



Effet de la bétaine, de la C-Phycocyanine ou de l'activité physique sur la croissance tumorale du cancer du poumon chez le rat

Carmen Dupuis

► To cite this version:

Carmen Dupuis. Effet de la bétaine, de la C-Phycocyanine ou de l'activité physique sur la croissance tumorale du cancer du poumon chez le rat. Médecine humaine et pathologie. Université Clermont Auvergne [2017-2020], 2017. Français. NNT : 2017CLFAS005 . tel-01887153

HAL Id: tel-01887153

<https://theses.hal.science/tel-01887153>

Submitted on 3 Oct 2018

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

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

ÉCOLE DOCTORALE
DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

Thèse

Présentée à l'Université Clermont Auvergne

pour l'obtention du grade de DOCTEUR
(Décret du 5 juillet 1984)

Spécialités : Nutrition et Physiologie

Soutenue le 26 juin 2017

Carmen DUPUIS

- Effet de la bétaine, de la C-phycocyanine ou de l'activité physique sur
la croissance tumorale du cancer du poumon chez le rat.
-

Président :

M. PORTIER Hugues, Maître de Conférence - Habilité à diriger des recherches, CNRS, B2OA, UMR 7052 - Université Diderot - Université d'Orléans

Rapporteurs :

Mme FABRE Claudine, Professeur des Universités, URePSSS, EA 7369 - Université de Lille 2

M. PIALLOUX Vincent, Professeur des Universités, LIBM Lyon, EA 7424 - Université de Lyon

Examineur :

Mme VASSON Marie-Paule, Professeur des Universités - Praticien Hospitalier, UNH, INRA, UMR 1019 - Université Clermont Auvergne

Membres :

Mme FILAIRE Edith, Directeur de thèse, Professeur des Universités, CIAMS EA 4532 - Université Paris-Sud - Université d'Orléans

M. FILAIRE Marc, Directeur de thèse, Professeur des Universités - Praticien Hospitalier, UNH, INRA, UMR 1019 - Université Clermont Auvergne

M. BERTHON Jean-Yves, Docteur en biologie, Saint-Beauzire

Laboratoire d'accueil :

Equipe micro-environnement cellulaire, immunomodulation et nutrition (ECREIN)

Laboratoire de Biochimie, Biologie moléculaire et Nutrition

Unité de Nutrition Humaine (UNH), UMR1019

Remerciements

En tout premier lieu, je remercie vivement la Ligue contre le Cancer Nationale et les comités du Puy-de-Dôme et de l'Allier qui ont financé cette thèse, ainsi que le centre régional de lutte contre le cancer Jean Perrin et l'Institut National de Recherche Agronomie de Theix de m'avoir accueillie pour ce long travail. Je remercie Ming Wei et Amine Adda Berkane de la société Cellvax qui m'ont accueillie dans leurs locaux parisiens pour les expérimentations animales. Je remercie également le directeur général de Greentech, Jean-Yves Berthon, pour le temps consacré à notre projet, pour la confiance accordée à notre équipe, pour le don de deux éléments indispensables à cette thèse : la bêtaïne et la C-phycocyanine ; et pour sa présence en tant que membre invité à la soutenance.

Je remercie Monsieur Stéphane Pallu d'avoir pris part à cette thèse en tant que membre du comité de thèse et de m'avoir donné de précieux conseils. Je remercie le Professeur Claudine Fabre qui a accepté de participer à cette thèse, d'une part en tant que membre du comité de thèse et d'autre part, en tant que membre rapporteur du jury et qui, de ce fait, m'a conseillé tout au long de ce travail et m'a fait profiter de ses connaissances. Je remercie également le Professeur Vincent Pialoux qui me fait l'honneur d'examiner mon travail et me permet ainsi de bénéficier de son expertise scientifique. Professeur Fabre et professeur Pialoux, je vous remercie pour vos remarques qui vont me permettre d'améliorer ce travail.

Je remercie Monsieur Portier Hugues d'avoir accepté d'examiner cette thèse. Monsieur Portier, je vous remercie du temps consacré à ce travail, de me faire profiter de votre expérience et de vos connaissances.

Je remercie mes directeurs de thèse : le professeur Edith Filaire et le professeur Marc Filaire. Edith, je vous remercie pour votre confiance accordée depuis le master 2, pour votre aide dans la construction de mon projet de thèse, pour tous les moyens que vous m'avez donnés, pour vos conseils avisés, pour votre disponibilité et pour votre réactivité très appréciables. Marc, je vous remercie d'avoir été présent dans la construction de mon projet de thèse, d'avoir œuvré pour obtenir des moyens matériels, de m'avoir conseillé et de m'avoir permis d'approcher le monde médical. Edith et Marc, je vous suis reconnaissante de m'avoir fait partager votre expérience, et de m'avoir fait vivre des moments enrichissants et instructifs. Par votre rigueur, votre culture et votre intérêt scientifique, vous êtes des exemples. Vous m'avez poussé à donner le meilleur et je vous en remercie.

Je remercie l'ensemble de l'équipe ECREIN pour leur écoute et leurs conseils lors des réunions. Plus particulièrement, je remercie Professeur Marie-Paule Vasson pour son accueil chaleureux alors que j'étais « Sans Laboratoire Fixe », ce qui m'a permis d'accéder à des moyens matériels mais surtout de côtoyer une équipe très sympathique, de bons conseils et serviable. Madame Vasson, je vous remercie d'avoir accepté de siéger à la soutenance de cette thèse et je vous suis reconnaissante de votre considération et de vos conseils. Aïcha Demidem, Marie Goepp, Marie-Chantal Farges, Nicolas Goncalves-Mendes, et plus particulièrement Adrien Rossary, je vous remercie d'avoir pris le temps de m'écouter et de répondre à mes questions ainsi de m'avoir conseillée tout au long de cette thèse.

Petit clin d'œil à Jérémie Talvas, sans qui les Western Blot n'auraient pas été si magiques et les pauses déjeuner n'auraient pas été si sportives. Je te remercie de m'avoir transmis ton savoir, d'avoir été disponible pour chacune de mes questions (même les plus débiles et les plus pénibles), d'avoir partagé des pauses thé et des histoires de paillasse qui m'ont souvent permis de décompresser et de relativiser.

Autre petit clin d'œil à Stéphanie Rougé, qui a pris le temps de m'aiguiller dans mes débuts et qui apporte toujours la joie et la bonne humeur dans le laboratoire. Je te remercie d'avoir répondu à mes appels quand tu ne travaillais pas pour répondre à mes questions et surtout à la question « mais où est ce réactif ? ». Je te remercie également pour tes conseils, ton écoute, ton réconfort parfois, ta gentillesse et ta folie qui fait du bien à l'esprit !

Je remercie Manon Martinet, avec qui j'ai passé d'excellents moments. Je te remercie pour ta compagnie, ton écoute et ta gentillesse. Nos moments de commérages et nos pauses déjeuners animées vont me manquer !

Je remercie Sinda Mahbouli et Camille Teilhet, mes deux premières « colocataires ». Sinda et Camille, vos conseils avisés et votre écoute, votre sympathie et vos encouragements et les moments de détente qu'on a partagés ont contribué à la réalisation cette thèse. Partager votre bureau a été un réel plaisir !

Je remercie Rea Bingula, pour ses cours de croate et d'anglais, et ceux de fran-glish ! Rea, notre cohabitation aura été brève mais intense ! Je te remercie pour ton écoute, ton soutien, tes conseils, ta bonne humeur et les bons moments partagés.

Je souhaite également remercier tous mes amis qui m'ont soutenu et plus particulièrement les plus proches. Marika, Emmanuel, Antoine, Julie, Aline, Marion, Léa, Pauline, Audrey, Juliette

et Eléonore, je vous remercie pour votre écoute, vos encouragements et pour tous les merveilleux moments passés avec vous.

Je remercie ma tante et mon oncle d'avoir facilité mes séjours parisiens. Maud et Philippe, je vous remercie de m'avoir accueillie chez vous durant plusieurs mois, d'avoir rendu mon quotidien facile et divertissant, d'avoir été patients et attentifs, de m'avoir toujours écoutée et encouragée. La cohabitation avec vous était aisée et j'en garderai de très bons souvenirs.

Je remercie également tous les autres oncles et tantes, les cousins et cousines, que je ne vais tous citer sinon ça prendrait trois pages ! Je vous remercie de vous être intéressés à mon travail, de m'avoir encouragée et d'avoir contribué de près ou de loin à mon évolution scientifique (clin d'œil aux sujets « contrôle » de l'étude humaine !).

Je remercie mes parents, pour tout ce qu'ils ont fait et font encore pour moi. Maman et Papa, votre amour, votre patience et votre soutien inconditionnels m'ont toujours aidé à avancer et me donnent envie de me dépasser, chaque jour, un peu plus. Je vous remercie de m'avoir permis de faire de si longues études, d'être toujours à l'écoute et soucieux de mon bien-être. Et je vous dis mille mercis de croire en moi et en chacun de mes projets.

Je remercie mon frère, ma belle-sœur et ma nièce qui ont toujours été à l'écoute et m'ont toujours soutenu. Ben, Cécile et Lison, je vous remercie d'avoir écouté mes monologues sur ma thèse, d'avoir fait le maximum pour qu'on passe du temps ensemble quand je revenais me ressourcer dans les Deux-Sèvres et d'avoir su me changer les idées quand on se voyait !

Je remercie ma belle-famille. Marie-Claude, Paul, Sébastien, Agnès, Anna, Antoine et François, vos petites attentions, votre gentillesse et les bons moments passés avec vous dans cette dernière année m'ont permis de me détendre et de rester optimiste.

Enfin, Rémi, je te remercie d'être venu jusqu'à Paris rendre mes journées parisiennes meilleures, de m'avoir supportée, d'avoir été présent même quand j'étais pénible (ce qui veut dire 99% du temps), de m'avoir soutenue quotidiennement, de m'avoir remonté le moral quand c'était nécessaire, et d'avoir endosser le rôle fastidieux de « re-lecteur ». C'est dans les moments durs qu'on en apprend le plus ! J'aime tout ce que j'ai appris cette année et particulièrement ce que j'ai appris sur toi.

Abréviations

4-HNE : 4-hydroxynonéal

8-OHdG : 8-hydroxy-2'-désoxyguanosine

8-oxoGua : 8-oxo-7,8-dihydroguanine

A

A: Adénine

AdipoR1/R2 : adiponectin receptor ½

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADP : Adénosine diphosphate

AdoHcy : S-adenosylhomocysteine

AdoMet : S-adenosylmethionine

AGI : Acides gras insaturés

AGPI : Acides gras poly-insaturés

AKT : Protéine kinase B

AMPK : AMP-activated protein kinase

ANK: Ankyrin-repeat motif

AP : Activité physique

AP-1 : Activator protein 1

Apaf-1 : Apoptotic peptidase activating factor 1

APC : Adenomatous polyposis coli

ARE : Antioxydant response elements

ATF4 : Activating transcription factor 4

ATM : Ataxia telangiectasia mutated

ATP : Adénosine triphosphate

ATRA :All-trans retinol acid

B

BADH : Betaine aldehyde dehydrogenase

Bak : Protéines mitochondriales de la famille des Bcl-2

Bax : Protéines mitochondriales de la famille des Bcl-2

b[a]p : Benzo[a]pyrène

Bcl-XL : Protéines mitochondriales de la famille des Bcl-2

Bcl-2 : B-cell lymphoma 2

Bet : Bétaïne

Bid : protéines mitochondriales de la famille des Bcl-2

BHMT : Betaine-homocysteine S-methyltransferase

BPCO ou COPD : Bronchopneumopathie chronique obstructive

BSA : Bovin serum albumin

C

C : Cytosine

CAD : Caspase-activated DNase

CAT : Catalase

CCT : CTP-phosphocholine cytidyltransferase

CD4⁺ : Cluster of differentiation 4

Cdc37 : Co-chaperon of HSP90

CDK : Cyclin-dependent kinase

CDKN2A : Cyclin-dependent kinase Inhibitor 2A

cIAP, Inhibiteurs cytoplasmiques de l'apoptose

CHDH : Choline dehydrogenase

CHK : Choline kinase

C-PC : C-Phycocyanine

CPCP : Cancer du poumon à petites cellules

CPNCP : Cancer du poumon non à petites cellules

CPT : Diacylglycerol cholinephosphotransferase (cytidine 5-diphosphate choline)

CO₂ : Dioxyde de carbone

Cox : Cyclooxygénase

COX : Cytochrome c oxidase

CREB : C-AMP Response Element-binding protein

CTL : Lymphocytes T cytotoxiques

CTNNB1 : Catenin Beta 1

Cul3 : Cullin-3

Cu/Zn-SOD : Superoxyde dismutase cytoplasmique (Cuivre/Zinc)

CXCL : Chemokine CXC

CYP : Cytochrome P450

Cyt c : Cytochrome c

D

DDH : Dimethylglycine dehydrogenase
DHEA : Ehydroépiandrostérone ou prastérone
DHEA-S : Sulfate d'éhydroépiandrostérone
DMG : Dimethylglycine
DNMT1 : DNA (cytosine-5) –methyltransferase 1
DTT : Dithiothreitol

E

E2 :17-beta-oestradiol
EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor
EML4 : Echinoderm microtubule-associated protein-like4
ER- α ou ER- β : Oestrogène alpha ou beta
ERC ou RSC : Espèces réactives dérivées du chlorure ERN ou RNS : Espèces réactives dérivées de l'azote
ERK : Extracellular signal-regulated kinases
ERO ou ROS : Espèces réactives dérivées de l'oxygène
ERS ou RSS : Espèces réactives dérivées du soufre
ER-stress : Stress au niveau du réticulum endoplasmique

F

FAD : Flavine adénine dinucléotide
FADD : Fas-associated DD
Fas : Fatty acid synthase
FNDC5 : Type I membrane protéine fibronectin type III domain containing 5
Foxa2 : Forkhead box protein A2
FoxO : Forkhead box , de classe O

G

G : Guanine
GEE : Glutathion ethyl ester
GH : Hormone de croissance
Gly : Glycine
GLUT-4 : transporteur de glucose 4

GNMT : Glycine N-methyltransferase
GPx :Glutathion peroxydase
GSH : Glutathion réduit
GSK3 : Glycogen synthase kinase 3
GSSG : Glutathion oxydé
GST : Glutathion S transférase
Grb2 : Growth factor receptor-bound protein 2

H

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène
H₂O : Eau
Hcy : Homocystéine
HIF1- α : Hypoxia-inducible factor 1-alpha
HO : Hèmes oxygénases
HO₂ $\cdot$: Radical perohydroxyle
HOCl : Acide hypochloreux
HOONO : Acide nitrique
HSP : Heat shock protein

I

IASLC : Association Internationale d'Etude du Cancer du Poumon
I-CAD : Inhibiteur de CAD
IDH2 : isocitrate dehydrogenase (NADP(+)) 2, mitochondrial
IFN- γ : Interféron gamma
IGF : Facteurs de croissance à insuline
IGF-1R : Insulin-like growth factor-1 receptor
IGFBP-3 : Insulin-like growth factor-binding protein
I κ B : inhibiteur d'I κ B
IKK : I κ B kinase
IL : Interleukines
IL-6R : Interleukin-6 receptor
IMC : Indice de masse corporelle
iNOS : Oxyde nitrique synthase
IR : Insulin receptor
IRS-1 : Insulin receptor substrate-1

J

JAB1 : Jun activating binding protein 1

JAK : Kinase Janus

JNK : C-Jun N-terminal kinases

K

Keap1 : Kelch-like ECH-associated protein 1

L

LLBA : Liquide de lavage broncho-alvéolaire

LIF : Leukemia inhibitory factor

LKB1 : Kinase hépatique B1

M

M₁dG : 3-(2-deoxy-β-d-erythro-pentafuranosyl)pyrimido[1,2-α]purin-10(3H)-one deoxyguanosine

MAPK : Mitogen-activated protein kinase

MDM2 : Double Minute 2 Protein

MEK : Mitogen-activated protein kinase kinase

MEEK : Mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-related kinase kinase

MET : Metabolic Equilavent Task

Met : Méthionine

Metnl : Meteorin-like

MDA : Malondialdéhyde

MGMT : O₆-methylguanine-DNA methyl-transferase

MLK : Mixed-lineage kinase

MLKL : Mixed lineage kinase domain-like

MMK :

Mn-SOD : Superoxyde dismutase mitochondriale (manganèse)

MPO : Myeloperoxidase

MMP : Matrix métalloprotéinase

mTOR : Mammalian target of rapamycin

mTHF : 5-methyltetrahydrofolate

MTHF : Méthylenetetrahydrofolate

MTR : Méthionine synthase

N

NAD⁺ : Nicotinamide adénine dinucléotide

NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

NEMO : NF-κB essential modulator

NF1 : Neurofibromatose 1

NF-κB : Nuclear factor – kappa B

NIK : NF-κB inducing kinase

NK : Natural killers

NNK : Nicotine-derived nitrosaminoketone

NO : oxyde nitrique

NO₂ : dioxyde d'azote

Nox : NADPH (nicotinamide adénine dinucléotide) oxydases

Nrf2 : Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2

O

O₂ : Dioxygène

O₂⁻ : Anion peroxyde

O₂^{•-} : Radical superoxyde

ObR : Leptin receptor

OH[•] : Radical hydroxyle

OONO⁻ : Peroxynitrite

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

OOH : Hydroperoxydes

OPA : Ortho-phthal-aldéhyde

OXPHOS : Phosphorylation oxydative mitochondriale

P

P : phosphorylation

PAH : Polycyclic aromatic hydrocarbons

PAI-1 : Plasminogen activator inhibitor-1

PC : Phosphatidylcholine

PDK1 : pyruvate déshydrogénase kinase

PE : Phosphatidylethanolamine

PEMT : Phosphatidylethanol-amine N-methyltransferase

PFK : Phosphofructokinase

PI3K : Phosphoinositide 3-kinase

PGC-1α : Proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1-alpha

PGE2, PGD2 ou PGI2 : Prostaglandines

PGF 2 a : 8-epiprostaglandine
 PIP3 : Phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphate
 PKA : Protéine kinase A
 PKC : Protein kinase C
 PPAR : Peroxisome proliferator-activated receptors
 PR : Récepteurs de la progestérone
 PRE : Progesterone responsive elements
 PKCε : Protein kinase Cε
 Prxs : Peroxysomes
 PTEN : Phosphate and tensin homolog deleted on chromosome 10
 PTHLH : Parathyroid hormone-like protein
 PTHrP : Parathyroid hormone-like related protein
 pTNM : Classification TNM post-opératoire
 Purpald : 4-amino-3-hydrazino-5-mercaptop-1,2,4-triazpme

R

R : Radical
 RB1 : gène du rétinoblastome
 RCOH : Aldéhydes
 RIPK1/3 : Receptor interacting protein kinases
 RH : Rel Homology
 RHD : Rel-homology domain
 RL : Radicaux libres
 RO· : Radical alkoxyle
 RO₂· : Radical peroxy
 RUNX3 : Runt-related transcription factor 3
 RXR : Ligand du récepteur rétinoïde X

S

SAM : S-adenosylméthionine
 Sarc : Sarcosine (monomethylglycine)
 SDH : Sarcosine déhydrogénase
 Ser : Serine
 -SH : Groupement thiol
 Shc : Src homology 2 domain-containing
 SHMT : Serine hydroxymethyltransferase
 Sirt : Sirtuines

SOD : Superoxyde dismutase
 SRC1 : Steroid receptor coactivator 1
 STAT : Transducteur activateur de transcription
 STK11 : Serine/threonine kinase 11

T

T : Thymine
 TAD: transcriptional activation domain
 TBA : Acide thiobarbiturique
 TBARS : Substances réactives de l'acide thiobarbiturique
 TGF-β : Transforming Growth Factor-Beta
 Th : T helper
 THF : Tetrahydrofolate
 TNF-α : Tumor necrosis factor-α
 TNF-R1 : Tumor necrosis factor-receptor 1
 TNM : Classification en fonction de la tumeur, des nodules et des métastases
 TP53 :
 TRADD : TNFRSF1A-associated via death domain
 TRAF2 : TNF receptor-associated factor 2
 Treg : Lymphocytes T régulateurs
 TRx : Thiorédoxines
 TRxR ou ThxR : Thiorédoxines réductases
 TSC1/2 : Tuberous sclerosis complex 1 ou 2
 TXA2 : Thromboxane A2

U

Ub :
 UCP-1 : Uncoupling protein-1
 uPA : Urokinase-type plasminogen activator
 uPAR : Urokinase-type plasminogen activator receptor

V

VEGF : Vascular endothelial growth factor
 VEGFR : Vascular endothelial growth factor receptor
 Vit : Vitamine

Tables des matières

Résumé.....	1
Abstract.....	2
Liste des publications et communications	3
Liste des illustrations	5
Avant-propos	7
Introduction bibliographique	10
1. Le cancer du poumon	11
1.1. Le cancer	11
1.1.1. Définition	11
1.1.2. Classification	12
1.1.3. Concept de facteur de risque et de prévention	13
1.1.4. Traitements.....	13
1.2. Le cancer du poumon	14
1.3. Les facteurs impliqués dans la carcinogenèse pulmonaire	15
1.3.1. Anomalies génétiques à l'origine de la dérégulation des voies de signalisation	15
1.3.2. Facteurs de risque comportementaux et environnementaux	17
1.3.3. Facteurs de risque endogènes.....	21
2. Implication du stress oxydatif dans la cancérogenèse pulmonaire	24
2.1. Le stress oxydatif	24
2.1.1. La production des espèces réactives dérivées de l'oxygène (ERO).....	24
2.1.2. Les effets bénéfiques des ERO	26
2.1.3. Les dommages oxydatifs.....	27
2.1.4. Les systèmes de défense antioxydants	31
2.2. L'implication du stress oxydatif dans la carcinogénèse pulmonaire	37
2.2.1. Le stress oxydatif et les étapes de la cancérogenèse pulmonaire.....	37
2.2.2. Modifications des défenses antioxydantes lors d'un cancer du poumon	38
2.2.3. Stress oxydatif, inflammation et cancer du poumon.....	40
2.2.4. ERO, voies de signalisation redox-sensible et cancer du poumon.....	45
2.2.1. ERO, apoptose et cancer du poumon : rôle de la caspase-3.....	46
3. Facteurs nutritionnels permettant le maintien de l'équilibre redox	48
3.1. Activité physique, stress oxydatif et cancer du poumon.....	48
3.1.1. Effets de l'activité physique.....	48
3.1.2. Les effets de l'activité physique sur l'initiation et la progression tumorale du cancer du poumon.....	51
3.2. Les micronutriments, des facteurs clés dans la prévention du cancer du poumon	54
3.2.1. Les vitamines	55
3.2.2. Les oligo-éléments	57
3.2.3. La bétaine	58
3.2.4. La C-phycoyanine (C-PC).....	64
Objectif de thèse	68
Matériels et méthodes	72
1. Etude I.....	73
1.1. Design de l'étude	73
1.2. Nourriture et boisson.....	73
1.3. L'activité physique.....	74
1.4. Traitement des gastrocnémiens	74
1.5. Analyses	74
1.6. Statistiques	77
2. Etude II	77
2.1. Culture cellulaire et injection	78
2.2. Design de l'étude	78

2.3.	Nourriture et boisson.....	79
2.4.	Evaluation des tumeurs	79
2.5.	Traitement des tumeurs.....	79
2.6.	Analyses.....	80
2.7.	Statistiques	85
3.	Etude III.....	85
3.1.	Culture cellulaire et injection.....	86
3.2.	Design de l'étude	86
3.3.	Nourriture et boisson.....	87
3.4.	L'activité physique.....	87
3.5.	Evaluation des tumeurs	87
3.6.	Traitement des tumeurs.....	87
3.7.	Analyses.....	88
3.8.	Statistiques	93
	Résultats.....	94
	Étude I	95
	Résumé.....	96
	Article.....	100
	Étude II.....	115
	Résumé.....	116
	Article.....	121
	Étude III	141
	Résumé.....	142
	Article.....	146
	Discussion générale et perspectives	160
	1. Discussion générale	161
	2. Perspectives	167
	Conclusion générale	169
	Références.....	172
	Annexes	205

Effet de la bétaine, de la C-phycocyanine ou de l'activité physique sur la croissance tumorale du cancer du poumon chez le rat.

Le stress oxydatif joue un rôle prépondérant en tant que messager secondaire dans la régulation de nombreux processus cellulaires tels que l'apoptose, la survie et la prolifération et serait impliqué dans l'ensemble des étapes de la carcinogenèse pulmonaire. L'activité physique et la nutrition sont deux facteurs pouvant moduler le stress oxydatif et les mécanismes associés. La bétaine et la C-Phycocyanine sont deux micronutriments reconnus pour avoir des effets antioxydants, anti-inflammatoires et antiprolifératifs. Récemment notre équipe a montré *in vitro* qu'un traitement en bétaine et/ou la C-phycocyanine diminuait la viabilité des cellules A549 (carcinome pulmonaire).

L'objectif général de ce travail de thèse était d'évaluer l'effet de facteurs nutritionnels (bétaine, C-PC ou activité physique) sur la croissance tumorale de cellules A549 implantées chez le rat Nude et de déterminer les mécanismes sous-jacents.

Dans un premier temps, nous avons étudié l'effet d'une supplémentation nutritionnelle (bétaine ou C-phycocyanine) associée ou non à la pratique d'une activité physique volontaire (roue d'activité) sur l'équilibre redox et l'inflammation, chez des rats sains. Nous avons montré que la bétaine et la C-phycocyanine augmentaient les défenses antioxydantes tandis que l'activité physique volontaire n'avait pas d'effet si elle n'était pas couplée à une supplémentation. Nous avons également mis en évidence que C-phycocyanine inhibait l'augmentation de Cox-2 musculaire induite par l'activité physique.

