniProt, P12830) codée sur le chromosome 16q22.1 (NCBI, NC_000016.9) impliquée dans les jonctions intercellulaires adhérentes ainsi que les desmosomes et lie les microfilaments d'actine grâce à l' α -caténine et la β -caténine et est donc un marqueur de cellules épithéliales [5]. La perte d'expression de l'E-cadhérine, une protéine reconnue comme étant un suppresseur de tumeur, est une étape clé de l'EMT [41, 82]. En effet, la répression de l'expression de l'E-cadhérine mène à une perte de la polarité épithéliale [53]. De plus, la perte de l'E-cadhérine entraîne la libération de la β -caténine qui pourra alors transloquer au noyau [83]. L'E-cadhérine est rarement mutée dans le cancer ovarien et la diminution de son expression est plutôt causée par la répression génétique exercée par plusieurs des facteurs de transcription impliqués dans l'EMT [84]. Ces derniers, lient le promoteur de l'E-cadhérine, ce qui entraîne le recrutement des méthylases d'histones et l'inactivation de la transcription du gène de l'E-cadhérine. Lorsque l'expression de E-cadhérine est forcée dans les cellules, celles-ci retrouvent leur phénotype épithéial et leur prolifération diminue [35].

Pour sa part, la N-cadhérine est une protéine de 906 acides aminés (UniProt, P19022) codée sur le chromosome 18q11.2 [85]. Cette protéine est reconnue comme étant un marqueur des cellules mésenchymales. Elle participe aux contacts intercellulaires ponctuels caractéristiques des cellules mésenchymales. La surexpression de cette protéine, même dans un modèle où la E-cadhérine est exprimée, augmente la migration et l'invasion des cellules [86, 87].

1.4.6 La β -caténine

La β -caténine est une protéine de 781 acides aminés encodée sur le chromosome 3p21 (SwissProt P35222.1, NCBI NC_000003.11). La β -caténine est une protéine impliquée dans les contacts intercellulaires qui lient la E-cadhérine au cytosquelette d'actine [88]. Ses niveaux d'expression sont habituellement bas lorsqu'elle n'est pas associée aux complexes d'interactions intercellulaires puisqu'elle est alors rapidement ubiquitinée et dégradée par le protéasome, un phénomène impliquant GSK3 β . Toutefois, cette boucle est brisée lorsque le ligand *Wingless type* (Wnt) se lie à son récepteur et entraînera l'inhibition de la GSK3 β et par conséquent l'accumulation de β -caténine [89]. Cette dernière pourra alors se rendre au noyau, lier les facteurs de transcription Lef/Tcf [90] et agir comme facteur de transcription pouvant entre autres induire l'EMT et favoriser la prolifération cellulaire [91-93]. L'expression des ligands Wnt1, Wnt3 ainsi que celle de la β -caténine est diminuée par le microARN miR-34 [42]. Lors de l'apoptose, les caspases clivent la β -caténine, entraînant ainsi la perte de contacts entre la cellule et les cellules voisines ainsi que la déstabilisation de la membrane plasmique [94, 95]. Une étude effectuée sur une lignée cellulaire de mélanome a démontré qu'une suppression de l'expression de β -caténine augmente la capacité métastatique malgré une diminution de la prolifération [96].

1.4.7 La Vimentine

La Vimentine est une protéine de 466 acides aminés codée sur le chromosome 10p13 (NCBI, NP_003371 et NC_000010.10). Il s'agit d'un membre de la famille des protéines de filaments intermédiaires de type III qui est caractéristique des cellules mésenchymales et un marqueur de l'EMT. La Vimentine est également exprimée dans une grande variété de cellules non épithéliales dont les cellules musculaires, les cellules de Sertoli et les globules blancs entre autres. Une forte expression de cette protéine dans le cancer colorectal serait associée à une croissance cellulaire rapide et à une plus grande capacité de migration [97]. L'expression de la Vimentine peut être augmentée par différents facteurs de transcription impliqués dans l'EMT dont Snail et ZEB1 [42, 52]

ainsi que par différents inducteurs de cette transition dont le TGF- β , l'EGF, le cisplatine et la β -caténine [36, 98-100]. La Vimentine possède également des rôles en signalisation cellulaire. Entre autres, la Vimentine peut empêcher la déphosphorylation de Erk en interagissant physiquement avec cette kinase et ainsi prolonger son activité ou permettre son transport dans la cellule [101]. Des fibroblastes sans expression de Vimentine sont fonctionnellement normaux, mais possèdent une moins grande stabilité structurale et une moins grande capacité de migration [102]. De plus, des souris sans Vimentine présentaient des complications rénales et vasculaires en conditions de stress [97].

1.4.8 Erk

Les protéines Erk1 et Erk2 sont encodées sur les chromosomes 16p11.2 et 22q11.21 (NCBI NC_000016.9, NC_000022.10) respectivement et ont 379 et 360 acides aminés respectivement (UniProt P27361, P28482). Erk1 et Erk2 font partie de la famille des MAPK et sont principalement activées dans une cascade signalétique classique des MAPK : Ras \rightarrow Raf \rightarrow MEK1/2 \rightarrow Erk1/2. [103]. MEK1/2 seraient les seules kinases capables de phosphoryler Erk1/2 [104]. Dans cette cascade signalétique, Erk phosphoryle MEK1/2 sur la tyrosine 292, ce qui diminue l'activité de MEK1/2 et sert de boucle de contrôle pour l'activation de cette voie de signalisation [105]. Le signal initial activant cette signalisation sera fréquemment un facteur de croissance qui liera son récepteur. Parmi les autres protéines pouvant intervenir pour mener à l'activation de cette cascade signalétique, on retrouve PKC [106] et ATM. ATM mène à l'activation de Erk en cas de dommages à l'ADN [107]. Exprimer PTEN dans des cellules de cancer de la prostate qui n'en exprimaient pas diminue l'activation d'Akt, mais également celle de Erk [108]. Erk1/2 ont pour cibles principales les protéines contenant la séquence consensus Pro/Xxx/Ser/Thr/Pro où la sérine est l'acide aminé qui sera phosphorylé [109].

L'implication de la protéine Erk dans l'apoptose est controversée. Dans certains modèles cellulaires, l'activation de Erk mène à la mort cellulaire en conditions de

dommages à l'ADN tandis que, dans d'autres modèles, cette protéine entraîne plutôt un arrêt du cycle cellulaire et inhibe l'apoptose [110].

1.4.8.1 *Erk et l'EMT*

La kinase Erk est impliquée dans l'EMT induite par le TGF- β [111] et également par d'autres molécules comme le cisplatine dans le cancer ovarien [36]. Dans une étude réalisée sur des coupes histologiques de cancers endométriaux, une plus forte présence de Erk phosphorylée était observée au front invasif de la tumeur, ce qui suggère l'implication de cette protéine dans l'invasion myométriale [112]. En conditions hypoxiques, Erk1/2 stabilise Hif-1 α et augmente son activité transcriptionnelle [113]. De plus, dans l'activation de différents récepteurs tyrosine-kinases, Erk phosphoryle le corécepteur LRP6 et favorise ainsi l'activation de la voie Wnt/ β -caténine [114]. L'activation de Erk peut entraîner une augmentation des niveaux de plusieurs marqueurs de l'EMT dont ZEB1 et ZEB2 [42] ainsi que Snail [82].

1.4.9 p53

L'homéostasie cellulaire dépend de nombreux facteurs. Parmi ces derniers, p53, un facteur de transcription, occupe une place primordiale de par son influence sur un vaste éventail de processus cellulaires. Cette protéine est reconnue pour son importance dans le cancer en raison de ses rôles importants dont le contrôle du cycle cellulaire, l'induction de l'apoptose ou de la sénescence ainsi que son implication dans la réponse aux dommages à l'ADN [115]. La protéine p53 contient plusieurs domaines fonctionnels : le domaine de transactivation (acides aminés 1-93, incluant un domaine riche en prolines), de liaison à l'ADN (acides aminés 94-292), de localisation nucléaire (importation nucléaire : acides aminés 305-322 et exportation nucléaire : acides aminés 11-27 et 340-351), et de tétramérisation (acides aminés 325-356) principalement [116, 117].

En conditions physiologiques les niveaux cellulaires de p53 sont maintenus bas principalement par l'action de Mdm2, une protéine E3-ubiquitine ligase responsable d'entrainer la dégradation de p53 par le protéasome [118]. Toutefois, lors de l'activation des caspases-2 et -3, Mdm2 peut être clivée. Le fragment ainsi généré conserve sa capacité à lier p53, mais perd sa fonction d'ubiquitine-ligase. De ce fait, p53 se retrouve stabilisé lorsqu'il lie le fragment de Mdm2 [119, 120]. De plus, lors de dommages à l'ADN, p53 sera stabilisé afin de répondre au stress imposé à la cellule [121, 122].

Dans les cellules cancéreuses, il est fréquent que des mutations surviennent dans cette protéine [123]. Les cellules cancéreuses sont alors libérées des contraintes que représente p53 pour lui et de peuvent se diviser malgré des dommages à L'ADN. Le cancer ovarien ne fait pas exception à ce chapitre avec un taux de mutations de la protéine p53, incluant celles donnant un phénotype sans p53, atteignant plus de 60 % [124, 125]. Les mutations surviennent le plus fréquemment dans le domaine de liaison à l'ADN [123]. Une représentation schématique des mutations répertoriées dans cette protéine est présentée à la figure 1.9. Ces mutations entravent la capacité de p53 à se lier à l'ADN pour influencer la transcription de ses cibles génétiques, ce qui entrave ses fonctions de suppresseur de tumeur, et mène parfois à un gain de fonction qui favorisera le développement du cancer. L'effet d'un mutant de p53 peut également s'exercer, s'il coexiste un allèle sauvage et un allèle muté, lors de la formation du tétramère de protéines p53 où le mutant jouera un rôle de dominant négatif sur p53 sauvage [126, 127]. La suppression de p53 peut également diminuer la chimiorésistance chez le cancer ovarien. Un plus haut taux de mort cellulaire a été démontré chez des cellules A2780 surexprimant Mdm2 en diminuant la capacité de réparation de l'ADN chez ces cellules [128].

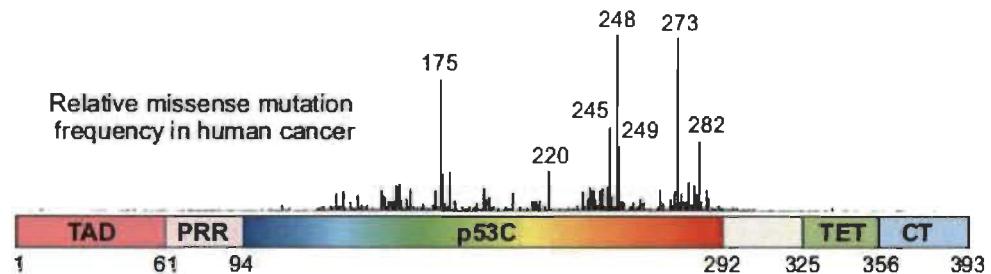


Figure 1.9 Répartition des mutations dans la protéine p53 (tiré de [116]).

TAD : transactivation, PRR : région riche en prolines, p53C : liaison à l'ADN, TET : tétramerisation, CT : C-terminal

1.4.9.1 *p53 et l'EMT*

Le facteur de transcription p53 est reconnu pour son action à l'encontre de l'EMT. Par exemple, p53 peut induire le micro-ARN miR-200c par liaison directe à son promoteur afin de réduire l'expression de ZEB1 [129]. p53 peut également réduire les niveaux de β -caténine en entraînant la dégradation de celle-ci par le protéasome. Ce processus requiert l'activité de la protéine GSK3 β . Conséquemment, une protéine p53 mutée fonctionnellement est incapable d'accomplir cette fonction [130]. p53 peut aussi induire l'expression du micro-ARN miR-34a afin de réprimer l'expression du facteur de transcription Snail. De plus, deux études démontrent que p53 peut entraîner la dégradation de Snail dans un modèle d'hépatocarcinome [57] et de Slug dans un modèle de cancer du poumon [131]. Dans les deux cas, la dégradation requiert la formation d'un complexe comprenant p53, Mdm2 et Snail ou Slug, entraînant l'ubiquitination de ces protéines et leur dégradation par le protéasome. Une étude menée sur des échantillons tumoraux de patients a révélé que le cancer avait progressé et formé des métastases distantes chez les patients ayant perdu l'expression de p53, alors qu'il n'y avait pas de métastases chez les patients ayant une mutation dans cette protéine [125].

1.4.10 Le facteur de croissance transformant β

La superfamille du facteur de croissance transformant β (TGF- β) comprend plusieurs cytokines et facteurs de croissance peptidiques dont le TGF- β (qui a trois isoformes : TGF- β 1, TGF- β 2 et TGF- β 3), les *bone morphogenetic proteins* (BMPs) ainsi que les ligands Activin et Nodal [132]. Le TGF- β est impliqué notamment dans le développement, la différentiation cellulaire, le contrôle de la prolifération cellulaire et influence la survie de la cellule. La signalisation canonique du TGF- β implique les deux récepteurs du TGF- β , les récepteurs I et II, ainsi que les protéines Smad2 et Smad3. Lorsque le TGF- β atteint la surface de la cellule cible, il lie un dimère de récepteurs II, ce qui entraîne le recrutement deux récepteurs I et l'activation de ces récepteurs. L'activation des récepteurs entraîne la phosphorylation des R-Smads, Smad2 et Smad3, qui pourront se lier à la co-Smad, Smad4, pour transloquer au noyau et induire la transcription de gènes [133]. Il existe également d'autres voies qui peuvent être impliquées dans la signalisation de cette cytokine, dont les voies des MAPK (Erk, p38 et JNK), la voie PI3K/Akt (pour laquelle une association entre la sous-unité p85 de la PI3K et les récepteurs I et II a été démontrée [134]) ainsi que des GTPases Rho-like dont RhoA et Cdc42 [135]. Ce dernier groupe de protéines est principalement impliqué dans l'induction de l'EMT par le TGF- β .

Le TGF- β est une cytokine qui favorise l'homéostasie en conditions normales, mais dont la fonction est fréquemment détournée chez les cellules cancéreuses. En effet, parmi les mutations accumulées au cours de son développement, un cancer parviendra fréquemment à résister aux effets protecteurs du TGF- β et utilisera plutôt cette cytokine à son avantage pour favoriser l'acquisition d'une ou de plusieurs des caractéristiques du cancer [136, 137]. En effet, l'exposition au TGF- β , autocrine ou par ajout au milieu de culture, des lignées cellulaires HeLa et KLE entraîne l'induction de l'expression de XIAP, un facteur de survie cellulaire. De plus, l'induction de l'expression de XIAP a mené à la dégradation de PTEN, un suppresseur de tumeur, par le protéasome suite à son ubiquitination médiée par XIAP [138]. Le TGF- β peut aussi augmenter l'invasion de

cellules de carcinome endométrial *in vitro*, par les voies d'Akt-XIAP et de la PKC-MMP9 [139].

1.4.10.1 *Interactions entre le TGF- β et p53*

Le TGF- β et p53 peuvent coopérer dans l'induction de l'expression de certains gènes. Par exemple, une association physique entre la Smad 2 et la protéine p53 peut moduler l'expression de certains gènes. Ceci s'applique notamment lors du développement embryonnaire, mais aussi dans le cas de la réponse cytostatique induite par le TGF- β , laquelle n'est pas induite dans les cellules ayant une déficience en p53 [140].

En contrepartie, il a été démontré que le TGF- β 1 induit l'activation de la transcription de Mdm2 par la voie des Smads [141]. Lors de l'induction de l'EMT, le TGF- β entraîne une diminution des niveaux de p53, un changement renversé lorsque le traitement se termine [129]. Une telle diminution de l'expression de p53 pourrait contribuer à l'élimination de ce suppresseur de tumeur dans une cellule cancéreuse.

1.5 Le Resvératrol

Le Resvératrol, ou 3,4',5-trihydroxy-trans-stilbène, est un composé naturel produit par plusieurs plantes, incluant notamment le raisin et est présent notamment dans le vin. Il s'agit d'une phytoalexine, c'est-à-dire un composé produit par les plantes possédant un potentiel anti-infectieux contre les infections fongiques [142]. Une représentation de la molécule de Resvératrol est montrée à la figure 1.10. Le Resvératrol existe aussi sous l'isoforme *cis*, mais ce dernier ne possède presque pas d'activité en comparaison avec l'isoforme *trans* qui est l'isoforme dominant. Cette molécule est également un phytoestrogène, c'est-à-dire une molécule qui possède une similarité avec l'oestradiol et qui peut agir en tant qu'agoniste des récepteurs aux oestrogènes [143]. Dans certains cas, il peut également agir en tant qu'antagoniste de ces mêmes récepteurs [144].

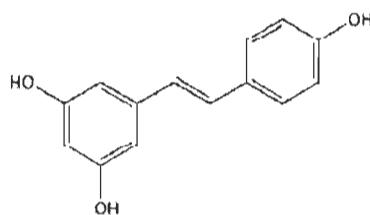


Figure 1.10 Structure chimique du Resvératrol.

L'intérêt pour le Resvératrol est apparu au début de la décennie 1990, principalement en France où, malgré une consommation d'aliments riches en gras, un faible taux de maladies coronariennes était observé. Pour expliquer ce paradoxe, des chercheurs ont avancé que la consommation modérée de vin, couramment répandue en France, expliquerait cette constatation [145]. L'effet bénéfique du vin a peu après été attribué au Resvératrol, présent dans le vin rouge [146]. Plusieurs études ont alors été effectuées sur le Resvératrol qui, depuis, est reconnu comme une molécule possédant une multitude d'effets bénéfiques. En effet, cette molécule est antioxydante, anti-inflammatoire, inhibe l'agrégation des plaquettes et agit également contre le cancer [147].

1.5.1 Mécanismes d'action

Les effets anti-inflammatoires du Resvératrol impliquent entre autres l'inhibition de l'expression et de l'activité de la cyclooxygénase-2 (COX-2), une enzyme responsable de la production de prostaglandines, des molécules impliquées dans l'inflammation et pouvant aussi favoriser le développement tumoral [147]. Les propriétés antioxydantes du Resvératrol pourraient expliquer ses effets protecteurs sur le système cardiovasculaire où cette molécule peut séquestrer des espèces réactives de l'oxygène et augmenter l'expression d'enzymes liées à la détoxification des molécules oxydantes [148]. L'effet du Resvératrol sur la capacité d'agrégation des plaquettes explique aussi son rôle cardioprotecteur en empêchant la formation de thromboses [149]. Parallèlement, au niveau du foie, le Resvératrol favorise l'expression d'enzymes détoxifiantes telles que la glutathione S-transferase et la NAD(P)H:quinine

oxydoréductase en plus d'inhiber des enzymes hépatiques telles que le cytochrome P450 (1A1 et 3A/2), qui ont la capacité d'activer les carcinogènes [147]. Ces mécanismes permettent de diminuer l'exposition des cellules à des molécules dommageables en inactivant ces dernières et en favorisant leur élimination.

Le Resvératrol peut inhiber la progression du cycle cellulaire. En effet, il peut notamment directement inhiber la transcription de l'ADN en inhibant la ribonucléotide réductase, responsable de convertir les ribonucléotides en désoxyribonucléotides, et l'ADN polymérase [150]. Cette phytoalexine induit également la sénescence dans un modèle cellulaire de carcinome du colon possédant p53 sauvage [151]. De manière similaire, dans les cellules de cancer hépatique HepG2, possédant p53 sauvage, le Resvératrol a provoqué un arrêt de croissance en phase G1 du cycle cellulaire impliquant une augmentation des niveaux de la protéine p21. Cet effet n'a cependant pas été observé dans la lignée Hep 3B, négative pour p53 [152]. Lors d'une étude réalisée avec trois lignées cellulaires de cancer gastrique, le Resvératrol a provoqué un arrêt de croissance en phase G1 du cycle cellulaire. Pour ce faire, le Resvératrol a induit une augmentation de l'expression de p21 et de p16. Cette action du Resvératrol est dépendante de l'expression de la protéine Sirt-1 [153]. Par ailleurs, le Resvératrol peut induire une augmentation de la transcription et de l'activité de Sirt-1, diminuant la progression tumorale, la prolifération des cellules cancéreuses et augmentant la mortalité de ces cellules [154].

Il a été démontré que le Resvératrol induit la mort cellulaire par apoptose chez des lignées cellulaires de cancer endométrial et diminue la prolifération de ces cellules. Cet effet implique notamment une diminution de l'activité d'Akt, une kinase favorisant la survie cellulaire [155]. En contrepartie, lorsque le Resvératrol est administré *in vivo* à des rates immatures pour évaluer son effet sur l'utérus à une dose de 5mg/kg, cette molécule exerce un effet prosurvie qui pourrait être attribué à son rôle d'agoniste des récepteurs à l'oestrogène. Le poids de l'utérus et la présence de glandes ont augmenté, démontrant que le Resvératrol favorise le développement de cet organe [156]. Dans un modèle de cancer ovarien, le Resvératrol peut également diminuer l'activité des voies

Akt et Erk, ce qui peut diminuer la capacité de survie des cellules [157]. Dans le modèle de cancer hépatique HepG2, un traitement avec le Resvératrol provoque une augmentation de la mort cellulaire dépendante de p53 et impliquant une augmentation de l'expression de Bax [152]. Dans une étude effectuée dans plusieurs modèles cancéreux, un traitement avec le Resvératrol a provoqué une augmentation l'apoptose. Pour ce faire, le Resvératrol a induit la translocation de Bax, dépendante de XIAP, à la membrane mitochondriale, permettant la perméabilisation de celle-ci ainsi que la relâche du cytochrome C [158].

Au niveau du cancer ovarien, il a été démontré que le Resvératrol induit la mort cellulaire par autophagie [159]. Cet effet peut être attribué à une diminution du métabolisme du glucose et de sa captation par la cellule, ce qui prive la cellule cancéreuse d'une importante source d'énergie et la place dans une condition de stress. Cet effet n'a pas été observé chez une lignée de fibroblastes humains sains utilisée comme modèle de cellules saines, requérant un moins grand apport énergétique et pouvant plus facilement subvenir à leurs besoins lors d'une diminution de l'entrée du glucose [160]. Lorsque des lignées cellulaires de cancer ovarien sont traitées avec le cisplatine et le Resvératrol, ces dernières ne sont pas en mesure de recommencer à croître une fois le traitement arrêté. Ces résultats démontrent une coopération entre ces deux agents qui augmentent l'efficacité de la thérapie [161]. Dans un modèle de neuroblastome, le Resvératrol affecte l'activation de Erk de manière dose-dépendante en l'activant, à de faibles doses de 1 à 10 μ M, et en l'inhibant à de fortes doses de 50 à 100 μ M [162].

