Impact des composés phytochimiques sur l’adipogénèse en lien avec les cancers liés à l’obésité

Table des matières

[Table des matières 2](#_Toc466810247)

[Résumé 3](#_Toc466810248)

[Mots clé 3](#_Toc466810249)

[Descriptions du projet de recherche 4](#_Toc466810250)

[I. Impact des phytochimiques sur le processus d’adipogénèse 4](#_Toc466810251)

[A) Analyse de la formation de vésicules lipidiques 5](#_Toc466810252)

[B) Expression génique et protéique des acteurs de la différenciation 5](#_Toc466810253)

[C) Suivi de la migration cellulaire 5](#_Toc466810254)

[II. Influence des phytochimiques sur l’activité paracrine des adipocytes 6](#_Toc466810255)

[A) Analyse de l’activité paracrine des adipocytes par ELISA 6](#_Toc466810256)

[B) Traitements par les milieux conditionnés 6](#_Toc466810257)

[C) Rôle des macrophages sur les sécrétions adipocytaires 7](#_Toc466810258)

[III. Ciblage spécifique de la curcumine dans les adipocytes 7](#_Toc466810259)

[A) Expression de la Sortiline lors de l’adipogénèse 8](#_Toc466810260)

[B) Incorporation du peptide couplé à la curcumine au cours de la différenciation 8](#_Toc466810261)

[C) Efficacité du peptide *in vitro* 8](#_Toc466810262)

[D) Efficacité du peptide *in vivo* 8](#_Toc466810263)

[Références 8](#_Toc466810264)

[Justifications du budget 8](#_Toc466810265)

[Echéancier 8](#_Toc466810266)

Résumé

Il existe de nombreuses évidences montrant que l’obésité promeut les risques de développer un cancer [1]. Le tissu adipeux synthétise une variété d’hormones, dont les adipokines, qui est corrélée à une hausse de l’angiogenèse favorisant la croissance des tumeurs [2]. Un syndrome inflammatoire chronique modéré, fréquent chez les obèses, est alors susceptible de favoriser l’apparition d’un microenvironnement tumoral dû à l’hypersécrétion d’adipokines. Des données épidémiologiques indiquent qu’une consommation accrue de composés phytochimiques contenus dans les fruits et légumes joue un rôle dans la prévention du cancer [3]. Des études ont également démontré que ces composés sont capables de réduire le potentiel inflammatoire du tissu adipeux. Il est alors plausible que l’influence des phytochimiques sur les sécrétions d’adipokines du tissu adipeux amoindrit les risques de développer un cancer. Les principaux objectifs du projet sont d’identifier les adipokines dont l’expression et la sécrétion sont perturbées par les composés phytochimiques dans un modèle de cellules souches adipeuses humaines et d’évaluer l’effet de la régulation paracrine du tissu adipeux sur l’angiogenèse et l’inflammation des cellules tumorales.

Mots clé

Phytochimiques, adipogénèse, inflammation, angiogénèse, sortiline, cancer

Descriptions du projet de recherche

De nos jours, il a été établi avec certitude que le tissu adipeux est un acteur prépondérant dans le développement de certains cancers [2]. En effet, celui-ci communique avec les cellules cancéreuses avoisinantes en leur procurant de l’énergie ainsi que des molécules inflammatoires et angiogéniques favorisant leur survie et leur développement.

Il est donc impératif d’atténuer le rôle détenu par les adipocytes et ce de différentes façons. D’une part il est nécessaire de ralentir l’adipogénèse afin de diminuer la formation d’adipocytes matures et d’autres parts de réduire la sécrétion de protéines pro-inflammatoires et pro-angiogéniques du tissu adipeux.

Les composés phytochimiques se présentent comme des candidats potentiels pour répondre à ces problématiques. Leurs propriétés anti-inflammatoires sont indéniables comme le suggère l’étendue de résultats que l’on peut trouver dans littérature scientifique. De plus, nous disposons non seulement de composés phytochimiques mais aussi de peptides capables d’acheminer directement le composé phytochimique spécifiquement dans les adipocytes par l’intermédiaire d’un marqueur spécifique.