Dans un second temps, nous avons étudié l'effet de la bétaine et/ou la C-Phycocyanine sur la croissance des cellules A549 implantées chez des rats Nude. Nous avons montré que ces deux micronutriments associés ou non ralentissaient la croissance des tumeurs pulmonaires, au travers de mécanismes communs (activation de NF- κ B, augmentation de la peroxydation lipidique et de l'expression de cytokine pro-inflammatoire (IL-1 β , Cox-2 et TNF- α) au sein de la tumeur) et de mécanismes propres à chaque micronutriment. La C-phycocyanine a induit une diminution du ratio AKT phosphorylé / AKT total et une augmentation du ratio p38 phosphorylé / p38 total, mécanisme en faveur de l'apoptose et de l'autophagie. La bétaine associée à la C-phycocyanine a augmenté le ratio caspase-3 / pro-caspase-3.

Dans un dernier temps, nous avons évalué l'effet de l'activité physique volontaire sur la croissance tumorale des cellules A549 implantées chez des rats Nude. Nous avons mis en évidence que l'activité physique volontaire ralentissait la croissance des tumeurs pulmonaires induites, sans différence significative avec la bétaine et/ou la C-phycocyanine. Il apparaît que l'augmentation de la peroxydation lipidique, l'activation de la MAPK p38 et de NF- κ B, et l'inhibition d'AKT, favorisant la mort cellulaire soient impliquées dans cette diminution tumorale.

Un régime enrichi en bétaine et/ou C-phycocyanine ralentit la croissance cellulaire d'adénocarcinome pulmonaire implanté chez le rat, suggérant leur intérêt dans l'action anti-carcinogène pulmonaire. L'activité physique semble jouer sur les mêmes mécanismes. Nos résultats méritent d'être confirmés par des protocoles à plus large échelle et suggèrent de possibles applications chez des patients porteurs de tumeurs pulmonaires.

Mots clés : bétaine, C-phycocyanine, roue d'activité, stress oxydatif, apoptose, inflammation, cellules A549, rats nude

Effect of betaine, C-phycoyanin or physical activity on tumour growth of lung cancer in rats.

Oxidative stress seems to play a crucial role as a secondary messenger in the regulation of several cellular processes such as apoptosis, survival and proliferation, and could be involved in all steps of the lung carcinogenesis (i.e. initiation, promotion and progression). Physical activity and nutrition are two factors able to modulate oxidative stress and associated mechanisms. Betaine and C-phycoyanin are two known micronutrients having antioxidant, anti-inflammatory and anti-proliferative effects. Previously, our team showed that betaine and/or C-phycoyanin treatment decreased the viability of A549 cells *in vitro* (pulmonary adenocarcinoma cell line).

The main objective of this work was to evaluate the effect of nutritional factors (betaine, C-phycoyanin) or physical activity on growth of implanted A549 cells in Nude rats and to determine underlying mechanisms.

Firstly, we studied the effect of nutritional supplementation (betaine or C-phycoyanin) combined or not with voluntary physical activity (wheel running) on redox balance and inflammation in healthy rats. We showed that betaine and C-phycoyanin increased antioxidant defenses, whereas voluntary physical activity did not have an effect when it was not associated with micronutrient supplementation. We also observed that C-phycoyanin inhibited physical activity-induced muscle Cox-2 activity increase.

Secondly, we studied the effect of betaine and/or C-phycoyanin on growth of implanted A549 cells in Nude rats. We showed that these two micronutrients, whether associated or supplied separately, slowed down the lung tumour growth through similar mechanisms (NF-κB activation and increase of lipid peroxidation and expression of pro-inflammatory cytokines (IL-1β, Cox-2 et TNF-α) in tumour). Also, some mechanisms were specific for each micronutrient or their combination. C-phycoyanin induced a decrease of phosphorylated AKT / total AKT ratio, and an increase of phosphorylated p38 / total p38 ratio, both mechanisms promoting apoptosis and autophagy. On the other hand, betaine associated with C-phycoyanin increased caspase-3 / pro-caspase-3 ratio.

Finally, we studied the effect of voluntary physical activity on growth of implanted A549 cells in Nude rats. We showed that voluntary physical activity slowed down the lung tumour growth, without significant difference if animals were supplied with betaine or/and C-phycoyanin. It seems that the increase of lipid peroxidation, NF-κB and p38 activation, and AKT inhibition, all having a role in promotion of a cell death, are responsible for the tumour growth slowdown following the physical activity.

In conclusion, diet enriched with betaine or/and C-phycoyanin slows down the growth of pulmonary adenocarcinoma cells implanted in rats, suggesting their interest in anti-cancer activity. Physical activity seems to act on similar mechanisms as these micronutrients. Our results have to be confirmed with further studies, but are already suggesting a potential application in lung cancer patients.

Keys words: nutrition, betaine, C-phycoyanin, voluntary physical activity, oxidative stress, apoptosis, inflammation, lung cancer, wheel running, A549 cells, rats

Ab At é re bni A b nc c éi e bni A

J'ai bénéficié d'une allocation doctorale et notre équipe a bénéficié d'un soutien financier pour l'ensemble des expérimentations, accordés par la **Ligue Contre Le Cancer** (Nationale et comités de l'Allier et du Puy-de-Dôme) pour les travaux *in vivo*.

Publications ›

Filaire E, Dupuis C, Galvaing G, Aubreton S, Laurent H, Richard R, Filaire M. Lung Cancer : what are the links with oxidative stress, physical activity and nutrition. Lung Cancer. 2013;82:283-9. (*Annexe 1*)

Dupuis C, Filaire M, Filaire E. Activité physique spontanée et qualité de vie des patients atteints d'un cancer du poumon, en attente d'une résection pulmonaire. Science et Sports. 2015;30:47-50. (*Annexe 2*)

Bingula R, Dupuis C, Pichon C, Berthon J-Y, Filaire M, Pigeon L, Filaire E. The antitumour effects of betaine and/or C-phycocyanin on the lung cancer A549 cells *in vitro* and *in vivo*. Journal of Oncology. 2016:e8162952. (*Annexe 3*)

Dupuis C, Berthon J-Y, Larue J, Rougé S, Filaire M, Filaire E. Effects of 6 weeks of betaine or C-phycocyanin supplementation associated or not with wheel running on redox status. Science et sports. *In press*. (Etude I)

Dupuis C, Filaire M, Rossary A, Berthon J-Y, Wei M, Rougé S, Talvas J, Filaire E. Betaine and/or C-Phycocyanin slowed down the growth of lung cancer A549 cells *in vivo*. Journal of Oncology. Soumis le 23 mars 2017. (Etude II)

Dupuis C, Filaire M, Wei M, Vasson MP, Talvas J, Filaire E. Wheel running slowed down the growth of lung cancer A549 cells in rats. Medicine and Science in Sports and Exercise. Soumis le 21 avril 2017. (Etude III)

Communications ›

Dupuis C, Filaire M, Filaire E. Impact of spontaneous physical activity on quality of life and psychological parameters among patients with lung cancer waiting for a lung resection. In : Société Française de Psychologie du Sport. (n°5, Nice, 12-14 mai 2014). The SFPS' 5th International Congress of Sport Psychology for Performance and Health across the lifespan. In Symposium : Cancer, Physical Activity and Psychology. (communication orale)

Galvaing G, Aubreton S, Laurent H, Dupuis C, Richard R, Filaire M. Intérêt d'un réentraînement préopératoire en endurance des muscles inspiratoires avant exérèse pulmonaire

pour cancer bronchopulmonaire. In : Société Française de Chirurgie Thoracique et Cardio-Vasculaire (n°67, Tours, 11-14 juin 2014). Journal de Chirurgie Thoracique et Cardio-vasculaire. Vol 18, Suppl 1, p.108. Juin 2014. (communication orale de Géraud Galvaing)

Dupuis C, Filaire M, Filaire E. Statut nutritionnel et niveau d'activité des patients atteints d'un cancer du poumon non à petites cellules, en attente d'une résection pulmonaire In : Journées de l'Ecole Doctorale des Sciences de la Vie, Santé, Agronomie, Environnement (n°20, Clermont-Ferrand, 12-14 mai 2015). (communication affichée) (**Annexe 4**)

Dupuis C, Bingula R, Pigeon L, Filaire M, Berthon J-Y, Pichon C, Filaire E. Impact de la bétaine sur la croissance des cellules A549: approche in vitro et in vivo. In : Oncoriales (n°1, Andrézieux, 7 juillet 2015). (communication affichée) (**Annexe 5**)

Dupuis C, Filaire M, Filaire E. Supplémentation nutritionnelle et/ou activité physique : effet sur l'équilibre redox chez des rats sains et des rats ayant une tumeur pulmonaire induite. In : journée de la recherche en cancérologie. CHRU, Centre Jean Perrin, Clermont-Ferrand, 9 février 2016. (communication orale)

Dupuis C, Filaire M, Filaire E. Nutrition, Activité Physique et Cancer. In : Assemblée générale du Comité de l'Allier de la Ligue contre le Cancer. Vichy, 7 avril 2016. (communication orale)

Dupuis C, Filaire M, Rossary A, Berthon J-Y, Talvas J, Filaire E. Bétaine et/ou C-Phycocyanine : effet sur la croissance tumorale des cellules A549 chez le rat Nude. In : 19^e colloque de la Ligue Nationale contre le Cancer. Polydôme, Clermont-Ferrand, 2-3 février 2017 (communication affichée). (**Annexe 6**)

Ab Aère Ab èni A

Figure 1. Bases moléculaires de la cancérogénèse. (Collège Français des Pathologistes, 2012)

Figure 2. Les trois phases du processus de la cancérogénèse. (Liu et al., 2015)

Figure 3. Les importantes mutations dans les voies de signalisation impliquées dans l'adénocarcinome pulmonaire (Harris & McCormick, 2010)

Figure 4. Implication des espèces réactives d'oxygène (ERO) et de l'inflammation, induites ou non par la consommation de tabac, dans le développement d'une broncho-pneumopathie obstructive chronique (BPCO) et du cancer du poumon. (Adcock et al., 2011)

Figure 5. Liste des constituants de la fumée de cigarette considérés comme cancérogènes. (Sciences et avenir, 2013)

Figure 6. Mécanismes induits par la consommation de tabac, provoquant la survenue d'un cancer du poumon. (Hecht, 2012)

Figure 7. Lien entre rythme circadien, activité endocrine, défenses immunitaires et progression tumorale. Figure adaptée de (Eismann et al., 2010)

Figure 8. Activation des voies anti-tumorales et pro-tumorales par des cytokines.

Figure 9. Interactions entre les cellules tumorales et les cellules immunitaires et inflammatoires dans le microenvironnement tumoral. (Lin & Karin, 2007)

Figure 10. Les radicaux libres et leurs métabolites actifs. (Duracková, 2010)

Figure 11. Régulation ERO-dépendante des sirtuines. Adaptée de (Merksamer et al., 2013)

Figure 12. Schéma général des marqueurs de l'oxydation des lipides, des acides aminés et des acides nucléiques au cours du stress oxydant. (Michel et al., 2008)

Figure 13. Mécanismes en chaîne de la peroxydation des acides gras. (Guéritat, 2015).

Figure 14. Localisation des principales défenses antioxydantes au sein de la cellule. (Garait, 2006)

Figure 15. Les radicaux libres, leurs métabolites et les antioxydants permettant leur élimination. Adaptée de (Duracková, 2010)

Figure 16. Réactions de conjugaison entre le glutathion et d'autres composés. (Ballatori et al., 2009)

Figure 17. Activation de la voie Keap1/Nrf2. (May, 2012)

Figure 18. Voies activées suite à la fixation de TNF- α sur le récepteur TNFR-1. (van Horssen et al., 2006)

Figure 19. Conséquences de l'activation des IKK β . (Perkins, 2007)

Figure 20. Activation de la voie PI3K/AKT/mTOR et ses conséquences. (Oda et al., 2015)

Figure 21. Activation de la voie p38 MAPK et réponses biologiques associées. Adaptée de (Rana et al., 2013)

Figure 22. Voies apoptotiques menant à l'activation de caspase-3. <https://pubs.acs.org/cen/news/84/i38/8438molecule.html>

Figure 23. Activation de la signalisation par les ERO dans le muscle squelettique en réponse à un exercice. (Scheele et al., 2009)

Figure 24. Structure chimique de la bétaine. (Ueland, 2010)

Figure 25. Synthèse de la bétaine à partir de la choline. (1) Choline déshydrogénase; (2) bétaine aldéhyde déshydrogénase. (Peluso et al., 2000)

Figure 26. Métabolisme de la choline et de la bétaine et leur lien avec le métabolisme du carbone. (Ueland, 2010)

Figure 27. Rôle protecteur antioxydant de la C-Phycocyanine via l'activation de Nrf2. Adaptée de (Gao et al., 2016)

Figure 28. Signalisation cellulaire et facteurs transcriptionnels impliqués dans l'induction de HO-1 par les ROS. (Lyoumi et al., 2007).

Figure 29. Schéma expérimental de l'étude I.

Figure 30. Schéma expérimental de l'étude II.

Figure 31. Schéma expérimental de l'étude III.

Figure 32. Réponses antioxydantes suite à l'augmentation des ERO induite par une activité physique. Adaptée de (Olsen et al., 2015)

Figure 33. Production de ERO pouvant conduire à l'apoptose. (Qiu et al., 2015)

▪

□v□i bt nt nA□

▪

Avant-Propos

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS 2017), la population des personnes de plus de 60 ans est celle qui augmente le plus ces dernières années. Le vieillissement de la population engendre une augmentation des cas de maladies chroniques telles que le diabète et les maladies cardio-vasculaires mais également des cas de cancers. En 2015, le cancer était la deuxième cause de mortalité dans le monde avec 8.8 millions de décès dont un tiers était dû à des facteurs comportementaux (alcool, tabac, sédentarité) et alimentaires (OMS 2017). Trente à cinquante pourcents des cancers actuels pourraient être prévenus *via* la réduction de ces facteurs de risque (OMS 2017).

Un cancer se développe en trois étapes : l'initiation, la promotion et la progression. Suite à une lésion importante au niveau de l'ADN, la cellule va se transformer. Cette cellule modifiée va, par la suite, se développer et proliférer, formant ainsi des amas de cellules transformées. Ces cellules acquièrent des caractéristiques spécifiques à la cellule cancéreuse, d'un point de vue morphologique et fonctionnel. Le cancer est caractérisé notamment par des altérations des mécanismes de régulation cellulaire : mutations des oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeur, défaut de différenciation, dérégulation de l'apoptose, et déséquilibre de balance pro-oxydant/antioxydant, induisant une augmentation du stress oxydatif. A terme, ce dernier peut engendrer des dommages sur les constituants de la cellule : les protéines, les lipides et l'ADN. Un système de défense antioxydant endogène permet de réduire le stress oxydatif *via* la détoxification des espèces pro-oxydantes notamment. Il est également possible d'améliorer son système de défenses antioxydantes par la pratique d'une activité physique régulière, cette pratique permettant des adaptations physiologiques ou bien encore par l'apport de certains micronutriments considérés comme antioxydants (Clarkson & Thompson, 2000). La bétaine (dérivé d'acides aminés présent dans la nourriture) et la C-Phycocyanine (C-PC) (phycobiliprotéine extraite d'algues) sont deux micronutriments connus pour leurs propriétés antioxydantes mais également pour leurs propriétés anti-inflammatoires et antiprolifératives.

Ce travail s'intéresse particulièrement au cancer du poumon non-à-petites cellules qui est la première cause de décès par cancer dans le monde (Siegel et al., 2013). Parmi les facteurs de ce cancer, le stress oxydatif joue un rôle important et peut être modulé grâce à des facteurs nutritionnels tels que l'alimentation et l'activité physique. Il est connu qu'une alimentation riche en fruits et légumes, sources de micronutriments tels que les antioxydants et qu'une activité physique régulière permettent de diminuer le risque d'avoir un cancer du poumon (Steindorf et al., 2006; Tarrazo-Antelo et al., 2014).

Avant-Propos

Connaissant le lien entre cancer du poumon et les mécanismes redox-sensibles, nous avons évalué l'effet de la bétaine, de la C-PC ou de l'activité physique régulière modérée sur l'équilibre redox et les mécanismes redox-sensibles tels que l'inflammation et l'apoptose dans un cadre non pathologique et pathologique (cancer du poumon).

Une première étude *in vivo* réalisée par notre équipe a permis d'évaluer l'effet de la bétaine et/ou la C-PC sur la croissance tumorale des cellules A549 (adénocarcinome pulmonaire humaine) et sur certains mécanismes redox-sensibles (expression de NF- κ B et de p38 MAPK, et cycle cellulaire). En effet, nous avons montré que la bétaine seule ou associée à la C-PC permettait une diminution de la viabilité des cellules A549. L'association de la bétaine et de la C-PC induisait également une réduction de l'expression de NF- κ B stimulée par TNF- α et une augmentation de l'expression du pro-apoptotique p38 MAPK. Mon travail a consisté à évaluer chez des rats sains l'effet de la bétaine ou la C-PC associée ou non à une activité physique sur la modulation de l'équilibre redox et l'inflammation. Dans un second temps, chez des rats Nude ayant une tumeur pulmonaire sous-cutanée implantée, l'effet de la bétaine et/ou la C-Phycocyanine ou l'activité physique sur la croissance tumorale de cellules A549 *in vivo*, a été investigué ainsi que certains mécanismes explicatifs de cet effet, en lien avec l'inflammation et l'équilibre redox. Nous avons émis l'hypothèse que les facteurs nutritionnels étudiés ralentiraient la croissance tumorale *via* la stimulation de mécanismes en lien avec le stress oxydatif et l'inflammation.

La première partie du manuscrit permet de comprendre le contexte général grâce à une introduction bibliographique divisée en trois parties. Seront traités le cancer et plus particulièrement le cancer du poumon ainsi que les termes associés (classification, traitement, prévention) et les principaux facteurs de risque. La seconde partie s'intéresse au stress oxydatif, phénomène physiologique impliqué dans la cancérogenèse pulmonaire. Après avoir défini ce processus et cité des moyens de l'évaluer, ce chapitre traite des raisons de son implication dans l'ensemble des étapes de la cancérogenèse et des mécanismes associés. La relation entre nutrition, stress oxydatif, mécanismes redox-sensibles et cancer du poumon sera traitée, avec une attention particulière pour deux micronutriments que sont la bétaine et la C-Phycocyanine.

La seconde partie du manuscrit présente les différentes études réalisées sous forme de publications, précédées d'un résumé, permettant de répondre aux hypothèses exposées dans les objectifs de cette thèse. La dernière partie de ce manuscrit est constituée de la discussion générale de l'ensemble des résultats et des perspectives.

ibnébné e ren t Resé

□□□□□□□□□□□□□□□□ □□□

□□□□□ □□□□□**i** □□ □

1.1.1. □ Définition

Le cancer est la survenue dans un organe d'une population cellulaire dont la croissance et la prolifération échappent aux mécanismes de régulation de l'organisme. Les conséquences principales sont de deux ordres : 1) l'apparition d'une tumeur, 2) la possibilité de migration puis de fixation de cellules tumorales à distance formant des métastases. Des facteurs exogènes (l'exposition à des substances toxiques de natures extrêmement diverses) et endogènes (troubles génétiques, épigénétiques) favorisent la carcinogénèse. Face à cela, l'organisme est doté de mécanismes de défenses (immunité, apoptose, réparation tissulaire ...). La cancérisation d'un tissu apparaît lorsque les mécanismes de défenses de l'organisme sont dépassés.

Sur le plan génétique, suite à des mutations ponctuelles de segments du génome (remaniements, amplifications, délétions), l'ADN est lésé et les cellules sont alors transformées, ce qui amène à des perturbations de mécanismes clés tels que la prolifération et la différenciation. L'organisme possède un système de réparation d'ADN (réparation directe de la lésion, réparation par excision de base ou de nucléotides, réparation des mésappariements, réparation par jonction d'extrémités non homologues, réparation par recombinaison homologue) (Sancar et al., 2004). L'accumulation d'altérations génétiques conduit à une multiplication de dérèglements du fonctionnement des cellules. Le système de réparation n'est alors plus suffisant et progressivement, la cellule normale se transforme en cellule cancéreuse (Figure 1) (Collège Français des Pathologistes, 2012). Les cellules cancéreuses initiées (initiation) vont proliférer (promotion) et l'apoptose va être inhibée jusqu'à un stade pré-néoplasique (stade réversible). Enfin, la tumeur va progresser *via* notamment des désordres génétiques supplémentaires, une instabilité génétique. La croissance tumorale varie d'une tumeur à l'autre et l'extension peut être soit locale, soit à distance (métastases) (Figure 2) (Liu et al., 2015).

Une cellule cancéreuse peut se caractériser par de nombreuses propriétés dont :

- □ des propriétés morphologiques : une anisocytose (variabilité de la taille), des modifications nucléaires (mitoses anormales et plus nombreuses, variation de la taille, augmentation du rapport nucléocytoplasmique, chromatine en mottes, nucléoles

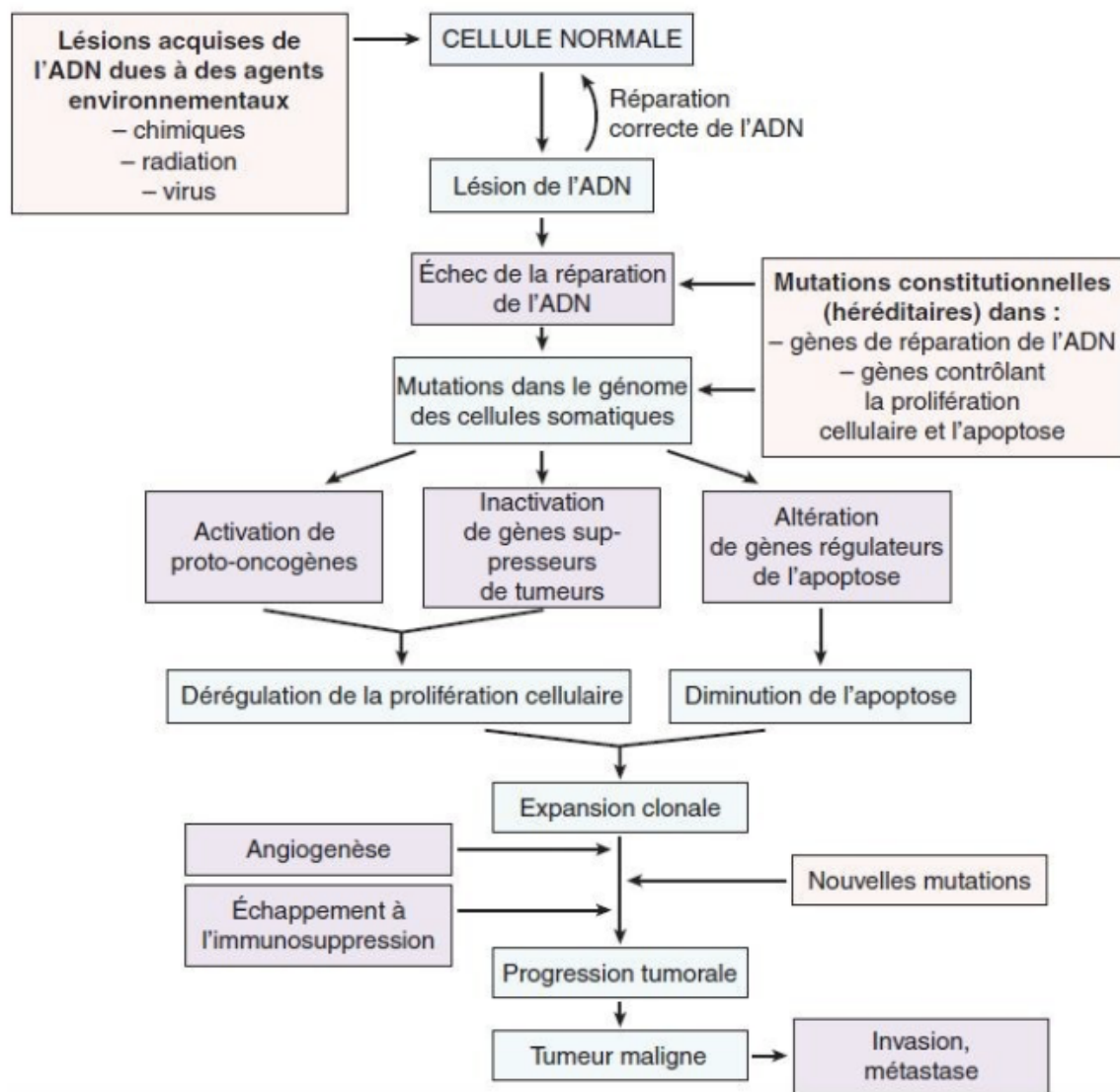


Figure 1. Bases moléculaires de la cancérogénèse. (Collège Français des Pathologistes, 2012).