1.5.2 Le Resvératrol et l'EMT

Comme décrit plus haut, le Resvératrol peut être impliqué dans de nombreux processus cellulaires. Récemment, un rôle dans l'inhibition de l'EMT lui a été attribué. En effet, dans le modèle cellulaire MCF-7 de cancer du sein, le Resvératrol a contré l'induction de l'EMT par l'EGF, un facteur de croissance reconnu pour induire l'EMT chez les modèles cellulaires de cancer du sein. Le cotraitements des cellules avec l'EGF

et le Resvératrol a bloqué l'activation de la MAPK Erk induite par l'EGF, et ainsi l'induction de l'EMT [99]. Dans les cellules cancéreuses hépatiques HepG2 traitées avec le facteur de croissance HGF, le Resvératrol a inhibié la capacité d'invasion des cellules par un mécanisme indépendant de Erk ou de l'inhibition de l'activité du récepteur du HGF [163]. Le Resvératrol peut également inhiber l'induction de l'EMT par le TGF- β dans le modèle de cancer du poumon A549, notamment en augmentant l'expression de l'E-cadhérine et en diminuant l'expression des marqueurs mésenchymaux normalement induits par le TGF- β [98]. De plus, dans une étude chez des lignées cellulaires de cancer ovarien, le Resvératrol a diminué l'expression du facteur hypoxique Hif-1 α ainsi que du facteur de croissance VEGF, deux molécules pouvant être impliquées dans l'EMT et la progression tumorale [164]. Le traitement de cellules cancéreuses du sein, du colon et de myélome avec le Resvératrol a provoqué une diminution de l'expression et de l'activité de la MMP-2 et de la MMP-9 [147].

1.5.3 Inconvénients du Resvératrol

Malgré la multitude d'effets bénéfiques attribuables au Resvératrol, cette molécule présente un problème de taille pour le traitement de patients : sa biodisponibilité. Une étude a démontré que l'administration de Resvératrol à des patients sains, autant par voie orale que par voie intraveineuse, résultait en une très faible quantité de Resvératrol non modifié dans la circulation sanguine de ceux-ci [165]. Ceci peut s'expliquer par le métabolisme très rapide du Resvératrol par le foie, qui augmente de ce fait la capacité d'excration du Resvératrol dans l'urine et dans les fèces. Les voies métaboliques impliquées comprennent principalement la conjugaison au sulfate ou à l'acide glucuronique. Ces métabolites perdent beaucoup d'efficacité pour agir contre les cellules cancéreuses, ce qui diminue l'efficacité du Resvératrol et limite ainsi son utilisation *in vivo* [166, 167]. Il est toutefois avancé par certains auteurs que les sulfatases et glucuronidases présentes dans différents tissus de l'organisme pourraient convertir une partie de ces métabolites en Resvératrol et donc restaurer son activité antitumorale, mais cette hypothèse est encore débattue [159, 166].

1.6 Objectifs de l'étude

En raison de l'importance du phénomène de métastasie dans la progression du cancer, nous avons voulu déterminer l'impact d'un traitement de chimiothérapie avec le cisplatine sur la transition épithéliale-mésenchymale dans deux lignées cellulaires de cancer ovarien. Ces cellules, A2780 et A2780CP, sont sensibles et résistantes au cisplatine respectivement et offrent un modèle intéressant afin d'étudier l'importance de la chimiorésistance dans l'induction potentielle de l'EMT par la chimiothérapie; les cellules résistantes au cisplatine devraient profiter du traitement pour progresser dans l'EMT contrairement aux cellules sensibles. En second lieu, nous nous sommes intéressés au Resvératrol, une molécule aux multiples effets bénéfiques pour la santé, qui est également reconnue pour ses propriétés anticancéreuses, et dont l'influence sur le processus d'EMT est encore relativement méconnu. Lors de traitements avec le cisplatine et le Resvératrol, nous avons étudié l'induction de la mortalité cellulaire par ces agents, l'induction de l'EMT par le cisplatine et son inhibition par le Resvératrol, dans notre modèle cellulaire (marqueurs de l'EMT, morphologie et migration). Nous avons également utilisé les cellules OVCAR-3 et SKOV-3 afin de consolider notre étude concernant l'impact du cisplatine et du Resvératrol sur le potentiel migratoire des cellules. Finalement, l'induction de la sénescence par le cisplatine et le Resvératrol a été considérée dans les cellules A2780 et A2780CP en tant que mécanisme alternatif d'inhibition de l'EMT induite par le cisplatine dans les cellules cotraitées avec le Resvératrol.

Parallèlement, une courte étude de l'induction de l'EMT dans des lignées cellulaires de cancer ovarien présentant différentes mutations pour la protéine p53 a été effectuée chez A2780 (p53 sauvage), A2780CP (p53 : un allèle muté, un allèle sauvage), OVCAR-3 (p53 muté) et SKOV-3 (sans p53 fonctionnel). Finalement, la mort cellulaire a été brièvement étudiée dans ce même modèle cellulaire lors d'un traitement conjoint avec le cisplatine et la cytokine TGF- β 1.

CHAPITRE II

RESVERATROL INHIBITS CISPLATIN-INDUCED EPITHELIAL-TO-MESENCHYMAL TRANSITION IN OVARIAN CANCER CELL LINES

Le contenu de ce chapitre a été publié en anglais dans la revue PLOS ONE en date du 22 janvier 2014.

2.1 Contribution des auteurs

Sébastien Baribeau a participé à la conception du projet de même qu'à sa planification. Il a réalisé les expériences présentées dans l'article, analysé les résultats et rédigé le manuscrit.

Parvesh Chaudhry a supervisé le projet de recherche et participé à sa conception de même qu'à l'analyse des résultats et a contribué à la réalisation des expériences.

Sophie Parent a réalisé les expériences présentées dans l'article.

Éric Asselin a supervisé le projet et participé à sa conception et à l'analyse des résultats. Il a participé à la rédaction du manuscrit et apporté les modifications finales.

2.2 Résumé de l'article

De nombreux patients atteints de cancer verront leur maladie récidiver et former des métastases. La transition épithéliale-mésenchymale (EMT) est un processus important dans la progression du cancer. En raison du lien cisplatine-EMT récemment démontré, nous avons voulu trouver un agent en mesure de contrer l'induction de cette transition lorsque les cellules sont traitées avec le cisplatine. La mort cellulaire a été

évaluée par double marquage Annexin-V/PI et lecture au cytomètre en flux chez les cellules A2780 et A2780CP. Les cellules ont été traitées avec du cisplatine, 10µM, et différentes concentrations de Resvératrol pour évaluer l'effet sur l'EMT induite par le cisplatine, par Western Blot et RT-PCR. Une étude de morphologie et de migration cellulaire a été effectuée sur une durée de 72h chez ces deux lignées cellulaires. Nos résultats indiquent que le cisplatine induit un changement morphologique chez les cellules cancéreuses ovariennes A2780 et également chez A2780CP, résistantes au cisplatine, avec une efficacité moindre. Le Resvératrol a causé une mortalité cellulaire chez les deux lignées par un processus indépendant de l'apoptose. Le Resvératrol a aussi inhibé l'induction de Snail par le cisplatine, a empêché le changement morphologie et diminué la capacité de migration cellulaire. De plus, le Resvératrol a induit un arrêt de croissance par sénescence chez les deux lignées cellulaires. Ces résultats indiquent que le Resvératrol est un composé intéressant pour contrer l'EMT induite par le cisplatine dans les cellules de cancer ovarien. En augmentant la mortalité cellulaire, le Resvératrol possède un intérêt certain comme traitement adjuvant à la chimiothérapie. L'utilisation d'inhibiteurs de la voie de la MAPK Erk pourrait également s'avérer bénéfique pour réduire la métastasie chez le cancer ovarien.

2.3 Article scientifique

Resveratrol inhibits cisplatin-induced epithelial-to-mesenchymal transition in ovarian cancer cell lines

Abstract

Background: Many patients diagnosed with ovarian cancer experience recurrence and metastasis, two aspects that will often cause their demise. Epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) is a key process involved in cancer progression. With increasing evidence linking Cisplatin and EMT, we wanted to identify a compound able to counter EMT progression when cancer cells are treated with Cisplatin.

Methodology/Principal Findings: Cell death was evaluated by cytometry with Annexin V/PI staining in A2780 and A2780CP cells. Ovarian cancer cell lines were treated with Cisplatin (24h, 10 μ M) and different concentrations of Resveratrol to evaluate its effect on Cisplatin-induced EMT using Western Blot and RT-PCR analysis. Morphological studies and wound healing assay to evaluate cell motility were performed using 72h Cisplatin treatment with A2780 and A2780CP cells. Densitometry was done on Western Blot and PCR results, and statistical significance was determined using One-Way ANOVA followed by Tukey post-hoc test. Our results show that Cisplatin induced EMT-associated morphological changes in the A2780 ovarian cancer cell line and to a lesser extent in its Cisplatin-resistant counterpart A2780CP. Resveratrol caused cell death in A2780 and A2780CP cell lines in an apoptotic-independent manner. Resveratrol inhibited Cisplatin-induced Snail expression by reducing the Erk pathway activation, reverted morphological changes induced by Cisplatin and decreased cell migration.

Conclusions: These results indicate that Resveratrol has interesting potential to prevent Cisplatin-induced EMT in ovarian cancer cells. By increasing cell death, it also represents an inviting approach as adjuvant therapy to be used with chemotherapy. Using Erk pathway inhibitors could also prove helpful in ovarian cancer treatment to reduce the risk of metastasis.

Introduction

Ovarian cancer is the seventh most common cancer and the third most common amongst gynaecological cancers in Canadian women. Ovarian cancer is also the gynaecological cancer with the highest mortality rate and a 5-year survival rate estimated to only 15-25% [1]. This can be explained by the fact that patients affected by ovarian cancer often already have a high-stage disease at the moment of diagnosis [2,3]. The usual treatment for ovarian cancer consists of surgical cytoreduction followed by platinum-based chemotherapy [4]. Despite initial response to the treatment, many

patients will relapse and eventually be affected by metastases and ultimately meet their demise.

Epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) is a physiological process that occurs during embryonic development and occasionally in adults, for example during wound healing [5]. EMT is a phenomenon during which cells will undergo a transition from an epithelial phenotype to a more motile and invasive mesenchymal phenotype, rendering them able to invade tissues and form metastases. The main hallmark of EMT is the loss of E-cadherin, a junction protein typically expressed in epithelial cells. In most cases, E-cadherin loss is mediated by transcriptional repressors, and mutations of the gene or the protein are not common events [6]. The most commonly involved repressors include Snail, Slug, and ZEB1 that directly bind to the E-cadherin promoter to repress its transcription [7,8]. Many factors are known to induce EMT, including cytokines such as TGF- β [9] or the MAPK-Erk pathway [10]. A recent study on ovarian cancer reported Cisplatin as an inducer of EMT [11].

Snail and Slug are transcription factors mainly known for their involvement in EMT where they repress the expression of epithelial markers, such as E-cadherin and Claudin-1, and increase the expression of mesenchymal markers, such as ZEB1 and MMP-9 [12-16]. They can also repress the expression and function of the tumor suppressor p53 and promote chemoresistance [17,18]. During EMT progression, it is believed that Snail will be the first factor to become active to initiate the transition whereas Slug would be expressed in later stages to allow the cells to retain their mesenchymal characteristics [19]. ZEB1 is another important promoter of EMT by repressing ZO-1 and E-cadherin [20], but can also be involved in increasing the proliferation rate of cells [21].

Resveratrol (trans-3,4',5-trihydroxystilbene) is a natural compound produced in many plants including red grapes [22], and subsequently present in wine, known for its antioxidant and its protective effects on the cardiovascular system and against cancer in

which it can inhibit multiple stages of the disease [23]. During the last years, these many effects placed Resveratrol in the spotlight of research.

In this study, we investigated the impact of Resveratrol on Cisplatin-induced EMT in ovarian cancer. We found that cells co-treated with Resveratrol and Cisplatin did not show the characteristic features of EMT, as Resveratrol treatment abrogated Cisplatin-induced Snail protein and mRNA expressions in a dose-dependent manner. This involved the Erk pathway, which was inhibited by Resveratrol and its involvement was confirmed via specific MEK1/2 inhibition with U0126. Resveratrol also blocked morphological changes in A2780 and A2780CP cells and decreased the migration ability of A2780 and A2780CP cells during a wound healing assay. Similar inhibition of migration was observed in OVCAR-3 and SKOV-3 cells. We also propose β -catenin as a marker of resistance to Cisplatin-induced apoptosis as it was cleaved only in Cisplatin-sensitive cell lines.

Materials and methods

Reagents

Dulbecco's modified Eagle medium-F12 (DMEM-F12), and Bovine growth serum (BGS) were purchased from HyClone (South Logan, Utah). Gentamycin, Cisplatin, and Resveratrol were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). The MEK1/2 inhibitor and the Senescence β -galactosidase staining kit were purchased from Cell Signaling Technology (Danvers, MA). Dead cell apoptosis kit with annexin-V/PI, Trizol reagent and Moloney murine leukemia virus (M-MLV) reverse transcriptase were purchased from Invitrogen (Carlsbad, CA).

Cell culture and treatment

Human ovarian cancer cell lines A2780 and A2780CP (resistant to Cisplatin) cells were a kind gift from Dr G. Peter Raaphorst (Ottawa Regional Cancer Center, Ottawa, Canada) and were originally described in [24]. OVCAR-3 and SKOV-3 cell lines were purchased from the ATCC. A2780 and A2780CP cells were cultured in DMEM-F12 medium supplemented with 2% BGS. OVCAR-3 cells were cultured in RPMI-1640 medium and SKOV-3 cells were cultured in McCoy's medium both supplemented with 10% FBS. Gentamycin (50 μ g/mL) was added to all culture media.

To study the impact of Resveratrol on Cisplatin-induced EMT, A2780 and A2780CP cells were co-treated with Resveratrol and 10 μ M Cisplatin for 24h. To study the impact of the Erk pathway on Cisplatin-induced EMT, ovarian cancer cell lines were pretreated with 20 μ M U0126 for 1h, then Cisplatin was added to the culture medium for 24h at a final concentration of 10 μ M. DMSO was used as control for U0126 and Resveratrol.

Detection of cell death by flow cytometry

A2780 and A2780CP cells were treated with Resveratrol and Cisplatin for 24h. At harvest, cells were centrifuged at 500rpm for 5 minutes, washed with PBS and then centrifuged 300rpm for 5 minutes. Cell death was evaluated with Annexin-V-FITC and propidium iodide (PI) double staining using dead cell apoptosis kit according to the manufacturer's protocol. Fluorescence was read using a Cytomics FC 500 MPL flow cytometer (Beckman Coulter). Positive cells for Annexin-V and/or PI were considered as dead cells.

MTT assay

Proliferation of A2780 and A2780CP cells was evaluated by MTT assay. Cells were plated in duplicate in 96-well plates and left to adhere overnight. The following day, cells in growth phase were treated with 0-60 μ M Resveratrol with or without 10 μ M Cisplatin for 24h in 100 μ L culture medium. 4h before the end of treatment, 10 μ L of MTT solution was added to each well and plates were placed in the incubator. 4h later, 100 μ L solubilisation solution (10% SDS in 0.01M HCl) was added to each well and plates were left in the incubator overnight. The following day, the absorbance was read at A595nm with a Fluostar Optima plate reader.

Western Blot

Cells were harvested after 24h Resveratrol-Cisplatin or U0126-Cisplatin treatment and washed twice with phosphate-buffered saline (PBS). Cells were then lysed in RIPA lysis buffer containing complete protease inhibitor cocktail (Roche Applied Science) and subjected to three freeze/thaw cycles at -20°C. Cells were then centrifuged and the supernatant was collected. Protein concentration was estimated using the BioRad DC Protein assay. Equal amount of proteins (20-40 μ g) were then separated onto SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes (BioRad, Hercules, CA). Membranes were blocked in 5% non-fat skimmed milk in PBS-Tween 20 0.05% (PBS-T) for 1h before incubation with primary antibody (diluted 1:1000 in PBS-T/milk) overnight at 4°C (all

antibodies are from Cell Signaling Technology, Danvers, MA, except GAPDH from Abcam (Cambridge, MA)). Primary antibody targeting Snail was incubated 2h at room temperature and HRP-conjugated-GAPDH was incubated 45 minutes at room temperature. After incubation, the membranes were washed four times in PBS-T before incubation with horseradish peroxidase conjugated secondary antibody (BioRad, Hercules, CA) diluted 1:3000 in PBS-T/milk. Membranes were washed four times in PBS-T and the antibodies were revealed using SuperSignal West Femto substrate (Thermo Scientific, Rockford, IL), as described by the manufacturer using UVP Bio Imaging System. GAPDH was used as loading control.

Cell morphology

Cells were grown in 6-well plates and then treated with 2.5 μ M Cisplatin and/or 60 μ M Resveratrol for 72h in A2780 and A2780CP cells to allow enough time for EMT morphological changes to occur. After treatment, cells were washed with fresh medium to remove dead cells. Finally, cells were observed under a Carl Zeiss Axio observerZ1 microscope to determine their morphology and picture were taken in phase contrast microscopy using 20X magnification. Cells presenting mesenchymal characteristics, with a more fibroblast-like morphology and cellular protusions, were considered as having undergone EMT.

Wound healing assay

To evaluate cell motility, cells were plated in 24-well plates and grown to confluence. A sterile tip was used to create a scratch in the cell layer. Cells were then treated with 2.5 μ M Cisplatin and 60 μ M Resveratrol and pictures were taken at appropriate times to evaluate wound closure. Wounds were evaluated using ImageJ software to measure the wound area at different time points. The percentage of wound closure was calculated as wound area at a given time compared to the initial wound surface. Pictures shown are representative of three independent experiments performed in duplicates.

Reverse Transcriptase PCR (RT-PCR)

Total RNA was extracted from treated cells using Trizol Reagent according to the manufacturer's instructions. 500ng of RNA was reverse transcribed using M-MLV reverse transcriptase and oligo(dT) primers. The reverse-transcribed RNA was then amplified by PCR using specific primers. GAPDH was used as an internal control. Human Snail was amplified using the sense primer 5'-TCGGAAGCCTAACTACAGCGA-3' and antisense primer 5'-AGATGAGCATTGGCAGCGAG-3' (fragment length 140bp). Human TCF8-ZEB1 was amplified using sense primer 5'-TTACACCTTGATACAGAACCC-3' and antisense primer 5'-TTTACGATTACACCCAGACTGC-3' (fragment length 100bp). Human Vimentin was amplified using sense 5'-CGAAAACACCCCTGCAATCTT-3' and antisense primer 5'-CTGGATTCCCTTCGTGGA-3' (fragment length 133bp). GAPDH was amplified using sense 5'-GTCAGTGGTGGACCTGACCT-3' and antisense primer 5'-GACTTGACAAAGTGGTCG-3' (fragment length 139bp). GAPDH was used as control.

Senescence-associated β -galactosidase staining

Cells were plated in 6-well plates and left to adhere overnight. The following day, cells were treated with 60 μ M Resveratrol and 2.5 μ M Cisplatin for 72h. After the treatment, cells were washed to remove non-adherent cells and stained with the Senescence β -galactosidase staining kit according to the manufacturer's instructions. Cells were then counted under a light microscope to evaluate the percentage of senescent cells which appeared as blue cells.

Densitometry and Statistical analysis

Densitometric analysis was done on the Western Blot results and PCR pictures using Quantity One software (BioRad) to determine the abundance of proteins or

amplified mRNA studied. In both cases, GAPDH was used as control. In wound healing assays, wound area was measured using ImageJ software. Wound closure was evaluated by comparing the wound area at a given time to the initial wound area. Comparison between treatments was performed using GraphPad PRISM software version 5.00 (San Diego, CA) using one-way ANOVA analysis and the post hoc Tukey's test. Statistical significance was accepted when $p < 0.05$. All experiments performed in this study were repeated three independent times.

Results

Resveratrol induces cell death in ovarian cancer cells

Treatment of A2780 and A2780CP ovarian cancer cells with Resveratrol increased cell death in a dose-dependent manner as shown by the proportion of PI-positive cells. The low proportion of Annexin-V staining in Resveratrol-treated samples but not in Cisplatin-treated samples suggests that Resveratrol might induce cell death through a different mechanism or occur faster than Cisplatin-induced cell death (Figure 1).

We investigated apoptosis and autophagy as potential cell death mechanisms. In A2780 cells, Cisplatin induced an increase in caspase-3 and PARP cleavage, indicating induction of cell death through apoptosis. By contrast, treatment of A2780 or A2780CP cells with Resveratrol did not affect the levels of cleaved caspase-3 despite the presence of dead cells, strengthening the possibility that a mechanism other than apoptosis is involved (Figure 2). We then decided to study autophagy induction by evaluating the expression levels of LC3B-II and Beclin-1, two proteins known for their involvement in autophagy progression. Resveratrol caused an increase in LC3B-II levels in both cell lines, supporting results from Oripipari et al. showing autophagy as a potential mechanism responsible for Resveratrol-induced cell death [25]. In our model, we did not observe an increase in Beclin-1 levels, which is already expressed at relatively high levels in A2780 and A2780CP cell lines.

Resveratrol potentiates Cisplatin-induced decrease in cell proliferation

We next sought to evaluate the effect of Resveratrol on the proliferation of A2780 and A2780CP cell lines. As shown in Figure 3, low doses of Resveratrol (20-40 μ M) slightly increases proliferation of both cell lines despite the cell death associated to this treatment. At the highest dose tested (60 μ M) Resveratrol induced a slight decrease in proliferation in A2780 cells and almost no change in A2780CP cells. In Cisplatin-sensitive A2780 cells, Resveratrol potentiates the decrease in cell proliferation observed when Cisplatin is used as treatment suggesting a synergistic action between these two compounds. This was not observed in Cisplatin-resistant A2780CP cells but the highest Resveratrol dose did not increase proliferation when used in combination with Cisplatin.

Resveratrol inhibits Cisplatin-mediated EMT induction in ovarian cancer cell lines

To assess the impact of Resveratrol on Cisplatin-induced EMT, A2780 and A2780CP cells were co-treated with Resveratrol and Cisplatin. As expected, treating the cells with Cisplatin increased the protein levels of Snail, Vimentin and ZEB1, three of the main markers of EMT. Treating the cells with Cisplatin and Resveratrol decreased the expression levels of Snail, but did not show this effect on Vimentin and ZEB1 expression. By contrast, these two proteins were slightly increased when cells were exposed to Resveratrol alone (Figure 4A). The decrease in Snail levels in A2780 treated with Resveratrol and Cisplatin correlates with a decrease in Snail mRNA levels. However, this was not the case in A2780CP cells where no significant change was observed in Snail mRNA levels between samples treated with Cisplatin and those treated with both Cisplatin and Resveratrol, suggesting some post-translational mechanisms might also be involved in Snail downregulation in these cells (Figure 4B). ZEB1 and Vimentin mRNA levels remained mostly unaltered in cells treated with either Resveratrol, Cisplatin or both agents. In our cell model, we could not assess EMT progression based on downregulation of E-cadherin because A2780 and A2780CP cells do not express this protein.