L’objectif du projet vise à démontrer l’aptitude de certains composés phytochimiques à réduire le potentiel inflammatoire et angiogénique des adipocytes. Pour ce faire, nous allons démontrer que les composés phytochimiques inhibent le processus d’adipogénèse et par conséquent, empêche la maturation des pré-adipocytes. Ensuite, nous analyserons l’activité paracrine des adipocytes lorsque ceux-ci seront soumis aux propriétés anti-inflammatoires des phytochimiques. Enfin, nous allons déterminer si les cellules avoisinantes les adipocytes sont susceptibles d’être influencé indirectement par les composés phytochimiques en modifiant la composition des sécrétions adipocytaires.

I. Impact des phytochimiques sur le processus d’adipogénèse

L’adipogénèse est le processus durant lequel des préadipocytes issus de cellules souches mésenchymateuses (MSC) se différencient pour devenir des adipocytes matures [4]. Ces derniers ont des fonctions multiples et variées au sein de l’organisme dont la sécrétion de cytokines inflammatoires et angiogéniques, nommées adipokines.

Bien que certains phytochimiques ont déjà demontré une certaines aptitudes à influence l’adipogénèse la plupart de ces recherches ont été réalisées sur un modèle murin et demeurent incomplètes [5]. Les préadipocytes que nous utilisons proviennent de cellules souches humaines ce qui nous rapproche des conditions physiologiques humaines. Plusieurs techniques seront mises en œuvre pour analyser l’adipogénèse sous des angles différents.

A) Analyse de la formation de vésicules lipidiques

La fin de l’adipogénèse se caractérise par l’apparition de vésicules lipidiques dans le cytoplasme des adipocytes. La formation de ces vésicules est au cœur du métabolisme lipidique des adipocytes. Il existe des colorants, dont l’OilRedO, qui sont capables de s’introduire dans les vésicules pour se fixer aux triglycérides et aux acides gras.

Nous allons incorporer le OilRedO dans les vésicules et mesurer la quantité absorbée qui sera directement proportionnelle à la taille et au nombre de vésicules lipidiques formées au cours du processus. Ainsi nous allons ainsi déterminer l’impact de composés phytochimiques sur le métabolisme lipidique des adipocytes directement lié à l’adipogénèse.

B) Expression génique et protéique des acteurs de la différenciation

La différenciation est aussi marquée par une modulation chromatinienne importante et par conséquent d’un remaniement de l’expression génique [6]. Parmi les gènes régulés, on retrouve des facteurs de transcription de la famille C/EBP et PPAR. Des gènes impliqués dans le métabolisme lipidique comme la lipoprétéine lipase ou encore des gènes exprimant des adipokines comme l’adiponectine et la résistine.

L’expression de ces gènes sera mesurée au cours d’intervalles de temps réguliers par PCR quantitative. De cette façon, nous aurons des informations sur l’évolution de ces gènes tout au long de la différenciation. L’ajout ou non de composés phytochimique durant le processus va alors influencer l’expression de ces gènes nous indiquant si ces derniers sont capables d’influencer l’adipogénèse. En parallèle seront réalisés des expériences d’immunobuvardage pour confirmer les résultats de qPCR.

C) Suivi de la migration cellulaire

La morphologie ainsi que les contacts intercellulaires vont être profondément modifiés au cours de la différenciation. Par exemple, certaines adipokines comme la resisitine vont induire l’expression de protéines impliquées dans l’adhérence cellulaire et d’autres vont augmenter l’expression de protéines chemoattractantes [7].

Si les composés phytochimiques influent sur l’adipogénèse et par conséquent, sur les protéines citées, il est fort plausible que ces derniers vont également modifier le profil migratoire des adipocytes. Nous disposons d’un instrument qui mesure la migration cellulaire selon le principe d’impédance : le dispositif xCELLigence. Celui-ci mesure la perturbation du potentiel électrique entre les électrodes de la plaque causée par le passage des cellules d’une chambre à une autre. Ainsi, nous pouvons mesurer en temps réal la vitesse de migration des adipocytes traité avec les composés phytochimiques.