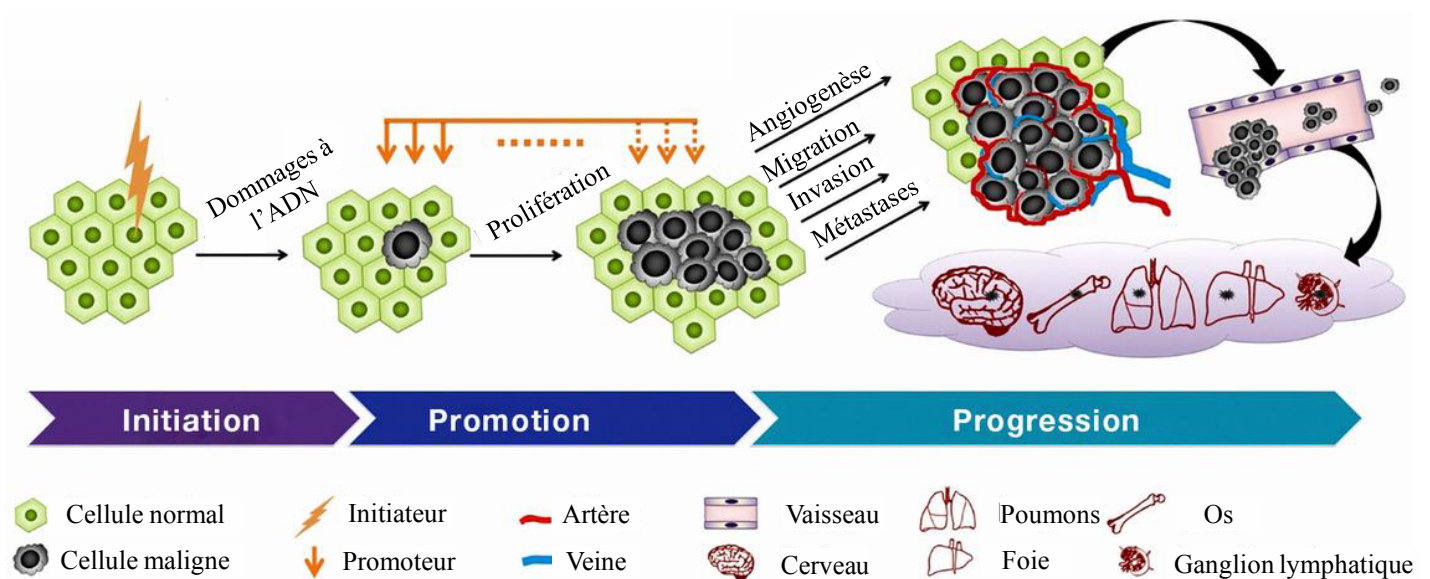


Figure 2. Les trois phases du processus de la cancérogénèse. (Y. Liu et al., 2015)

volumineux, irréguliers et/ou multiples) et des modifications cytoplasmiques (basophilie) (Robertis & Robertis, 1983)

- □ des propriétés fonctionnelles : croissance cellulaire illimitée (immortalité), indépendance vis-à-vis des systèmes de régulation de la prolifération cellulaire, perte de l'inhibition de contact, pouvoir invasif, angiogenèse, perte d'adhésivité (possibilité de migrer) et métastases (pouvoir de greffe) (Mallard, 2010).

Deux types de gènes sont impliqués dans la prolifération tumorale :

- □ les oncogènes codant pour une protéine induisant une prolifération cellulaire maligne, soit apportés par un virus, soit activés par un proto-oncogène (=gène normal codant pour une protéine régulant positivement la prolifération cellulaire)
- □ les anti-oncogènes correspondant aux gènes suppresseurs de tumeur (=gène normal codant pour une protéine régulant négativement la prolifération cellulaire). Une perte d'activité de la protéine induit ainsi une prolifération cellulaire maligne (Lacave, Larsen, & Robert, 2005; Mallard, 2010).

1.1.2. □ Classification

Les cancers sont d'abord classés suivant leur type histologique :

- □ les cancers solides qui comprennent ceux développés au dépend des muqueuses (épithélioma ou carcinomes) et ceux développés au dépend du tissu conjonctif (sarcomes) ;
- □ les cancers du tissu sanguin.

Il existe aussi des classifications histopronostiques très utilisés en pratique clinique car utiles aux indications thérapeutiques. Pour le cancer du poumon, qui est un carcinome développé au dépend de la muqueuse bronchique, la classification TNM est la principale classification pronostique permettant d'établir la stratégie thérapeutique. La classification TNM s'appuie sur l'ensemble des résultats de l'examen clinique, de l'imagerie, des endoscopies et des biopsies et permet ainsi de déterminer les stades en fonction de la taille de la tumeur primitive (T), de la présence d'adénopathies (N), et des métastases à distance (M).

1.1.3. □ Concept de facteur de risque et de prévention

Un facteur de risque est une variable qui augmente le risque de maladie de manière statistiquement significative. Chaque cancer a ses propres facteurs de risque, les principaux facteurs de risque identifiés sont : la génétique, les infections, la nutrition, la sédentarité, le surpoids et l'obésité, le tabac, l'alcool, les médicaments, les facteurs hormonaux, les radiations ou/et les expositions professionnelles (Lacave et al., 2005).

Afin de réduire l'incidence et la prévalence des cancers, il existe trois types de prévention :

- □ la prévention primaire : qui se fait en amont de la maladie et qui vise à diminuer l'incidence de la maladie dans une population. Elle comprend la vaccination, les règles hygiéno-diététiques et des suppléments nutritionnelles.
- □ la prévention secondaire : qui correspond aux mesures prises pendant la maladie et qui vise à diminuer la prévalence de la maladie (durée et gravité). Elle comprend le dépistage et le traitement.
- □ la prévention tertiaire : qui se fait en aval de la maladie afin de diminuer la prévalence des incapacités chroniques et des récives. Elle comprend des mesures de réadaptation et de rééducation (OMS 2017).

1.1.4. □ Traitements

Suite au diagnostic d'un cancer, différents traitements sont alors possibles, seuls ou associés :

- □ la chirurgie : curative (exérèse tumorale, des métastases et un curage ganglionnaire), préventive (traitement des lésions précancéreuses), de reconstruction et palliative (permettant de préserver la qualité de vie des patients incurables)
- □ la radiothérapie (électromagnétique ou particulaire) : curative (exclusive, en association avec la chirurgie (néo-adjuvante ou adjuvante), en association avec la chimiothérapie (association séquentielle ou concomittante), palliative (exclusive ou en association avec la chimiothérapie) et symptomatique (antalgique, de décompression, hémostatique)
- □ la chimiothérapie : curative (exclusive, en association avec la chirurgie (néo-adjuvante ou adjuvante), en association avec la radiothérapie (association séquentielle ou concomitante), palliative
- □ l'hormonothérapie : concerne les cancers hormonodépendants

- □ l'immunothérapie : a pour but d'augmenter l'expression de certains composants du système immunitaire
- □ les thérapies ciblées : visent à diminuer l'activité des protéines impliquées dans la prolifération cellulaire ("DCEM modules en schémas," 2007).

□□□□ □□□□i □□ □**é t néc ni** □

En France, le cancer du poumon est le troisième cancer le plus fréquent chez les hommes et chez les femmes (39 495 nouveaux cas en 2012 dont 71% d'hommes) et est la première cause de décès par cancer (29 949 décès en 2012) (Inca 2017). C'est un cancer de mauvais pronostic car 85% des patients sont diagnostiqués à des stades avancés (dont 55% à un stade métastatique) et la survie à 10 ans est inférieure à 33% (Tas et al., 2013) .

Les facteurs de risques sont le tabac, l'amiante, les rayons X, le radon, et des substances telles que chrome arsenic nickel, particules fines de diesel.... L'importance de la consommation de tabac et, à un degré moindre, de l'exposition professionnelle et environnementale font du cancer du poumon un enjeu majeur de santé publique dans le monde.

On différencie les cancers du poumon « non à petites cellules » (80% des cas) des cancers du poumon à petites cellules, de pronostic très péjoratif. Les cancers non à petites cellules se divisent eux-mêmes en trois groupes : le carcinome épidermoïde (45% des cas), l'adénocarcinome (25%) et les autres variétés histologiques moins fréquentes (dont le carcinome à grandes cellules (10%) (Filaire et al., 2013).

La classification histopronostique TNM est utilisée. La recherche d'anomalies génétiques (mutations du gène codant pour EGFR, translocations et altérations de certains gènes) et de « checkpoints » inhibiteurs de l'immunité est permet de caractériser le profil biomoléculaire des tumeurs et de personnaliser les traitements des patients.

En 2017, sur le plan thérapeutique, le traitement à visée curative est centré sur la chirurgie seule ou en association avec la chimiothérapie et ou la radiothérapie. Dans certains cas, pour des patients jugés inopérables, la radio-chimiothérapie est utilisée. Les traitements à visée palliative utilisent la chimiothérapie, la radiothérapie, les immunothérapies, les thérapies ciblées.

Effet de la bétaine, de la C-phycocyanine ou de l'activité physique sur la croissance tumorale du cancer du poumon chez le rat- Carmen Dupuis - 2017

1.3.1. Anomalies génétiques à l'origine de la dérégulation des voies de signalisation

La signalisation cellulaire correspond à l'ensemble des processus cellulaires permettant la transduction d'un signal, allant de la fixation d'un ligand à un récepteur membranaire jusqu'à la réaction cellulaire. Une voie de signalisation correspond à la succession de protéines activées suite à l'activation du récepteur par le ligand, conduisant à une réponse cellulaire finale (apoptose, prolifération, différenciation, ...).

De nombreuses mutations dans les voies de signalisation induisant une activation ou une inhibition de la voie ou des mutations des récepteurs peuvent être impliquées dans la cancérogenèse pulmonaire.

EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) est un récepteur transmembranaire, activé par liaison au ligand et qui engendre une autophosphorylation et l'activation de nombreuses molécules et cascades de transcription du signal en aval (Carpenter & Jiang, 2013). Plus précisément, c'est un récepteur à tyrosine kinase qui active Ras/MAPK, JAK/STAT et PI3K/AKT (Jorissen et al., 2003). Ces voies sont versatiles et peuvent être activées par de nombreux facteurs de croissance, des cytokines inflammatoires et des hormones (Ho et al., 2016). Elles régulent la prolifération cellulaire, la survie, la migration et la différenciation, inhibent l'apoptose et jouent un rôle important dans le développement et la progression du cancer du poumon non à petites cellules (CPNPC) (Ho et al., 2016; Jorissen et al., 2003). On estime qu'environ 27% des patients avec un cancer du poumon présentent une mutation du gène codant pour l'EGFR (Figure 3). Dans les CPNPC, le gène codant pour l'EGFR est régulé à la hausse, amplifié, muté ou surexprimé (Hirsch et al., 2003; Kanematsu et al., 2003). L'activation de la cascade d'EGFR est davantage augmentée dans les biopsies bronchiques des fumeurs avec ou sans broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO) comparés aux non-fumeurs (O'Donnell et al., 2004) et l'arrêt du tabac ne conduit pas à une réduction de l'expression d'EGFR (Lapperre et al., 2007). Une surexpression d'EGFR a été l'une des premières anomalies constatées chez les fumeurs présentant un risque élevé de développer un cancer du poumon (Wilbur et al., 2002) et les mutations somatiques dues à la cigarette peuvent persister pendant des années (Franklin et al., 1997; Wistuba et al., 1997). L'activation d'EGFR engendre une hypersécrétion des mucus en réponse à l'élastase neutrophile (enzyme digestive, produite par les neutrophiles lors d'une infection ou réaction inflammatoire) et au stress oxydatif, reliant

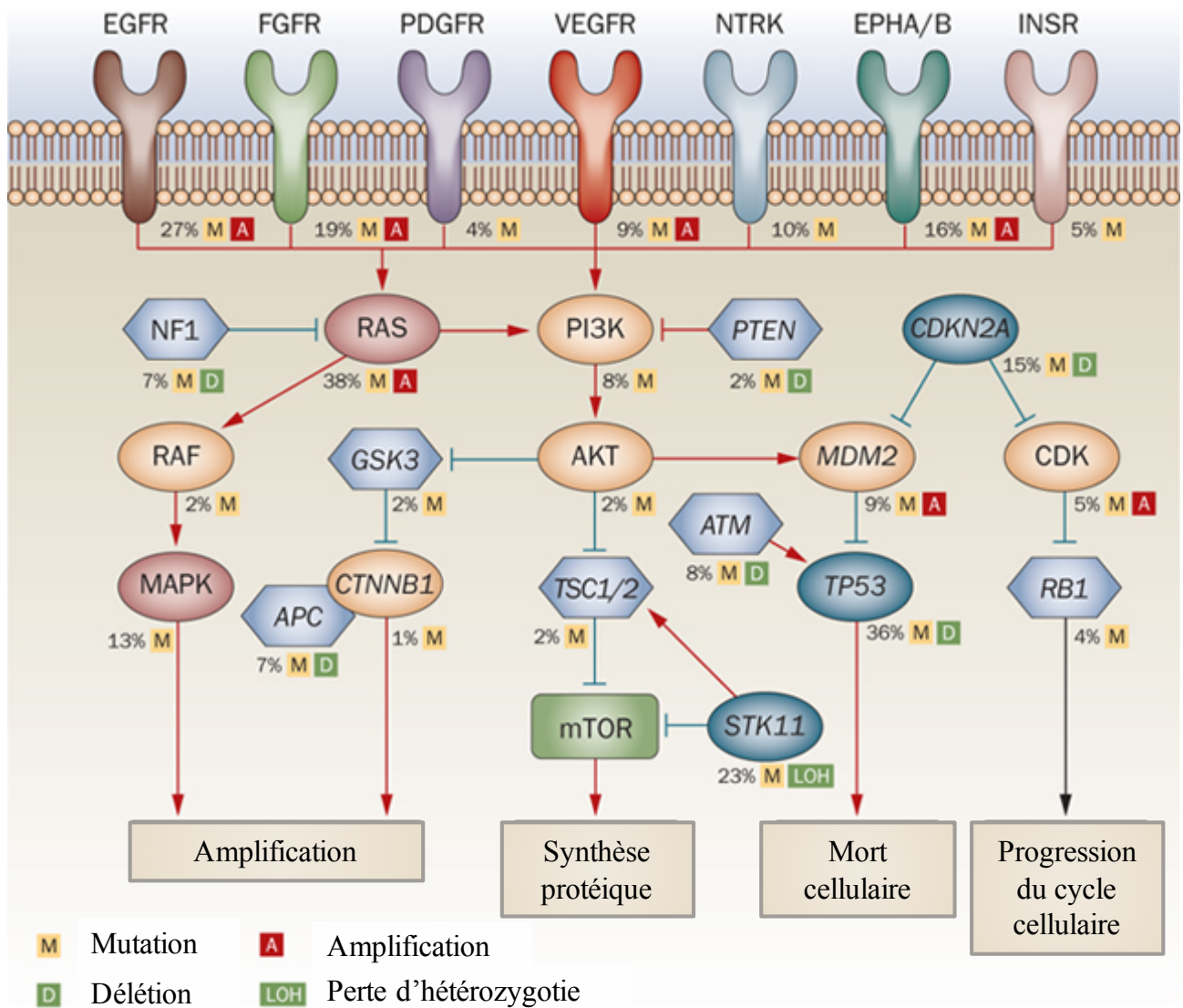


Figure 3. Les importantes mutations dans les voies de signalisation impliquées dans l'adénocarcinome pulmonaire (Harris and McCormick 2010)

ainsi l'inflammation des voies aériennes à un mécanisme important du cancer du poumon (Burgel & Nadel, 2004).

La voie PI3K/AKT/mTOR joue un rôle important dans la régulation de la prolifération et de la survie cellulaire (Engelman et al., 2006). Cette voie est dérégulée dans 50 à 70% des cas de CPNPC (Ding et al., 2008). Une activation aberrante de cette voie est l'un des mécanismes impliqués dans la résistance aux inhibiteurs d'EGFR, utilisés lors des traitements du cancer du poumon (Fumarola et al., 2014)

Des réarrangements du récepteur à tyrosine kinase ALK (Anaplastic lymphoma kinase) résultant de la fusion d'ALK avec EML4 (echinoderm microtubule-associated protein-like4) sont observés dans 4% des CPNPC (Cooper et al., 2013). L'activation aberrante d'AKT est impliquée dans la prolifération cellulaire et l'inhibition de l'apoptose induites par les voies Ras/Raf/MAPK1, PI3K/AKT et JAK3-STAT3 (Cooper et al., 2013; Shaw & Solomon, 2011). C'est également le cas de ROS-1 qui est un proto-oncogène dont l'activation conduit à la signalisation des PI3K/AKT/mTOR, STAT3 et Ras/MAPK/ERK (Chin et al., 2012). Les kinases Raf sont aussi des médiateurs essentiels de la voie de signalisation MAPK et, de ce fait, ont un rôle important dans de nombreux processus cellulaires tels que la prolifération, la différenciation et la régulation transcriptionnelle. On retrouve une mutation de BRAf dans 3 à 5 % des CPNPC, essentiellement chez les fumeurs ou les anciens fumeurs (Brustugun et al., 2014). Les protéines Ras sont également capables d'activer PI3K/AKT/mTOR et Raf/MEK/ERK. Des mutations de NRas sont observées dans 1% des CPNPC (Ohashi et al., 2013). La protéine c-MET (Cellular-mesenchymal-epithelial transition) est considérée comme un proto-oncogène, activant de nombreuses voies d'aval dont PI3K/AKT/mTOR et contribuant notamment à l'angiogenèse, la croissance et l'invasion cellulaire (Cooper et al., 2013). Une surexpression de c-MET est fréquemment observée chez les patients atteints d'un CPNPC.

Dans environ 80% des cas de cancer du poumon, des mutations du gène suppresseur de tumeur p53 ont été observées. Ces mutations de p53 ont été positivement associées à la consommation de la cigarette ou à son exposition (Cooper et al., 2013) et sont également associées à une résistance au traitement. Des mutations de p53 induisent la progression et la migration cellulaires (Mogi & Kuwano, 2011).

La découverte de molécules capables d'inhiber certaines voies de signalisation a permis des progrès importants dans le traitement du cancer du poumon dans les années 2000.

1.3.2. □ Facteurs de risque comportementaux et environnementaux

A divers degrés, les facteurs environnementaux et comportementaux sont impliqués dans deux mécanismes liés au cancer du poumon : l'inflammation et le stress oxydatif.

□□□□□□□□ □□

Le tabagisme est le facteur de risque principal du cancer du poumon, qui est associé au tabagisme dans 85% des cas (Warren & Cummings, 2013). Le risque de développer un cancer du poumon est 20 fois plus élevé chez un fumeur que chez un non-fumeur (Tyczynski et al., 2003).

La fumée de tabac apporte directement de radicaux oxygénés au niveau des poumons (Pryor et al., 1983) et en libère également par des mécanismes indirects (inflammation, auto-oxydation des composés). Le stress oxydatif induit l'activation de nombreuses voies intracellulaires incluant des kinases, des facteurs de transcription et des événements épigénétiques qui modulent la réponse inflammatoire, le cycle cellulaire et la prolifération cellulaire (Chung & Adcock, 2008) (Figure 4).

La fumée de cigarettes comporte des radicaux libres et plus de 5000 composants dont plus de 90 sont considérés comme carcinogéniques par l'agence internationale pour la recherche contre le cancer (Hecht, 2012) (Figure 5).

Certains composants de la cigarette sont des carcinogènes réactifs mais la plupart sont pro-carcinogènes et ont besoin d'être activés par des enzymes de phase I comme celles encodées par la famille du cytochrome P450 (CYP) et d'être convertis en carcinogènes actifs. La plupart des carcinogènes actifs peuvent se lier à l'ADN et former des adduits à l'ADN capables d'induire des mutations et d'initier le cancer. A la suite des réactions de phase I, les enzymes de phase II comme les GST (glutathion S transférase) sont responsables de la détoxification des formes actives de PAH (polycyclic aromatic hydrocarbons) époxydes (Shimada et al., 2004). Le métabolisme des substances nocives présentes dans la fumée de tabac par des enzymes métabolisant les xénobiotiques est habituellement bénin mais dans certains cas, le processus métabolique peut transformer des substances inoffensives en substances chimiques toxiques (Ben-Zaken et al., 2007), ce qui suggère que les différences dans le métabolisme des xénobiotiques peuvent contribuer à la fois au développement d'une broncho-pneumopathie

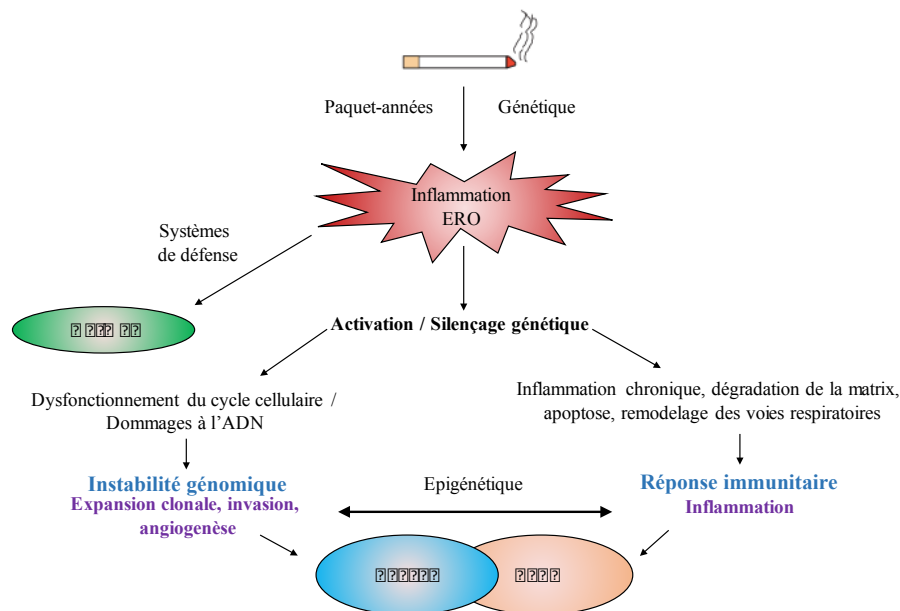


Figure 4. Implication des espèces réactives d'oxygène (ERO) et de l'inflammation, induites ou non par la consommation de tabac, dans le développement d'une broncho-pneumopathie obstructive chronique (BPCO) et du cancer du poumon (Adcock, Caramori, and Barnes 2011)

Liste des 93 constituants de la fumée du tabac dangereux ou potentiellement dangereux pour la santé humaine					
	Cancérogène	Toxique respiratoire	Toxique cardio-vasculaire	Toxique pour la reproduction et le développement	Addictif
Acétaldéhyde (éthanal)	☠	☠			☠
Acétamide	☠				
Acétone		☠			
Acroléine		☠	☠		
Acrylamide	☠				
Acrylonitrile	☠	☠			
Aflatoxine B1	☠				
4-aminobiphényle	☠				
1-aminonaphthalène	☠				
2-aminonaphthalène	☠				
Ammoniac		☠			
Anabasine					☠
O-anisidine	☠				
Arsenic	☠		☠	☠	
A-α-C (2-amino-9H-pyrido[2,3-b]indole)	☠	☠			
Benz[a]anthracène	☠	☠			
Benz[j]acéanthrylène	☠				
Benzène	☠		☠	☠	
Benzo[b]fluoranthène	☠				
Benzo[k]fluoranthène	☠		☠		
Benzo[b]furane	☠				
Benzo[a]pyrène	☠				
Benzo[c]phénanthrène	☠				
Béryllium	☠				
1,3-butadiène	☠	☠		☠	
Cadmium	☠	☠		☠	
Acide caféique	☠				
Monoxyde de carbone				☠	
Catéchol	☠				
Dioxines et furanes chlorés	☠			☠	
Chromium	☠	☠		☠	
Chrysène	☠		☠		
Cobalt	☠		☠		
Coumarine Hépatotoxique					
Crésols (o-, m-, et p- crésol)	☠	☠			
Crotonaldéhyde	☠				
Cyclopenta[c,d]pyrène	☠				
Dibenz[a,h]anthracène	☠				
Dibenzo[a,e]pyrène	☠				
Dibenzo[a,h]pyrène	☠				
Dibenzo[a,i]pyrène	☠				
Dibenzo[a,l]pyrène	☠				
2,6-diméthylaniline	☠				
Carbamate d'éthyle (uréthane)	☠			☠	
Éthylbenzène	☠				
Oxyde d'éthylène	☠	☠		☠	
Formaldéhyde	☠	☠			
Furanes	☠				
Glu-P-1 (2-amino-6-méthylpyrido[1,2-a:3',2'-d]imidazole)	☠				
Glu-P-2 (2-aminopyrido[1,2-a:3',2'-d]imidazole)	☠				
Hydrazine	☠	☠	☠		
Cyanure d'hydrogène	☠	☠	☠		
Indéno[1,2,3-cd]pyrène	☠				
IQ (2-amino-3-méthylimidazo[4,5-f]quinoline)	☠				
Isoprène	☠				
Plomb	☠		☠	☠	
MeA-α-C (2-amino-3-méthyl-9H-pyrido[2,3-b]indole)	☠				
Mercure	☠			☠	
Méthyléthylcétone		☠			
5-méthylchrysène	☠				
4-(méthylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK)	☠				
Naphthalène	☠	☠			
Nickel	☠	☠			
Nicotine				☠	☠
Nitrobenzène	☠	☠		☠	
Nitrométhane	☠				
2-nitropropane	☠				
N-nitrosodiméthylamine (NDELA)	☠				
N-nitrosodiméthylamine (NDMA)	☠				
N-nitrosométhyléthylamine	☠				
N-nitrosomorpholine (NMOR)	☠				
N-nitrososarcosine (NSAR)	☠				
N-nitrosopipéridine (NPIP)	☠				
N-nitrosopyrrolidine (NPYR)	☠				
N-nitrososarcosine (NSAR)	☠				
Nornicotine					☠
Phénol		☠	☠		
PhIP (2-amino-1-méthyl-6-phénylimidazo[4,5-b]pyridine)	☠				
Polonium-210	☠				
Propionaldéhyde		☠	☠		
Oxyde de propylène	☠	☠			
Quinoline	☠				
Sélénium		☠			
Styrène	☠				
O-toluidine	☠				
Toluène		☠		☠	
Trp-P-1 (3-amino-1,4-diméthyl-5H-pyrido[4,3-b]indole)	☠				
Trp-P-2 (1-méthyl-3-amino-5H-pyrido[4,3-b]indole)	☠				
Uranium-235	☠	☠			
Uranium-238	☠	☠			
Acétate de vinyle	☠				
Chlorure de vinyle	☠				

Figure 5. Liste des constituants de la fumée de cigarette considérés comme cancérogènes (Sciences et avenir, 2013)

obstructive chronique (BPCO) et d'un cancer du poumon (Gresner et al., 2007; Rotunno et al., 2009) (Figure 6).