Activation of the MAPK Erk is associated with Cisplatin-induced EMT

We next investigated the mechanism by which Resveratrol counters Cisplatin-induced Snail expression. The MAPK/Erk pathway is one of the possible mechanisms that can be involved in EMT induction in cells. In A2780 and A2780CP cells, Erk2 phosphorylation was increased in response to Cisplatin. The activation of this pathway was significantly inhibited by Resveratrol, corresponding to a decrease in Snail levels in A2780 and A2780CP cell lines (Figure 4). To further confirm the involvement of Erk in the increase of Snail levels in response to Cisplatin, we used U0126, a MEK1/2 specific inhibitor (Figure 5). Pretreatment of cells with this inhibitor significantly reduced the activation levels of Erk2 in A2780 and A2780CP cells, which also correlated with a significant decrease in Snail protein in both cell lines. Slight increases in the protein levels of Vimentin and ZEB1 were also observed (Figure 5A). Snail mRNA levels were decreased when both cells lines were treated with Cisplatin and U0126, suggesting Cisplatin-induced Snail expression through the Erk pathway requires transcription of the Snail gene. ZEB1 and Vimentin mRNA levels did not show significant changes when A2780 and A2780CP cells were treated with Cisplatin and U0126 alone or in combination (Figure 5B). These results support Resveratrol-induced EMT inhibition through the Erk pathway.

Resveratrol blocks Cisplatin-induced morphological changes

In order to avoid excessive Cisplatin-induced cytotoxicity in A2780 cells, we decided to use 2.5 μ M Cisplatin to assess morphological changes in A2780 and A2780CP cells for a 72h treatment. Treatment of ovarian cancer cells with Cisplatin induced morphological changes reminiscent of EMT as the cells lost their epithelial cobblestone-like morphology to acquire a more elongated fibroblast-like shape. Cellular protusions also appeared in Cisplatin-treated cells compared to control samples. Both A2780 and A2780CP cells showed these modifications indicating their progression through EMT. To test the effect of Resveratrol on this phenomenon, we used 60 μ M, the concentration at which Snail downregulation was the most evident. Addition of Resveratrol to Cisplatin treatment blocked these morphological changes as the cells did

not acquire any of the characteristic mesenchymal morphological features (Figure 6). It is also interesting to note that Resveratrol-treated cells became bigger and displayed an irregular appearance suggesting another cellular transformation, such as a senescence program, could be occurring [26].

Resveratrol induces senescence

We evaluated senescence induction in our cell lines after Cisplatin and Resveratrol treatment and observed a significant increase in Resveratrol-induced senescence in both cell lines after 72h, with a more pronounced effect in A2780 cells (Figure 7). We also observed higher senescence levels in A2780 cells treated with Cisplatin and suggest that continuous exposure to Cisplatin might induce an oxidative stress leading to senescence in these Cisplatin-sensitive cells. Senescence induction in A2780 and A2780CP cells could be another mechanism involved in the inhibition of cisplatin-induced EMT by Resveratrol.

Resveratrol inhibits cell migration

Considering the morphological transformation occurring in A2780 and A2780CP cells, we next evaluated the migration ability of these cells with a wound healing assay. Cells were treated with $2.5\mu\text{M}$ Cisplatin, to avoid excessive cytotoxicity in A2780 cells, and $60\mu\text{M}$ Resveratrol. In both cell lines, 72h were required for the wound to completely close up in untreated cells, suggesting that these cell lines don't have a very mobile phenotype. Resveratrol treatment clearly inhibited cell migration at every time point where wound closure was evaluated, reducing the wound closure to only 20-25% after 72h for both cell lines whereas the control cells had almost completely closed the wounds (Figure 8A and 8B). Resveratrol's action would not be affected by Cisplatin in A2780CP cells where this agent exerted the same effect on the cells with or without Cisplatin.

Furthermore, we investigated the potential of Resveratrol to inhibit the migration ability of OVCAR-3 cells, an epithelial cell line expressing E-cadherin and without basal expression of ZEB1 or Vimentin which shows little migration potential, and SKOV-3 cells, a mesenchymal cell line showing basal expression of Vimentin and ZEB1 as well as a mesenchymal morphology and high migration potential despite basal E-cadherin expression (Figure S1). Similar to A2780 and A2780CP cells, OVCAR-3 cells required at least 72h to close the wound. In this cell line, Resveratrol significantly reduced the closure of the wound after 72h and at every time point studied when used in combination with Cisplatin. In SKOV-3 cells, only 24h were required to observe 80-85% wound closure and Resveratrol significantly decreased the migration of these cells when used alone or in combination with Cisplatin at this time point, indicating that this phytoalexin possesses the capacity to reduce the migration of cells that possess a high basal migration potential as well as cells with low migration potential (Figure 8C and 8D). Results observed in OVCAR-3 and SKOV-3 cells correlate with those observed in A2780 and A2780CP respectively, where sensitivity to cisplatin is also similar.

To address the possibility of an increase in the invasion potential of the cells, we performed a zymography assay in A2780, A2780CP, OVCAR-3 and SKOV-3 cells with Cisplatin and Resveratrol treatments. In all four cell lines, we only detected pro-MMPs at different levels, highest pro-MMP activity was observed in OVCAR-3 cells and lowest activity was observed in A2780 and A2780CP cells, which displayed almost no pro-MMP activity. We did not observe any active form of MMPs in this assay for any of the cell lines studied. Furthermore, Resveratrol and Cisplatin treatment, alone or in combination, did not affect pro-MMPs activity and did not induce active MMPs, suggesting that these treatment do not alter the invasion capacity of the cells (data not shown).

Discussion

Recently, Haslehurst et al. demonstrated an involvement for Snail and Slug, two of the main EMT activating transcription factors, in the chemoresistance of ovarian cancer [27]. Moreover, the demonstration that Cisplatin induces EMT [11] brings about a new

challenge: how to fight back? Indeed, preventing EMT induction by Cisplatin shows an interesting potential to help patients overcome chemotherapy resistance and metastatic dissemination. In order to try to answer to this problem, we evaluated the impact of Resveratrol, a natural compound known for its wide array of beneficial effects [28], on Cisplatin-induced EMT in ovarian cancer.

First, we assessed cell death in response to Cisplatin and Resveratrol in A2780 and A2780CP cells. In A2780 cells, Resveratrol increased cell death when used as a single treatment and when used in combination with Cisplatin where it potentiated Cisplatin-induced cell death. By contrast, in Cisplatin-resistant A2780CP cells, Resveratrol induced cell death to a lesser extent compared to A2780 cells when used as a single treatment and failed to sensitise A2780CP cells to Cisplatin-induced death in our conditions where cell death remained the same as Resveratrol treatment alone. Our results suggest apoptosis is not responsible for Resveratrol-induced cell death as there is no increase in cleaved caspase-3. An alternative mechanism of cell death could be autophagy, which was previously shown to be involved in ovarian cancer cell death by Resveratrol [25]. We also show an increase in LC3B-II in both cell lines, suggesting cell death could be caused by this cellular process despite no increase in Beclin-1 levels, which could be due to the time point selected.

We suggest that β -catenin could be used as a marker to evaluate cancer sensitivity to Cisplatin. In our model, only the sensitive cell line (A2780) displayed β -catenin downregulation when treated with Cisplatin (Figure 2), consequent with a previous report demonstrating β -catenin cleavage by caspase-3 during apoptosis [29]. However, β -catenin could not be used as a marker for caspase-independent cell death mechanisms as its downregulation requires caspase-3 activation.

Despite an increase in cell death, Resveratrol increased cellular proliferation when used at low doses (20 and 40 μ M) in our cell lines. We previously demonstrated that resveratrol can bind to the estrogen receptor α (ER α) in uterine cancer cells [30]. However, A2780 and A2780CP cell lines are ER α negative but we hypothesize that

Resveratrol might bind to the estrogen receptor β (ER β). This could also explain the synergistic action between Cisplatin and Resveratrol in A2780 cells since binding of Resveratrol to ER β could increase gene transcription and then expose DNA to Cisplatin and increase its efficiency to induce cell death.

We confirmed results published earlier in a study on ovarian cancer reporting that Cisplatin increases EMT markers in ovarian cancer [11]. Cisplatin caused an increase in the protein levels of Snail, ZEB1 and Vimentin in both cell lines studied as soon as 24h of treatment. Such a quick increase in Snail levels suggests that Cisplatin induces an EMT program even after a one-time/short-term treatment while TGF- β , a cytokine known for its ability to induce EMT, usually requires 72h to achieve this process [31]. The increase in Snail levels was reverted by Resveratrol in a dose-dependent manner, which would involve the Erk pathway, as confirmed by MEK1/2 specific inhibition by U0126. However, Resveratrol and U0126 still increased Vimentin and ZEB1 levels.

Despite their lack of E-cadherin expression, A2780 and A2780CP cells represent an interesting model to study the induction of EMT since they possess many of the characteristics of epithelial cells such as an epithelial morphology that is altered by Cisplatin, thus allowing cells to gain a fibroblast-like mesenchymal morphology (Figure 6), and a low migration capacity in basal conditions (Figure 8). By contrast, SKOV-3 cells, which express basal E-cadherin levels, do not display an epithelial phenotype as they display fibroblast-like morphology (Figure S1) and possess an evident capacity to close a wound under basal conditions (Figure 8). Thus, we believe that A2780 and A2780CP cells, despite their defaults in their expression of some of the EMT markers, are an interesting model to study EMT induction by cisplatin as they display many epithelial characteristics. Other research groups also used A2780 cells as an epithelial model in their studies. Recently, Fangfang Du et al. demonstrated the potential involvement of EMT in the acquisition of paclitaxel resistance in A2780 cells [32].

Furthermore, Cisplatin-resistant A2780CP cells, which are less sensitive to Resveratrol-induced cell death, support that results observed in A2780 cells regarding

EMT inhibition by Resveratrol are not due to excessive cell death and that Resveratrol possesses the potential to inhibit EMT in this cell model.

Another clue that Resveratrol inhibits Cisplatin-induced EMT came from the cellular morphology. Indeed, A2780 and A2780CP cells treated with Cisplatin alone displayed an evident morphology change from an epithelial cobblestone-like morphology to a more elongated morphology with cellular protrusions reminiscent of cells having undergone EMT. However, cells treated with both Cisplatin and Resveratrol did not show such morphological modifications.

Recent studies in lung and colon cancer showed that Resveratrol induces senescence when used at doses in a range corresponding to the doses used in our study when treated for at least 10-12 days [33,34]. We were then interested in studying senescence induction by Resveratrol in A2780 and A2780CP cells. According to our results, Resveratrol induces a senescent phenotype in A2780 and A2780CP cells after 72h of treatment in an interesting proportion of the cells. This phenomenon could also be a mechanism through which Resveratrol inhibits Cisplatin-induced EMT in A2780 and A2780CP cells since induction of senescence would inhibit the initiation of other cellular programs such as EMT and then block the effects of Cisplatin on these two ovarian cancer cell lines.

In wound healing assay, Resveratrol treatment displayed a marked decrease in cell migration in A2780 and A2780CP cells. This suggests that Resveratrol is able to inhibit migration, one of the main features acquired by cells undergoing EMT, and could then reduce metastatic potential of ovarian cancers. The decrease in migration observed for OVCAR-3 and SKOV-3 cells also holds potential for a wider application as Resveratrol also reduces the migration ability of another epithelial cell line, as well as a mesenchymal cell lines displaying a stronger migration capacity.

Recent studies using other cancer cell lines also support the role of Resveratrol in EMT inhibition. Vergara et al. demonstrated that Resveratrol inhibits EMT induction by

EGF in MCF-7 breast cancer cell line via inhibition of the EGF-mediated Erk pathway activation [35]. A study from another group also supports the role of Resveratrol in inhibiting EMT induction in cancer cells in A549 lung cancer cells. In their study, the authors report that Resveratrol blocks TGF- β 1 induced EMT and reduces the levels of EMT transcription factors Snail and Slug [36]. In our study, we suggest two mechanisms can be responsible for EMT inhibition by Resveratrol (Figure 9). Resveratrol treatment reduced Cisplatin-mediated activation of the Erk pathway in A2780 and A2780CP cells, thus inhibiting Snail expression. Furthermore, Resveratrol significantly induced senescence in both cell lines, which could act as a dominant protection program in the cell to prevent the activation of other cellular differentiation pathways. In this regard, as a bonus to preventing EMT induction by Cisplatin, Resveratrol could alter cellular proliferation pathways and be a major determinant to prevent cancer progression. The fact that more than 90% of ovarian cancers are of epithelial origin [37] allows EMT to play a determinant role in ovarian cancer progression. Another important aspect of EMT is its possible involvement in the ability of cancer cells to resist to chemotherapeutic agents as well as acquire other important advantages such as resistance to anoikis and evasion from the immune system [38]. Combining these important consequences of EMT, it is clear that this phenomenon is a major factor involved in the high mortality rates associated with ovarian cancer. Considering this, finding new approaches to block EMT induction in cancer shows great promise to improve the outcome for patients. Our results suggest that Resveratrol might be an interesting compound to prevent cancer development or as an adjuvant molecule for cancer treatment once diagnosed.

However, bioavailability of Resveratrol might be a problem since it is quickly metabolised and it might be difficult to reach high local concentrations matching the doses used during in vitro studies [39]. To assess this problem it would be important to find alternate routes of administration, such as localised treatment or local injections, to improve Resveratrol's effect on cancer cells. In regard of our results, targeting the Erk pathway also shows interesting promise to decrease cancer progression towards metastasis and could reveal an important asset in the fight against cancer.

Supporting Information

Figure S1 Epithelial and mesenchymal markers expressed in OVCAR-3 and SKOV-3 cells and their basal morphology.

Expression of the epithelial marker (E-cadherin) and expression of the mesenchymal markers (ZEB1, Vimentin and Snail) was determined in OVCAR-3 and SKOV-3 cells treated or not with Cisplatin and Resveratrol (A). Basal morphology is shown for both cell lines under their corresponding protein expression profile (B). Despite its E-cadherin expression, SKOV-3 displays morphological characteristics of mesenchymal cells.

Acknowledgments

We are grateful to Valerie Leblanc for her technical assistance throughout the study

Figures

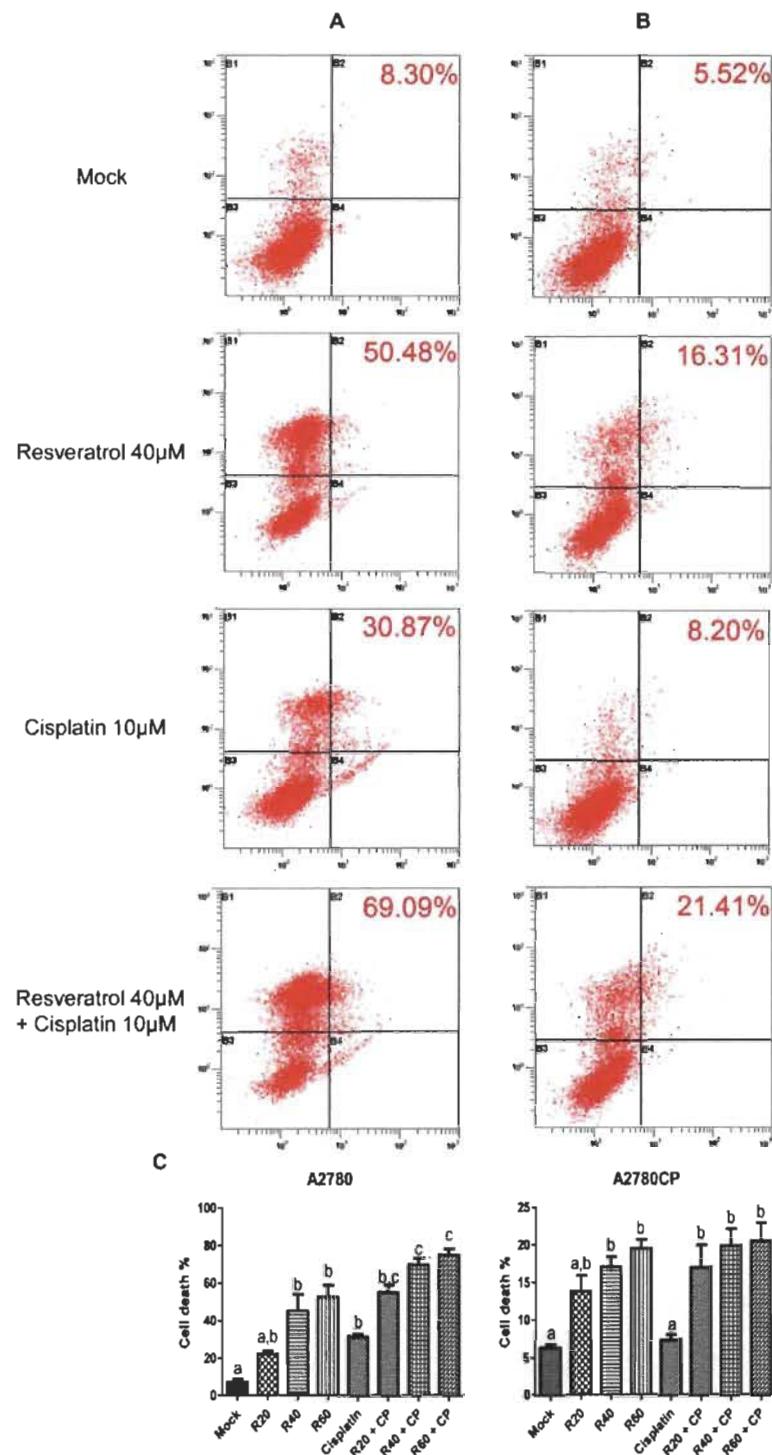


Figure 1 Resveratrol induces cell death and potentiates Cisplatin cytotoxicity

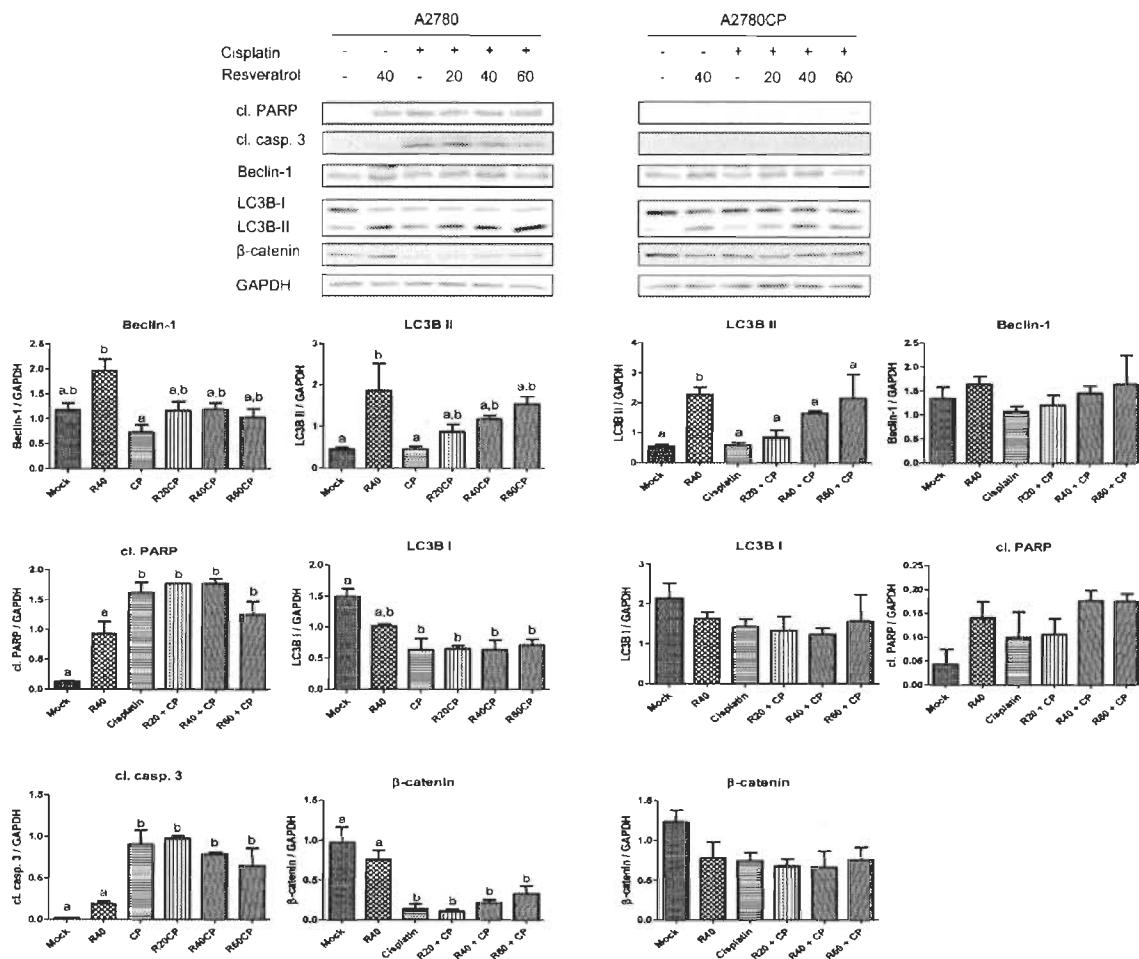


Figure 2 Resveratrol potentiates Cisplatin-induced cell death through autophagy

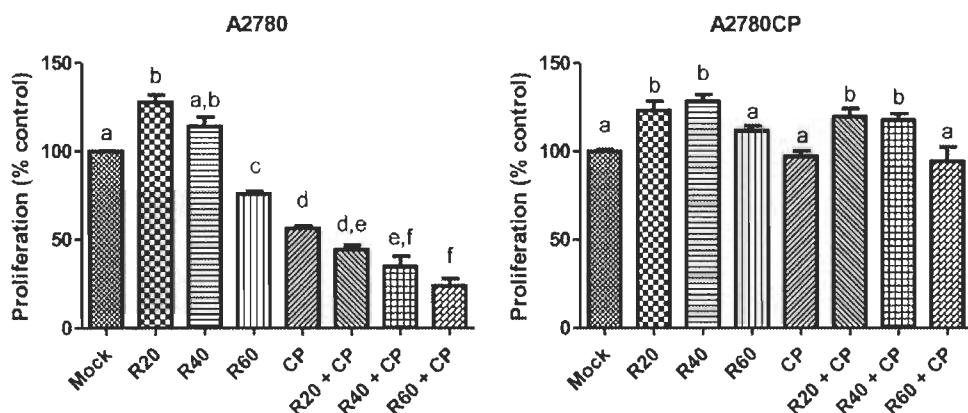


Figure 3 Resveratrol decreases proliferation of Cisplatin-sensitive A2780 cells but not Cisplatin-resistant A2780CP cells