II. Influence des phytochimiques sur l’activité paracrine des adipocytes

La transformation des pre-adipocytes en adipocytes matures est notamment marquée par l’apparition d’un profil sécrétoire important dont les adipokines sont les actrices majeures. Celles-ci permettent aux adipocytes d’influencer l’activité des cellules environnantes qui les reçoivent.

Dans un contexte tumoral, l’activité paracrine des adipocytes est amplifiée en conséquence des signaux envoyés par les cellules cancéreuses. L’élévation du taux de molécules pro-inflammatoires et pro-angiogéniques secrétées par les adipocytes vont avoir pour effets d’augmenter la survie et la prolifération des cellules cancéreuses [2].

L’intérêt de ce deuxième volet est alors de montrer que les composés phytochimiques sont capables de réduire les sécrétions des adipocytes en analysant leurs milieux (que l’on appelle milieux conditionnés) pour ensuite les incuber avec d’autres lignées cellulaires afin de démontrer que l’influence des phytochimiques sur les sécrétions adipocytaires affecte également les voies de signalisation des cellules en périphérie.

A) Analyse de l’activité paracrine des adipocytes par ELISA

A ce jour, plus de cinquantes adipokines ont été découvertes. Elles interviennent dans des mécanismes d’action endocrines, paracrines, autocrines et juxtacrines influençant une grande variété de processus physiologiques ou pathologiques dont l'immunité, angiogénèse et l'inflammation [8].

Afin de les cribler, nous allons récolter les milieux conditionnés et les soumettre à un test ELISA colorimétrique qui permet de mesurer qualitativement la présence de 31 adipokines qui tiennent un rôle dans les mécanismes cités précédemment.

B) Traitements par les milieux conditionnés

Pour mesurer l’étendue du potentiel pro-inflammatoire et pro-angiogénique du tissu adipeux sur son environnement, nous allons sélectionnés les milieux conditionnés qui répondent au mieux aux traitements par les phytochimiques d’après les tests ELISA. Ces milieux conditionnés vont ensuite être utilisé comme traitement sur des cellules endothéliales et des cellules du cancer du côlon.

Après isolation des cellules, l’expression des gènes et des protéines régulant les voies de l’angiogénèse et de l’inflammation va être analysée par qPCR et immunobuvardage. De cette façon, nous allons être en mesure de vérifier si la diminution de la sécrétion d’adipokines inhibe les voies inflammatoires et angiogéniques des cellules touchées par les adipokinees.

En parallèle, nous allons analyser la migration de ces cellules en présence des milieux conditionnés grâce au sytème xCELLigence. Ainsi nous pourrons faire le lien entre l’expression génique avec le comportement observé en migration.

C) Rôle des macrophages sur les sécrétions adipocytaires

Le tissu adipeux physiologique regroupe une population importante de cellules dont les macrophages. Ces derniers appartiennent à la famille les leucocytes et joue un rôle clé dans l’immunité [9].

Dans un contexte d’obésité, les macrophages vont infiltrés d’avantage le tissu adipeux pour devenir la principale source de sécrétion de cytokines pro-inflammatoire. L’adipokine responsable de l’infiltration est l’adipokine MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein-1) [10]. Dans un premier temps nous allons mesurer l’expression de cette adipokine en présence de composés phytochimiques. Ensuite, les adipocytes seront mis en co-culture avec des macrophages et l’expression des adipokines dans le milieu sera à nouveau évaluée par ELISA et l’expression intra-cellulaire sera mesurée par qPCR et immunobuvardage. De plus, des cellules du cancer du côlon ainsi que des cellules endothéliales seront traités avec les milieux conditionnés issus l’association des macrophages avec les adipocytes et leur migration sera analysée par xCELLigence. Finalement, nous envisageons de faire des expériences de co-culture en présence d’une population d’adipocytes/macrophages avec des cellules endothéliales. Pour chacune de ces expériences, nous allons tester différents composés phytochimiques et nous détermineront si leurs propriétés anti-inflammatoire et anti-angiogéniques sont efficaces pour atténuer la coopération des adipocytes avec les macrophages.