Le Benzo[a]pyrène est l'un des principaux carcinogènes de la fumée de cigarette. Il induit la production de OH•, qui est favorisée par la prostaglandine E2 et a tendance à augmenter le malondialdéhyde (MDA) et la production de 8-oxo-2'-désoxyguanosine (8-oxo-dG), pouvant ainsi induire des dommages oxydatifs au niveau de l'ADN (Chen et al., 2011). Il a également tendance à diminuer la production de superoxyde dismutase (SOD) et glutathion peroxydase (GPx) (Chen et al., 2011). Les dommages produits sur l'ADN par le B[a]p induisent une cascade de réponses cellulaires, impliquant le cytochrome-c médiant lui-même l'activation de la caspase-3.

D'autres substances peuvent engendrer des modifications favorisant la progression du cancer du poumon. NNK (nicotine-derived nitrosaminoketone) induit à lui seul une prolifération AKT dépendante et la survie des cellules cancéreuses pulmonaires NF-κB dépendante.

Outre les substances cancérigènes, la fumée de cigarettes engendre également des changements dans la réponse inflammatoire. En effet, elle active les cellules épithéliales et les macrophages, induit une inflammation pulmonaire et la sécrétion de cytokines et chimiokines inflammatoires comme TNF-α (Tumor Necrosis Factor-Alpha), TGF-β (Transforming Growth Factor-Beta), IL(Interleukine)-1, IL-6, IL-8, CXCL (Chemokine CXC) 9 et CXCL10 (Adcock et al., 2011; Takahashi et al., 2010) à travers les voies du stress oxydatif et promeut la tumorigénèse du cancer du poumon par déclenchement de l'inflammation dépendante de IKκ-β et JNK1 (Takahashi et al., 2010). Des changements pro-inflammatoires ont été observés dans les poumons des fumeurs et l'inflammation est fermement associée à la promotion de la tumeur et l'activation de NF-κB (Malkinson, 2005). Cette inflammation peut persister des années après l'arrêt du tabac (Adcock et al., 2011).

Concernant la e-cigarette, les avis sont controversés et aujourd'hui, il n'y a pas assez de preuves scientifiques permettant de dire que la consommation n'est pas nocive pour l'organisme même si, à priori, elle serait au moins 20 fois moins dangereuse que la cigarette (Dautzenberg & Garelik, 2016). La e-cigarette induit également la production d'espèces pro-oxydantes dont le peroxyde d'hydrogène et induit la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, comme l'IL(interleukine)-6 et IL-8 (Lerner et al., 2015a; Lerner et al., 2015b). L'incandescence du

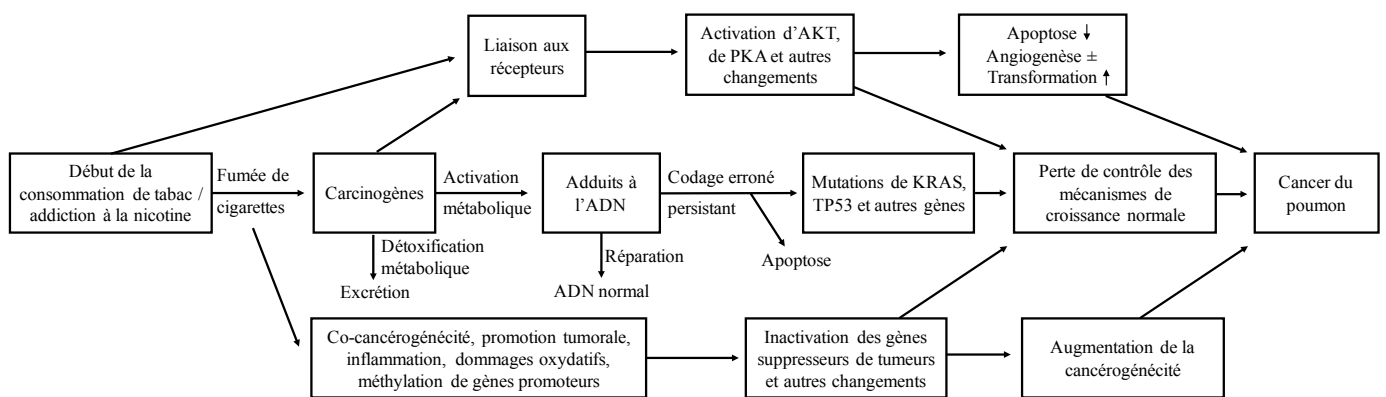


Figure 6. Mécanismes induits par la consommation de tabac, provoquant la survenue d'un cancer du poumon (Hecht, 2012)

tabac est de 800°C environ, tandis que celle de la cigarette électronique est de 60°C seulement, ce qui n'a pas la même conséquence sur le plan de l'inflammation.

2.2.2 Les agents physiques et chimiques

La seconde cause du cancer du poumon serait l'exposition professionnelle. Les agents cancérogènes sont de trois natures différentes : physiques (radiations ionisantes, radiations ultra-violettes), chimiques (amiante, benzène, béryllium et ses composés, cadmium et ses composés, chlorométhyl méthyl éther ...) et biologiques (virus, parasites ...) (Stewart & Kleihues, 2005). Les expositions à l'amiante, au benzène, aux poussières de bois et aux radiations ionisantes constitueraient la grande majorité des cancers liés à une exposition professionnelle (centreonberard.fr, 2017). La proportion des cancers du poumon liés à une exposition professionnelle est estimée à 15% chez les hommes (INCa, 2017). La pollution environnementale (particules fines de diesel, insecticides, fongicides et herbicides) serait la troisième cause de cancer du poumon (moins de 5% des cancers) (Baldi & Lebailly, 2007; Stewart & Kleihues, 2005).

L'exposition à des carcinogènes va engendrer des ERO et des lésions génétiques (Delattre et al., 2005). L'amiante, par exemple, génère des radicaux hydroxyles *via* la stimulation des macrophages alvéolaires. Le MDA produit suite à une exposition à l'amiante, conduit à la formation d'adduits 3-(2-deoxy-β-d-erythro-pentafuranosyl)pyrimido[1,2-α]purin-10(3H)-one deoxyguanosine (M₁dG). S'ils ne sont pas réparés, ces adduits peuvent bloquer la réplication cellulaire et engendrer des mutations impliquées dans la carcinogenèse (Bonassi et al., 2017). L'exposition à l'amiante augmente par 5 le risque d'avoir un cancer du poumon.

2.2.3 Les agents biologiques

On estime qu'un tiers des morts par cancer est lié au surpoids/obésité, à la sédentarité et une alimentation pauvre en micronutriments (Zoeller, 2009). Des études ont notamment établi que la sédentarité et l'obésité augmentaient le risque d'avoir un cancer du poumon (Cao et al., 2012; Schmid & Leitzmann, 2014).

➤ □ Sédentarité

La sédentarité est caractérisée par la répétition de comportements n'induisant pas de dépenses énergétiques supérieures à 1.5 MET (metabolic equivalent task), en position assise et allongée, telles que regarder la télévision, lire ou conduire. Les comportements sédentaires diffèrent de l'inactivité qui est considérée comme l'absence d'activité physique à intensité modérée et vigoureuse (Shen et al., 2014). La pratique d'une activité physique peut protéger contre la survenue de maladies pulmonaires et du cancer du poumon (Wang et al., 2016) (voir partie 3.1.1). A contrario, la sédentarité va engendrer des effets délétères et un risque important d'obésité, pouvant également être associé à un risque plus élevé de cancer du poumon. L'inactivité physique sans prise de poids pendant deux semaines induit un ensemble de changements métaboliques et physiologiques (Olsen et al., 2008) incluant une diminution de la masse musculaire et de la sensibilité à l'insuline et une augmentation des triglycérides plasmatiques, indiquant une rapide adaptation à une diminution du niveau énergétique (Scheele et al., 2009). En effet, l'absence d'exercice réduit la sensibilité à l'insuline et à terme, peut engendrer une insulino-résistance (pouvant être impliquée dans le cancer du poumon) (Booth et al., 2008).

➤ □ Obésité

Les liens entre cancer et obésité sont nombreux. L'obésité provoque, entre autres, des résistances à l'insuline et à la leptine et de nombreux dysfonctionnements au niveau du tissu adipeux, pouvant engendrer l'expression de cytokines pro-inflammatoires et une augmentation de VEGF (Prieto-Hontoria et al., 2011). La relation inverse entre obésité et cancer du poumon est confirmée par la leptine (Yang et al., 2013). La leptine a des activités mitogéniques, pro-inflammatoires et pro-angiogéniques. Les tissus pulmonaires expriment la leptine et ses récepteurs (Malli et al., 2010).

L'implication de l'axe insuline-IGF dans le cancer du poumon chez les fumeurs est indépendant de la voie de l'obésité mais pourrait être induit par l'inflammation chronique créée par l'obésité associée au fait de fumer, l'inflammation réduisant la sensibilité à l'insuline (Ho et al., 2016).

➤ □ Nutrition déséquilibrée

Des apports insuffisants ou *a contrario* des apports trop importants en certains nutriments constituent également un facteur de risque important. Une consommation insuffisante de fruits

et légumes (moins de 400 g par jour) comportant de nombreux composés protecteurs (vitamines, antioxydants, fibres ...) augmente le risque d'avoir un cancer. Une alimentation comportant trop de viandes rouges et de charcuteries (plus de 500 g par semaine), d'alcool, de sel, de produits fumés, séchés ou salés et de produits riches en acides gras saturés et en sucres raffinés augmente également le risque d'avoir un cancer (Donaldson, 2004).

1.3.3. □ Facteurs de risque endogènes

□ *nm* □ *ms* □ *cd* □

Bien que le cancer du poumon ne soit pas un cancer hormono-dépendant et que les stratégies thérapeutiques ne reposent pas sur l'hormonothérapie, certaines équipes ont travaillé sur les liens entre hormones et cancer du poumon. Des auteurs ont mis en évidence que les hormones pouvaient être impliquées aussi bien dans l'initiation que dans la progression du cancer du poumon. Les hormones n'étant pas l'objet de cette thèse, ce sujet n'est que succinctement abordé.

Certaines hormones telles que 17- β -œstradiol(E2) agissent comme un mitogène pour les cellules CPNPC *in vitro* et *in vivo* (Siegfried et al., 2012) et peuvent moduler l'expression des gènes importants pour le contrôle de la prolifération cellulaire dans les lignées cellulaires CPNPC (Siegfried, 2014). Par ailleurs, les rythmes circadiens contrôlent une variété de processus biologiques dont la division cellulaire et le métabolisme, deux mécanismes impliqués dans la carcinogénèse pulmonaire (Papagiannakopoulos et al., 2016). Les hormones ayant un rythme circadien (e.g. mélatonine, hormone de croissance, cortisol) peuvent altérer la croissance tumorale, *via* la suppression de l'angiogenèse, la stimulation de l'immunité anti-tumorale et le contrôle de certains oncogènes (Eismann et al., 2010) (Figure 7). Il a été montré que les patients atteints d'un cancer du poumon subissaient une dérégulation des rythmes circadiens, et plus particulièrement une dérégulation de l'axe hypothalamo-hypophysaire surrénalien (Mazzocchi et al., 2010). Une insuffisance surrénale (diminution du niveau de cortisol, d'aldostérone et d'androgènes (DHEA, DHEA-S et androsténone)) est associée au CPPC (Noguchi et al., 2016). La manipulation de la voie androgénique permet une meilleure survie chez les patients exposés avant et après le diagnostic (Harlos et al., 2015).

Enfin, l'insuline et IGF-1 augmentent la susceptibilité d'avoir un cancer du poumon car ils peuvent être un mitogène puissant en signalant les voies Ras/MAPK et PI3K alors que IGFBP-

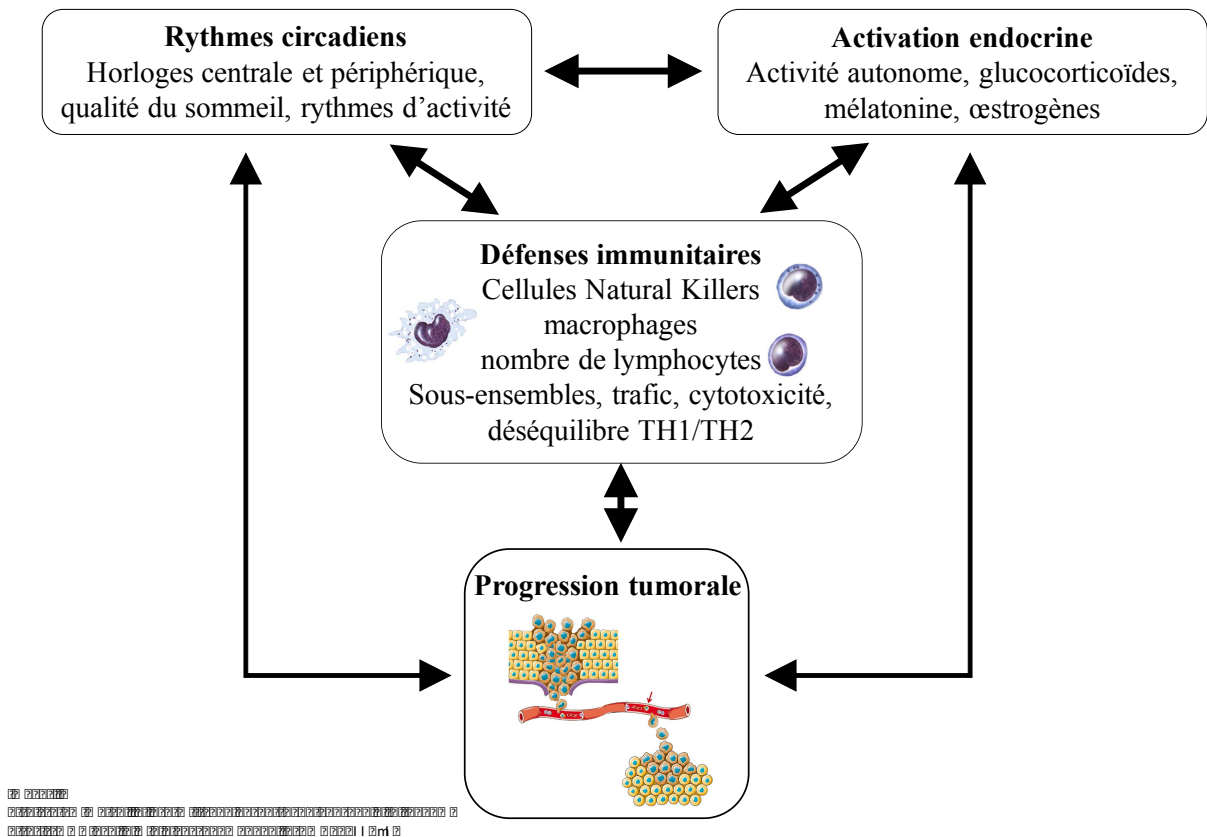


Figure 7. Lien entre rythme circadien, activité endocrine, défenses immunitaires et progression tumorale. Figure adaptée de (Eismann, Lush, and Sephton 2010)

3 (qui supprime ces deux voies) réduit leur risque (Ho et al., 2016). Lors de la tumorigénèse et le développement du cancer du poumon, on a observé une diminution de IGFBP-3 (Insulin-like growth factor-binding protein), ce qui ferait de lui un biomarqueur possible du cancer du poumon (Cao et al., 2012). Chen et al. (2009) a démontré que IGFBP-3 était inversement corrélé avec le risque de cancer du poumon et qu'il pouvait agir comme suppresseur de tumeur.

2.2.2.2. L'inflammation des voies aériennes inférieures

L'inflammation des voies aériennes inférieures peut jouer un rôle important dans le développement du cancer du poumon (Wistuba, 2007). Cette progression pas à pas peut être facilitée chez les fumeurs qui développent une BPCO en raison de troubles de la clairance de substances cancérigènes renforcés par le dépôt de particules dans les grandes bronches (Segal et al., 2002). L'inflammation chronique causée par des infections persistantes est largement impliquée dans le développement tumoral (Coussens & Werb, 2002). L'initiation, la promotion et la progression des tumeurs sont stimulées par l'augmentation systémique des cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-17, IL-1 β , IFN- γ) (Handschin & Spiegelman, 2008; Kawata et al., 2012; Mei & Liu, 2016; Nadda et al., 2013). Par ailleurs, le développement tumoral peut être causé par une dérégulation immunitaire et une auto-immunité (Grivennikov et al., 2010). En fait, le microenvironnement tumoral est composé de cellules tumorales et de son stroma environnant mais également de cellules immunitaires innées (dont les macrophages, les neutrophiles, les cellules NK (natural killers), les cellules dendritiques ...) et adaptatives (lymphocytes B et T) (de Visser & Coussens, 2006). La communication entre ces différentes cellules est soit directe, soit par l'intermédiaire de la production de cytokines et de chimiokines. En fonction de leur origine, les différentes cytokines peuvent à la fois induire ou inhiber la croissance tumorale (Lin & Karin, 2007). A travers l'activation de certains effecteurs tels que des facteurs de transcription (NF- κ B (nuclear factor – kappa B) et AP-1 (activator protein) qui sont des régulateurs du cycle cellulaire) et des caspases (Figure 8), les cytokines peuvent contrôler l'environnement immunitaire et inflammatoire, soit en faveur de la progression tumorale (avec IL-6, IL-17, IL-23), soit en faveur d'une immunité anti-tumorale (IL-24) (Grivennikov et al., 2010) (Figure 9).

Dans le microenvironnement tumoral, l'immunité anti-tumorale est souvent supprimée par plusieurs lignées de leucocytes, induisant une diminution de l'efficacité des thérapies combinées du cancer du poumon (Dogan et al., 2011). Plus précisément, les cellules

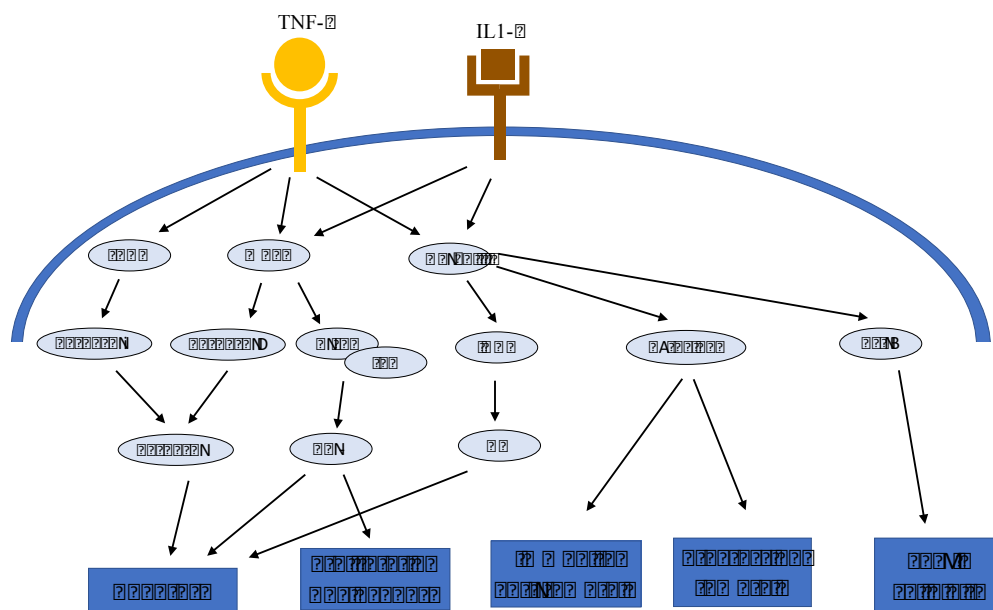


Figure 8. Activation des voies anti-tumorales et pro-tumorales par des cytokines.

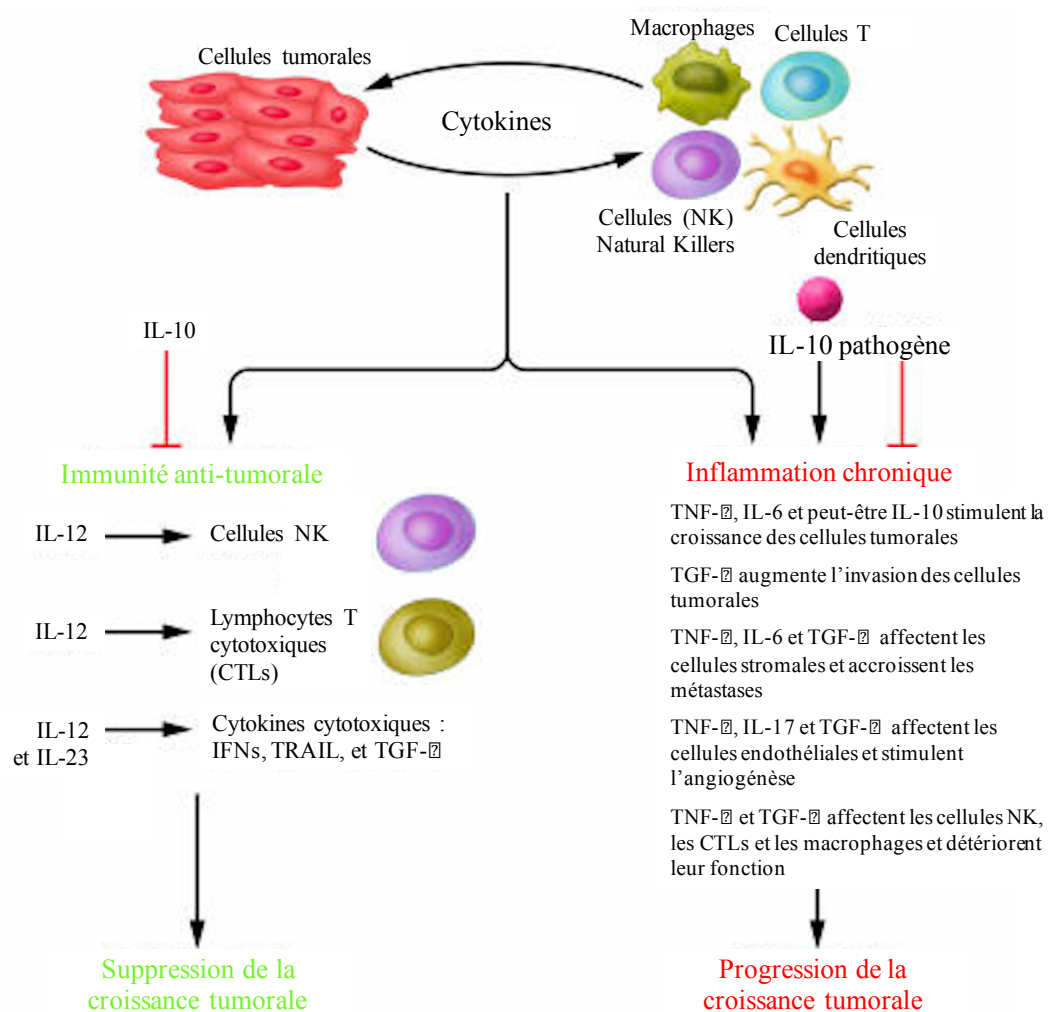


Figure 9. Interactions entre les cellules tumorales et les cellules immunitaires et inflammatoires dans le microenvironnement tumoral. (Lin and Karin 2007)

suppresseurs dérivées de myéloïde (MDSC) génèrent des ERO et des cytokines immuno-régulatrices supprimant les réponses des cellules T CD4 + et CD8 + favorisant la progression tumorale et les métastases (Sawant et al., 2013). La reconnaissance de cette étape clé de la carcinogenèse et la découverte de médicament capable de restaurer l'immunité anti-tumorale (l'immunothérapie) représentent après les thérapies ciblées, la 2^{ème} « révolution » dans le traitement du cancer du poumon.

Les macrophages sont des cellules immunitaires innées jouant des rôles centraux dans de nombreuses réponses immunitaires. Ce sont des facteurs clés reliant l'inflammation et le cancer. Ils constituent la majorité de l'infiltration immunitaire au sein des tumeurs et dans la majorité des cancers, la présence de macrophages associés aux tumeurs (TAMs) est de mauvais pronostic (Conway et al., 2016). Par ailleurs, les macrophages M2 favorisent l'angiogenèse et sont considérés comme promoteurs de tumeurs (Mantovani et al., 2002).

Le rôle des cellules immunitaires et de l'inflammation dans la carcinogenèse pulmonaire n'est pas encore totalement établi (Conway et al., 2016). Dans la partie 2.2.3, nous abordons plus précisément les liens entre inflammation et cancer du poumon.

□□□□ □□□□□□□□ □□□ □□□□□□ □□1□□□□□□ □□□□□ □□ □□□□, □□□□□ □□□□
□□□□ □□□□□□□□

□□□□ □□Ab □AA□nao□□be□□

Les radicaux libres sont des espèces moléculaires ayant un ou plusieurs électrons appariés, leur nature chimique « instable » induit une réactivité très importante. Au cours du métabolisme, les cellules produisent de façon permanente des espèces réactives. Les espèces réactives sont de nature endogène et exogène. Les sources endogènes comprennent des peroxysomes et des enzymes, en particulier les enzymes détoxifiantes provenant du complexe P450 et des complexes des NADPH (nicotinamide adénine dinucléotide) oxydases (Nox). La plupart de ces enzymes agissent dans la mitochondrie, qui est le site principal du stress oxydatif. Les sources exogènes rassemblent quant à elles les radiations, les ultra-violets, les composés chimiques (polluants environnementaux, fumée de cigarette, alcool), les champs électriques et l'exercice.