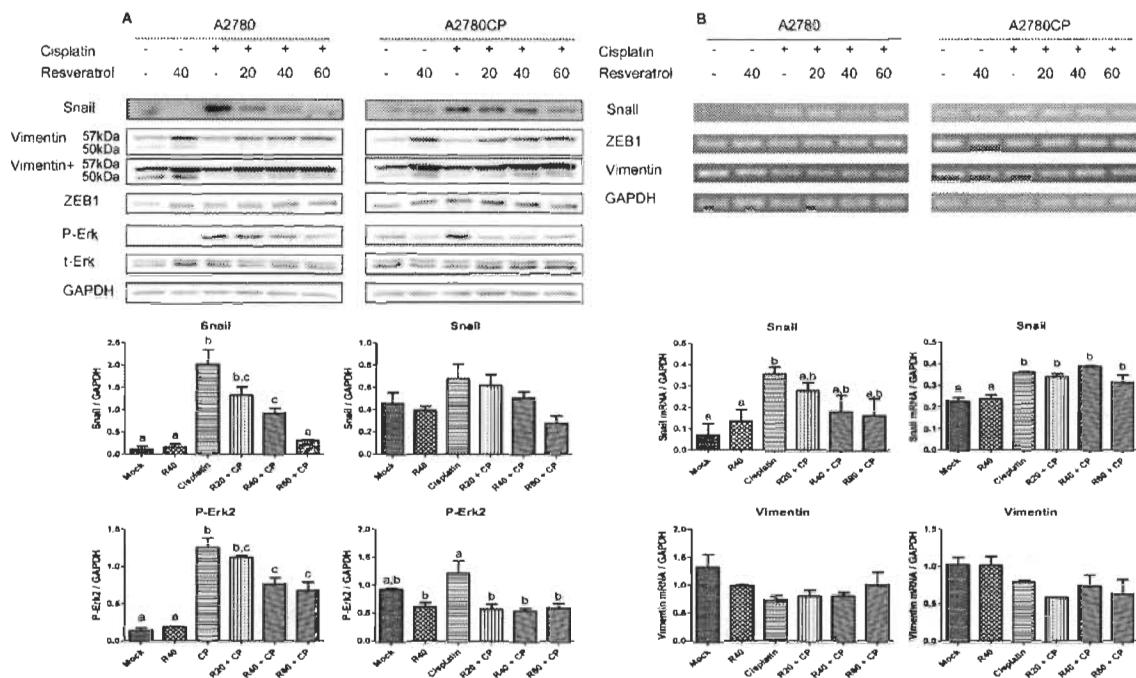


Figure 4 Resveratrol reduces Cisplatin-induced Snail expression

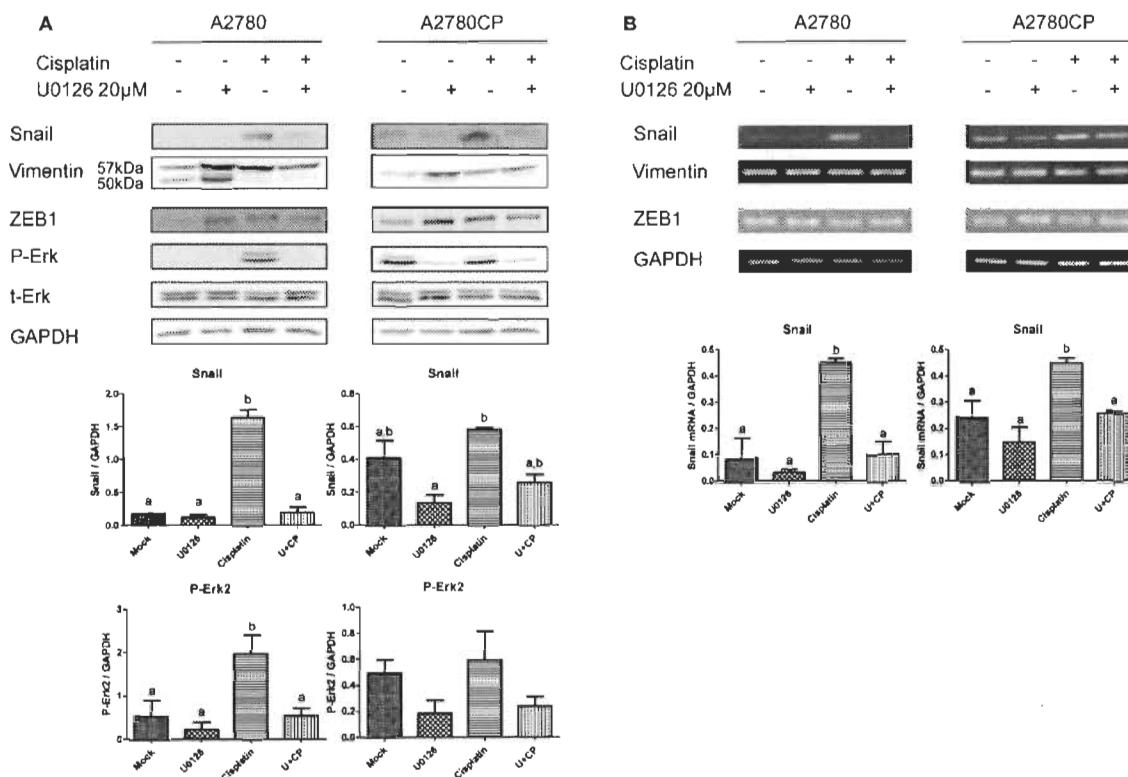


Figure 5 Erk inhibition abrogates Cisplatin-induced EMT in four ovarian cancer cell lines

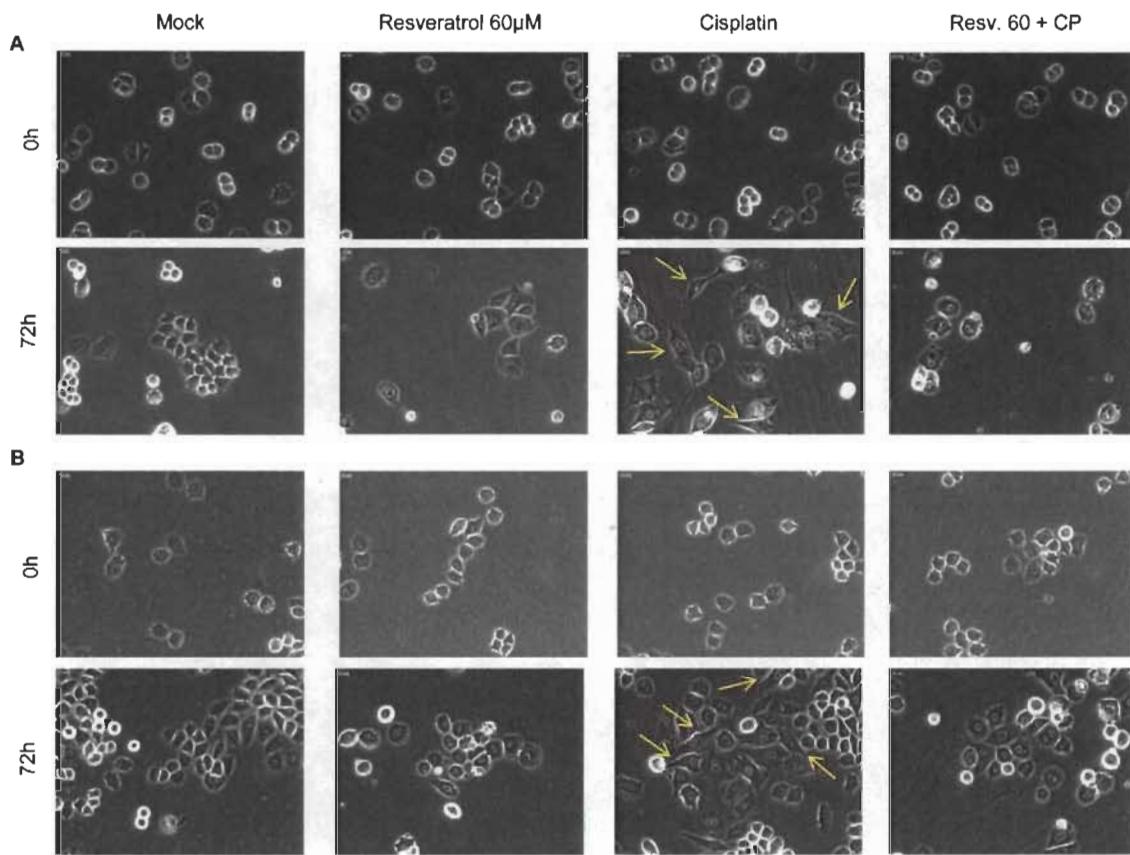


Figure 6 Resveratrol blocks EMT morphological changes induced by Cisplatin

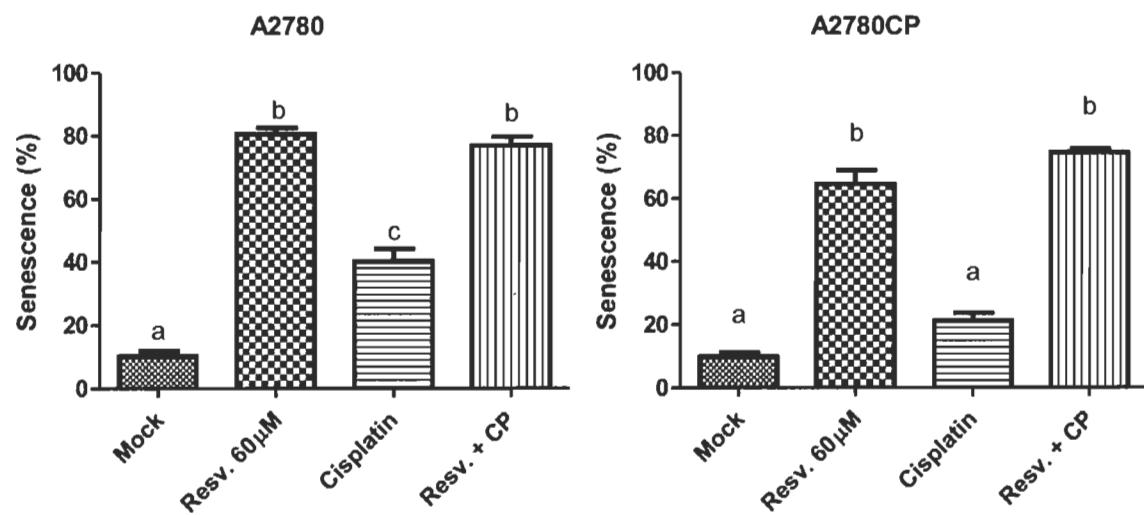


Figure 7 Resveratrol and Cisplatin induce senescence in ovarian cancer cell lines

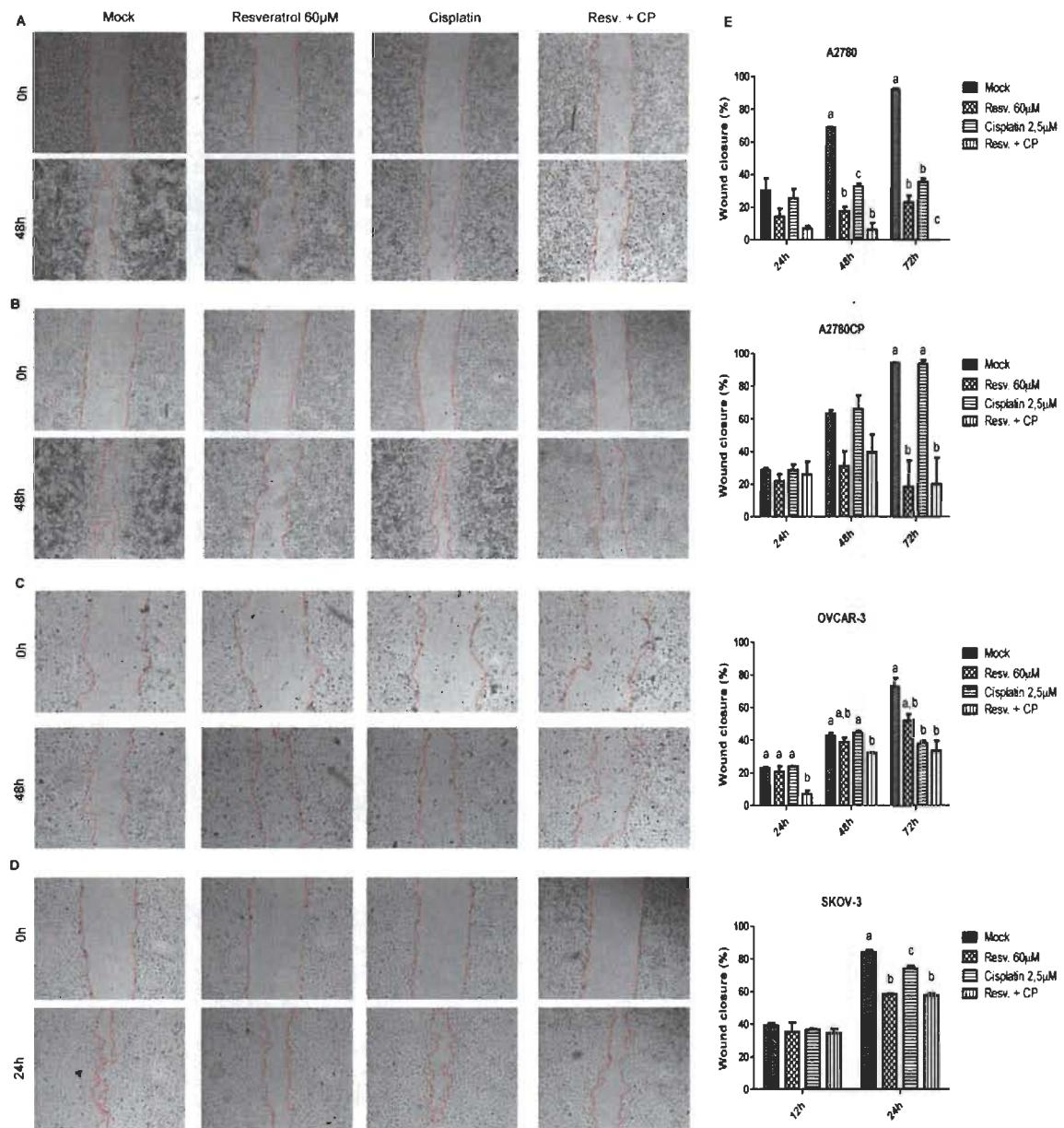


Figure 8 Wound healing capacity of ovarian cancer cell lines is impaired by Resveratrol

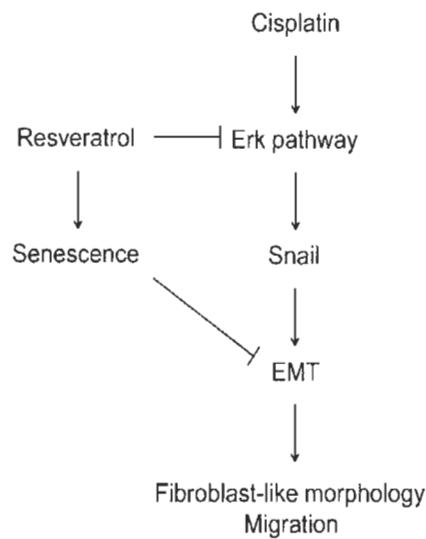


Figure 9 Involvement of Resveratrol in the inhibition of Cisplatin-induced EMT.

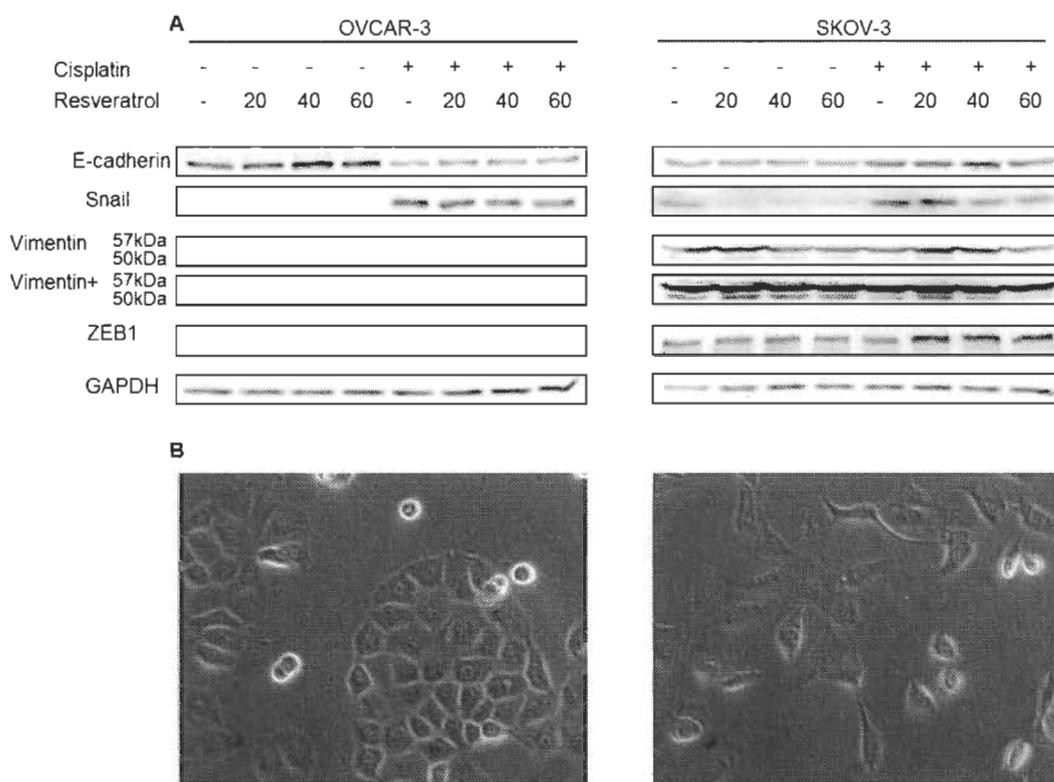


Figure S1 Epithelial and mesenchymal markers expressed in OVCAR-3 and SKOV-3 cells and their basal morphology.

Figure legends

Figure 1. Resveratrol induces cell death and potentiates Cisplatin cytotoxicity.

Cell death levels were evaluated by flow cytometry with Annexin-V and PI staining in A2780 and A2780CP cells. Representative flow cytometry results are shown for A2780 (A) and A2780CP cells (B) treated with 10 μ M Cisplatin and 40 μ M Resveratrol. In the upper right corner, percentage of cell death is shown, corresponding to apoptotic and necrotic cell death. Annexin-V and PI negative cells (B3) are non-apoptotic. Annexin-V positive and PI negative cells (B4) are in the early stages of apoptosis. Annexin-V positive and PI positive cells (B2) are in late apoptosis. Annexin-V negative and PI positive cells (B1) are necrotic cells. Cell death percentage is shown in (C) for both cell lines treated with increasing doses of Resveratrol up to 60 μ M with or without Cisplatin 10 μ M. Results shown are representative of three independent experiments. In graphs, columns identified with different letters are significantly different ($p<0.05$). In graphs, mock: untreated cells, R20: Resveratrol 20 μ M, R40: Resveratrol 40 μ M, R60: Resveratrol 60 μ M, CP: Cisplatin, R20CP: Resv. 20 μ M + Cisplatin, R40CP: Resv. 40 μ M + Cisplatin, R60CP: Resv. 60 μ M + Cisplatin.

Figure 2. Resveratrol potentiates Cisplatin-induced cell death through autophagy.

The mechanism of cell death was studied in A2780 and A2780CP cells in response to Cisplatin and Resveratrol. The absence of increase in cleaved PARP levels and caspase-3 cleavage when higher doses of Resveratrol are used suggests Resveratrol would induce cell death through a mechanism independent of apoptosis. The significant increase in LC3BII suggests Resveratrol could induce cell death through autophagy. Densitometry analysis is shown under Western Blot for each cell line. Results shown are representative of three independent experiments. In graphs, columns identified with different letters are significantly different ($p<0.05$). In graphs, mock: untreated cells, R40: Resveratrol 40 μ M, CP: Cisplatin, R20CP: Resv. 20 μ M + Cisplatin, R40CP: Resv. 40 μ M + Cisplatin, R60CP: Resv. 60 μ M + Cisplatin.

Figure 3. Resveratrol decreases proliferation of Cisplatin-sensitive A2780 cells but not Cisplatin-resistant A2780CP cells.

MTT assay was performed to evaluate A2780 and A2780 cell lines proliferation in response to 10 μ M Cisplatin and increasing doses up to 60 μ M of Resveratrol. A2780 cells proliferation was increased by Resveratrol at 20 μ M and decreased at 60 μ M while all doses suggest an increase in proliferation in A2780CP cells. Resveratrol also potentiates Cisplatin decrease of proliferation in A2780 cells. Graph bars with different letters are statistically different ($p<0.05$). In graphs, mock: untreated cells, R20: Resveratrol 20 μ M, R40: Resveratrol 40 μ M, R60: Resveratrol 60 μ M, CP: Cisplatin, R20CP: Resv. 20 μ M + Cisplatin, R40CP: Resv. 40 μ M + Cisplatin, R60CP: Resv. 60 μ M + Cisplatin.

Figure 4. Resveratrol reduces Cisplatin-induced Snail expression.

Western Blot analysis of EMT markers Snail, Vimentin and ZEB1 in A2780 and A2780CP (A) cells in response to 10 μ M Cisplatin with or without increasing doses of Resveratrol. Densitometric analysis is shown under each cell line Western Blots. Resveratrol inhibits Cisplatin-induced Snail expression in a dose-dependent manner but slightly increases ZEB1 and Vimentin levels. The Resveratrol dose-dependent decrease in P-Erk2 levels suggests the involvement of the Erk pathway in Resveratrol-induced Snail downregulation. The EMT markers Snail, Vimentin and ZEB1 expression were analysed by RT-PCR in A2780 and A2780CP (B) cells treated with 10 μ M Cisplatin with or without increasing doses of Resveratrol. Resveratrol or Cisplatin treatment had no effect on ZEB1 and Vimentin mRNA levels. Vimentin and ZEB1 densitometry is shown under each cell line. Snail mRNA expression was decreased only in A2780 cells, suggesting another mechanism could be involved in A2780CP cells. Images shown are representative of three independent experiments. In graphs, columns identified with different letters are significantly different ($p<0.05$). In graphs, mock: untreated cells, R40: Resveratrol 40 μ M, CP: Cisplatin, R20CP: Resv. 20 μ M + Cisplatin, R40CP: Resv. 40 μ M + Cisplatin, R60CP: Resv. 60 μ M + Cisplatin.

Figure 5. Erk inhibition abrogates Cisplatin-induced EMT in four ovarian cancer cell lines.