III. Ciblage spécifique de la curcumine dans les adipocytes

Les composés phytochimiques et plus particulièrement la curcumine alimentaire présentent une faible biodisponibilité qui se caractérise par de faibles concentrations dans le plasma et les tissus. De nombreuses stratégies ont été mises en œuvre pour palier à ce déficit que ça soit par l’intermédiaire de facteurs d’absorptions ou de nano-matériaux [11].

Une équipe de recherche avec laquelle nous travaillons conjointement développe des peptides couplés à des phytochimiques (la curcumine) ou à des drogues (doxorubicine). Ces peptides acheminent ces molécules spécifiquement aux cellules qui expriment la sortiline.

La sortiline est une protéine ubiquitaire exprimée majoritairement dans le système nerveux central [12]. Récemment, des recherches ont montré que la sortiline peut provoquer un déséquilibre homéostasique qui serait à l’origine de nombreux cancers [13] et c’est donc la raison pour laquelle de tels peptides ont été conçus : pour délivrer des molécules aux cellules cancéreuses exprimant un taux élevé de sortiline.

Mes travaux préliminaires, conjointement avec les données de littérature scientifique, indiquent que la sortiline n’est pas exprimée chez les pre-adipocytes mais dès lors qu’elles rentrent en phase de différenciation, l’expression de la sortiline croît de façon importante jusqu’à maturation en adipocytes. La sortiline détient un rôle important dans le développement du métabolisme lipidique et notamment dans la formation des vésicules Glut4 [14].

Ces raisons nous poussent à croire que ces peptides vont acheminer spécifiquement et efficacement les molécules phytochimiques dans les adipocytes.

A) Expression de la Sortiline lors de l’adipogénèse

Une cascade de gènes marque la phase précoce et tardive de l’adipogènèse qui se traduit par une mobilisation du métabolisme lipidique et par conséquent, de la sortiline. Nous allons donc suivre son évolution à des temps décisif de l’adipogénèse. Des expériences de qPCR et immunobuvardage nous permettront de mesurer son expression à des labs de temps précis et corréler ces observations avec l’expression des gènes phares de l’adipogénèse comme PPARG et CEPBA.

B) Incorporation du peptide couplé à la curcumine au cours de la différenciation

Nous voulons ensuite mesurer l’efficacité d’incorporation du peptide couplé à la curcumine en fonction du niveau d’expression de la sortiline que nous aurons déterminé au point précédent. Pour ce faire, nous allons mesurer la fluorescence de la curcumine lié au peptide au microscope à fluorescence confocal en temps réel comparativement avec la curcumine seule. Ainsi, nous allons savoir si le peptide augmente significativement la biodisponibilité de la curcumine. Nous disposons également du peptide seul couplé à une molécule fluorescent qui pourra être utilisé pour confirmer les résultats précédents.

De plus, nous allons transfecter les adipocytes avec des ARN interférant ciblant la sortiline afin d’inhiber son expression. L’incorporation du peptide sera alors à nouveau re-évaluer par microscopie à fluorescence afin de déterminer avec certitude que la biodisponibilité accrue de la curcumine est bien la conséquence de l’interaction du peptide avec la sortiline.

C) Efficacité de la curcumine couplé au peptide *in vitro*

Marquage de l’ADN fragmenté => microscope à fluo

Transfection

siSORT1 et voir si le peptide est capable de rentrer dans les adipocytes

Migration

D) Efficacité de la curcumine couplé au peptide *in vitro*

Références

Justifications du budget

*Echéancier*

Lié échéancier et budget

Le fichier doit être conforme aux directives suivantes :

• Les feuilles sont de 8 ½" x 11" (216 mm x 279 mm)

• La police de caractères utilisée pour le corps du texte doit être en Times New Roman de 12 points

• Les marges (latérales, supérieures et inférieures) doivent être établies à 3/4 po (1,87 cm)

• Format PDF (suffixe \*.pdf); non protégé

REMARQUE

Voir l’expression de MCP-1