A l'état physiologique, il existe un équilibre redox entre la production des espèces réactives et les systèmes de défense antioxydants. Sous certaines conditions et notamment sous l'effet de certains stimuli endogènes (hypertension, diabète ...) ou exogènes (polluants environnementaux, tabagisme ...), il apparaît un déséquilibre provoqué soit par une production exagérée de radicaux libres soit par une diminution des défenses antioxydantes. On parle alors de stress oxydatif. Ce mécanisme conduit à des altérations moléculaires, elles-mêmes impliquées dans de nombreux processus pathologiques comme le cancer, l'athérosclérose, l'inflammation, la dégénérescence neuronale ...

Les espèces réactives peuvent être dérivées de l'oxygène (ERO ou ROS), de l'azote (ERN ou RNS), du soufre (ERS ou RSS) ou du chlorure (ERC ou RSC). Les ERO sont les plus abondantes dans l'organisme et seront l'objet de la prochaine partie.

2.1.1. □ La production des espèces réactives dérivées de l'oxygène (ERO)

Au cours de phénomènes de stress oxydatif ou lors du métabolisme normal du dioxygène (O₂), certaines cellules vont produire des espèces réactives dérivées de l'oxygène (ERO) et donner naissance à des produits intermédiaires, pouvant être induits suite à des réactions de Haber-Weiss ou de Fenton. Les ERO forment une famille d'entités chimiques composée de :

- □ radicaux libres oxygénés (espèces chimiques possédant un électron célibataire – non apparié) qui sont le radical superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), le radical perohydroxyle ($HO_2^{\cdot}$), le radical hydroxyle ($OH^{\bullet}$), le radical peroxyde ($RO_2^{\cdot}$) et le radical alkoxyde ($RO^{\cdot}$)
- □ dérivés non radicalaires (ne possédant pas d'électron célibataire) dont la toxicité est importante, tels que l'oxygène singulet, l'anion peroxyde (O_2^-), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), et le peroxynitrite ($ONOO^-$).

On peut distinguer les radicaux primaires ayant un rôle physiologique particulier et les radicaux secondaires, issus de la réaction des radicaux primaires avec des entités biochimiques cellulaires (lipides, protéines, glucides...). La production d'énergie suite à la consommation d' O_2 n'est pas la seule source d'ERO. Les sources de ERO peuvent être endogènes ou exogènes (substances toxiques de l'environnement dont la fumée de cigarettes comme vu précédemment, radiations ionisantes ou Ultra-Violet, champs électriques, xénobiotiques pro-oxydants et cytokines pro-inflammatoires) (Ayala et al., 2014).

Les sources primaires d'espèces réactives dérivées de l'oxygène endogènes sont le réticulum endoplasmique, les peroxysomes (importante source de H_2O_2) et la mitochondrie (Moldovan & Moldovan, 2004) mais également une variété de mécanismes dont des réactions enzymatiques et l'auto-oxydation de certains composés. En effet, de nombreux systèmes enzymatiques identifiés dans les cellules sont capables de générer des espèces oxydantes (Birben et al., 2012) :

- □ les NAD(P)H oxydases sont des enzymes catalysant la formation d' $O_2^{\cdot-}$ en utilisant NADH ou NADPH comme substrat. Outre leur rôle important dans la réponse immunitaire, les NAD(P)H oxydases auraient également un rôle dans la croissance cellulaire (Krause, 2004)
- □ la xanthine-oxydase joue un rôle important dans la production des ROS (particulièrement $O_2^{\cdot-}$ et H_2O_2). Elle catalyse la dégradation de l'hypoxanthine en acide urique (sous condition de forte en ATP et de déficit en O_2), mais également l'oxydation de la xanthine en acide urique (lors de l'ischémie/reperfusion ou en condition hypoxique)
- □ le réticulum endoplasmique est doté d'enzymes catalysant de nombreuses réactions détoxifiant les molécules liposolubles et certains produits métaboliques toxiques. Le cytochrome P450, l'enzyme la plus connue de ce complexe, oxyde les xénobiotiques et les AGI (acides gras insaturés), ce qui induit la production de ERO (McLean et al., 2015). La production d'ERO est également liée à la présence de cyclo-oxygénase (Cox).

La mitochondrie reste la principale source d'ERO dans l'organisme, *via* la chaîne respiratoire mitochondriale. L'oxygène est réduit à 95 % dans les mitochondries par voie enzymatique en molécule non toxique comme H_2O . Ainsi, au sein de la respiration mitochondriale, la réduction de l'oxygène par 4 électrons conduit à la formation d' H_2O . Cette réduction totale passe par différentes étapes et environ 2 à 4% de l'oxygène consommé au niveau mitochondrial induit la formation d'espèces radicalaires, qui sont les intermédiaires de cette réduction et qui agissent en cascade. Les trois principaux ERO sont l'anion superoxyde, le radical hydroxyle et le peroxyde d'hydrogène.

Les radicaux superoxydes sont potentiellement toxiques mais ne sont pas les plus délétères et vont être catalysés par les superoxydes dismutases, ce qui va engendrer la production de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) *via* les NADP[H] oxydases (NOX), la xanthine oxydase et les acides aminés oxydases, dans les peroxysomes grâce à la consommation d'une molécule d'oxygène (Dupuy et al., 1991). Cette molécule peut devenir toxique *via* des réactions Haber-Weiss et de Fenton qui, en présence de métaux de transition vont donner naissance au radical hydroxyle ($\cdot OH$). $\cdot OH$ est le ERO le plus réactif et est régulé grâce à la catalase (qui accélère sa dismutation) et à la glutathion peroxydase qui catalyse sa réduction par le glutathion. L'attachement de l'oxygène sur des radicaux centrés sur le carbone engendre également la formation de radicaux peroxydes ($RO_2\cdot$). L'oxydation d'un substrat RH donne naissance à des hydroperoxydes (RO_2H). La décomposition des RO_2H par des cations métalliques engendre quant à elle des radicaux alkoxydes ($RO\cdot$). La production d'autres radicaux est également possible en présence de certaines substances ; par exemple, en présence de chlorure, H_2O_2 va être converti en acide hypochloreux ($HOCl$) (Figure 10).

2.1.2. □ Les effets bénéfiques des ERO

Les espèces réactives jouent un rôle important dans la régulation de la transcription des gènes et de la synthèse protéique (Jackson, 2005; Steensberg et al., 2007), et dans le contrôle physiologique de la fonction cellulaire : amplification des voies de signalisation, modification du calcium intra-cytosolique (qui est un régulateur essentiel dans certaines voies de signalisation cellulaires) et activation de récepteurs des voies de signalisation intracellulaires, de protéines kinases, des cascades des MAPK (mitogen-activated protein kinase), et des facteurs de transcription tels que AP-1 and NF- κ B (Delattre et al., 2005). Les MAPK et notamment p38 et

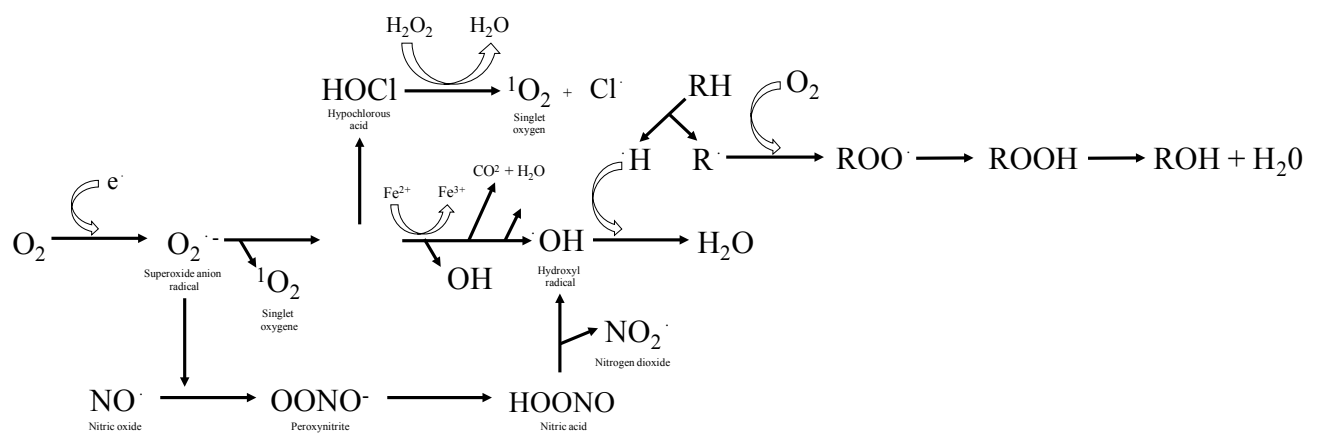


Figure 10. Les radicaux libres et leurs métabolites actifs (Duracková 2010)

JNK, peuvent être les médiateurs de signaux pro-apoptotiques et affecter certaines protéines impliquées dans l'apoptose, telles que NF- κ B ou caspase-3.

Une élévation de la concentration en ERO est essentielle pour induire l'expression de gènes ayant une activité antioxydante. L'homéostasie redox repose sur l'induction de cascades médiées par les ERO, conduisant à une augmentation de l'expression des enzymes antioxydantes et/ou à une augmentation du système de transport de la cystéine qui lui-même facilite l'augmentation du glutathion intracellulaire (qui est un puissant antioxydant) (Dröge, 2002). A long terme, la stimulation du système pro-oxydant, peut induire des adaptations du système antioxydant (dans la partie 3.1.1., le cas de l'activité physique sera abordé).

Les ERO jouent également un rôle dans la réponse immunitaire. Dans un environnement pathogène et inflammatoire, une importante production d'ERO induite par les macrophages constituerait la première ligne de défense (Dröge, 2002). Elles permettent l'adhérence des leucocytes aux cellules endothéliales (Roy et al., 1999) et améliorent l'activation fonctionnelle des lymphocytes T (Hehner et al., 2000).

La production de radicaux libres est essentielle pour le métabolisme cellulaire. Par exemple, les sirtuines sont des désacétylases d'histone NAD-dépendantes, impliquées dans le métabolisme cellulaire *via* la régulation de mécanismes épigénétiques. Elles jouent un rôle dans la réponse oxydative en désacétylant de nombreux facteurs de transcription régulant les gènes antioxydants. Elles peuvent également activer le coactivateur proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 α (PGC-1 α) et les facteurs de transcription de la famille FOXO qui stimulent l'expression de gènes antioxydants tels que SOD2. Les sirtuines vont également inactiver NF- κ B (Merksamer et al., 2013) (Figure 11).

2.1.3. □ Les dommages oxydatifs

Le schéma ci-contre reporte les produits de dégradation induit par l'oxydation des lipides, des protéines et des acides nucléiques (Figure 12).

Figure 12 : Les produits de dégradation induits par l'oxydation des lipides, des protéines et des acides nucléiques.

Les cellules sont en partie constituées de lipides, notamment au niveau des membranes. Dans les membranes, l'oxydation des acides gras poly-insaturés (AGPI) peut altérer leur fonction,

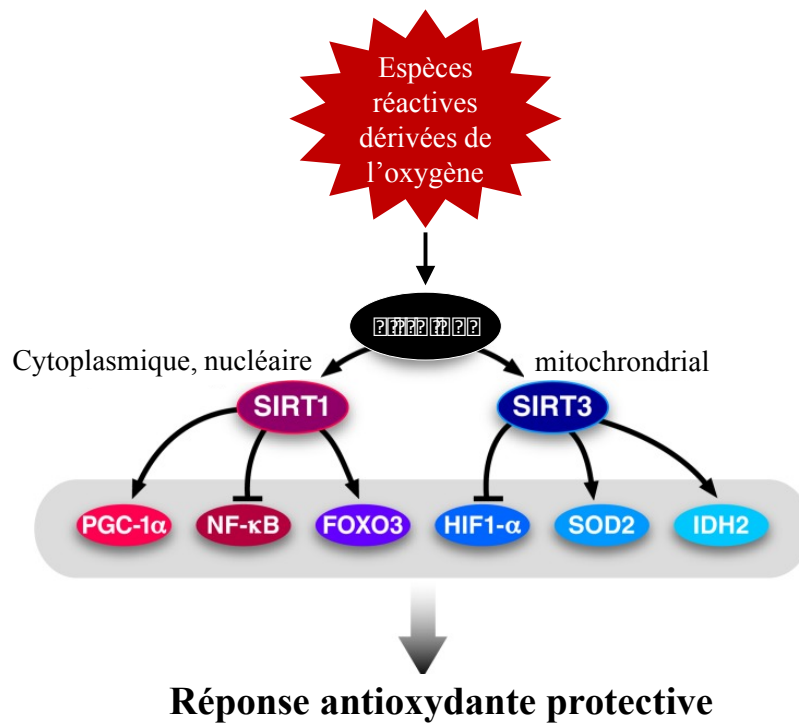


Figure 11. Régulation ERO-dépendante des sirtuines. Adaptée de (Merksamer et al., 2013).

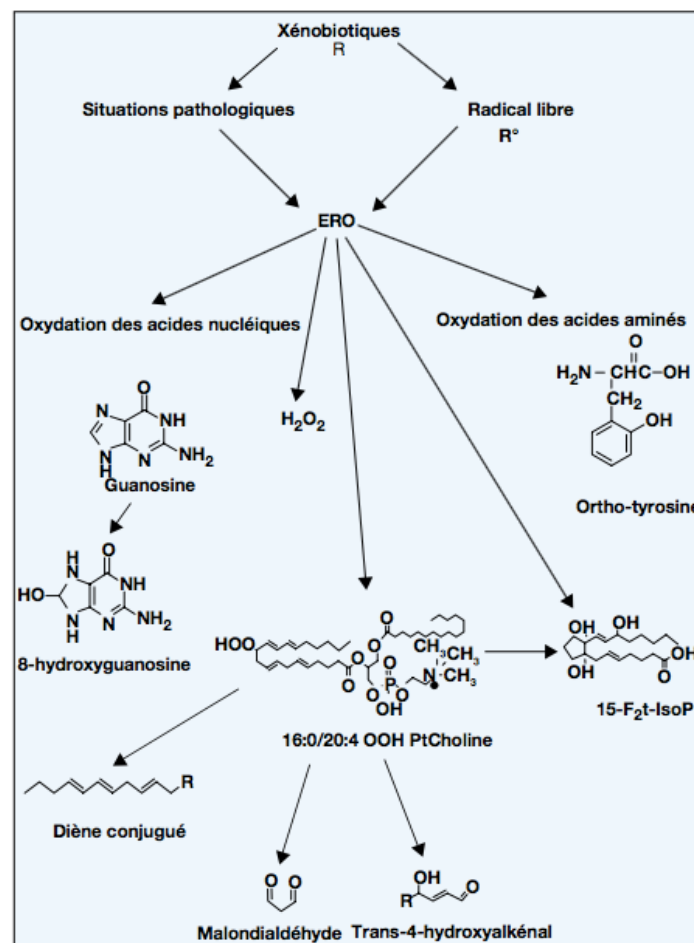


Figure 12. Schéma général des marqueurs de l'oxydation des lipides, des acides aminés et des acides nucléiques au cours du stress oxydant. (F. Michel, D. Bonnefont-Rousselot, E. Mas, J. Draï, P. Thérond, 2008)

diminuer leur fluidité, inactiver leurs récepteurs et les enzymes, augmenter la perméabilité non spécifique aux ions et perturber leur structure (Sathish et al., 2003). Les deux ERO pouvant profondément affecter les lipides sont le radical hydroxyle et l'hydroperoxyde (Ayala et al., 2014). Lors de la première phase de la peroxydation lipidique, les acides gras libres, les phospholipides, les triglycérides, les esters de cholestérol et le cholestérol peuvent conduire à la formation d'hydroperoxydes (ROOH), de radicaux et de diènes conjugués particulièrement instables. Ces produits primaires de l'oxydation lipidique vont par la suite se décomposer rapidement en produits secondaires : les endoperoxydes cycliques qui eux-même vont se décomposer en produits terminaux : en aldéhydes (RCOH, i.e. le malondialdéhyde), en 4-hydroxyl-alkénals (dont 4-hydroxynonénal) ou en isoprostanes. Ces produits de la peroxydation lipidique et notamment les produits terminaux stables vont permettre d'évaluer l'oxydation des lipides (Figure 13) (Guéritat, 2015). Il est également intéressant de mesurer les diènes conjugués car cela permet d'accéder aux produits d'oxydation lipidiques primaires (Catala, 2012).

Les ERO peuvent également interagir directement avec les acides gras poly-insaturés (tels que l'acide arachidique) pour former de la 8-epiprostaglandine (PGF 2 a) appartenant à la famille des isoprostanes.

➤ □ Les isoprostanes

Les isoprostanes sont des éicosanoïdes formés lors de la peroxydation lipidique des AGPI, pouvant avoir des effets pro-inflammatoires. Parmi eux, les F2-isoprostanes sont des molécules très stables et fréquemment utilisées comme marqueur de la peroxydation lipidique (Roberts & Milne, 2009) mais aussi comme marqueur de l'inflammation (Basu & Helmersson, 2009). La quantification des isoprostanes serait le dosage de référence pour l'évaluation du stress oxydant, grâce à leur stabilité et leur sensibilité (Morrow & Roberts, 1997). Par contre, des précautions doivent être prises concernant les échantillons (prélèvement et stockage) car des isoprostanes peuvent se former accidentellement, *via* un processus d'auto-oxydation.

➤ □ Le 4-hydroxynonénal

Le 4-hydroxynonénal (4-HNE) est considéré comme le principal produit toxique généré par les peroxydes lipidiques suite à des attaques sur les acides gras omega-3 et omega-6 (Esterbauer et al., 1991). 4-HNE, réagit avec les protéines, peut conduire à l'apparition de groupements

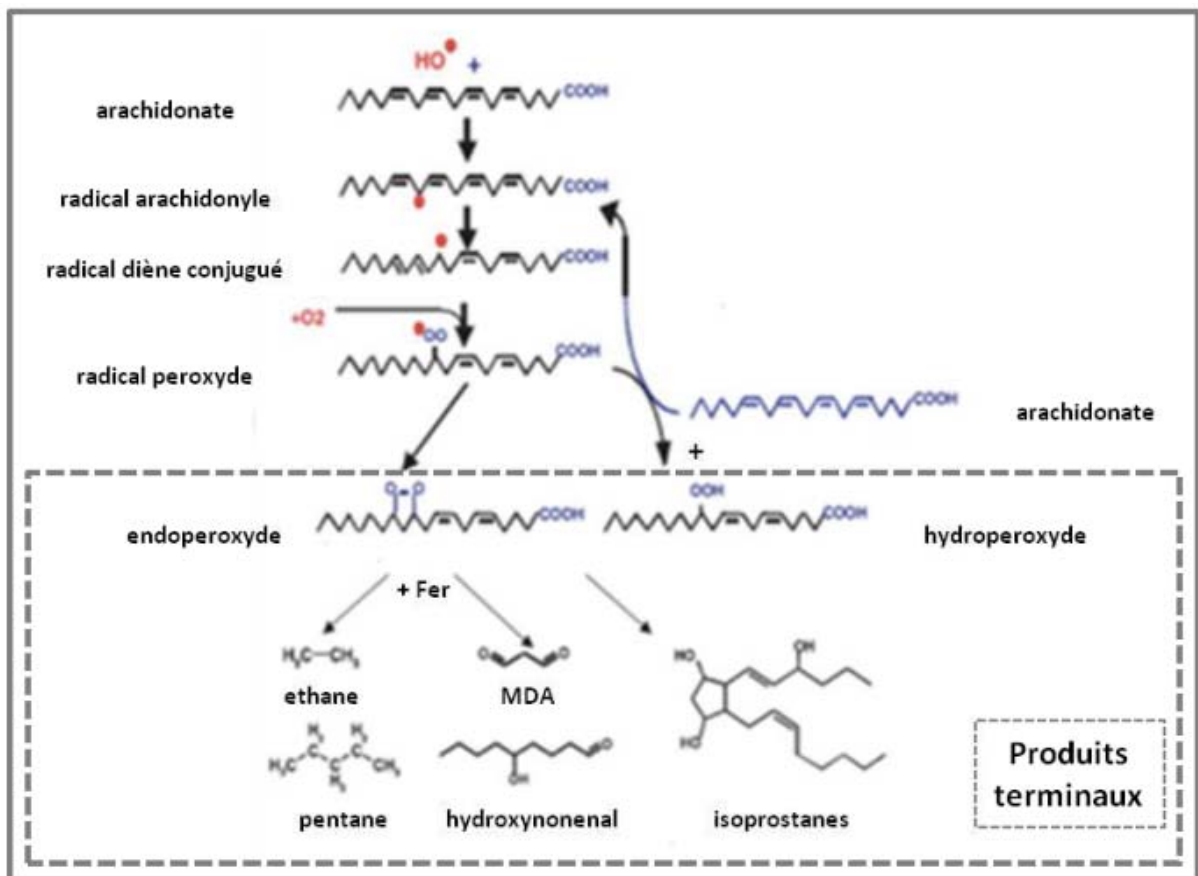


Figure 13. Mécanismes en chaîne de la peroxydation des acides gras. (Guéritat, 2015)

carbonyles dans les protéines (Michel et al., 2008). 4-HNE serait impliqué dans la régulation de nombreux facteurs redox-sensibles comme Nrf2 (Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2), AP-1 et NF- κ B et ainsi, impliqué, entre autres, dans la prolifération cellulaire, la survie cellulaire et l'apoptose (Ayala et al., 2014). Par ailleurs, 4-HNE est capable d'activer PI3K/AKT (voie anti-apoptotique) *via* une modification et une inhibition de PTEN (phosphate and tensin homolog deleted on chromosome 10), qui est considéré comme un gène suppresseur de tumeur et le régulateur primaire d'AKT (Chalhoub & Baker, 2009). Le dosage de 4-HNE est moins utilisé que celui du MDA, cependant, celui-ci est possible par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (Michel et al., 2008).

➤ □ Le malondialdéhyde

Le malondialdéhyde (MDA) est le produit final de décomposition oxydative de lipides insaturés, produit secondaire du métabolisme de l'acide arachidonique, relativement stable grâce à sa fonction aldéhyde (Steghens et al., 2001). Le MDA peut agir comme messenger dans la signalisation cellulaire et réguler l'expression des gènes. L'excès de MDA produit peut s'associer aux groupements aminés libres des protéines, conduisant à la formation de produits d'addition pouvant altérer les propriétés biologiques des protéines concernées (Michel et al., 2008). Le MDA est régulièrement utilisé comme marqueur de la peroxydation lipidique car il réagit facilement avec l'acide thiobarbiturique (TBA) (Ayala et al., 2014). Ainsi, les substances réactives de l'acide thiobarbiturique (TBARS) peuvent également être utilisées comme marqueur de la peroxydation lipidique. Cependant, leur concentration n'est pas spécifique à l'attaque des lipides ; notamment, l'auto-oxydation des échantillons augmente leur concentration. Le dosage des aldéhydes comme marqueur de la peroxydation lipidique n'est pertinent que dans le cadre d'un régime alimentaire contrôlé (Wilson et al., 2002).

■ □ Les dommages oxydatifs aux protéines

Les protéines et les acides aminés peuvent subir des attaques indirectes (par glyco-oxydation et lipo-oxydation) et des attaques directes conduisant à :

- □ l'apparition de groupements hydroperoxydes (-OOH) et de groupements carbonyles suite à la fragmentation des protéines et l'oxydation du squelette carboné de la chaîne polypeptidique

- L'oxydation des acides aminés va engendrer des modifications de structure des protéines et des acides aminés pouvant altérer leurs propriétés biologiques voire les fragmenter ou les dénaturer. En effet, les phénomènes d'oxydation peuvent conduire à l'inhibition de la phosphorylation de certaines protéines, à l'inactivation d'enzymes, ou encore à la formation de ponts disulfures (Delattre et al., 2005).

Les principales cibles de l'oxydation sont les acides aminés basiques (arginine, histidine, lysine), les acides aminés aromatiques (phénylalanine, tryptophane et tyrosine) et les acides aminés soufrés (cystéine et méthionine) (Delattre et al., 2005). Les acides aminés soufrés et aromatiques sont les plus redox-sensibles. Les dommages sur la cystéine et la méthionine sont réversibles ; pour toutes les autres protéines, selon la nature des dommages, leur oxydation engendre leur dégradation (Coux, 2011). Les groupements carbonyles des protéines et les nitrotyrosines sont des produits stables de l'oxydation des protéines et permettent ainsi de l'évaluer. Les protéines carbonylées sont utilisées afin d'évaluer l'oxydation des protéines.