A2780 and A2780CP cell lines were pre-treated with U0126 to inhibit Erk activity and treated with Cisplatin for 24h. Western Blot are shown in (A). Corresponding densitometry is shown under each cell line. Erk inhibition reduced Cisplatin-induced Snail expression but slightly increased ZEB1 and Vimentin expression in both cell lines. Corresponding PCR results are shown in (B). Snail mRNA decrease in U0126+Cisplatin treated samples suggests Snail regulation by Cisplatin involves gene transcription. Results shown are representative of three independent experiments. In graphs, columns identified with different letters are significantly different ($p<0.05$). In graphs, mock: untreated cells, CP: Cisplatin, U+CP: U0126 + Cisplatin.

Figure 6. Resveratrol blocks EMT morphological changes induced by Cisplatin.

A2780 (A) and A2780CP (B) cell lines were treated for 72h with $2.5\mu\text{M}$ Cisplatin with or without $60\mu\text{M}$ Resveratrol to allow EMT morphological changes to become apparent. Cisplatin induced cellular morphological changes reminiscent of EMT in A2780 cells evident after 72h, which were abrogated when Resveratrol was added to the treatment. Resveratrol exerted the same effect on A2780CP cells although the morphological changes induced by Cisplatin were less pronounced. Cells were observed under 20X magnification, scale bar in the upper left corner of the pictures represent $20\mu\text{m}$. Arrows indicate examples of cells having undergone an EMT. Images shown are representative of three independent experiments.

Figure 7. Resveratrol and Cisplatin induce senescence in ovarian cancer cell lines.

Treatment of A2780 and A2780CP cells with Resveratrol significantly increased the proportion of senescent cells. Cisplatin induced a significant increase of senescence in A2780 cells. Cells were stained for β -galactosidase activity and counted under a light microscope to assess the percentage of senescent (blue) cells. In graphs, columns identified with different letters are significantly different ($p<0.05$). The analysis was performed with three independent experiments.

Figure 8. Wound healing capacity of ovarian cancer cell lines is impaired by Resveratrol.

The migratory ability of A2780 (A), A2780CP (B), OVCAR-3 (C), and SKOV-3 (D) cells was evaluated by wound healing assay. A scratch was made with a sterile tip in a confluent layer of cells and wound closure was observed after 24, 48, and 72h of Cisplatin and Resveratrol treatment for A2780, A2780CP, and OVCAR-3 cells, and 12 and 24h for SKOV-3, corresponding to the moment where the wound was almost completely closed. In both cell lines, Resveratrol decreased the migration of the cells in the wound, preventing its closing after 72h. Representative pictures are shown at t=48h. Graphical representation of wound closure after the different time points studied is shown in (E). Results shown are representative of three independent experiments performed in duplicates. In graphs, treatments are compared within each time point studied and columns identified with different letters are significantly different ($p<0.05$).

Figure 9 Involvement of Resveratrol in the inhibition of Cisplatin-induced EMT

Treatment of ovarian cancer cell lines with Cisplatin results in the activation of the Erk pathway and subsequent induction of Snail expression and induction of EMT. By contrast, Resveratrol prevents Cisplatin-mediated EMT induction by antagonizing the activation of the Erk pathway, thus preventing Snail levels increase and EMT induction. Furthermore, Resveratrol could also prevent Cisplatin-induced EMT through induction of a senescence program that would block the progression of other cellular differentiation programs like EMT.

Figure S1 Epithelial and mesenchymal markers expressed in OVCAR-3 and SKOV-3 cells and their basal morphology

Expression of the epithelial marker (E-cadherin) and expression of the mesenchymal markers (ZEB1, Vimentin and Snail) was determined in OVCAR-3 and SKOV-3 cells treated or not with Cisplatin and Resveratrol (A). Basal morphology is shown for both cell lines under their corresponding protein expression profile (B). Despite its E-cadherin expression, SKOV-3 displays morphological characteristics of mesenchymal cells.

References

1. Society CC (2011) Canadian Cancer Statistics.
2. Auersperg N, Wong AS, Choi KC, Kang SK, Leung PC (2001) Ovarian surface epithelium: biology, endocrinology, and pathology. *Endocr Rev* 22: 255-288.
3. Colombo PE, Fabbro M, Theillet C, Bibeau F, Rouanet P, et al. (2013) Sensitivity and resistance to treatment in the primary management of epithelial ovarian cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*.
4. Kim A, Ueda Y, Naka T, Enomoto T (2012) Therapeutic strategies in epithelial ovarian cancer. *J Exp Clin Cancer Res* 31: 14.
5. Thiery JP (2002) Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer* 2: 442-454.
6. Lombaerts M, van Wezel T, Philippo K, Dierssen JW, Zimmerman RM, et al. (2006) E-cadherin transcriptional downregulation by promoter methylation but not mutation is related to epithelial-to-mesenchymal transition in breast cancer cell lines. *Br J Cancer* 94: 661-671.
7. Nieto MA (2002) The snail superfamily of zinc-finger transcription factors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3: 155-166.
8. Aigner K, Dampier B, Descovich L, Mikula M, Sultan A, et al. (2007) The transcription factor ZEB1 (deltaEF1) promotes tumour cell dedifferentiation by repressing master regulators of epithelial polarity. *Oncogene* 26: 6979-6988.
9. Bakin AV, Tomlinson AK, Bhowmick NA, Moses HL, Arteaga CL (2000) Phosphatidylinositol 3-kinase function is required for transforming growth factor beta-mediated epithelial to mesenchymal transition and cell migration. *J Biol Chem* 275: 36803-36810.
10. Cui W, Yazlovitskaya EM, Mayo MS, Pelling JC, Persons DL (2000) Cisplatin-induced response of c-jun N-terminal kinase 1 and extracellular signal--regulated protein kinases 1 and 2 in a series of cisplatin-resistant ovarian carcinoma cell lines. *Mol Carcinog* 29: 219-228.

11. Latifi A, Abubaker K, Castrechini N, Ward AC, Liongue C, et al. (2011) Cisplatin treatment of primary and metastatic epithelial ovarian carcinomas generates residual cells with mesenchymal stem cell-like profile. *J Cell Biochem* 112: 2850-2864.
12. Batlle E, Sancho E, Franci C, Dominguez D, Monfar M, et al. (2000) The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nat Cell Biol* 2: 84-89.
13. Cano A, Perez-Moreno MA, Rodrigo I, Locascio A, Blanco MJ, et al. (2000) The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat Cell Biol* 2: 76-83.
14. Hajra KM, Chen DY, Fearon ER (2002) The SLUG zinc-finger protein represses E-cadherin in breast cancer. *Cancer Res* 62: 1613-1618.
15. Wels C, Joshi S, Koefinger P, Bergler H, Schaider H (2011) Transcriptional activation of ZEB1 by Slug leads to cooperative regulation of the epithelial-mesenchymal transition-like phenotype in melanoma. *J Invest Dermatol* 131: 1877-1885.
16. Kurrey NK, Amit K, Bapat SA (2005) Snail and Slug are major determinants of ovarian cancer invasiveness at the transcription level. *Gynecol Oncol* 97: 155-165.
17. Lee SH, Lee SJ, Jung YS, Xu Y, Kang HS, et al. (2009) Blocking of p53-Snail binding, promoted by oncogenic K-Ras, recovers p53 expression and function. *Neoplasia* 11: 22-31, 26p following 31.
18. Kurrey NK, Jalgaonkar SP, Joglekar AV, Ghanate AD, Chaskar PD, et al. (2009) Snail and slug mediate radioresistance and chemoresistance by antagonizing p53-mediated apoptosis and acquiring a stem-like phenotype in ovarian cancer cells. *Stem Cells* 27: 2059-2068.
19. Hotz B, Arndt M, Dullat S, Bhargava S, Buhr HJ, et al. (2007) Epithelial to mesenchymal transition: expression of the regulators snail, slug, and twist in pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* 13: 4769-4776.

20. Eger A, Aigner K, Sonderegger S, Dampier B, Oehler S, et al. (2005) DeltaEF1 is a transcriptional repressor of E-cadherin and regulates epithelial plasticity in breast cancer cells. *Oncogene* 24: 2375-2385.
21. Hu F, Wang C, Du J, Sun W, Yan J, et al. (2010) DeltaEF1 promotes breast cancer cell proliferation through down-regulating p21 expression. *Biochim Biophys Acta* 1802: 301-312.
22. Cal C, Garban H, Jazirehi A, Yeh C, Mizutani Y, et al. (2003) Resveratrol and cancer: chemoprevention, apoptosis, and chemo-immunosensitizing activities. *Curr Med Chem Anticancer Agents* 3: 77-93.
23. Jang M, Cai L, Udeani GO, Slowing KV, Thomas CF, et al. (1997) Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science* 275: 218-220.
24. Louie KG, Behrens BC, Kinsella TJ, Hamilton TC, Grotzinger KR, et al. (1985) Radiation survival parameters of antineoplastic drug-sensitive and -resistant human ovarian cancer cell lines and their modification by buthionine sulfoximine. *Cancer Res* 45: 2110-2115.
25. Opiari AW, Jr., Tan L, Boitano AE, Sorenson DR, Aurora A, et al. (2004) Resveratrol-induced autophagocytosis in ovarian cancer cells. *Cancer Res* 64: 696-703.
26. Chen QM, Tu VC, Catania J, Burton M, Toussaint O, et al. (2000) Involvement of Rb family proteins, focal adhesion proteins and protein synthesis in senescent morphogenesis induced by hydrogen peroxide. *J Cell Sci* 113 (Pt 22): 4087-4097.
27. Haslehurst AM, Koti M, Dharsee M, Nuin P, Evans K, et al. (2012) EMT transcription factors snail and slug directly contribute to cisplatin resistance in ovarian cancer. *BMC Cancer* 12: 91.
28. Catalgol B, Batirel S, Taga Y, Ozer NK (2012) Resveratrol: French paradox revisited. *Front Pharmacol* 3: 141.
29. Schmeiser K, Hammond EM, Roberts S, Grand RJ (1998) Specific cleavage of gamma catenin by caspases during apoptosis. *FEBS Lett* 433: 51-57.

30. Sexton E, Van Themsche C, Leblanc K, Parent S, Lemoine P, et al. (2006) Resveratrol interferes with AKT activity and triggers apoptosis in human uterine cancer cells. *MolCancer* 5:45.: 45.
31. Xie L, Law BK, Chytil AM, Brown KA, Aakre ME, et al. (2004) Activation of the Erk pathway is required for TGF-beta1-induced EMT in vitro. *Neoplasia* 6: 603-610.
32. Du F, Wu X, Liu Y, Wang T, Qi X, et al. (2013) Acquisition of paclitaxel resistance via PI3Kdependent epithelialmesenchymal transition in A2780 human ovarian cancer cells. *Oncol Rep* DOI 10.3892/ol.2013.1568.
33. Luo H, Yang A, Schulte BA, Wargovich MJ, Wang GY (2013) Resveratrol Induces Premature Senescence in Lung Cancer Cells via ROS-Mediated DNA Damage. *PLoS One* 8: e60065.
34. Heiss EH, Schilder YD, Dirsch VM (2007) Chronic treatment with resveratrol induces redox stress- and ataxia telangiectasia-mutated (ATM)-dependent senescence in p53-positive cancer cells. *J Biol Chem* 282: 26759-26766.
35. Vergara D, Valente CM, Tinelli A, Siciliano C, Lorusso V, et al. (2011) Resveratrol inhibits the epidermal growth factor-induced epithelial mesenchymal transition in MCF-7 cells. *Cancer Lett* 310: 1-8.
36. Wang H, Zhang H, Tang L, Chen H, Wu C, et al. (2013) Resveratrol inhibits TGF-beta1-induced epithelial-to-mesenchymal transition and suppresses lung cancer invasion and metastasis. *Toxicology* 303: 139-146.
37. Park SH, Cheung LW, Wong AS, Leung PC (2008) Estrogen regulates Snail and Slug in the down-regulation of E-cadherin and induces metastatic potential of ovarian cancer cells through estrogen receptor alpha. *Mol Endocrinol* 22: 2085-2098.
38. Tiwari N, Gheldof A, Tatari M, Christofori G (2012) EMT as the ultimate survival mechanism of cancer cells. *Seminars in Cancer Biology* 22: 194-207.
39. Gescher AJ, Steward WP (2003) Relationship between mechanisms, bioavailability, and preclinical chemopreventive efficacy of resveratrol: a conundrum. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 12: 953-957.

CHAPITRE III

RÉSULTATS SUPPLÉMENTAIRES

3.1 Étude p53 - EMT

Le second volet du projet a été consacré à l'étude de l'induction de l'EMT par le cisplatine chez le cancer ovarien en relation avec différentes mutations de la protéine p53. Afin d'étudier cet aspect, nous avons utilisé quatre lignées cellulaires de cancer ovarien possédant différentes mutations pour cette protéine : A2780 (p53 normal), A2780CP (un allèle normal, un allèle muté V172F), OVCAR-3 (p53 muté R248Q) et SKOV-3 (sans expression de p53) [168-170]. Lors de l'étude de l'expression de p53 chez ces lignées, nous avons observé la présence d'une bande relativement faible pour p53 chez la lignée SKOV-3 malgré qu'elle soit reconnue en littérature comme étant « p53-null » (Figure 3.1). Toutefois, SKOV-3 ne possédait aucune expression de Mdm2, autant en conditions basales que lors du traitement avec le cisplatine, et l'expression de p53 n'a aucunement été modulée par le cisplatine. Cela suggère que, malgré la présence d'une bande pour p53, SKOV-3 présenterait un phénotype « sans p53 fonctionnel » puisque la principale cible transcriptionnelle de p53, Mdm2, n'est aucunement présente, ce qui correspondrait aux descriptions de la littérature à l'effet que SKOV-3 serait « p53-null ».

Pour évaluer l'induction de l'EMT par le cisplatine dans ces lignées, nous avons traité les quatre lignées cellulaires avec le cisplatine pour une durée de 24h et évalué l'expression de quelques marqueurs de cette transition (Figure 3.1). Chez les quatre lignées, le cisplatine a provoqué une augmentation évidente de l'expression de Snail ainsi qu'une augmentation de ZEB1 et de Vimentine, sauf chez OVCAR-3 où aucune expression de ZEB1 et de Vimentine n'a été observée. Les changements de Vimentine, en particulier pour A2780 et A2780CP, montrent une diminution de la bande de 50kDa et une augmentation de celle de 57kDa, suggérant une augmentation de la rigidité du

cytosquelette de Vimentine. De plus, une légère diminution, non significative, de l'expression du marqueur E-cadhérine a été observée chez les lignées OVCAR-3 et SKOV-3, les seules à posséder une expression basale pour cette protéine, suggérant que Snail, et possiblement d'autres facteurs, sont bel et bien activés pour réprimer ce marqueur épithéial. Ces changements suggèrent une induction rapide de l'EMT chez les quatre lignées après le traitement de 24h au cisplatine, et ce, indépendamment des mutations de la protéine p53. L'induction de l'EMT par le cisplatine ne serait donc aucunement dépendante de la fonction de ce suppresseur de tumeur. Ces résultats suggèrent que tout cancer pourrait être susceptible de procéder à l'EMT lors d'un traitement au cisplatine. Ce phénomène de transformation cellulaire suite à un traitement avec un agent chimiothérapeutique est donc particulièrement préoccupant.

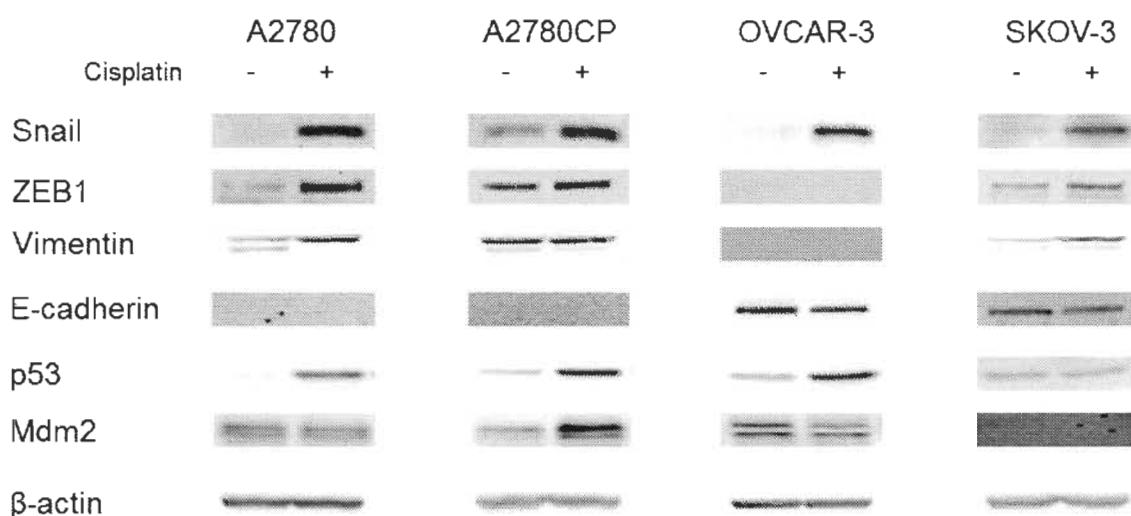


Figure 3.1 Le cisplatine induit l'EMT indépendamment des mutations de p53.

L'induction de l'expression de marqueurs de l'EMT a été évaluée chez quatre lignées cellulaires possédant différentes mutations pour la protéine p53 : A2780 (sauvage), A2780CP (un allèle sauvage, un allèle muté V172F), OVCAR-3 (muté R248Q) et SKOV-3 (sans p53 fonctionnel). Les cellules ont été traitées avec du cisplatine 10 μ M pour 24h et l'expression de facteurs de transcription inducteurs de l'EMT a été étudiée. Chez les quatre lignées, une augmentation marquée de l'expression

de Snail a été observée, de même qu'une augmentation de Vimentine et de ZEB1 chez les lignées l'exprimant, indiquant que p53 ne serait pas impliqué dans l'induction de l'EMT par le cisplatine.

Malgré que l'absence d'une protéine p53 fonctionnelle chez SKOV-3 n'empêche pas l'induction de l'EMT par le cisplatine, cet aspect pourrait toutefois permettre à ces cellules d'adopter un phénotype mésenchymal en conditions basales. En effet, ces cellules possèdent une morphologie irrégulière se rapprochant des cellules mésenchymales lorsqu'elles sont cultivées *in vitro*, démontrant une apparence presque fibroblastique avec la présence de prolongements cytoplasmiques. De plus, lors d'un essai de migration cellulaire, la lignée SKOV-3 est la seule des quatre lignées qui possède un potentiel évident de migration après 24h en conditions basales où près de 80-85 % de la plaie a été refermée. Les trois autres lignées, pour leur part, démontrent un faible potentiel de migration et requièrent 72h de croissance pour refermer la plaie (Figure 3.2). L'effet du Resvératrol sur la migration de cette lignée cellulaire a également été étudié lors d'un essai de migration, en mesurant la migration après 12h et 24h. Après 12h, aucun changement n'a été observé entre les cellules, peu importe le traitement utilisé (résultats non montrés). Toutefois, après 24h, le Resvératrol a provoqué une diminution significative de la migration cellulaire, réduisant cette dernière à environ 60 %. Cela suggère que l'effet du Resvératrol sur la diminution de migration ne requiert pas la présence de p53 fonctionnelle et pourrait s'appliquer à une vaste majorité de cancers ovariens. Cependant, de manière surprenante, une légère diminution de la migration a été observée en réponse au cisplatine après 24h de traitement qui ne peut pas être expliquée par l'induction de mort cellulaire chez cette lignée qui est résistante à ce traitement.

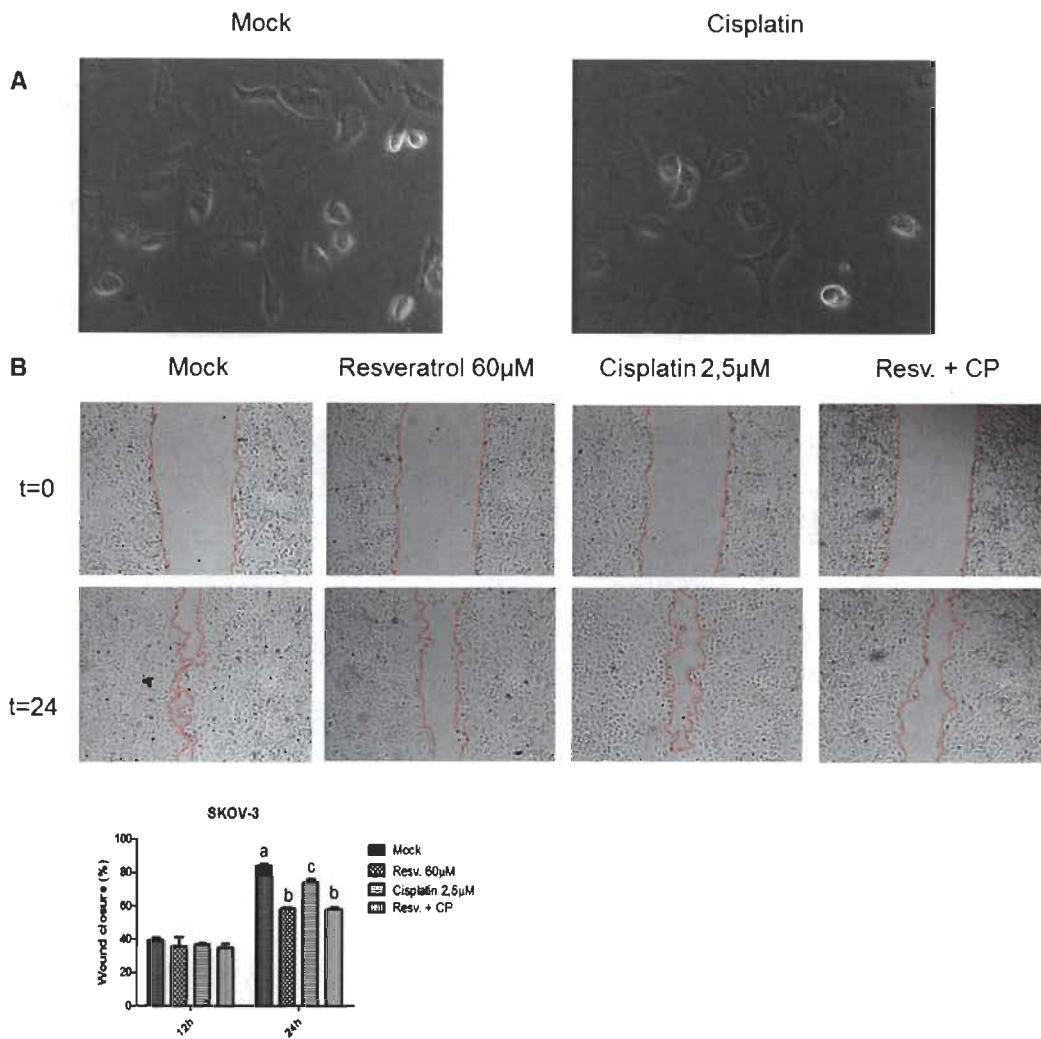


Figure 3.2 Les cellules SKOV-3 possèdent un phénotype mésenchymal en conditions basales.

La morphologie et la capacité des cellules SKOV-3 en conditions basales et lors d'un traitement avec le cisplatine ont été étudiées. La morphologie cellulaire est montrée en (A) pour les cellules en conditions basales et traitées au cisplatine où, dans les deux cas, une morphologie davantage mésenchymale peut être observée. En (B), la capacité de migration des cellules a été évaluée lors d'un essai de migration 24h après avoir créé la plaie. Les cellules SKOV-3 démontrent une capacité de migration évidente après 24h, ce qui a été significativement inhibé par le Resvératrol et, moins efficacement, par le cisplatine.

3.2 Étude de la mort cellulaire avec le TGF- β , les mutations de p53 et le cisplatine

Lors du début du projet, nous nous sommes intéressés au TGF- β , une cytokine présentant habituellement des effets bénéfiques pour l'organisme mais qui, lors de la progression du cancer, ne parviendra plus à jouer ces rôles protecteurs auprès des cellules cancéreuses. Dans ce modèle d'étude, l'utilisation du TGF- β_1 en combinaison avec le cisplatine n'a pas produit de résultats concluants; cette stratégie étant, dans la majorité des cas, inefficace pour moduler la mort cellulaire observée chez ces quatre lignées cellulaires. En effet, aucun changement dans les niveaux de caspase-3 clivée ou de PARP clivé n'a été observé chez nos lignées, sauf chez les cellules SKOV-3 où l'utilisation de cette cytokine a diminué le clivage de la protéine PARP. Ces résultats permettent de croire qu'à plus long terme, cette lignée cellulaire pourrait bénéficier du TGF- β afin d'augmenter sa capacité de survie (Figure 3.3). Nous avons également remarqué une tendance vers l'augmentation pour l'expression de Mdm2, responsable de la dégradation de la protéine p53 par le protéasome. Nos résultats sont en accord avec des résultats publiés par une autre équipe qui a démontré l'induction de l'expression génétique de Mdm2 suite à un traitement avec le TGF- β chez le cancer du sein [141]. Cependant, notre modèle d'étude n'était pas totalement adéquat puisque les lignées A2780 et A2780CP ne répondent pas à la stimulation avec le TGF- β_1 par la voie canonique comme en témoigne l'absence de phosphorylation de la protéine Smad2 malgré une exposition des cellules à la cytokine.

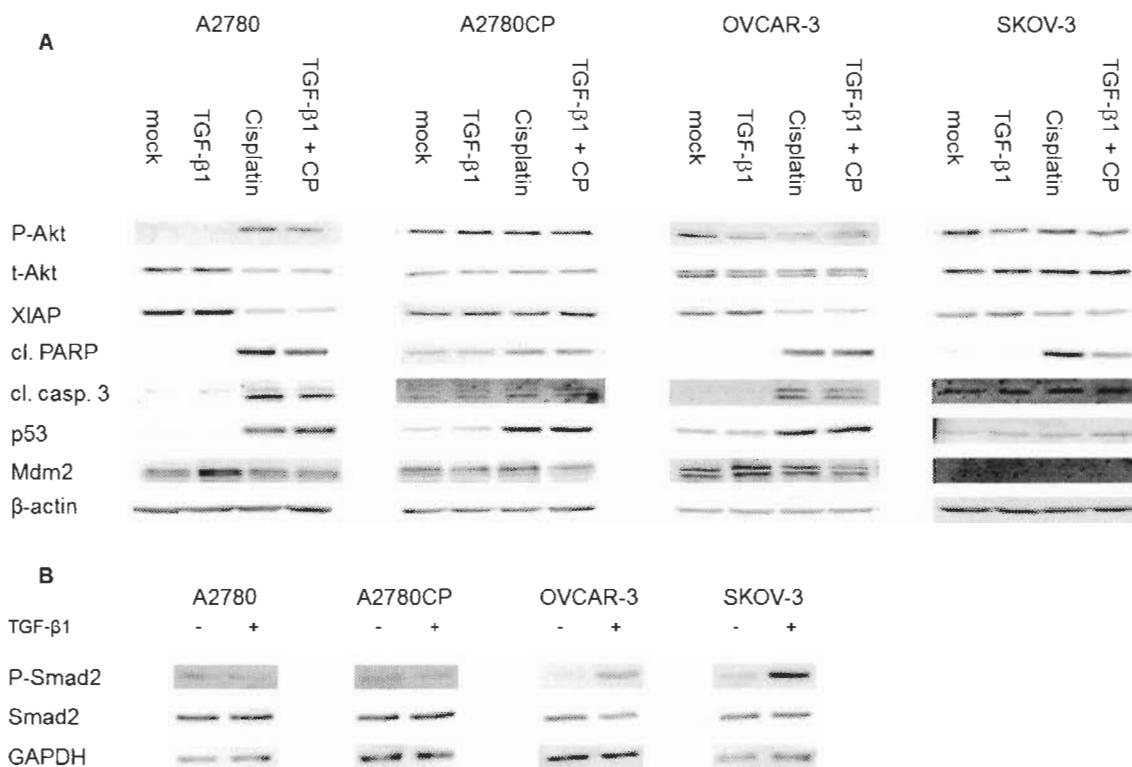


Figure 3.3 Étude de la mort cellulaire dans quatre lignées de cancer ovarien

Les quatre lignées cellulaires, possédant diverses mutations pour la protéine p53, ont été traitées avec l'isoforme TGF- β 1 (10ng/mL) et le cisplatine (10 μ M) pour une durée de 24h. Les cellules A2780 et OVCAR-3 sont davantage sensibles au cisplatine que les cellules A2780CP et SKOV-3, lesquelles y sont résistantes. A2780 ont p53 normal, A2780CP ont un allèle muté V172F et un allèle normal, OVCAR-3 ont une mutation R248Q et SKOV-3 sont sans p53 fonctionnel. En (A), différents marqueurs de la mort par apoptose ainsi que p53 et Mdm2 ont été étudiés. En (B), la phosphorylation de Smad2 en réponse au TGF- β 1 a été évaluée pour les quatre lignées cellulaires. CP : cisplatine.

CHAPITRE IV

DISCUSSION

Le cancer ovarien est une maladie fréquemment diagnostiquée à un stade avancé avec des métastases en raison de l'absence de symptômes spécifiques, ce qui en complique le traitement [7]. De ce fait, c'est un cancer présentant un taux de mortalité élevé, d'où l'importance de trouver des alternatives pour son traitement. Un phénomène cellulaire important dans la progression cancéreuse est la transition épithéliale-mésenchymale (EMT), qui favorise l'apparition de métastases et l'acquisition des caractéristiques du cancer en général [5, 40]. Le cisplatine, tout comme ses dérivés, est un agent de chimiothérapie couramment utilisé depuis la fin des années 70 dans la lutte contre le cancer, dont le cancer ovarien [20]. Cependant, la résistance à ce traitement, innée ou acquise en cours de traitement, représente un problème de taille pour les patients atteints de cancer. Le Resvératrol, pour sa part, est une phytoalexine reconnue pour son vaste éventail d'effets bénéfiques. Parmi ceux-ci se retrouvent des propriétés antioxydantes, des vertus cardioprotectrices, un rôle anti-inflammatoire ainsi qu'une capacité à agir contre les cellules cancéreuses, autant pour empêcher leur apparition que pour inhiber la progression de la maladie [150, 171].

Haslehurst *et al.* ont récemment démontré une implication pour Snail et Slug, deux des principaux facteurs de transcription impliqués dans l'induction de l'EMT, dans la chimiorésistance du cancer ovarien [49]. De plus, la démonstration que le cisplatine induit l'EMT chez les cancers ovariens [36] amène un nouveau défi : comment contrer ce phénomène? En effet, empêcher l'induction de l'EMT par des agents chimiothérapeutiques s'avérerait particulièrement bénéfique pour les patients atteints du cancer, diminuant les risques de rechute et de métastasie à la suite de leur traitement en plus d'inhiber l'acquisition d'autres avantages reliés à l'EMT tels qu'une meilleure capacité de survie et l'acquisition de propriétés de cellules souches incluant une capacité de réplication illimitée [42]. Pour tenter de contrer ce phénomène, nous nous sommes

intéressés au Resvératrol puisque la relation entre cette molécule et l'induction de l'EMT par le cisplatine est inconnue.

Dans notre étude, nous avons utilisé deux lignées cellulaires de cancer ovarien : les cellules A2780 (sensibles au cisplatine) ainsi que les cellules A2780CP (dérivées de A2780, résistantes au cisplatine). Ces cellules présentent l'avantage d'être isotypiques et de ne différer l'une de l'autre que par l'acquisition d'une résistance au cisplatine, ce qui en fait un excellent modèle d'étude de la chimiorésistance. Ceci permet d'éviter des résultats qui pourraient être différents en raison d'un profil d'expression génétique ou protéique différent entre deux lignées cellulaires qui ne seraient pas identiques. L'utilisation de ces deux lignées cellulaires nous permet de croire que les différences observées entre les deux lignées peuvent être attribuables à la chimiorésistance.

Tout d'abord, nous avons évalué l'effet du Resvératrol et du cisplatine sur la mortalité cellulaire. Chez A2780 et A2780CP, cette phytoalexine induit la mortalité cellulaire, avec un effet davantage marqué chez A2780, qu'elle soit utilisée seule ou en combinaison avec le cisplatine. Elle agit en synergie avec le cisplatine chez les cellules A2780 en augmentant la mort cellulaire, mais ne parvient pas à augmenter la sensibilité des cellules A2780CP à cet agent chimiothérapeutique dans les conditions utilisées dans notre étude. Nos résultats démontrent que l'apoptose ne serait pas responsable de la mort induite par le Resvératrol, contrairement à celle induite par le cisplatine, puisqu'aucune augmentation des niveaux de caspase-3 clivée n'a été observée lorsque les cellules sont traitées avec le Resvératrol. Parallèlement, chez les cellules traitées avec le Resvératrol, la cytométrie en flux révèle seulement une très faible proportion de cellules passant par les quadrants correspondants aux cellules marquées positivement avec l'Annexine-V contrairement au cisplatine où les cellules passent par ces quadrants (Figure 1). Ce résultat nous a amenés à considérer que la mort cellulaire induite par le Resvératrol pourrait être due à un mécanisme différent de l'apoptose induite par le cisplatine. De ce fait, un mécanisme alternatif, l'autophagie, pourrait être impliqué dans notre modèle cellulaire. L'induction de ce type de mort cellulaire par le Resvératrol a déjà été démontré par d'autres chercheurs dans les cancers ovariens [159]. Une augmentation

significative des niveaux de LC3B-II a été observée chez les deux lignées cellulaires traitées avec le Resvératrol, ce qui indique une augmentation de l'autophagie chez ces cellules et qui supporte la mort cellulaire par ce mécanisme. Cependant, aucune augmentation de Beclin-1 n'a été trouvée, ce qui pourrait être attribuable au temps de traitement choisi. Vérifier l'expression de Beclin-1 à un temps de traitement plus court aurait potentiellement permis d'obtenir une augmentation des niveaux de celle-ci.

Dans notre modèle cellulaire, une diminution des niveaux de β -caténine a été observée lors du traitement avec le cisplatine seulement chez les cellules A2780 (Figure 2), sensibles à cet agent, ce qui corrèle avec les résultats d'une autre équipe qui a démontré le clivage de la β -caténine par la caspase-3 [94]. La β -caténine pourrait ainsi être utilisée comme marqueur pour évaluer la sensibilité au cisplatine, et à la mort par apoptose en général, mais ne pourrait servir pour d'autres formes de mort cellulaire comme l'autophagie qui requièrent pas l'activation de la caspase-3.

Lorsqu'utilisé aux doses les plus faibles, 20 μ M et 40 μ M, le Resvératrol induit une augmentation de la prolifération cellulaire chez les deux lignées cellulaires, et ce, malgré une certaine mortalité cellulaire. Notre laboratoire a précédemment démontré que le Resvératrol peut lier le récepteur aux oestrogènes α chez le cancer utérin [155]. Cependant, les cellules A2780 et A2780CP sont négatives pour ce récepteur, et l'effet ne peut donc pas être expliqué par ce mécanisme. En revanche, il serait possible que le Resvératrol puisse lier le récepteur aux oestrogènes β et ainsi avoir un impact sur la prolifération cellulaire puisque le Resvératrol est une phytooestrogène [143]. De plus, la liaison au récepteur aux oestrogènes β pourrait expliquer la synergie entre le Resvératrol et le cisplatine chez les cellules A2780 puisque l'activation du récepteur, augmenterait la quantité d'ADN exposé au cisplatine, ce qui favoriserait ainsi l'efficacité de cet agent chimiothérapeutique à induire la mort de la cellule.

Nos résultats confirment les résultats publiés précédemment qui montrent qu'un traitement avec le cisplatine induit l'EMT dans le cancer ovarien [36]. Le cisplatine a causé une augmentation des niveaux des protéines Snail, ZEB1 et Vimentine dans les

deux lignées cellulaires après un traitement de 24 heures. Une induction de l'expression de Snail aussi rapide suggère que l'activation du programme d'EMT par le cisplatine peut se produire après une seule exposition de courte durée à cet agent chimiothérapeutique, conférant ainsi un avantage immédiat aux cellules qui survivront au choc cytotoxique. Cela pourrait leur permettre, entre autres, d'augmenter leur chimiorésistance et d'augmenter leur aptitude pour la formation de métastases. Cette hypothèse es supportée par l'observation que la lignée A2780CP, résistante au cisplatine, exprime un niveau basal de Snail supérieur comparativement à A2780, laquelle lignée ne possède aucune expression basale de cette protéine. Pour sa part, le TGF- β , une cytokine également reconnue pour induire ce phénomène, requiert habituellement 72h pour accomplir cette transformation cellulaire et nécessite également une perte de sensibilité à ses fonctions de suppresseur de tumeur [111].

L'utilisation du Resvératrol en cotraitement avec le cisplatine diminue l'expression de Snail de manière dose dépendante chez les deux lignées cellulaires. Chez A2780, cela impliquerait la voie de signalisation de la MAPK Erk, laquelle est diminuée de manière dose-dépendante par la Resvératrol. Cependant, chez la lignée A2780CP, la diminution de l'expression de Snail causée par le Resvératrol ne serait pas entièrement due à cette voie de signalisation et impliquerait davantage un mécanisme posttraductionnel puisque l'ARNm ne varie presque pas chez cette lignée. L'implication de la MAPK Erk dans l'augmentation de Snail a été confirmée par l'utilisation de l'inhibiteur spécifique de MEK1 et de MEK2, U0126, qui a également contré l'induction de l'expression de Snail par le cisplatine. Cependant, le Resvératrol et l'inhibiteur U0126 ont provoqué une augmentation des niveaux de Vimentine et de ZEB1, lorsqu'ils ont été utilisés seuls.

La Vimentine présente deux bandes chez certaines lignées cellulaires, une à 57kDa et l'autre à 50kDa. Dans une étude effectuée chez un modèle de levure lors d'une infection virale, une équipe a démontré une augmentation de la phosphorylation de la Vimentine provoquant une modification similaire de la taille de la protéine lors de la migration en Western Blot, ce qui pourrait impliquer le clivage de la Vimentine [172].

De plus, Goto *et al.* ont démontré la phosphorylation de la Vimentine sur plusieurs résidus par la protéine p21-activated kinase. Cette hyperphosphorylation de la Vimentine mène à une désorganisation du réseau de filaments intermédiaires ainsi qu'à la condensation de la Vimentine en granules [173]. En contrepartie, la protéine phosphatase 2A peut déphosphoryler la Vimentine et empêcher sa réorganisation en granules [174]. Dans notre modèle les deux bandes de Vimentine sont augmentées par le traitement au Resvératrol ou à l'inhibiteur U0126, avec un effet davantage marqué pour la bande non phosphorylée apparaissant à 57kDa. Cela suggère une possible augmentation de la rigidité du cytosquelette qui se réorganisera moins facilement et donc une diminution du potentiel de motilité cellulaire. L'augmentation globale d'expression de cette protéine, pour sa part, serait attribuable à une augmentation de sa stabilité puisqu'aucune modification dans la quantité d'ARNm n'a été observée par RT-PCR. Dans le cas de ZEB1, son augmentation n'est pas significative, mais pourrait être un mécanisme cellulaire pour augmenter sa survie puisqu'il s'agit de l'un des rôles potentiels de ZEB1.

Pour confirmer l'induction de l'EMT dans notre modèle cellulaire, nous avons étudié la morphologie des cellules après un traitement de 72 heures avec le Resvératrol et le cisplatine d'une durée de 72 heures afin de permettre la progression de l'EMT. Le traitement des cellules avec le cisplatine a provoqué les changements morphologiques caractéristiques de l'EMT, c'est-à-dire un changement d'apparence d'une morphologie régulière épithéliale vers une apparence se rapprochant du fibroblaste avec l'apparition de projections cytoplasmiques, et ce, chez les deux lignées cellulaires. Lorsque les cellules ont été cotraitées avec le Resvératrol et le cisplatine, les changements morphologiques ont été bloqués. Par ailleurs, le traitement avec le Resvératrol seul n'a pas provoqué de changement vers une apparence fibroblastique, ce qui confirme que cette molécule n'induit pas l'EMT lorsqu'utilisée comme seul traitement. Ces résultats suggèrent que l'utilisation du Resvératrol, à titre préventif ou en tant que traitement seul, n'augmente pas les risques de métastasie et pourrait même prévenir l'apparition de cellules métastatiques au sein d'une tumeur.

Le traitement avec le Resvératrol affecte la morphologie cellulaire et les cellules deviennent plus grosses et irrégulières, ce qui suggère la possibilité d'induction d'un programme de sénescence. Des études effectuées sur les cancers du poumon et du colon ont démontré l'induction de la sénescence par le Resvératrol lorsqu'utilisé à des doses similaires à celles utilisées dans notre étude lors d'un traitement de dix à douze jours [151, 175]. Nous avons évalué l'induction de la sénescence par le Resvératrol et le cisplatine par marquage colorimétrique de l'activité de la β -galactosidase associée à la sénescence. Chez les deux lignées cellulaires, le Resvératrol a induit une augmentation significative de la sénescence, avec une efficacité davantage marquée chez A2780 comparativement à A2780CP, atteignant une proportion d'environ 80 % et 65 % respectivement. Il est important de noter ici que les cellules A2780 et A2780CP expriment le suppresseur de tumeur p53, une protéine importante dans l'induction de la sénescence [176], et que cela pourrait en partie expliquer l'induction de l'arrêt de croissance chez ces cellules. De plus, une certaine proportion des cellules traitées au cisplatine a également été marquée positivement pour la sénescence, dans une proportion plus grande chez les cellules sensibles à cet agent, ce qui pourrait être attribuable au choc oxydatif soutenu causé par le cisplatine, un stimulus reconnu comme facteur inducteur de la sénescence par exemple lors de l'utilisation du peroxyde d'hydrogène pour induire la sénescence [177].

L'acquisition d'un phénotype motile est une des caractéristiques acquises par les cellules qui progressent dans l'EMT. Afin d'évaluer la capacité de migration en réponse au Resvératrol et au cisplatine, nous avons effectué un essai de migration cellulaire. Lorsque les cellules A2780 et A2780CP ont été traitées avec le Resvératrol, une diminution marquée de leur potentiel de migration a été observée. La capacité du Resvératrol à interférer avec la migration cellulaire permet de croire que cet agent pourrait diminuer le potentiel métastatique des cellules cancéreuses de l'ovaire en diminuant leur capacité à quitter la tumeur principale. Toutefois, dans les conditions utilisées dans notre étude, le cisplatine n'a pas été en mesure d'augmenter la migration cellulaire. Ce résultat pourrait être attribué à la dose utilisée qui n'était peut-être pas suffisante, puisque nous voulions comparer les cellules A2780 et A2780CP en utilisant

le même traitement. Comme les cellules A2780 sont très sensibles au cisplatine, la dose de cisplatine utilisée était relativement faible. Parallèlement, le temps de traitement était peut-être trop court avec cette faible dose pour que le phénotype migratoire apparaisse chez ces cellules.

Des études récentes supportent également le rôle du Resvératrol potentiel dans l'inhibition de l'EMT dans diverses lignées cellulaires cancéreuses. Vergara *et al.* ont démontré que le Resvératrol inhibe l'induction de l'EMT par le facteur de croissance épidermique (EGF) chez la lignée de cancer du sein MCF-7, et ce, en inhibant l'activation de la voie de signalisation de la MAPK Erk [99]. Une autre étude supporte également l'inhibition de l'EMT par le Resvératrol, chez le cancer du poumon. Le Resvératrol empêche alors l'induction de l'EMT par le TGF- β 1 chez les cellules A549, où une diminution de Snail et de Slug a été démontrée, mais le mécanisme impliqué n'a pas été démontré par les auteurs [98]. Il serait toutefois plausible d'avancer comme hypothèse que la MAPK Erk pourrait être impliquée également dans ce contexte puisqu'il s'agit de l'une des voies de signalisation utilisées par le TGF- β pour induire l'EMT [111]. Ces études, ainsi que la nôtre, mettent en évidence un nouveau rôle pour le Resvératrol dans l'inhibition de la progression du cancer et ouvrent la voie à de nouvelles avenues thérapeutiques qui pourraient permettre d'empêcher la métastasie, autant pour le cancer en cours de traitement que lors d'une rechute.

À cet effet, le Resvératrol apparaît comme une stratégie thérapeutique intéressante, autant en prévention du cancer que pour le traitement de celui-ci. Toutefois, l'un des principaux problèmes rencontrés lors de l'utilisation du Resvératrol est sa biodisponibilité. En effet, cette molécule est rapidement métabolisée et atteint seulement de faibles concentrations sanguines et locales, beaucoup plus faibles que les doses utilisées *in vitro*, ce qui pourrait diminuer grandement son efficacité et compromettre son utilisation clinique [178]. Afin de surmonter cet obstacle, des stratégies telles que l'administration du Resvératrol par des voies alternatives, comme une injection localisée au site de la tumeur, ou la modification chimique de la molécule, pourraient s'avérer plus adéquate pour atteindre une efficacité optimale. Par exemple, une étude a utilisé

divers dérivés méthylés du Resvératrol et a démontré que certains d'entre eux, en particulier ceux ayant un groupement méthyle aux positions 3, 4 et 5, possédaient une plus grande cytotoxicité *in vitro* sur différentes lignées cellulaires cancéreuses. Aucun test n'a cependant été effectué *in vivo* ou sur des lignées cellulaires normales [179]. L'effet de tels composés sur des cellules saines, et plus spécifiquement les dommages qu'ils pourraient causer à un organisme, est présentement inconnu. Toutefois, si ces derniers sont bien tolérés par les cellules saines, une concentration réduite serait requise au site tumoral pour obtenir un effet appréciable. Un tel composé pourrait alors être validé en vue d'une éventuelle utilisation comme traitement chez des patients. Par ailleurs, l'efficacité des métabolites du Resvératrol sur les cellules cancéreuses n'est pas bien connue, mais les informations disponibles indiquent que ces métabolites perdraient leur efficacité auprès des cellules cancéreuses [166, 167].