Les produits de la peroxydation lipidique peuvent interagir avec l'ADN, conduire à la formation d'adduits et engendrer des modifications telles que des mutations génétiques impliquées dans la carcinogénèse (Valko et al., 2004). La génotoxicité des ERO dans les divers processus cellulaires est la principale cause de la cancérogenèse induite par le stress oxydatif (Lee & Lee, 2006). A trop fortes concentrations, les ERO ont des effets délétères en induisant l'apoptose des cellules saines, *via* l'activation de diverses protéines (NF- κ B, p38, JNK) et de caspases et le codage de l'expression de cytokines pro-inflammatoires (IL1- β , IL-6 IL-18, IFN- γ , TNF- α) (Naik & Dixit, 2011). Les ERO et notamment le radical hydroxyle, peuvent alors engendrer de nombreuses dégradations au niveau des acides nucléiques, en induisant des cassures simples ou double-brin, l'oxydation des bases puriques et pyrimidiques, des mutations au sein de l'ADN

et une inactivation des protéines et des enzymes impliquées dans les voies de signalisation. La formation de 8-hydroxy-2'-désoxyguanosine (8-OHdG) est communément utilisée pour évaluer les dommages à l'ADN. La formation de 8-oxo-7,8-dihydroguanine (8-oxoGua) permet également d'évaluer les dommages sur l'ADN. La présence de résidus 8-oxoGua dans l'ADN conduisent à des transversions GC→TA, et leur présence dans la cellule peuvent engendrer des mutations ponctuelles (Tudek et al., 2010).

La production accrue d'ERO peut également affecter des mécanismes épigénétiques tels que la méthylation de l'ADN (Hitchler & Domann, 2007). Plus précisément, les ERO (notamment l'anion superoxyde et peroxyde d'hydrogène) augmentent la méthylation de l'ADN, *via* une hyperméthylation de PKCε (protein kinase Cε), de RUNX3 (runt-related transcription factor 3) ou de DNMT1 (DNA (cytosine-5)-methyltransferase 1) (Wongpaiboonwattana et al. 2013; Xiong et al., 2012).

Enfin, les ERO peuvent jouer un rôle dans la réponse inflammatoire et activer certaines voies de signalisation redox-sensibles (abordés respectivement dans les parties 2.2.3 et 2.2.4 dans le cadre du cancer du poumon).

2.1.4. □ Les systèmes de défense antioxydants

Pour contrer les dommages oxydatifs, l'organisme est doté de plusieurs systèmes de défenses. Une grande variété de molécules, désignées sous le terme d'antioxydants, assurent une protection des sites biologiques, du fait d'une élimination directe ou indirecte des molécules pro-oxydantes. La régulation des ERO se fait soit par la stimulation des systèmes antioxydants constitutifs de la cellule, soit par l'induction de gènes impliqués dans la réponse antioxydante et la répression de gènes impliqués dans la réponse pro-oxydante (You & Chan, 2015). Un antioxydant peut être défini comme une substance qui, présente à de faibles concentrations comparées à celles des substrats oxydables, prévient significativement ou retarde l'initiation du processus d'oxydation. Selon le type, les antioxydants peuvent agir en réduisant ou en dismutant les ROS, en les piégeant pour former un composé stable, en séquestrant les métaux de transition libres ou en générant du glutathion (GSH), molécule biologique antioxydante d'importance. Les antioxydants sont donc des régulateurs du taux de pro-oxydants dans l'organisme. Le système de défense contre les ERO est composé d'antioxydants endogènes (synthétisés par le corps) ou exogènes (apportés par l'alimentation, qui feront l'objet d'une autre partie). Ces défenses antioxydantes peuvent être des enzymes, des protéines, des molécules de petite taille telles que

les vitamines, ou bien encore des oligo-éléments agissant sur les différents sites de la cellule (Figure 14) (Garait, 2006). Les principales enzymes antioxydantes intracellulaires sont les superoxyde dismutases, la catalase et les glutathion peroxydases. Les principaux antioxydants non enzymatiques sont : le glutathion, l'acide urique, la bilirubine, l'acide lipoïque, et la coenzyme Q10. Des protéines enzymatiques comme les thiols oxydoréductases et transférases (système des thiorédoxines, peroxirédoxines, et glutathionrédoxines) et des hèmes oxygénases, des protéines non enzymatiques (transferrine, ferritine, lactoferrine, céruloplasmine, albumine, métallothionéines ...) et des facteurs de transcription codant pour des gènes impliqués dans la réponse antioxydantes complètent ce système de défenses antioxydantes. D'autres molécules peuvent présenter des propriétés antioxydantes, comme les sels d'urate, certaines protéines ou certains acides aminés (exemple : tryptophane, tyrosine, histidine, cystéine ...) mais leur pouvoir antioxydant intracellulaire reste difficile à apprécier car ils font intervenir de nombreux facteurs (Pisoschi & Pop, 2015).

2.2.2.2. Les enzymes antioxydantes intracellulaires

Suite à une attaque radicalaire, la détoxification active des espèces réactives va se faire grâce aux trois principales enzymes antioxydantes intracellulaires: le superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT) et le glutathion peroxydase (GPx) (Delattre et al., 2005) (Figure 15).

➤ La superoxyde dismutase

La SOD est la première ligne de défense de l'organisme contre les ERO, qui catalyse la dismutation de l'anion superoxyde en hydrogène peroxyde et en oxygène. Il y a 3 isoformes des SOD à cofacteurs métallique (CuZn-SOD, Mn-SOD, Ec-SOD) et sont localisés soit dans le cytoplasme (CuZn-SOD, SOD1), soit dans la mitochondrie (Mn-SOD, SOD2), soit dans la matrice extra-cellulaire (Ec-SOD, SOD3). Les réactions catalysées par SOD sont les suivantes : $M^{(n+1)+} - SOD + O_2^{\bullet-} \rightarrow M^{n+} - SOD + O_2$ et $M^{n+} - SOD + O_2^{\bullet-} + 2H^+ \rightarrow M^{(n+1)+} - SOD + H_2O_2$ (Birben et al., 2012).

➤ La catalase

La CAT est une enzyme héminique localisée essentiellement dans les peroxysomes, permettant la suppression des fortes concentrations de peroxyde d'hydrogène ($2H_2O_2 \rightarrow O_2 + H_2O$) mais

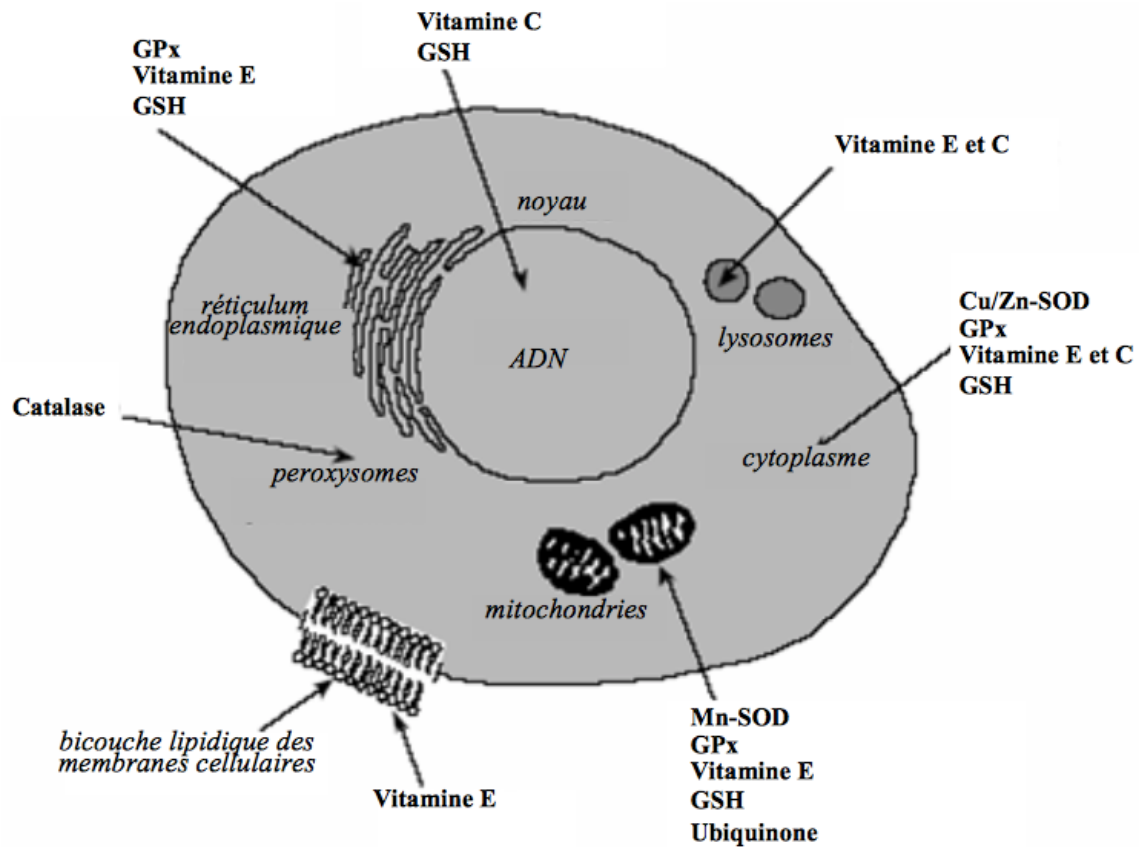


Figure 14. Localisation des principales défenses antioxydantes au sein de la cellule. Mn-SOD : superoxyde dismutase mitochondriale ; Cu/Zn-SOD : superoxyde dismutase cytoplasmique ; GSH : glutathion réduit (Blandine Garait 2006).

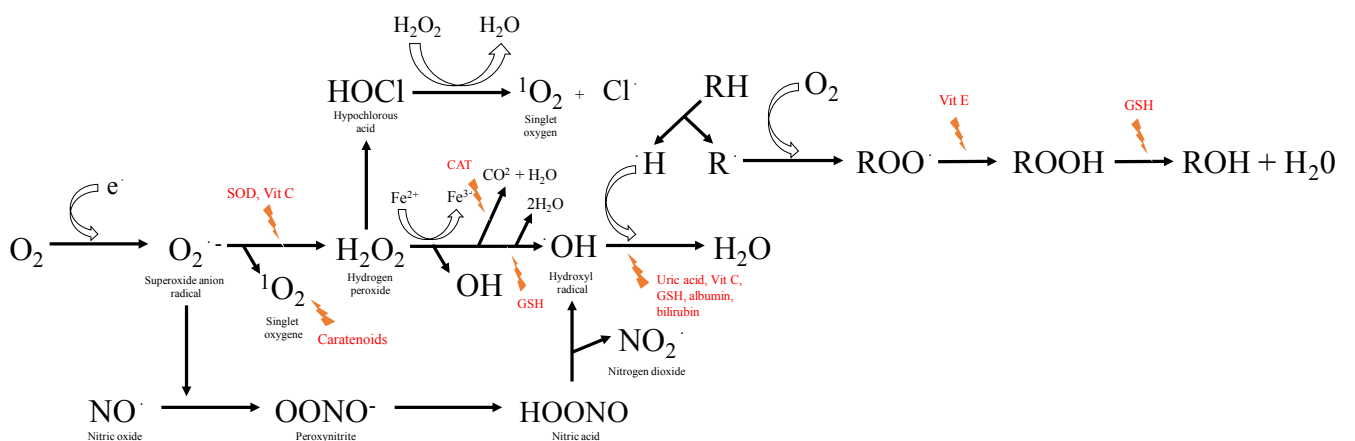


Figure 15. Les radicaux libres, leurs métabolites et les antioxydants permettant leur élimination. (Duracková 2010).

permet également la dégradation de certains substrats (notamment dégradation hépatique de l'alcool et de l'éthanol en acétaldéhyde) ($\text{Subst} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{résidu} + \text{H}_2\text{O}$) (Delattre et al., 2005).

➤ □ Le glutathion peroxydase

Le GPx qui est une enzyme à cofacteur de sélénium se localisant dans le cytosol et la matrice mitochondriale. Son action nécessite la présence de glutathion réduit (GSH). Elle a pour activité la dégradation des peroxydes organiques (ROOH) (et notamment des peroxydes lipidiques résultant de l'effet du stress oxydatif sur les acides gras poly-insaturés) et de la majorité du peroxyde d'hydrogène : $2\text{GSH} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{GSSG} + 2\text{H}_2\text{O}$ et $2\text{GSH} + \text{ROOH} \rightarrow \text{GSSG} + \text{ROH} + \text{H}_2\text{O}$. Il existe 4 types de GPx encodant différents gènes : GPx1 (au sein de la cellule, qui réduit les peroxydes lipidiques et H_2O_2), GPx2 (dans les cellules épithéliales gastro-intestinales, qui réduit les peroxydes provenant de l'alimentation), GPx3 (dans la matrice extra-cellulaire) et GPx4 (hydroperoxyde phospholipide GPx permettant la réduction des lipides estérifiés) (Arthur, 2000).

➤ □ Le glutathion réductase

La glutathion réductase permet, quant à elle, la régénération NADPH-dépendante du glutathion réduit à partir du glutathion oxydé.

➤ □ Les thiorédoxines

D'autres enzymes ont une activité antioxydante, comme les thiorédoxines (TRx), qui sont des enzymes d'oxydo-réduction intrinsèques comme toutes les protéines à groupement thiol (-SH), et qui jouent un rôle important dans la régulation du système immunitaire. Elles facilitent la réduction d'autres protéines en formant des ponts disulfures entre les résidus cystéine. Les thiorédoxines réductases (TRxR) maintiennent les TRx dans un état réduit actif. L'attaque nucléophile du pont disulfure de la protéine substrat va libérer un thiol, ce qui va engendrer la formation d'un pont disulfure entre la protéine et la TRx, et aboutir à une forme oxydée de la thiorédoxine. C'est alors que la TRxR réduit la TRx, en transférant des électrons provenant de NADPH et permet ainsi la régulation des ERO et de l'apoptose (Collet & Messens, 2010).

➤ □ Les glutathion S-transférases

Les Glutathion S-transférases (GST) sont une famille de supergènes d'enzymes de phase II ayant une activité antioxydante, présents dans de nombreux tissus dont le poumon, sous trois formes : cytosolique, mitochondriale et microsomale, jouant un rôle dans le métabolisme des eicosanoïdes et du glutathion (GSH) (Hayes & McLellan, 1999). Ces enzymes catalysent la détoxification d'une variété de composés réactifs électrophiles et inactivent les métabolites secondaires tels que les aldéhydes insaturés, les époxydes et les hydroperoxydes (Cote et al., 2009).

➤ □ Les hèmes oxygénases

D'autres systèmes endogènes peuvent être considérés comme antioxydants. Le système des hèmes oxygénases est constitué de trois isoenzymes : HO-1 inductible, HO-2 constitutive et HO-3. Les HO permettent la conversion de l'hème en monoxyde de carbone, en biliverdine et en fer et ont donc un effet protecteur indirect car il vient de la transformation de la biliverdine en bilirubine et vient également du fer produit par l'activité de HO, qui stimule la synthèse de la ferritine (Loboda et al., 2016).

2.2.2.2. Les antioxydants non enzymatiques

Il peut arriver que les espèces oxygénées passent les premières lignes de défense. Une détoxification passive aura alors lieu. Elle inclut tous les antioxydants non enzymatiques capables de neutraliser seulement un radical libre par molécule tels que les vitamines C et E, les caroténoïdes, les composés phénoliques, les flavonoïdes, l'albumine, l'acide urique, les polyamines, l'acide lipoïque, ... Les composés pouvant être dans l'alimentation, tels que les caroténoïdes, les vitamines E et C et les oligo-éléments seront abordés dans la partie 3.2.

➤ □ Le glutathion réduit et oxydé

Le glutathion est un tripeptide pouvant interagir avec les espèces réactives oxygénées mais est principalement utilisé comme substrat de la glutathion peroxydase, qui assure l'élimination des lipides oxydés et le peroxyde d'hydrogène (Birben et al., 2012). Le glutathion est également capable d'interagir avec des électrophiles, des oxydants, des radicaux, des métaux et des disulfides (Figure 16). Des concentrations élevées en GSH augmentent la capacité antioxydante

GSH + Electrophiles $\xrightarrow{GST}$ GS-R

GSH + Oxidants $\xrightarrow[\text{or PRX}]{GPX}$ GSSG or GS-SR (e.g., GS-protein)

GSH + Radicals $\longrightarrow$ GS $\cdot$ or GS-R (e.g., GS-NO)

GSH + Metals $\longleftrightarrow$ GS-M or GS-M-SG

GSH + Disulfides (e.g., Protein-S-SG $\longleftrightarrow$ Protein-SH + GSSG)

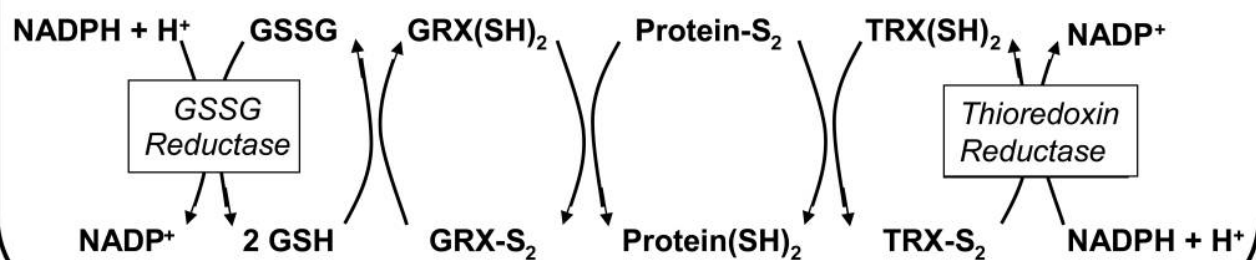


Figure 16. Réactions de conjugaison entre le glutathion et d'autres composés. (Ballatori et al., 2009)

(Ballatori et al., 2009). Le glutathion est présent sous forme réduite (GSH) ou oxydée (GSSG). Sous conditions oxydatives, les atomes sulfures de deux molécules de GSH donne chacun un électron et sont convertis en GSSG (Giustarini et al., 2016). Une augmentation du GSSG intracellulaire peut survenir suite une rupture d'H₂O₂ par le glutathion peroxydase. Le ratio GSH/GSSG est un indicateur du stress oxydatif (Zitka et al., 2012). Le ratio tend à diminuer soit par une augmentation du glutathion disulfide, soit une diminution du GSH. L'équilibre redox peut être maintenu, même face à un stress oxydatif par augmentation de l'activité du glutathion réductase ou *via* l'élimination du GSSG par les cellules. Un ratio GSH/GSSG élevé est le reflet d'une augmentation susceptible du stress oxydatif, pouvant induire des dommages impliqués dans les maladies telles que le cancer (Ballatori et al., 2009). Il est présumé que la diminution de GSH contribue à la mort cellulaire seulement lorsque le stress oxydatif est prolongé et que les systèmes cellulaires ne sont pas suffisants pour contrebalancer les attaques des ROS. En effet, dans les mitochondries saines, les niveaux de mGSH peuvent faire face aux ERO générés après un stimulus apoptotique (Marí et al., 2013). De plus, des concentrations trop basses en GSH induisent une diminution des défenses immunitaires.

Par ailleurs, certains facteurs de transcription tels que Nrf2 ou des myokines telles que l'irisine participent également à la réponse antioxydante.

➤ **Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 (Nrf2)**

Nrf2 est un facteur de transcription faisant partie du système antioxydant endogène. Dans des conditions normales, de faibles concentrations de Nrf2 maintenues par la dégradation protéosomique grâce à un mécanisme Keap-1-dépendant promeuvent une ubiquitination efficace et un renouvellement rapide (Shibata et al., 2008). Keap1 régule négativement l'activité de Nrf2 en ciblant la dégradation protéosomique (Singh et al., 2006). Après phosphorylation et détachement de son inhibiteur Keap-1, Nrf2 est transféré dans le noyau et se lie à des éléments de réponse antioxydante (ARE) eux-même liés à des gènes codant pour des protéines détoxifiantes antioxydantes (Figure 17). Par une induction transcriptionnelle des gènes porteurs d'ARE, Nrf2 active donc des voies cellulaires impliquées dans la régulation des lésions oxydatives, de l'inflammation, de l'immunité et de l'apoptose (Cho et al., 2006). Nrf2 augmente également l'expression de plusieurs enzymes protectrices et détoxifiantes de phase II et des enzymes antioxydantes comme les peroxyrédoxines (Shibata et al., 2008), SOD, CAT, et HO-1; et contrôle positivement l'expression de plusieurs protéines et enzymes impliquées dans la génération de glutathion (Rotblat et al., 2012) (Figure 17).

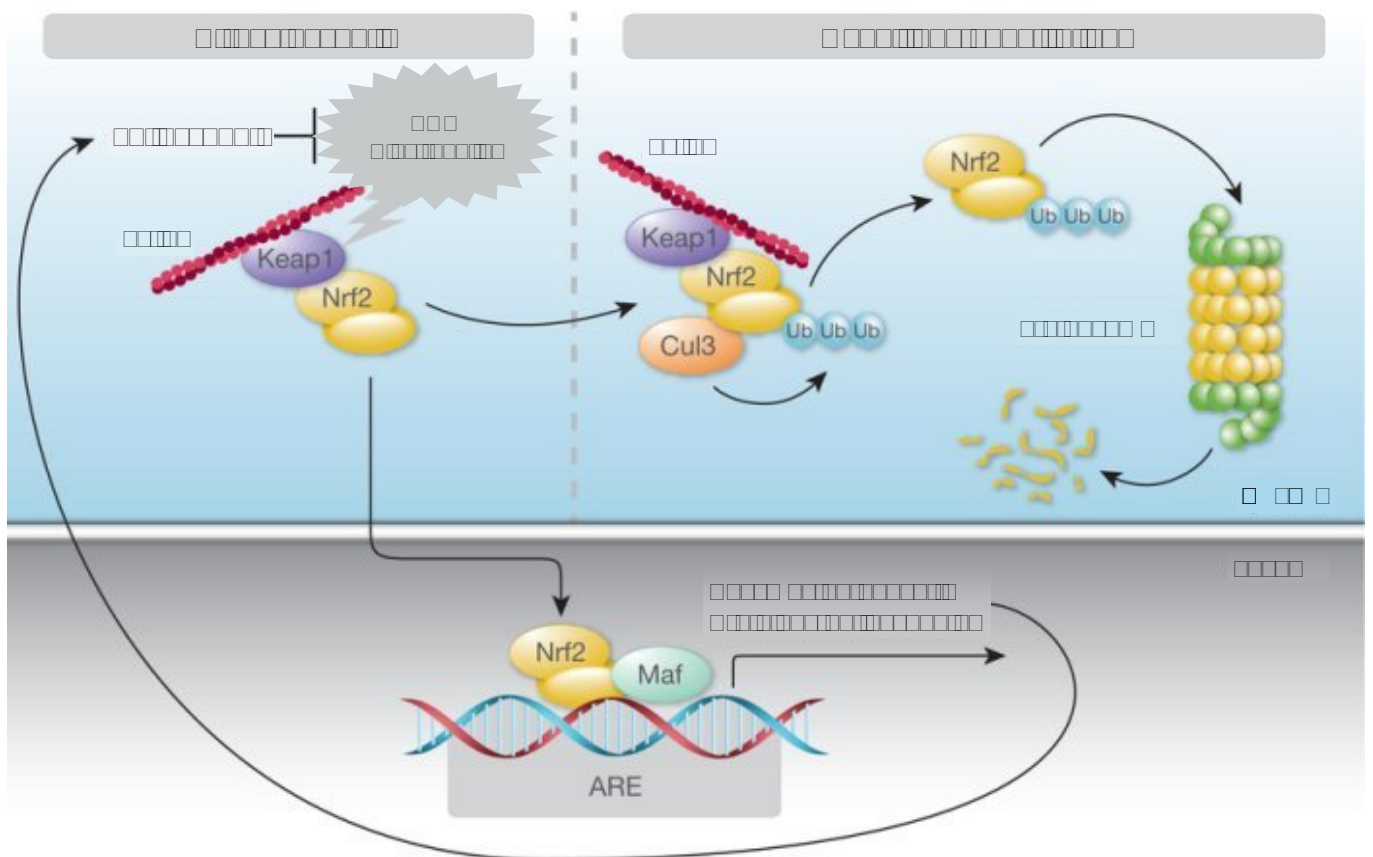


Figure 17. Activation de la voie Keap1/Nrf2. (May, 2012)

➤ □ L'irisine

L'irisine est considérée comme une myokine proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 α (PGC-1 α)-dépendante et est une hormone protéolytique dérivée du FNDC5, sécrétée par les myocytes (Zhu et al., 2015). Une augmentation de l'expression de l'irisine reflète l'action du co-activateur transcriptionnel PGC-1 α . Ce co-activateur médie de nombreux programmes biologiques reliés au métabolisme énergétique, et notamment un co-activateur de PPAR γ qui module l'expression d'uncoupling protein-1 (UCP-1) et la thermogénèse. PGC-1 α contrôle également la biogénèse mitochondriale et le métabolisme oxydatif de nombreux types cellulaires et stimule l'expression d'antioxydants tels que GPx1, CAT, MnSOD et l'expression de produits génétiques musculaires comme FNDC5 (qui encode l'irisine) (St-Pierre et al., 2006). Il conduit à un brunissement de la graisse blanche *via* l'élévation de UCP-1 menant à la thermogénèse et l'amélioration métabolique (Halpern, 2016). PGC-1 α joue un rôle dans le contrôle des ERO, en supprimant leur production par l'augmentation de l'expression de gènes impliqués (i.e. FOXO, Nrf2) dans la détoxification des ERO, par l'augmentation de l'expression des UCP qui sont capables d'atténuer la production d'ERO et par la modulation de p53 (qui est un gène suppresseur de tumeur) (Fu et al., 2016; García-Quintans et al., 2014; Sen et al., 2011). L'expression d'irisine peut donc être considérée comme un marqueur du stress oxydatif (Ost et al., 2016), et ce d'autant plus qu'elle est positivement corrélée au MDA et négativement au GSH (Samy et al., 2015). L'augmentation de l'irisine serait donc une réponse possible au stress oxydatif (Samy et al., 2015).