Lors d'une étude réalisée sur un modèle de souris traitées au cisplatine, un rôle protecteur contre les effets secondaires reliés à ce traitement a été démontré pour le Resvératrol. En effet, chez les souris prétraitées au Resvératrol avant l'administration de cisplatine, la toxicité associée au traitement de chimiothérapie a été diminuée chez les cellules somatiques et germinales, et ce, grâce à une réduction du stress oxydant causé par le cisplatine [180]. De ce fait, grâce notamment à ses propriétés antioxydantes, le Resvératrol s'avère une solution intéressante afin de diminuer les effets secondaires causés par un traitement au cisplatine et ainsi augmenter la qualité de vie des patients et éviter des complications causées par la toxicité de la chimiothérapie. Une autre étude effectuée chez le rat a démontré que le Resvératrol n'est pas toxique et est bien toléré par les animaux à des doses allant jusqu'à $700\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{jour}^{-1}$ pour une durée de 90 jours [181], ce qui permet de croire que le Resvératrol ne serait pas davantage dommageable chez l'humain. Ces deux arguments favorisent l'étude du Resvératrol, et d'éventuels dérivés, dans le but d'en arriver à une formulation pharmaceutique efficace pour faciliter la lutte contre le cancer.

Parallèlement, nos résultats indiquent également que la protéine p53, un important suppresseur de tumeur fréquemment muté dans le cancer, ne serait pas impliquée dans

l'induction de l'EMT par le cisplatine. Pour réaliser cette étude, nous avons utilisé quatre lignées cellulaires de cancer ovarien présentant différentes mutations dans la protéine p53 : A2780 (p53 sauvage), A2780CP (un allèle sauvage, un allèle muté V172F), OVCAR-3 (p53 muté R248Q) et SKOV-3 (sans expression de p53) [168-170]. Lors du traitement au cisplatine, une augmentation des niveaux de Snail chez les quatre lignées, et une augmentation de ZEB1 et de Vimentine chez toutes les lignées sauf OVCAR-3, ce qui permet de croire que les mutations de p53 n'influencerait pas l'induction de l'EMT par le cisplatine malgré que p53 puisse inhiber ce processus de dédifférentiation [182]. De ce fait, cette observation suggère que tout cancer, en supposant que nos résultats soient aussi valides pour d'autres organes, est susceptible de progresser vers l'EMT lors du traitement avec le cisplatine quelle que soit son expression de p53 et renforce l'importance de l'EMT dans le cancer. Toutefois, l'inhibition partielle de l'expression du marqueur épithéial E-cadhérine suggère que le traitement de 24h ne soit pas suffisant pour permettre une pleine progression dans l'EMT et qu'un traitement de plus longue durée offrirait une EMT plus complète.

En ce qui concerne l'étude réalisée avec le TGF- β 1 et le cisplatine, le choix des lignées cellulaires a été inadéquat en raison de la machinerie signalétique défectueuse dans les cellules A2780 et A2780CP, ce qui compromet les résultats obtenus dans ce volet de l'étude. Afin de pallier cette situation, une stratégie différente devrait être employée afin de vérifier l'interaction entre la signalisation du TGF- β et différentes mutations de la protéine p53. Par exemple, il serait envisageable d'utiliser les cellules SKOV-3, initialement sans p53 fonctionnel, et de réintroduire l'expression de la protéine p53 dans ces cellules, en utilisant un plasmide encodant une protéine p53 normale ou mutée. De cette façon, les résultats obtenus seraient davantage valides et pourraient efficacement être comparés avec comme avantage supplémentaire de ne faire varier que la protéine p53 puisque tous les résultats proviendraient de la même lignée cellulaire.

Par ailleurs, notre modèle cellulaire corrèle avec une étude réalisée par Sood *et al.* à l'effet que des patientes atteintes de cancer ovarien possédaient des métastases distantes seulement si leur cancer n'exprimait pas la protéine p53 [125]. De manière

similaire, dans notre modèle d'étude, seule la lignée SKOV-3, sans p53 fonctionnel, possède des caractéristiques de cellules mésenchymales en conditions basales *in vitro* et est directement issue des ascites d'une patiente, une indication d'une tendance vers la métastasie [6, 183]. Sans traitement, cette lignée possède une morphologie irrégulière se rapprochant du fibroblaste avec prolongements cytoplasmiques et possède une capacité de migration évidente lors d'un essai de migration, refermant 80 % de la plaie après seulement 24h. Ces aspects renforcent l'hypothèse selon laquelle p53 serait requise en conditions basales afin de réprimer l'induction de l'EMT chez les cancers ovariens, malgré que p53 ne soit pas en mesure de contrer complètement l'induction de l'EMT par le cisplatine.

Une hypothèse pour expliquer ce phénomène pourrait provenir de la capacité de p53 à induire l'expression de micro-ARNs, dont certains des familles miR-200 et miR-34, qui ont pour fonction de réprimer l'expression des protéines Snail, Slug et ZEB1 notamment, en ciblant leur ARNm. En perdant cette fonction pour p53, les cellules pourraient perdre ces inhibiteurs de l'EMT et, en conditions basales, être en mesure de progresser dans cette transition pour obtenir certaines propriétés de cellules mésenchymales.

La transition épithéliale-mésenchymale est un phénomène préoccupant pour les patients atteints de cancer puisqu'elle favorise la progression tumorale ainsi que l'apparition de métastases. De plus, puisqu'environ 90 % des cancers ovariens sont d'origine épithéliale [41], l'EMT doit être considérée comme une menace à prendre au sérieux. L'importance de l'EMT dans le cancer ne se limite pas seulement au processus métastatique, mais concerne également l'acquisition de résistance à la mort induite par les thérapies couramment utilisées (notamment la chimiothérapie et la radiothérapie), la résistance à l'anoïkose, l'évasion du système immunitaire ainsi que l'apparition d'un phénotype de cellules souches [40]. Ces nombreuses facettes de l'EMT renforcent son implication dans le cancer et la possible corrélation avec un haut taux de mortalité chez les patients affectés par cette maladie. En raison de ces multiples facettes de l'EMT, empêcher son développement dans le cancer est un objectif qu'il serait particulièrement

bénéfique à atteindre pour augmenter les chances de survie des patients et améliorer leur qualité de vie.

Cette étude a permis, tout d'abord, de confirmer l'induction de l'EMT par le cisplatine chez le cancer ovarien, processus qui se produit par la voie de la MAPK Erk. Par la suite, nous avons démontré, pour la première fois, la capacité du Resvératrol à inhiber la transition épithéliale-mésenchymale induite par le cisplatine chez le cancer ovarien. Cependant, nous avons étudié seulement deux lignées cellulaires, ce qui représente seulement une faible proportion des cancers ovariens et constitue donc une limitation importante de nos résultats. Pour remédier à cela, utiliser d'autres lignées cellulaires de cancer ovarien est à envisager afin d'obtenir un échantillon davantage représentatif de tous les cancers ovariens chez la population et avoir une plus grande diversité cellulaire.

Si les résultats s'avèrent intéressants avec les autres lignées cellulaires, il deviendrait alors envisageable d'étendre l'étude à d'autres cancers, par exemple ceux du sein et de l'utérus, afin de vérifier l'application de nos résultats. Éventuellement, vérifier cet aspect *in vivo*, chez des souris, serait la prochaine étape afin de conclure si les résultats obtenus peuvent être reproduits dans un modèle vivant. En effectuant une greffe de cellules cancéreuses, il serait possible de recréer une tumeur et de vérifier si le Resvératrol parvient toujours à inhiber la progression tumorale et la métastasie. De plus, cela permettrait de comparer divers modes d'administration du Resvératrol, soit par voie orale, intraveineuse ou même par injection localisée au site de la greffe tumorale, afin de déterminer la meilleure procédure pour obtenir un effet et une dose optimaux et mesurer la toxicité chez ce modèle animal.

Comparer des lignées cellulaires avec des différences dans l'expression de p53 est également un volet qu'il pourrait être intéressant d'étudier afin de mieux cerner une implication potentielle de p53 dans la réponse cellulaire au Resvératrol. Par exemple, en utilisant les cellules SKOV-3, sans p53 fonctionnel, il serait possible d'exprimer cette

protéine, mutée ou non, et d'évaluer son impact sur l'EMT, autant en conditions basales que lors de traitements avec le Resvératrol et le cisplatine.

Outre l'inhibition de l'EMT, le Resvératrol possède également la capacité d'induire la mort cellulaire par autophagie chez notre modèle de cellules cancéreuses, et ce, plus efficacement chez A2780, également sensible au cisplatine. Ce résultat suggère que l'acquisition de la résistance au cisplatine augmenterait également la résistance à d'autres formes de mort cellulaire, conférant par le fait même un avantage supplémentaire aux cellules résistantes au cisplatine. Chez de telles cellules multirésistantes, l'utilisation de composés induisant l'autophagie serait limitée en raison de sa plus faible efficacité. Toutefois, le Resvératrol induit également la sénescence dans notre modèle cellulaire, ce qui offre une stratégie thérapeutique intéressante pour le traitement du cancer ovarien. En effet, cela permet de contourner la résistance à la mort cellulaire afin d'empêcher le cancer de progresser malgré qu'il ne soit pas éliminé. Cela représenterait un atout intéressant pour contrôler la maladie et diminuer ses ravages chez les patients qui en sont atteints et dont le cancer est réfractaire aux traitements présentement en usage clinique.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] Statistique Canada. Les principales causes de décès au Canada. 2009.
- [2] Société canadienne du cancer. Statistiques canadiennes sur le cancer. 2012.
- [3] Lodish H, Berk A, Matsudaira P, Kaiser CA, Kreiger M, Scott MP, et al. Molecular Cell Biology. New York USA2003.
- [4] Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000;100:57-70.
- [5] Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nature reviews Cancer* 2002;2:442-54.
- [6] Bartlett. Ovarian cancer, Methods and Protocols: Humana Press; 2000, 817p.
- [7] Ng JS, Low JJ, Ilancheran A. Epithelial ovarian cancer. Best practice & research Clinical Obstetrics & Gynaecology 2012;26:337-45.
- [8] Chen VW, Ruiz B, Killeen JL, Cote TR, Wu XC, Correa CN. Pathology and classification of ovarian tumors. *Cancer* 2003;97:2631-42.
- [9] Romero I, Bast RC, Jr. Minireview: human ovarian cancer: biology, current management, and paths to personalizing therapy. *Endocrinology* 2012;153:1593-602.
- [10] Hennessy BT, Coleman RL, Markman M. Ovarian cancer. *Lancet* 2009;374:1371-82.
- [11] Behr M. Ovarian cancer. *Medsurg Nursing : Official Journal of the Academy of Medical-Surgical Nurses* 2009;18:248, 52.
- [12] Mader SS. Understanding Human Anatomy and Physiology, McGraw-Hill, 2004, 444p..
- [13] Johnson R. Biology. 6th edition, McGraw-Hill; 2001. p. 1238.
- [14] Robinson R. Biology: Macmillan Reference USA, 2002, 264p.

- [15] Société canadienne du cancer, Encyclopédie canadienne du cancer - Cancer ovarien. 2013.
- [16] Heintz AP, Odicino F, Maisonneuve P, Quinn MA, Benedet JL, Creasman WT, et al. Carcinoma of the ovary. FIGO 26th Annual Report on the Results of Treatment in Gynecological Cancer. International Journal of Gynaecology and Obstetrics: the official organ of the International Federation of Gynaecology and Obstetrics 2006;95 Suppl 1:S161-92.
- [17] Cancer TO. FIGO stage classification for ovarian cancer. 2013.
- [18] Kim A, Ueda Y, Naka T, Enomoto T. Therapeutic strategies in epithelial ovarian cancer. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research : CR 2012;31:14.
- [19] Miller ML, Ojima I. Chemistry and chemical biology of taxane anticancer agents. Chem Rec 2001;1:195-211.
- [20] Lebwohl D, Canetta R. Clinical development of platinum complexes in cancer therapy: an historical perspective and an update. Eur J Cancer 1998;34:1522-34.
- [21] Kartalou M, Essigmann JM. Mechanisms of resistance to cisplatin. Mutat Res 2001;478:23-43.
- [22] Lovejoy KS, Todd RC, Zhang S, McCormick MS, D'Aquino JA, Reardon JT, et al. cis-Diammine(pyridine)chloroplatinum(II), a monofunctional platinum(II) antitumor agent: Uptake, structure, function, and prospects. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2008;105:8902-7.
- [23] Wang D, Lippard SJ. Cellular processing of platinum anticancer drugs. Nature Reviews Drug Discovery 2005;4:307-20.
- [24] Univeristé de Toronto, O'Day DH. Apoptosis. [En ligne], <http://www.utm.utoronto.ca/~w3cellan/apoptosis.html> (Page consultée le 20 juillet 2013).
- [25] Nicholson DW. Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. Cell Death and Differentiation 1999;6:1028-42.
- [26] Bolsover SR, Hyams JS, Shephard EA, White HA, Wiedemann CG. Cell Biology A short Course. Second edition ed: John Wiley & Sons; 2004.
- [27] Dean EJ, Ranson M, Blackhall F, Dive C. X-linked inhibitor of apoptosis protein as a therapeutic target. Expert Opinion on Therapeutic Targets 2007;11:1459-71.

- [28] Thome M, Tschopp J. Regulation of lymphocyte proliferation and death by FLIP. *Nature Reviews Immunology* 2001;1:50-8.
- [29] Okada H, Mak TW. Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. *Nature Reviews Cancer* 2004;4:592-603.
- [30] Invitrogen, Autophagy Research. 2013, [En ligne], <http://www.lifetechnologies.com/content/dam/LifeTech/migration/images/cell-analysis/data.par.89173.image.-1.-1.1.gif> (Page consultée le 20 juillet 2013).
- [31] Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, Beach D, Lowe SW. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* 1997;88:593-602.
- [32] Godwin AK, Meister A, O'Dwyer PJ, Huang CS, Hamilton TC, Anderson ME. High resistance to cisplatin in human ovarian cancer cell lines is associated with marked increase of glutathione synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1992;89:3070-4.
- [33] Browne G, Sayan AE, Tulchinsky E. ZEB proteins link cell motility with cell cycle control and cell survival in cancer. *Cell Cycle* 2010;9:886-91.
- [34] Thiery JP, Sleeman JP. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2006;7:131-42.
- [35] Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of Clinical Investigation* 2009;119:1420-8.
- [36] Latifi A, Abubaker K, Castrechini N, Ward AC, Liongue C, Dobill F, et al. Cisplatin treatment of primary and metastatic epithelial ovarian carcinomas generates residual cells with mesenchymal stem cell-like profile. *Journal of Cellular Biochemistry* 2011;112:2850-64.
- [37] Lombaerts M, van Wezel T, Philippo K, Dierssen JW, Zimmerman RM, Oosting J, et al. E-cadherin transcriptional downregulation by promoter methylation but not mutation is related to epithelial-to-mesenchymal transition in breast cancer cell lines. *Br J Cancer* 2006;94:661-71.
- [38] Kalluri R, Neilson EG. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *The Journal of Clinical Investigation* 2003;112:1776-84.

- [39] Iwano M, Plieth D, Danoff TM, Xue C, Okada H, Neilson EG. Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis. *The Journal of clinical investigation* 2002;110:341-50.
- [40] Tiwari N, Gheldof A, Tatari M, Christofori G. EMT as the ultimate survival mechanism of cancer cells. *Semin Cancer Biol* 2012;22:194-207.
- [41] Park SH, Cheung LW, Wong AS, Leung PC. Estrogen regulates Snail and Slug in the down-regulation of E-cadherin and induces metastatic potential of ovarian cancer cells through estrogen receptor alpha. *Mol Endocrinol* 2008;22:2085-98.
- [42] Sanchez-Tillo E, Liu Y, de Barrios O, Siles L, Fanlo L, Cuatrecasas M, et al. EMT-activating transcription factors in cancer: beyond EMT and tumor invasiveness. *Cell Mol Life Sci* 2012;69:3429-56.
- [43] Frisch SM, Ruoslahti E. Integrins and anoikis. *Curr Opin Cell Biol* 1997;9:701-6.
- [44] Kurrey NK, Jalgaonkar SP, Joglekar AV, Ghanate AD, Chaskar PD, Doiphode RY, et al. Snail and slug mediate radioresistance and chemoresistance by antagonizing p53-mediated apoptosis and acquiring a stem-like phenotype in ovarian cancer cells. *Stem Cells* 2009;27:2059-68.
- [45] Kajiyama H, Shibata K, Terauchi M, Yamashita M, Ino K, Nawa A, et al. Chemoresistance to paclitaxel induces epithelial-mesenchymal transition and enhances metastatic potential for epithelial ovarian carcinoma cells. *Int J Oncol* 2007;31:277-83.
- [46] Li QQ, Xu JD, Wang WJ, Cao XX, Chen Q, Tang F, et al. Twist1-mediated adriamycin-induced epithelial-mesenchymal transition relates to multidrug resistance and invasive potential in breast cancer cells. *Clin Cancer Res* 2009;15:2657-65.
- [47] Yang AD, Fan F, Camp ER, van Buren G, Liu W, Somcio R, et al. Chronic oxaliplatin resistance induces epithelial-to-mesenchymal transition in colorectal cancer cell lines. *Clin Cancer Res* 2006;12:4147-53.
- [48] Nieto MA. The snail superfamily of zinc-finger transcription factors. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2002;3:155-66.
- [49] Haslehurst AM, Koti M, Dharsee M, Nuin P, Evans K, Geraci J, et al. EMT transcription factors snail and slug directly contribute to cisplatin resistance in ovarian cancer. *BMC Cancer* 2012;12:91.

- [50] Wu YD, Zhou BHP. Snail More than EMT. *Cell Adhes Migr* 2010;4:199-203.
- [51] Batlle E, Sancho E, Franci C, Dominguez D, Monfar M, Baulida J, et al. The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nature Cell Biology* 2000;2:84-9.
- [52] Cano A, Perez-Moreno MA, Rodrigo I, Locascio A, Blanco MJ, del Barrio MG, et al. The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nature Cell Biology* 2000;2:76-83.
- [53] Kurrey NK, Amit K, Bapat SA. Snail and Slug are major determinants of ovarian cancer invasiveness at the transcription level. *Gynecologic Oncology* 2005;97:155-65.
- [54] Dave N, Guaita-Esteruelas S, Gutarra S, Frias A, Beltran M, Peiro S, et al. Functional cooperation between Snail1 and twist in the regulation of ZEB1 expression during epithelial to mesenchymal transition. *J Biol Chem* 2011;286:12024-32.
- [55] Zhou BP, Deng J, Xia W, Xu J, Li YM, Gunduz M, et al. Dual regulation of Snail by GSK-3beta-mediated phosphorylation in control of epithelial-mesenchymal transition. *Nature cell biology* 2004;6:931-40.
- [56] Chen R, Yang Q, Lee JD. BMK1 kinase suppresses epithelial-mesenchymal transition through the Akt/GSK3beta signaling pathway. *Cancer Res* 2012;72:1579-87.
- [57] Lim SO, Kim H, Jung G. p53 inhibits tumor cell invasion via the degradation of snail protein in hepatocellular carcinoma. *FEBS Lett* 2010;584:2231-6.
- [58] Grille SJ, Bellacosa A, Upson J, Klein-Szanto AJ, van Roy F, Lee-Kwon W, et al. The protein kinase Akt induces epithelial mesenchymal transition and promotes enhanced motility and invasiveness of squamous cell carcinoma lines. *Cancer Res* 2003;63:2172-8.
- [59] Sahlgren C, Gustafsson MV, Jin S, Poellinger L, Lendahl U. Notch signaling mediates hypoxia-induced tumor cell migration and invasion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2008;105:6392-7.
- [60] Zavadil J, Cermak L, Soto-Nieves N, Bottinger EP. Integration of TGF-beta/Smad and Jagged1/Notch signalling in epithelial-to-mesenchymal transition. *The EMBO Journal* 2004;23:1155-65.

- [61] Lee SH, Lee SJ, Jung YS, Xu Y, Kang HS, Ha NC, et al. Blocking of p53-Snail binding, promoted by oncogenic K-Ras, recovers p53 expression and function. *Neoplasia* 2009;11:22-31, 6p following
- [62] Kim NH, Kim HS, Li XY, Lee I, Choi HS, Kang SE, et al. A p53/miRNA-34 axis regulates Snail1-dependent cancer cell epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Biol* 2011;195:417-33.
- [63] Escrivá M, Peiro S, Herranz N, Villagrasa P, Dave N, Montserrat-Sentis B, et al. Repression of PTEN phosphatase by Snail1 transcriptional factor during gamma radiation-induced apoptosis. *Mol Cell Biol* 2008;28:1528-40.
- [64] Cohen ME, Yin M, Paznekas WA, Schertzer M, Wood S, Jabs EW. Human SLUG gene organization, expression, and chromosome map location on 8q. *Genomics* 1998;51:468-71.
- [65] Wels C, Joshi S, Koefinger P, Bergler H, Schaider H. Transcriptional activation of ZEB1 by Slug leads to cooperative regulation of the epithelial-mesenchymal transition-like phenotype in melanoma. *The Journal of Investigative Dermatology* 2011;131:1877-85.
- [66] Hotz B, Arndt M, Dullat S, Bhargava S, Buhr HJ, Hotz HG. Epithelial to mesenchymal transition: expression of the regulators snail, slug, and twist in pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* 2007;13:4769-76.
- [67] Bhat-Nakshatri P, Appaiah H, Ballas C, Pick-Franke P, Goulet R, Jr., Badve S, et al. SLUG/SNAI2 and tumor necrosis factor generate breast cells with CD44+/CD24- phenotype. *BMC cancer* 2010;10:411.
- [68] Casas E, Kim J, Bendesky A, Ohno-Machado L, Wolfe CJ, Yang J. Snail2 is an essential mediator of Twist1-induced epithelial mesenchymal transition and metastasis. *Cancer Res* 2011;71:245-54.
- [69] Shih JY, Yang PC. The EMT regulator slug and lung carcinogenesis. *Carcinogenesis* 2011;32:1299-304.
- [70] Kajita M, McClinic KN, Wade PA. Aberrant expression of the transcription factors snail and slug alters the response to genotoxic stress. *Molecular and Cellular Biology* 2004;24:7559-66.
- [71] Wu WS, Heinrichs S, Xu D, Garrison SP, Zambetti GP, Adams JM, et al. Slug antagonizes p53-mediated apoptosis of hematopoietic progenitors by repressing puma. *Cell* 2005;123:641-53.

- [72] Vandewalle C, Van Roy F, Berx G. The role of the ZEB family of transcription factors in development and disease. *Cell Mol Life Sci* 2009;66:773-87.
- [73] Min C, Eddy SF, Sherr DH, Sonenshein GE. NF-kappaB and epithelial to mesenchymal transition of cancer. *Journal of Cellular Biochemistry* 2008;104:733-44.
- [74] Eger A, Aigner K, Sonderegger S, Dampier B, Oehler S, Schreiber M, et al. DeltaEF1 is a transcriptional repressor of E-cadherin and regulates epithelial plasticity in breast cancer cells. *Oncogene* 2005;24:2375-85.
- [75] Testoni B, Borrelli S, Tenedini E, Alotto D, Castagnoli C, Piccolo S, et al. Identification of new p63 targets in human keratinocytes. *Cell Cycle* 2006;5:2805-11.
- [76] Hu F, Wang C, Du J, Sun W, Yan J, Mi D, et al. DeltaEF1 promotes breast cancer cell proliferation through down-regulating p21 expression. *Biochimica et Biophysica Acta* 2010;1802:301-12.
- [77] Arumugam T, Ramachandran V, Fournier KF, Wang H, Marquis L, Abbruzzese JL, et al. Epithelial to mesenchymal transition contributes to drug resistance in pancreatic cancer. *Cancer Res* 2009;69:5820-8.
- [78] Vandewalle C, Comijn J, De Craene B, Vermassen P, Bruyneel E, Andersen H, et al. SIP1/ZEB2 induces EMT by repressing genes of different epithelial cell-cell junctions. *Nucleic Acids Research* 2005;33:6566-78.
- [79] Sayan AE, Griffiths TR, Pal R, Browne GJ, Ruddick A, Yagci T, et al. SIP1 protein protects cells from DNA damage-induced apoptosis and has independent prognostic value in bladder cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2009;106:14884-9.
- [80] Hill L, Browne G, Tulchinsky E. ZEB/miR-200 feedback loop: at the crossroads of signal transduction in cancer. *Int J Cancer* 2013;132:745-54.
- [81] Islam S, Carey TE, Wolf GT, Wheelock MJ, Johnson KR. Expression of N-cadherin by human squamous carcinoma cells induces a scattered fibroblastic phenotype with disrupted cell-cell adhesion. *J Cell Biol* 1996;135:1643-54.
- [82] Barbera MJ, Puig I, Dominguez D, Julien-Grille S, Guaita-Esteruelas S, Peiro S, et al. Regulation of Snail transcription during epithelial to mesenchymal transition of tumor cells. *Oncogene* 2004;23:7345-54.

- [83] Gottardi CJ, Wong E, Gumbiner BM. E-cadherin suppresses cellular transformation by inhibiting beta-catenin signaling in an adhesion-independent manner. *J Cell Biol* 2001;153:1049-60.
- [84] Risinger JI, Berchuck A, Kohler MF, Boyd J. Mutations of the E-cadherin gene in human gynecologic cancers. *Nature genetics* 1994;7:98-102.
- [85] Wallis J, Fox MF, Walsh FS. Structure of the human N-cadherin gene: YAC analysis and fine chromosomal mapping to 18q11.2. *Genomics* 1994;22:172-9.
- [86] Hazan RB, Phillips GR, Qiao RF, Norton L, Aaronson SA. Exogenous expression of N-cadherin in breast cancer cells induces cell migration, invasion, and metastasis. *J Cell Biol* 2000;148:779-90.
- [87] Nieman MT, Prudoff RS, Johnson KR, Wheelock MJ. N-cadherin promotes motility in human breast cancer cells regardless of their E-cadherin expression. *J Cell Biol* 1999;147:631-44.
- [88] Adams CL, Nelson WJ. Cytomechanics of cadherin-mediated cell-cell adhesion. *Curr Opin Cell Biol* 1998;10:572-7.
- [89] Akiyama T. Wnt/beta-catenin signaling. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 2000;11:273-82.
- [90] Mazieres J, He B, You L, Xu Z, Jablons DM. Wnt signaling in lung cancer. *Cancer letters* 2005;222:1-10.
- [91] Kim K, Lu Z, Hay ED. Direct evidence for a role of beta-catenin/LEF-1 signaling pathway in induction of EMT. *Cell Biology International* 2002;26:463-76.
- [92] Sanchez-Tillo E, de Barrios O, Siles L, Cuatrecasas M, Castells A, Postigo A. beta-catenin/TCF4 complex induces the epithelial-to-mesenchymal transition (EMT)-activator ZEB1 to regulate tumor invasiveness. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2011;108:19204-9.
- [93] Dahmani R, Just PA, Perret C. The Wnt/beta-catenin pathway as a therapeutic target in human hepatocellular carcinoma. *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology* 2011;35:709-13.
- [94] Schmeiser K, Hammond EM, Roberts S, Grand RJ. Specific cleavage of gamma catenin by caspases during apoptosis. *FEBS Lett* 1998;433:51-7.

- [95] Brancolini C, Lazarevic D, Rodriguez J, Schneider C. Dismantling cell-cell contacts during apoptosis is coupled to a caspase-dependent proteolytic cleavage of beta-catenin. *J Cell Biol* 1997;139:759-71.
- [96] Takahashi Y, Nishikawa M, Suehara T, Takiguchi N, Takakura Y. Gene silencing of beta-catenin in melanoma cells retards their growth but promotes the formation of pulmonary metastasis in mice. *Int J Cancer* 2008;123:2315-20.
- [97] Satelli A, Li S. Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy. *Cell Mol Life Sci* 2011;68:3033-46.
- [98] Wang H, Zhang H, Tang L, Chen H, Wu C, Zhao M, et al. Resveratrol inhibits TGF-beta1-induced epithelial-to-mesenchymal transition and suppresses lung cancer invasion and metastasis. *Toxicology* 2013;303:139-46.
- [99] Vergara D, Valente CM, Tinelli A, Siciliano C, Lorusso V, Acierno R, et al. Resveratrol inhibits the epidermal growth factor-induced epithelial mesenchymal transition in MCF-7 cells. *Cancer Letters* 2011;310:1-8.
- [100] Gilles C, Polette M, Mestdagt M, Nawrocki-Raby B, Ruggeri P, Birembaut P, et al. Transactivation of vimentin by beta-catenin in human breast cancer cells. *Cancer Res* 2003;63:2658-64.
- [101] Perlson E, Michaelevski I, Kowalsman N, Ben-Yaakov K, Shaked M, Seger R, et al. Vimentin binding to phosphorylated Erk sterically hinders enzymatic dephosphorylation of the kinase. *Journal of Molecular Biology* 2006;364:938-44.
- [102] Eckes B, Dogic D, Colucci-Guyon E, Wang N, Maniotis A, Ingber D, et al. Impaired mechanical stability, migration and contractile capacity in vimentin-deficient fibroblasts. *J Cell Sci* 1998;111 (Pt 13):1897-907.
- [103] Robinson MJ, Cobb MH. Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr Opin Cell Biol* 1997;9:180-6.
- [104] Yoon S, Seger R. The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth Factors* 2006;24:21-44.
- [105] Roskoski R, Jr. ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation. *Pharmacological Research : the Official Journal of the Italian Pharmacological Society* 2012;66:105-43.

- [106] Basu A, Tu H. Activation of ERK during DNA damage-induced apoptosis involves protein kinase C delta. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2005;334:1068-73.
- [107] Tang D, Wu D, Hirao A, Lahti JM, Liu L, Mazza B, et al. ERK activation mediates cell cycle arrest and apoptosis after DNA damage independently of p53. *J Biol Chem* 2002;277:12710-7.
- [108] Bouali S, Chretien AS, Ramacci C, Rouyer M, Becuwe P, Merlin JL. PTEN expression controls cellular response to cetuximab by mediating PI3K/AKT and RAS/RAF/MAPK downstream signaling in KRAS wild-type, hormone refractory prostate cancer cells. *Oncology Reports* 2009;21:731-5.
- [109] Davis RJ. The mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *J Biol Chem* 1993;268:14553-6.
- [110] Wei F, Yan J, Tang D. Extracellular signal-regulated kinases modulate DNA damage response - a contributing factor to using MEK inhibitors in cancer therapy. *Current Medicinal Chemistry* 2011;18:5476-82.
- [111] Xie L, Law BK, Chytil AM, Brown KA, Aakre ME, Moses HL. Activation of the Erk pathway is required for TGF-beta1-induced EMT in vitro. *Neoplasia* 2004;6:603-10.
- [112] Montserrat N, Mozos A, Llobet D, Dolcet X, Pons C, de Herreros AG, et al. Epithelial to mesenchymal transition in early stage endometrioid endometrial carcinoma. *Human Pathology* 2012;43:632-43.
- [113] Richard DE, Berra E, Gothie E, Roux D, Pouyssegur J. p42/p44 mitogen-activated protein kinases phosphorylate hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) and enhance the transcriptional activity of HIF-1. *J Biol Chem* 1999;274:32631-7.
- [114] Krejci P, Aklian A, Kaucka M, Sevcikova E, Prochazkova J, Masek JK, et al. Receptor tyrosine kinases activate canonical WNT/beta-catenin signaling via MAP kinase/LRP6 pathway and direct beta-catenin phosphorylation. *PloS One* 2012;7:e35826.
- [115] Zilfou JT, Lowe SW. Tumor suppressive functions of p53. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2009;1:a001883.
- [116] Joerger AC, Fersht AR. Structural biology of the tumor suppressor p53. *Annual Review of Biochemistry* 2008;77:557-82.

- [117] Harms KL, Chen X. The functional domains in p53 family proteins exhibit both common and distinct properties. *Cell Death and Differentiation* 2006;13:890-7.
- [118] Kubbutat MH, Jones SN, Vousden KH. Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature* 1997;387:299-303.
- [119] Pochampally R, Fodera B, Chen L, Shao W, Levine EA, Chen J. A 60 kd MDM2 isoform is produced by caspase cleavage in non-apoptotic tumor cells. *Oncogene* 1998;17:2629-36.
- [120] Oliver TG, Meylan E, Chang GP, Xue W, Burke JR, Humpton TJ, et al. Caspase-2-mediated cleavage of Mdm2 creates a p53-induced positive feedback loop. *Molecular Cell* 2011;43:57-71.
- [121] Kastan MB, Onyekwere O, Sidransky D, Vogelstein B, Craig RW. Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res* 1991;51:6304-11.
- [122] Lavin MF, Gueven N. The complexity of p53 stabilization and activation. *Cell Death and Differentiation* 2006;13:941-50.
- [123] Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. p53 mutations in human cancers. *Science* 1991;253:49-53.
- [124] Bernardini MQ, Baba T, Lee PS, Barnett JC, Sfakianos GP, Secord AA, et al. Expression signatures of TP53 mutations in serous ovarian cancers. *BMC Cancer* 2010;10:237.
- [125] Sood AK, Sorosky JI, Dolan M, Anderson B, Buller RE. Distant metastases in ovarian cancer: association with p53 mutations. *Clin Cancer Res* 1999;5:2485-90.
- [126] Rivlin N, Brosh R, Oren M, Rotter V. Mutations in the p53 Tumor Suppressor Gene: Important Milestones at the Various Steps of Tumorigenesis. *Genes & cancer* 2011;2:466-74.
- [127] Milner J, Medcalf EA, Cook AC. Tumor suppressor p53: analysis of wild-type and mutant p53 complexes. *Mol Cell Biol* 1991;11:12-9.
- [128] Mi RR, Ni H. MDM2 sensitizes a human ovarian cancer cell line. *Gynecologic Oncology* 2003;90:238-44.

- [129] Chang CJ, Chao CH, Xia W, Yang JY, Xiong Y, Li CW, et al. p53 regulates epithelial-mesenchymal transition and stem cell properties through modulating miRNAs. *Nature Cell Biology* 2011;13:317-23.
- [130] Sadot E, Geiger B, Oren M, Ben-Ze'ev A. Down-regulation of beta-catenin by activated p53. *Mol Cell Biol* 2001;21:6768-81.
- [131] Wang SP, Wang WL, Chang YL, Wu CT, Chao YC, Kao SH, et al. p53 controls cancer cell invasion by inducing the MDM2-mediated degradation of Slug. *Nature Cell Biology* 2009;11:694-704.
- [132] de Caestecker M. The transforming growth factor-beta superfamily of receptors. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 2004;15:1-11.
- [133] Wrana JL, Attisano L. The Smad pathway. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 2000;11:5-13.
- [134] Yi JY, Shin I, Arteaga CL. Type I transforming growth factor beta receptor binds to and activates phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem* 2005;280:10870-6.
- [135] Zhang YE. Non-Smad pathways in TGF-beta signaling. *Cell Research* 2009;19:128-39.
- [136] Tian M, Neil JR, Schiemann WP. Transforming growth factor-beta and the hallmarks of cancer. *Cellular Signalling* 2011;23:951-62.
- [137] Roberts AB, Wakefield LM. The two faces of transforming growth factor beta in carcinogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003;100:8621-3.
- [138] Van Themsche C, Chaudhry P, Leblanc V, Parent S, Asselin E. XIAP gene expression and function is regulated by autocrine and paracrine TGF-beta signaling. *Molecular Cancer* 2010;9:216.
- [139] Van Themsche C, Mathieu I, Parent S, Asselin E. Transforming growth factor-beta3 increases the invasiveness of endometrial carcinoma cells through phosphatidylinositol 3-kinase-dependent up-regulation of X-linked inhibitor of apoptosis and protein kinase c-dependent induction of matrix metalloproteinase-9. *J Biol Chem* 2007;282:4794-802.
- [140] Cordenonsi M, Dupont S, Maretto S, Insinga A, Imbriano C, Piccolo S. Links between tumor suppressors: p53 is required for TGF-beta gene responses by cooperating with Smads. *Cell* 2003;113:301-14.

- [141] Araki S, Eitel JA, Batuello CN, Bijangi-Vishehsaraei K, Xie XJ, Danielpour D, et al. TGF-beta1-induced expression of human Mdm2 correlates with late-stage metastatic breast cancer. *The Journal of Clinical Investigation* 2010;120:290-302.
- [142] Soleas GJ, Diamandis EP, Goldberg DM. Resveratrol: a molecule whose time has come? And gone? *Clinical Biochemistry* 1997;30:91-113.
- [143] Gehm BD, McAndrews JM, Chien PY, Jameson JL. Resveratrol, a polyphenolic compound found in grapes and wine, is an agonist for the estrogen receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1997;94:14138-43.
- [144] Bowers JL, Tyulmenkov VV, Jernigan SC, Klinge CM. Resveratrol acts as a mixed agonist/antagonist for estrogen receptors alpha and beta. *Endocr J* 2000;141:3957-667.
- [145] Renaud S, de Lorgeril M. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet* 1992;339:1523-6.
- [146] Goldberg DM. Does wine work? *Clinical Chemistry* 1995;41:14-6.
- [147] Catalgol B, Batirel S, Taga Y, Ozer NK. Resveratrol: French paradox revisited. *Frontiers in Pharmacology* 2012;3:141.
- [148] Ungvari Z, Orosz Z, Rivera A, Labinskyy N, Xiangmin Z, Olson S, et al. Resveratrol increases vascular oxidative stress resistance. *American journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology* 2007;292:H2417-24.
- [149] Wang Z, Huang Y, Zou J, Cao K, Xu Y, Wu JM. Effects of red wine and wine polyphenol resveratrol on platelet aggregation in vivo and in vitro. *International Journal of Molecular Medicine* 2002;9:77-9.
- [150] Athar M, Back JH, Kopelovich L, Bickers DR, Kim AL. Multiple molecular targets of resveratrol: Anti-carcinogenic mechanisms. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2009;486:95-102.
- [151] Heiss EH, Schilder YD, Dirsch VM. Chronic treatment with resveratrol induces redox stress- and ataxia telangiectasia-mutated (ATM)-dependent senescence in p53-positive cancer cells. *J Biol Chem* 2007;282:26759-66.
- [152] Kuo PL, Chiang LC, Lin CC. Resveratrol- induced apoptosis is mediated by p53-dependent pathway in Hep G2 cells. *Life Sci* 2002;72:23-34.

- [153] Yang Q, Wang B, Zang W, Wang X, Liu Z, Li W, et al. Resveratrol inhibits the growth of gastric cancer by inducing g1 phase arrest and senescence in a sirt1-dependent manner. *PLoS One* 2013;8:e70627.
- [154] Deng CX. SIRT1, is it a tumor promoter or tumor suppressor? *International Journal of Biological Sciences* 2009;5:147-52.
- [155] Sexton E, Van Themsche C, Leblanc K, Parent S, Lemoine P, Asselin E. Resveratrol interferes with AKT activity and triggers apoptosis in human uterine cancer cells. *Mol Cancer* 2006;5:45.:45.
- [156] Singh M, Parent S, Leblanc V, Asselin E. Resveratrol modulates the expression of PTGS2 and cellular proliferation in the normal rat endometrium in an AKT-dependent manner. *Biol Reprod* 2011;84:1045-52.
- [157] Vergara D, Simeone P, Toraldo D, Del Boccio P, Vergaro V, Leporatti S, et al. Resveratrol downregulates Akt/GSK and ERK signalling pathways in OVCAR-3 ovarian cancer cells. *Molecular BioSystems* 2012;8:1078-87.
- [158] Gogada R, Prabhu V, Amadori M, Scott R, Hashmi S, Chandra D. Resveratrol induces p53-independent, X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP)-mediated Bax protein oligomerization on mitochondria to initiate cytochrome c release and caspase activation. *J Biol Chem* 2011;286:28749-60.
- [159] Opiplari AW, Jr., Tan L, Boitano AE, Sorenson DR, Aurora A, Liu JR. Resveratrol-induced autophagocytosis in ovarian cancer cells. *Cancer Res* 2004;64:696-703.
- [160] Kueck A, Opiplari AW, Jr., Griffith KA, Tan L, Choi M, Huang J, et al. Resveratrol inhibits glucose metabolism in human ovarian cancer cells. *Gynecologic Oncology* 2007;107:450-7.
- [161] Bjorklund M, Roos J, Gogvadze V, Shoshan M. Resveratrol induces SIRT1- and energy-stress-independent inhibition of tumor cell regrowth after low-dose platinum treatment. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 2011;68:1459-67.
- [162] Miloso M, Bertelli AA, Nicolini G, Tredici G. Resveratrol-induced activation of the mitogen-activated protein kinases, ERK1 and ERK2, in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Neuroscience Letters* 1999;264:141-4.
- [163] De Ledinghen V, Monvoisin A, Neaud V, Krisa S, Payrastre B, Bedin C, et al. Trans-resveratrol, a grapevine-derived polyphenol, blocks hepatocyte growth factor-induced invasion of hepatocellular carcinoma cells. *Int J Oncol* 2001;19:83-8.

- [164] Cao Z, Fang J, Xia C, Shi X, Jiang BH. trans-3,4,5'-Trihydroxystibene inhibits hypoxia-inducible factor 1alpha and vascular endothelial growth factor expression in human ovarian cancer cells. *Clin Cancer Res* 2004;10:5253-63.
- [165] Walle T, Hsieh F, DeLegge MH, Oatis JE, Jr., Walle UK. High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans. *Drug Metabolism and Disposition: the Biological Fate of Chemicals* 2004;32:1377-82.
- [166] Subramanian L, Youssef S, Bhattacharya S, Kenealey J, Polans AS, van Ginkel PR. Resveratrol: challenges in translation to the clinic--a critical discussion. *Clin Cancer Res* 2010;16:5942-8.
- [167] Murias M, Miksits M, Aust S, Spatzenegger M, Thalhammer T, Szekeres T, et al. Metabolism of resveratrol in breast cancer cell lines: impact of sulfotransferase 1A1 expression on cell growth inhibition. *Cancer Letters* 2008;261:172-82.
- [168] Horiuchi A, Wang C, Kikuchi N, Osada R, Nikaido T, Konishi I. BRCA1 Expression is an Important Biomarker for Chemosensitivity: Suppression of BRCA1 Increases the Apoptosis via Up-regulation of p53 and p21 During Cisplatin Treatment in Ovarian Cancer Cells. *Biomarker Insights* 2007;1:49-59.
- [169] Yaginuma Y, Westphal H. Abnormal structure and expression of the p53 gene in human ovarian carcinoma cell lines. *Cancer Res* 1992;52:4196-9.
- [170] Lu X, Errington J, Curtin NJ, Lunec J, Newell DR. The impact of p53 status on cellular sensitivity to antifolate drugs. *Clin Cancer Res* 2001;7:2114-23.
- [171] Wu JM, Hsieh TC. Resveratrol: a cardioprotective substance. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2011;1215:16-21.
- [172] Singh B, Arlinghaus RB. Vimentin phosphorylation by p37mos protein kinase in vitro and generation of a 50-kDa cleavage product in v-mos-transformed cells. *Virology* 1989;173:144-56.
- [173] Goto H, Tanabe K, Manser E, Lim L, Yasui Y, Inagaki M. Phosphorylation and reorganization of vimentin by p21-activated kinase (PAK). *Genes Cells* 2002;7:91-7.
- [174] Turowski P, Myles T, Hemmings BA, Fernandez A, Lamb NJ. Vimentin dephosphorylation by protein phosphatase 2A is modulated by the targeting subunit B55. *Molecular Biology of the Cell* 1999;10:1997-2015.

- [175] Luo H, Yang A, Schulte BA, Wargovich MJ, Wang GY. Resveratrol Induces Premature Senescence in Lung Cancer Cells via ROS-Mediated DNA Damage. *PLoS one* 2013;8:e60065.
- [176] Itahana K, Dimri G, Campisi J. Regulation of cellular senescence by p53. *European Journal of Biochemistry / FEBS* 2001;268:2784-91.
- [177] Chen Q, Ames BN. Senescence-like growth arrest induced by hydrogen peroxide in human diploid fibroblast F65 cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1994;91:4130-4.
- [178] Gescher AJ, Steward WP. Relationship between mechanisms, bioavailability, and preclinical chemopreventive efficacy of resveratrol: a conundrum. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 2003;12:953-7.
- [179] Piotrowska H, Myszkowski K, Ziolkowska A, Kulcenty K, Wierzchowski M, Kaczmarek M, et al. Resveratrol analogue 3,4,4',5-tetramethoxystilbene inhibits growth, arrests cell cycle and induces apoptosis in ovarian SKOV-3 and A-2780 cancer cells. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2012;263:53-60.
- [180] Attia SM. Influence of resveratrol on oxidative damage in genomic DNA and apoptosis induced by cisplatin. *Mutation Research* 2012;741:22-31.
- [181] Bakin AV, Tomlinson AK, Bhowmick NA, Moses HL, Arteaga CL. Phosphatidylinositol 3-kinase function is required for transforming growth factor beta-mediated epithelial to mesenchymal transition and cell migration. *J Biol Chem* 2000;275:36803-10.
- [182] Schubert J, Brabletz T. p53 Spreads out further: suppression of EMT and stemness by activating miR-200c expression. *Cell Research* 2011;21:705-7.
- [183] ATCC. Product Information Sheet for ATCC® HTB-77™ (SKOV-3). 2011.