➤ □ Les glutarédoxines

Les glutarédoxines (des thioltransférases) sont des protéines dithiols ou monothiols impliquées dans la régulation redox des facteurs de transcription (par exemple NF- κ B, AP-1) et les cascades de signalisation. La glutarédoxine est réduite par le glutathion cellulaire réduit (GSH), qui est lui-même réduit par NADPH et le glutathion réductase. Les glutarédoxines sont capables de réduire les ponts disulfures ainsi que les protéines disulfures oxydées et le produit formé par le complexe protéine oxydée/molécule de glutathion (Vlami-Gardikas & Holmgren, 2002).

D'autres défenses antioxydantes non enzymatiques participent à la détoxification des ERO :

➤ □ les protéines thiols

➤ □ l'acide urique qui interagit avec les ERO et tout particulièrement le radical hydroxyle

- la bilirubine, l'albumine
- les protéines régulatrices, de transport, et de séquestration des métaux de transition (ferritine, transferrine)
- les protéines découplantes (UCP)
- le coenzyme Q10 (ubiquinone) qui est principalement présent sous sa forme réduite (ubiquinol) et qui est capable d'inhiber la peroxydation lipidique
- les autres antioxydants (vitamines, polyphénols, métaux) apportés par l'alimentation (traités en partie 3.2).

Le stress oxydatif est reconnu pour être impliqué dans de nombreuses pathologies dont le cancer, notamment *via* les dommages sur l'ADN.

2.2.1. Le stress oxydatif et les étapes de la cancérogenèse pulmonaire

Le stress oxydatif intervient dans les trois stades du cancer. Lors de l'initiation, les ERO peuvent produire des dommages sur l'ADN par mutations génétiques et altérations structurales dans l'ADN. Lors de la promotion, les ERO contribuent à une expression génétique anormale, au blocage de la communication entre cellules et à des modifications des systèmes de seconds messagers. Il en résulte une augmentation de la prolifération cellulaire et une diminution de l'apoptose. Enfin, les ROS participent à la progression tumorale par addition d'altérations de l'ADN sur les cellules initiées (Klaunig et al., 1998; Reuter et al., 2010).

Les poumons ont un fort risque de pathologies induites en partie par les radicaux libres provenant de l'oxygène et par la peroxydation lipidique. Ceci est dû au fait que le tissu pulmonaire contient des acides gras insaturés, qui sont des substrats lors de la peroxydation lipidique mais également au fait que les poumons sont exposés à de très fortes concentrations en oxygène (Torres et al., 2004). Chez les individus sans pathologie, les taux de peroxydation lipidique sont faibles car les poumons possèdent des systèmes de défense antioxydants très puissants. Dans certaines conditions, les défenses antioxydantes pulmonaires sont amoindries. Dans de nombreux cas tels qu'une exposition chronique à une situation de stress oxydatif élevé ou une pathologie (diabète, cancer, maladies neuro-dégénératives ...), la peroxydation des membranes lipidiques semble inévitable (Torres et al., 2004).

Par ailleurs, certains oncogènes (dont Ras) sont connus pour induire l'augmentation de la concentration d'ERO (Ogrunc et al., 2014; Visconti & Grieco, 2009). Un taux élevé d'espèces pro-oxydantes et un taux bas de molécules antioxydantes ont été relevés chez les patients atteints du cancer du poumon à un stade avancé comparativement à une population saine (Esme et al., 2008). Les concentrations de MDA et de 8-OH-dG des patients atteints d'un cancer du poumon sont plus élevées que celles d'une population saine (Cobanoglu et al., 2011).

Les gènes (NFE2L2, Nqo1) impliqués dans la modulation des composés oxydants et délétères semblent jouer un rôle important dans les interactions avec l'environnement génétique du cancer du poumon (Seibold & Schwartz, 2011). Les dommages oxydatifs au niveau de l'ADN engendrent la formation de lésions comme 8-oxo-deoxyguanosine et le stress oxydatif accentué cause une augmentation de la formation d'adduits 8-oHdG (Conaway et al., 1991). 8-oHdG est un marqueur important dans la cancérogenèse dû à ses instabilités et sa capacité à causer les transversions de G (guanine) en T (thymine) et A (adénine) en C (cytosine) (Cheng et al., 1992).

2.2.2. □ Modifications des défenses antioxydantes lors d'un cancer du poumon

Lors d'un cancer du poumon, de nombreuses altérations au niveau des défenses antioxydantes ont été observées et notamment des perturbations au niveau des défenses enzymatiques et de l'expression de Nrf2 et de l'irisine.

2.2.2.1. □ Modifications des défenses antioxydantes lors d'un cancer du poumon

Kontakiotis et al. (2011) ont mis en évidence une augmentation de la capacité antioxydante totale et de l'expression du glutathion dans liquide de lavage broncho-alvéolaire (LLBA) de patients atteints d'un cancer, sans augmentation au niveau sérique. Cette augmentation au niveau du LLBA représenterait une réponse adaptative induite par un stress oxydatif chronique local causé par le cancer.

Une autre étude a mis en évidence une augmentation de GSH au niveau du fluide de revêtement épithéliale ainsi qu'une diminution de l'activité de SOD (Melloni et al., 1996).

Enfin, une étude comparant des tissus sains à des tissus tumoraux pulmonaires a montré une augmentation de Mn-SOD et CuZn-SOD et une diminution de Ec-SOD dans les tissus tumoraux (Svensk et al., 2004). Mn- et CuZn-SOD sont les plus étudiés. Des études précédentes ont mis

en évidence que leur expression était associée à un mauvais pronostic (Kinnula & Crapo, 2004) et qu'ils pouvaient être une cible de p53 (Pani et al., 2000). De plus, une surexpression de Mn-SOD a été associée à la prolifération cellulaire *in vitro* (Kahlos et al., 2000).

3.2.1.2. Le rôle de Nrf2 dans la protection cellulaire

Nrf2 permet une protection des cellules normales mais aussi des cellules tumorales. En effet, l'action permanente antioxydante de Nrf2 diminuant le niveau de ROS intracellulaire pourrait favoriser la survie des cellules cancéreuses (Chartoumpekis et al., 2015). Cette activation peut être due à plusieurs facteurs : 1) l'impossibilité de Keap1 de séquestrer Nrf2 dans le cytoplasme, 2) une anomalie de Nrf2 ou de l'expression de son gène 3) la participation de Nrf2/Keap1 dans les voies impliquées dans le cancer (Padmanabhan et al., 2006). Ainsi, dans le cancer du poumon, plusieurs études ont montré l'importance de Nrf2. En effet, une expression aberrante ou une activation des membres de la voie de Nrf2 sont très fréquentes dans le cancer du poumon (Gañán-Gómez et al., 2013). Dans des lignées cellulaires, des mutations faux-sens de Keap1 étaient associées à une perte de la répression de Nrf2 (Padmanabhan et al., 2006). De plus, Singh et al. (2006) ont montré dans 6 lignées de cancer du poumon sur 12 et dans 10 cancers pulmonaires non à petites cellules sur 54, qu'une mutation, une insertion ou une délétion de Keap1 était présente et que ces cellules présentaient une augmentation du niveau de Nrf2 associée à la transcription de ses gènes cibles. De même, dans une étude portant sur 65 cas de cancer du poumon, il a été décrit une fréquence élevée de mutation de Keap1 dans les adénocarcinomes du poumon (Ohta et al., 2008).

Une forte expression constitutive de Nrf2 est observée dans de nombreuses cellules cancéreuses montrant une résistance au traitement anti-cancer. Une surexpression aberrante ou une hyper-activation de Nrf2 dans les cellules associée à une activité importante de PI3K/AKT peut engendrer un phénotype hyper-prolifératif et éventuellement, une croissance tumorale (Gañán-Gómez et al., 2013). Des mutations somatiques communes au niveau de la région de codage du gène Nrf2 sont associées à un mauvais pronostic dans le cadre d'un carcinome squameux du poumon (Shibata et al., 2008). Les mutations résultant d'une perte de la fonction de Keap1 sont davantage courantes dans les adénocarcinomes pulmonaires (Ohta et al., 2008; Padmanabhan et al., 2006; Singh et al., 2006). Nrf2 peut être une molécule cible importante dans le traitement des cancers du poumon non-à-petites-cellules, où sont présentes des mutations des gènes

EGFR, K-Ras ou Keap1 (Yamadori et al., 2012). La suppression de la surexpression de Nrf2 apparaît être une stratégie thérapeutique intéressante (Lim et al., 2013).

2.2.3. □ Stress oxydatif et cancer du poumon

Actuellement, peu d'études se sont intéressées au rôle de l'irisine dans la carcinogénèse. Une étude sur le cancer du sein a mis évidence que les niveaux d'irisine sériques étaient significativement inférieurs chez les patientes ayant un cancer mammaire que chez les femmes du groupe contrôle (Provatopoulou et al., 2015). Une autre étude, *in vitro* cette fois, avait montré qu'un traitement à l'irisine diminuait le nombre de cellules malignes MDA-MB-231 (cancer du sein), leur migration et leur viabilité, *via* une activation de l'apoptose caspase-dépendante (Gannon et al., 2015). Par ailleurs, il a été montré que l'irisine inhibait l'activation de la voie de signalisation ROS/p38 MAPK/NF-κB supprimant ainsi l'inflammation vasculaire et le dysfonctionnement endothélial retrouvés dans l'athérosclérose (Zhang et al., 2016). Outre son rôle dans le stress oxydatif, l'irisine régule divers mécanismes dont l'apoptose et certaines voies de signalisation intracellulaires (Shao et al., 2016), dont PI3K/AKT (Liu et al., 2015; Xin et al., 2016) et peut inhiber la prolifération des myoblastes cardiaques (Xie et al., 2015). Dans une étude très récente, il a été montré qu'un traitement à l'irisine réduisait l'invasion des cellules A549 *via* l'inhibition de la transition épithélio-mésenchymateuse, qui est un processus de reprogrammation épithéliale impliqué dans le développement du cancer, et de la voie PI3K/AKT (Shao et al., 2016).

2.2.3. □ Stress oxydatif, inflammation et cancer du poumon

L'inflammation joue un rôle ambivalent dans le cancer (Huang & Mellor, 2014). D'un côté, l'inflammation induit la formation d'ERO (Azad et al., 2008) pouvant contribuer à la cancérogenèse par l'intermédiaire d'une instabilité génomique, des altérations génétiques, une résistance à l'apoptose, l'angiogénèse et des métastases (Coussens & Werb, 2002; Fitzpatrick, 2001). De plus, l'inflammation chronique peut être liée à la tumorigénèse dans certaines conditions (Grivennikov et al., 2010; Vivier et al., 2008). D'un autre côté, de nombreux marqueurs inflammatoires stimulés par les ERO peuvent induire des mécanismes anti-tumoraux (Pedersen et al., 2016).

2.2.1. Les cytokines et le TNF- α

Les cytokines sont des substances de la signalisation cellulaire du système immunitaire jouant un rôle important dans les réponses inflammatoires et immunitaires (DeCotiis et al., 2016). Les cytokines sont régulées, sous l'action de stimulations immunitaires spécifiques, par de nombreux mécanismes : production en cascade et amplification, action synergétique, inhibition direction ou rétro-inhibition ; et après liaison à leurs récepteurs, les cytokines peuvent induire une production d'ERO (Delattre et al., 2005).

TNF- α est l'une des principales cytokines pro-inflammatoires. La relation entre TNF- α et les ERO est à double sens. En effet, lors de la nécroptose (nécrose programmée) induite par TNF- α , la phosphorylation de MLKL (mixed lineage kinase domain-like) médiée par RIPK1/3 (receptor interacting protein kinases) génère une production d'ERO au niveau de la mitochondrie et une activation de JNK (c-Jun N-terminal kinases) (Hennet et al., 1993; Zhao et al., 2012). Mais la production ROS peut également induire une expression de TNF- α (Liu et al., 1998). TNF- α peut être soluble (sTNF) ou lié à une membrane (mTNF). L'attachement de sTNF au récepteur TNFR1 peut engendrer l'activation de NF- κ B. En aval de TNF- α , les ERO sont essentiels à la signalisation de NF- κ B qui contrôle l'expression de nombreux facteurs anti-apoptotiques mais également l'expression de gènes codant pour l'apoptose, comme c-myc ou p53 (Blaser et al., 2016). TNF- α est impliqué notamment dans l'apoptose, la différenciation cellulaire et la transcription génique, par l'activation de caspases et de kinases spécifiques telles que MAPK, et de NF- κ B (Figure 18). TNF- α stimule à la fois la mort cellulaire *via* l'apoptose (caspase-dépendante) et la nécrose (qui n'est pas caspase-dépendante) (Fiers et al., 1999), et la survie cellulaire *via* l'activation de facteurs de transcription augmentant des protéines apoptotiques (Baud & Karin, 2001). TNF- α induit l'apoptose en ciblant les cellules à travers son récepteur TNF α 1, en activant deux types de caspases impliquées dans l'initiation et l'exécution de l'apoptose (B. Liu et al., 1998). TNF- α est notamment capable d'augmenter l'activité de caspase-3 (Hughes et al., 2005).

Par ailleurs, TNF- α pourrait réguler la fonction protéique de manière redox-dépendante (Sullivan et al., 2000).

Aucune différence d'expression TNF- α au niveau du liquide de lavage broncho-alvéolaire (LLBA) n'a été trouvée entre des sujets sains et des sujets ayant le cancer du poumon (Chen et

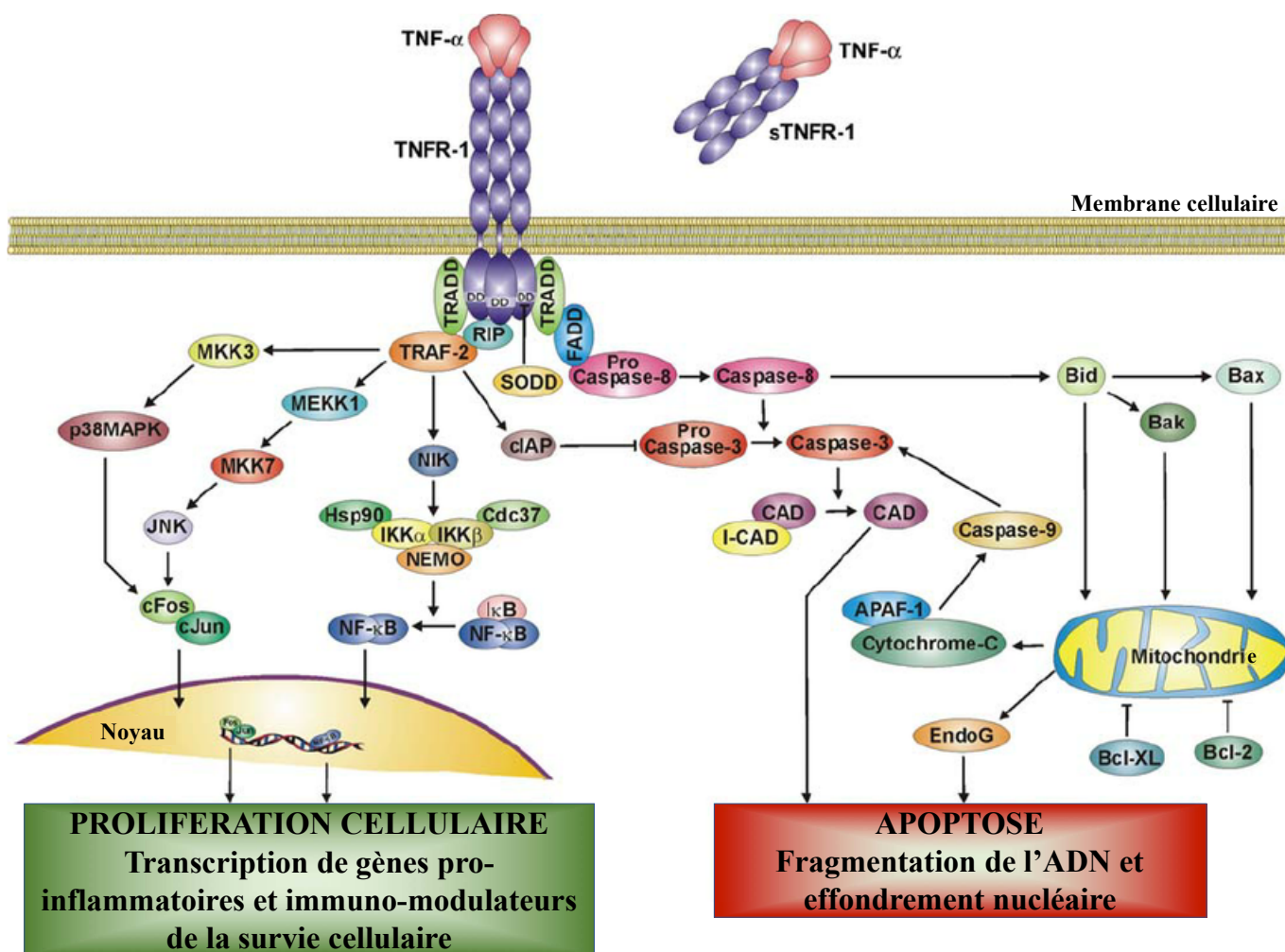


Figure 18. Voies activées suite à la fixation de TNF- α sur le récepteur TNFR-1. (van Horssen, Ten Hagen, & Eggermont, 2006) APAF-1, apoptosis protein activating factor 1; Bcl-2, B-cell lymphoma 2; Bid, Bak, Bax, and Bcl-XL, mitochondrial proteins of the Bcl-2 family; CAD, caspase-activated DNase; Caspase- 3/8/9, cysteine aspartase (apoptotic protease) 3/8/9; Cdc37, co-chaperon of HSP90; cIAP, cytoplasmic inhibitor of apoptosis; cFos/ cJun, transcription factors; DD, death domain; EndoG, mitochondrial DNase; FADD, Fas-associated DD; HSP90, heat shock protein 90; I-CAD, inhibitor of CAD; I κ B, inhibitor of NF- κ B; IKK α / β , I κ B kinase; JNK, cJun n-terminal kinase; MEKK1, mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-related kinase kinase 1; MKK3/7, MAPK kinase 3/7; NEMO, NF- κ B essential modulator; NF- κ B, nuclear factor kappa B transcription factor; NIK, NF- κ B inducing kinase; p38MAPK, p38 mitogen-activated protein kinase; RIP, receptor interacting protein; SODD, silencer of DD; sTNFR-1, soluble TNFR-1; TNF- α , tumor necrosis factor alpha; TNFR-1, TNF receptor 1; TRADD, TNF receptor-associated DD; TRAF-2, TNF receptor-associated factor-2.

al., 2014). Par contre, les concentrations en TNF- α sériques étaient plus élevées chez des patients ayant un cancer du poumon que chez des sujets sains (Dalaveris et al., 2009; De Vita et al., 1998).

Le facteur de transcription NF- κ B

Les NF- κ B sont des protéines faisant partie de la famille des facteurs de transcription impliquées dans de nombreux processus cellulaires normaux comme les réponses inflammatoires et immunitaires, la croissance cellulaire et l'apoptose. Ces facteurs de transcription sont très actifs aux différents stades de maladies telles que le cancer, les inflammations chroniques, l'asthme, les maladies neurodégénératives et cardio-vasculaires.

Il existe 5 formes de NF- κ B : p50, p52, c-Rel et Rel1 (p65), Rel-B encodées respectivement par NF κ B1, NF κ B2, REL, REL A et REL B. Les NF- κ B sont liés par un domaine de liaison/dimérisation à l'ADN appelé le domaine d'homologie Rel (RH : Rel Homology) en N-terminal. NF- κ B se lie aux sites κ B présents sur le promoteur des gènes cibles et régulent leur transcription *via* le recrutement de coactivateurs et co-répresseurs. Seuls p65, c-Rel et Rel B possèdent le domaine d'activation de la transcription nécessaire à la régulation positive de l'expression des gènes (Karin & Lin, 2002; Pahl, 1999). p50 et p52 peuvent uniquement réprimer la transcription sauf s'ils s'associent à un autre NF- κ B contenant un domaine d'activation de la transcription ou à d'autres protéines capables de recruter des coactivateurs. La partie N-terminale de NF- κ B donne la sélectivité des sites κ B et les résidus hydrophobes du domaine C-terminal octroyant l'interface de dimérisation entre les sous-unités de NF- κ B.

Dans son état inactif, les dimères de NF- κ B sont liés soit à une protéine : I κ B- α , I κ B- β ou I κ B- ϵ , soit à un précurseur des protéines p100 et p105. Les protéines I κ B permettent le maintien des dimères de NF- κ B dans le cytoplasme et ainsi, inactivent NF- κ B et préviennent la translocation nucléaire et leur liaison à l'ADN. I κ B- α est la protéine la plus étudiée et est rapidement dégradée pendant l'inactivation de la voie de signalisation de NF- κ B, ce qui induit la libération de nombreux dimères de NF- κ B. p65/p50 est l'une des premières cibles de I κ B- α .

Les NF- κ B peuvent être activés par de nombreux stimuli incluant les cytokines pro-inflammatoires, les mitogènes des cellules T et B, des bactéries, des lipopolysaccharides, des virus et les phénomènes de stress cellulaire et notamment par les ERO. Trois voies d'activation

Certaines études ont montré une activation anormale et soutenue de NF- κ B dans le cancer du poumon, générant et maintenant un environnement inflammatoire pro-tumoral (Zaynagetdinov et al., 2015) et qu'un traitement visant à inhiber l'activation de NF- κ B permettait de diminuer la croissance tumorale des cellules A549 (Choi et al., 2014).

La cyclooxygénase a trois isoformes avec des structures et des fonctions identiques mais encodées par différents gènes (Smith, DeWitt, & Garavito, 2000) : la Cox-1 (forme constitutive) a un rôle cytoprotecteur en maintenant l'homéostasie des organes, la Cox-2 (forme inducible) est présente dans les foyers inflammatoires, et la Cox-3 est une variante de la Cox-1 mais uniquement présente au niveau du cœur et du cortex cérébral (Chandrasekharan et al., 2002). Les Cox catalysent les mêmes réactions biochimiques et ont des constantes cinétiques égales concernant la conversion de l'acide arachidonique en prostanoïdes. En effet, les Cox convertissent l'acide arachidonique en prostaglandines (PGE₂, PGD₂ ou PGI₂) ou en thromboxanes, par l'intermédiaire de leur précurseur PGH₂. En conditions normales, Cox-2 n'est pas exprimée dans la plupart des cellules et son expression est liée à l'inflammation (Bhat et al., 2014), c'est pourquoi elle est fréquemment utilisée pour évaluer l'inflammation (Clària & Romano, 2005). Cependant, Cox-2 peut également affecter d'autres processus, dont

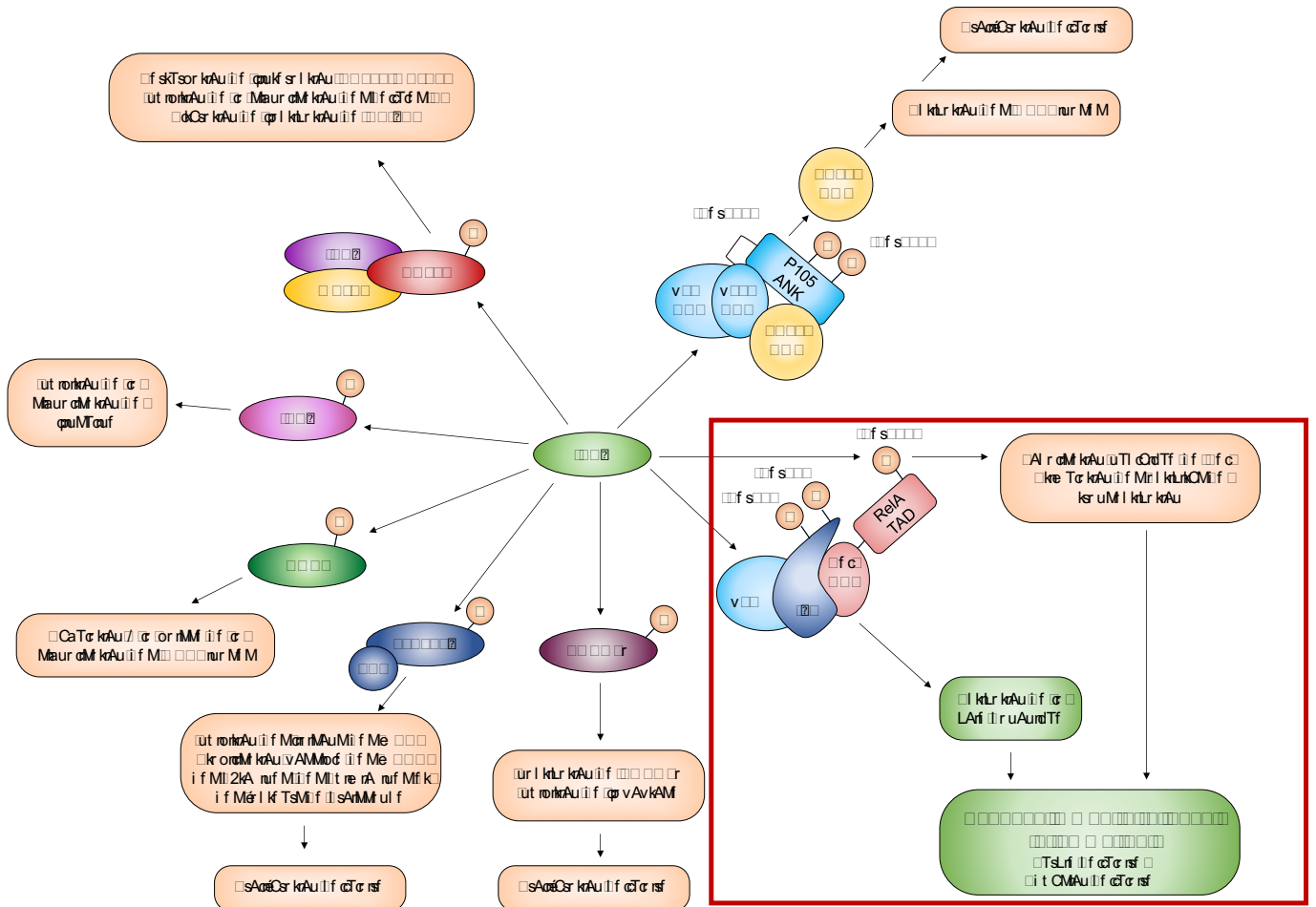


Figure 19. Conséquences de l'activation des IKKβ. (Perkins, 2007). En plus d'activer la voie de signalisation canonique de NF-κB *via* la phosphorylation des protéines IκB, les IKKβ phosphorylent d'autres substrats dont des sous-unités de NF-κB. La phosphorylation de RelA sur la sérine 536 peut entraîner une localisation nucléaire et une stimulation de ces fonctions de transactivation pouvant aboutir à une réponse immunitaire et inflammatoire. ANK: ankyrin-repeat motif; IκB: inhibiteur d'IκB; IKK: IκB kinase; NF-κB: nuclear factor-κB; P: phosphorylation; RHD: Rel-homology domain; TAD: transcriptional activation domain.

l'apoptose, la prolifération, l'angiogenèse, l'invasion et l'immunosuppression, qui sont des mécanismes impliqués dans le cancer (Hashimoto, 2012). Une augmentation de la Cox-2 est impliquée dans la cancérogenèse par son expression cellulaire et son activité métabolique (Cao & Prescott, 2002). En effet, Cox-2 libère des radicaux hydroxyles qui exercent un rôle dans l'activation de carcinogènes par la catalysation de l'oxydation de nombreux xénobiotiques dont les substances intermédiaires qui sont susceptibles de se lier à l'ADN (Dannenberg et al., 2001). Le thromboxane A2 (TXA2) a une activité Cox-2-dépendante. TXA2 convertit une partie de PGH₂ en MDA, qui est un agent mutagène capable de former des adduits à l'ADN (Rodrigues et al., 2004). Cox-2 est également impliquée dans la cancérogenèse par l'augmentation de PGE2 qui est en partie responsable de la diminution de l'apoptose (Bcl-2) et des défenses immunitaires (IL-12), et de l'augmentation de l'angiogenèse (VEGF) et de la prolifération tumorale (Matrix Metalloprotéinase (MMP) 2, MMP9) (Lacave et al., 2005).

Une surexpression de Cox-2 est associée à de nombreux cancers et à un mauvais pronostic du cancer du côlon (Li et al., 2014), de la prostate (Zhao et al., 2010), du sein (Jana et al., 2014) et du poumon (Bhat et al., 2014). Cox-2 interagit également avec NF-κB (Liao et al., 2015) et p53 (Corcoran et al., 2005), étant eux aussi impliqués dans la cancérogenèse.

🔗🔗🔗 / 🔗🔗🔗 🔗🔗

Les interleukines (IL) sont secrétées par les cellules du système immunitaire (et majoritairement par les lymphocytes Th (T helper) CD4⁺ (cluster of differentiation 4), possédant de nombreuses fonctions guidant à la maturation, la différenciation, la migration et l'adhésion des cellules immunitaires (Dröge, 2002; Sahoo & Im, 2010). Ces protéines initient des réponses immunitaires après liaison avec des récepteurs spécifiques. Leur réponse dépend du ligand et du récepteur à la surface de la cellule impliqués et du signal en cascade activé. Ces régulatrices et messagères du système immunitaire peuvent être induites suite à une production accrue d'ERO, *via* l'activation des voies redox-sensibles SFK-JNK et p38-NF-κB (Choi et al., 2015). Les interleukines peuvent avoir aussi bien une action anti-inflammatoire (i.e. IL-4, IL-10) que pro-inflammatoire (i.e. IL-1β, IL-17), et peuvent être impliquées dans la cancérogenèse *via* différents mécanismes dont la méthylation, l'immuno-inflammation, l'autophagie et la transition épithélio-mésenchymateuse et font l'objet d'immunothérapies ciblées dans le cadre du traitement du cancer (Anestakis et al., 2015).

Les interleukines pro-inflammatoires IL-1 β , IL-6 et IL-17 seraient impliquées dans la cancérogène et seraient la cible de thérapies combinées. Elles seraient plus particulièrement impliquées dans la transition épithélio-mésenchymateuse et contribueraient ainsi au processus métastatique (Anestakis et al., 2015). Une augmentation des cytokines pro-inflammatoires IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12 et IL-18 a été observée dans différents types de cancer dont le poumon (Gomes et al., 2014). De plus, les interleukines anti-inflammatoires IL-4 et IL-10 seraient également impliquées dans la cancérogenèse pulmonaire, *via* la stimulation de la croissance tumorale (Gomes et al., 2012; Lan et al., 2006). A contrario, IL-24 aurait un effet anti-tumoral et ferait partie des approches thérapeutiques du cancer du poumon (Zhang et al., 2013).

2.2.4. □ERO, voies de signalisation redox-sensible et cancer du poumon

En plus de l'instabilité génomique, les ROS peuvent spécifiquement activer certaines voies de signalisation et ainsi contribuer au développement tumoral par la régulation de la prolifération cellulaire, l'angiogenèse et les métastases (Storz, 2005).

2.2.4.1. La voie PI3K/AKT/mTOR

La voie PI3K/AKT/mTOR est une voie de signalisation intracellulaire redox-sensible jouant un rôle clé dans l'homéostasie cellulaire par sa fonction de régulation de l'apoptose, de la croissance et du cycle cellulaire, ainsi que de l'angiogenèse (Figure 20). Elle est fréquemment dérégulée dans les cellules cancéreuses, la plupart des protéines la constituant pouvant être mutée, déplétée ou surexprimée selon les cas (McCubrey et al., 2012). La majorité de ces protéines constitutives sont des gènes suppresseurs de tumeurs ou des proto-oncogènes, dont la mutation peut favoriser le développement d'un processus tumoral.

Dans le cas du cancer du poumon, cette voie peut réguler le développement tumoral, la croissance et la prolifération tumorales (Sun et al., 2015). Elle est la cible de nombreuses thérapies et son inhibition permet notamment la transition épithélio-mésenchymateuse et l'angiogenèse (Chen et al., 2016).

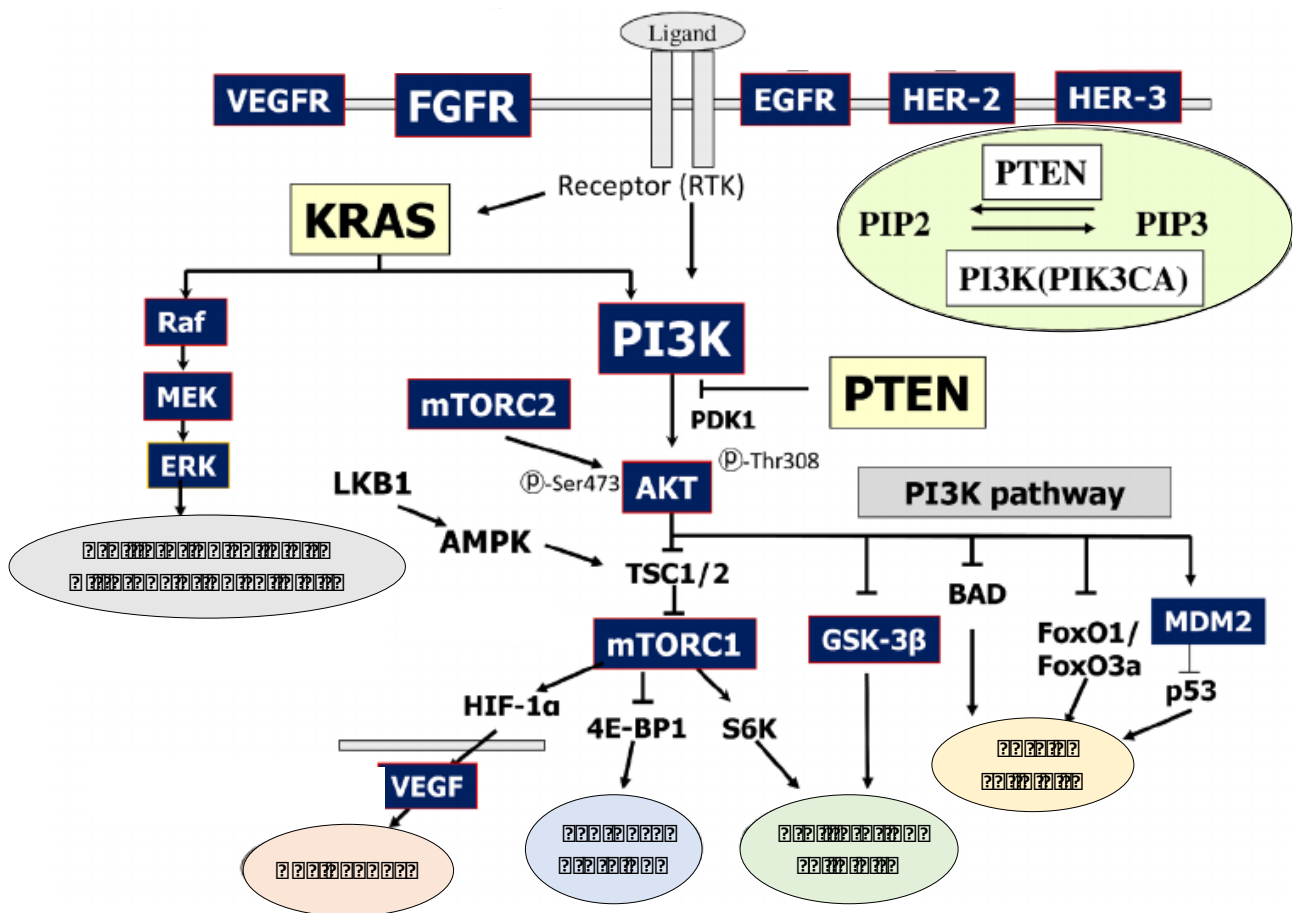


Figure 20. Activation de la voie PI3K/AKT/mTOR et ses conséquences. (Oda et al. 2015)

2.2.1. ERO, apoptose et cancer du poumon : rôle de la caspase-3

La voie MAPK/Erk1/2 est également une voie redox-sensible. Il existe 4 kinases MAP (MAPK) p38 : α , β , γ et σ activées dans les cellules immunitaires par des cytokines inflammatoires mais également par des hormones et des stress tels que des chocs thermiques et osmotiques. Les MAPK p38 peuvent à la fois être activées par des cytokines et avoir un rôle conséquent dans la réponse immunitaire en régulant l'expression d'un bon nombre de cytokines inflammatoires. Les MAPK ont également un rôle important dans la croissance cellulaire, l'apoptose et la régulation de l'expression génique. p38 MAPK est souvent associée à un effet anti-tumoral car elle régule négativement la survie cellulaire et la prolifération (Coulthard et al., 2009).

Dans une étude *in vitro* sur des cellules cancéreuses pulmonaires, il a été observé que p38 MAPK régulait l'expression d'EGFR *via* une augmentation de la stabilité de p53 (Park et al., 2016). Une autre étude *in vitro* a mis en évidence que la suppression de la voie p38 MAPK engendrait une augmentation de l'invasion et de la migration des cellules A549 (Xia et al., 2016) mais également une diminution de la capacité de réparation de l'ADN (Tsai et al., 2012). Dans le cas du cancer du poumon, la stimulation de la voie p38 MAPK a donc un effet anti-tumoral *via* son rôle dans l'apoptose et l'autophagie (Figure 21).

2.2.1. ERO, apoptose et cancer du poumon : rôle de la caspase-3

Les phénomènes d'apoptose peuvent être induits *via* l'action de différentes substances dont des cytokines (i.e. TNF- α) et des agents chimio-thérapeutiques. Dans de nombreux cas, l'apoptose est accompagnée d'une augmentation des ERO tels que H_2O_2 et $O_2\cdot$ ce qui suggère que les ERO sont des médiateurs de l'apoptose (Kim et al., 2000). La mort cellulaire peut être caspase-dépendante ou caspase-indépendante (Hyman & Yuan, 2012). L'activation des caspases est un événement apoptotique central. Les caspases sont des protéases à cystéine, présentes dans l'organisme sous forme inactive (pro-caspases). En réponse à des stimuli intrinsèques (cytochrome c) ou extrinsèques (les complexes : FasL (ligands extracellulaires)-Fas, TNF ligand-TNF-R1 et DR4/5-Apo2 L/TRAIL), les pro-caspases se clivent et deviennent actives (Parrish et al., 2013). Il existe 10 caspases identifiées qui peuvent être pro- ou anti-apoptotiques (Kim et al., 2000). Parmi elles, la caspase-3 reçoit une attention particulière du fait de sa forte implication dans le processus pro-apoptotique.

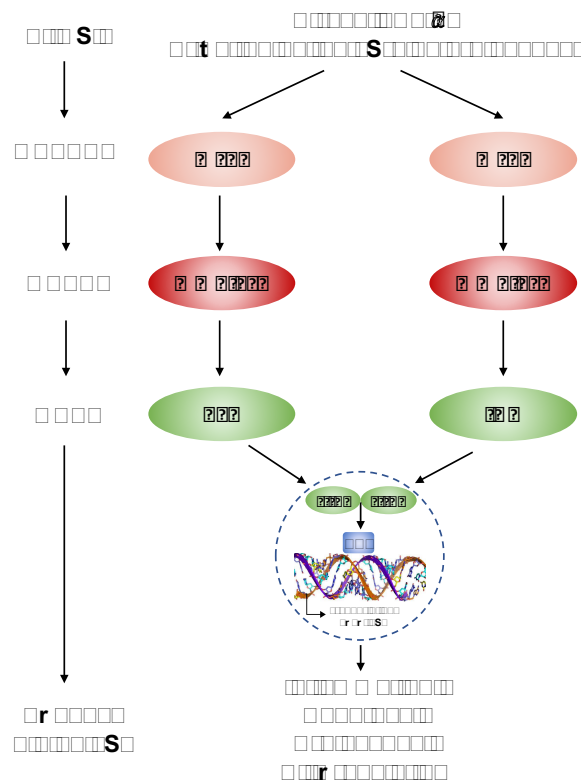
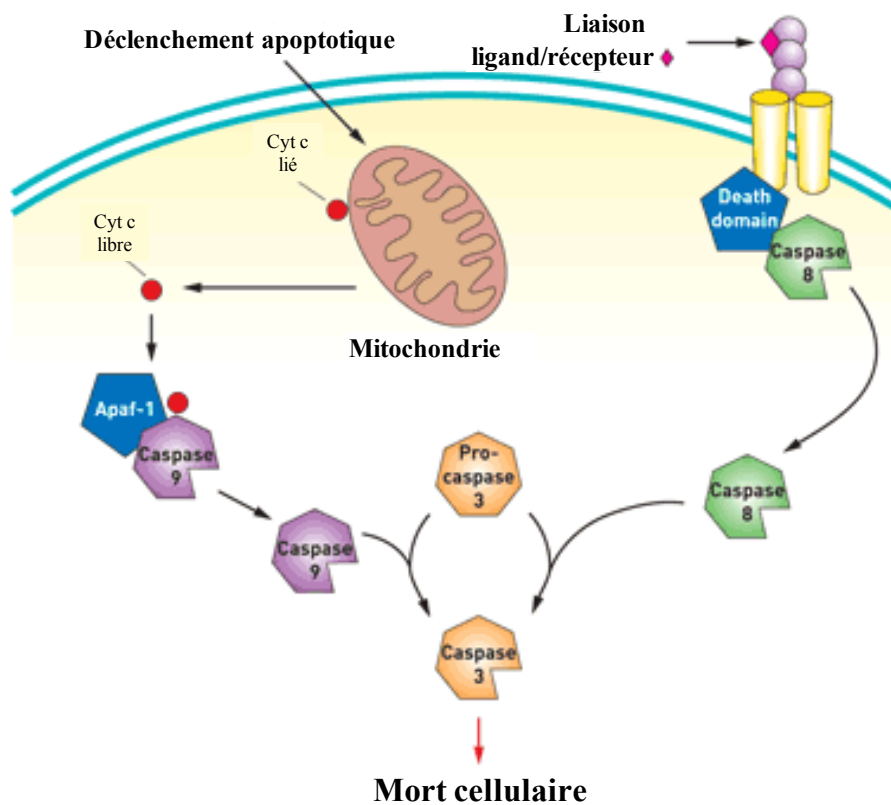


Figure 21. Activation de la voie p38 MAPK et réponses biologiques associées. Adaptée de (Rana et al. 2013) et de <http://35.8.152.15/faculty/gallo/~prev-fulltextGallo.html>



<https://pubs.acs.org/cen/news/84/i38/8438molecule.html>

Figure 22. Voies apoptotiques menant à l'activation de caspase-3. Cyt c : Cytochrome c, Apaf-1 : Apoptotic peptidase activating factor 1.

L'apoptose caspase-dépendante peut être initiée par deux voies différentes (Figure 22). Dans le premier cas, des liaisons ligand/récepteur sont impliquées. Dans le second cas, la libération du cytochrome-c à partir de la mitochondrie dans le cytosol va faciliter l'activation de caspase 9 (caspase initiateur), qui ensuite active en aval d'autres caspases dont caspase-3. Caspase-3 est une caspase exécutrice qui cause la digestion des protéines structurales dans le cytoplasme, la dégradation de l'ADN chromosomal, et éventuellement la phagocytose des cellules affectées. Ainsi résulte la mort cellulaire par apoptose (Movassagh & Foo, 2008).

Concernant le cancer du poumon, une relation inverse a été établie entre l'expression de la caspase-3 et de VEGF, qui est un facteur angiogénique (Volm et al., 1999). Une étude évaluant la caspase-3 suite à un traitement a montré qu'une activation de caspase-3 induisait l'apoptose des cellules A549 (Lü, 2016).

Le terme « nutrition » comprend aussi bien les apports nutritionnels (alimentation) que les dépenses énergétiques au travers de l'activité physique. En effet, l'OMS définit la nutrition comme « l'apport alimentaire qui répond aux besoins de l'organisme. Une bonne nutrition, c'est-à-dire un régime adapté et équilibré, et la pratique régulière d'exercice physique, sont autant de gages de bonne santé ». Dans cette partie, nous allons donc aborder les effets de l'activité physique *via* des adaptations et l'alimentation *via* des apports en micronutriments d'intérêt sur le maintien de l'équilibre redox et la modulation des mécanismes redox-sensibles au sein de l'organisme.

Le terme « nutrition » comprend aussi bien les apports nutritionnels (alimentation) que les dépenses énergétiques au travers de l'activité physique. En effet, l'OMS définit la nutrition comme « l'apport alimentaire qui répond aux besoins de l'organisme. Une bonne nutrition, c'est-à-dire un régime adapté et équilibré, et la pratique régulière d'exercice physique, sont autant de gages de bonne santé ». Dans cette partie, nous allons donc aborder les effets de l'activité physique *via* des adaptations et l'alimentation *via* des apports en micronutriments d'intérêt sur le maintien de l'équilibre redox et la modulation des mécanismes redox-sensibles au sein de l'organisme.

3.1.1. Effets de l'activité physique

L'activité physique (AP) implique des changements à différents niveaux : composition corporelle, niveaux d'hormones, inflammation systémique, fonctions des cellules immunitaires, qui sont de possibles médiateurs du rôle protecteur de l'activité physique.

Un exercice aigu engendre une augmentation de l'activité mitochondriale et des périodes répétées d'exercice augmenteraient la respiration mitochondriale, l'utilisation du glucose et de l'oxydation des acides gras (Scheele et al., 2009), et l'exercice chronique diminuerait les triglycérides (Samy et al., 2015).

Un exercice aigu engendre une augmentation de l'activité mitochondriale et des périodes répétées d'exercice augmenteraient la respiration mitochondriale, l'utilisation du glucose et de l'oxydation des acides gras (Scheele et al., 2009), et l'exercice chronique diminuerait les triglycérides (Samy et al., 2015).

Les ERO induites par la pratique d'une activité physique produisent une réponse hormonale qui, à bas niveaux, a des effets promoteurs de santé et des effets adaptatifs. L'activité physique augmente, entre autres, les niveaux de l'épinéphrine, du cortisol, d'hormones de croissance ayant des effets immuno-modulateurs (Nieman, 2001). Des épisodes d'exercice aigu induisent une augmentation des hormones du stress et des myokines (Ganesan et al., 2010) qui ont un effet antiprolifératif direct sur les cellules cancéreuses mammaires et colorectales (Aoi et al., 2013; Hojman et al., 2011).

2022/2023, 1^{er} semestre, 2022/2023, 1^{er} semestre

En plus des changements métaboliques, l'exercice augmente les ERO et induit des mécanismes de défenses endogènes antioxydants (Gomez-Cabrera et al., 2008). Effectivement, le stress oxydatif induit par l'activité physique joue un rôle dans l'induction des mécanismes de défenses cellulaires, conduisant au retardement du processus de vieillissement et à la diminution de l'incidence des maladies liées au stress.

L'exercice intense est associé à une augmentation de la production des RL et ERO ainsi qu'un stress au niveau du réticulum endoplasmique (ER-stress). A un niveau excessif, il engendre des dommages musculaires et la mort cellulaire. Cependant, une augmentation du stress oxydatif et du ER-stress sont nécessaires pour les améliorations adaptatives (Ost et al., 2016). L'ER-stress est lié aux dysfonctionnements dans la mitochondrie et à la génération d'ERO dans le muscle et est un mécanisme adaptatif dans le muscle squelettique durant l'exercice mais aussi en réponse à des altérations de l'alimentation (Rayavarapu et al., 2012).

L'exercice régulier conduit à l'induction des systèmes antioxydants et de réparation des dommages permettant une protection contre les ERO et d'atténuer le processus de vieillissement. Un entraînement en endurance conduit, quant à lui, à une augmentation de la densité mitochondriale et de la capacité oxydative (Scheele et al., 2009). Ainsi, à intensité modérée, l'exercice peut être considéré comme un antioxydant car il permet une augmentation adaptative des enzymes antioxydantes (Gomez-Cabrera et al., 2008).

Les ERO produits suite à un exercice engendrent l'activation de p38 MAPK, ainsi que ERK1 et ERK2 (Gomez-Cabrera et al., 2005) et moduleraient également la voie de signalisation PI3K/AKT/mTOR (Ma et al., 2013).

Par ailleurs, la génération d'ERO suite à l'exercice est essentielle à l'activation de certains mécanismes. Ainsi, la génération de superoxyde et de peroxyde d'hydrogène à partir de la mitochondrie du muscle est cruciale pour l'induction des cytokines pro-inflammatoires telles que les myokines (Scheele et al., 2009). Un comportement sédentaire engendre une diminution de l'expression de PCG-1 α tandis que l'activité physique engendre une surexpression de PCG-1 α , qui est coactivateur transcriptionnel médiant de nombreux effets cellulaires de l'activité physique (Russell et al., 2005). PCG-1 α est un régulateur clé de la biogenèse mitochondriale dans le muscle squelettique et aurait un rôle dans la régulation des gènes de défenses

antioxydantes. Une déplétion PGC-1 α chez la souris a eu pour résultat une diminution des enzymes piègeuses de ERO dans le muscle cardiaque : SOD2, ThxR2 (thioredoxin reductase-2) et CAT (Olsen et al., 2008). De plus, PGC-1 α aurait un rôle clé dans les adaptations à long terme à l'exercice (Handschin & Spiegelman, 2008). Une perte de PGC-1 α engendre l'induction transcriptionnelle de nombreux gènes dans le muscle, qui prennent part à l'inflammation locale ou systémique (Handschin & Spiegelman, 2008). L'investigation des protéines sécrétées à partir de la surexpression de PGC-1 α dans le muscle squelettique a amené à identifier l'irisine et la meteorin-like (metrnl) comme des myokines induites par l'exercice avec de potentiels effets bénéfiques pour la santé (Boström et al., 2012; Rao et al., 2014). Au cours d'un exercice musculaire, l'expression PGC-1 α est augmentée dans le muscle. Ceci induit l'expression de FNDC5 (type I membrane protéine fibronectin type III domain containing 5) qui une fois clivée va engendrer la formation de l'irisine (Halpern, 2016). Une surexpression de l'irisine entraîne une augmentation de la dépense énergétique totale et une perte de poids, améliore la tolérance au glucose et évite l'insulino-résistance chez les rats ayant des régimes enrichis en lipides (Boström et al., 2012). Le taux d'irisine dans le sérum est négativement associé à l'hyperglycémie, l'hypertriglycémie, et l'adiposité viscérale chez des patients atteints de diabète de type II (Kurdiova et al., 2014).

Le muscle squelettique est un organe endocrinien produisant et sécrétant des myokines en réponse aux contractions musculaires, ainsi influençant le métabolisme d'autres tissus et organes.

Le muscle squelettique est un organe endocrinien produisant et sécrétant des myokines en réponse aux contractions musculaires, ainsi influençant le métabolisme d'autres tissus et organes. Les contractions musculaires semblent provoquer une réponse cytokinique *via* des mécanismes TNF- α et NF- κ B dépendants. En effet, le muscle squelettique a la capacité d'exprimer de nombreuses myokines et celles-ci prennent part au réseau permettant les adaptations induites par l'exercice (Scheele et al., 2009) (Figure 23). La réponse cytokinique à l'exercice semble avoir un rôle important anti-inflammatoire, métabolique et physiologique. Le fait que l'exercice provoque une augmentation de la production des cytokines permet d'établir un lien potentiel entre l'activité contractile et la fonction immunitaire.

Les cellules immunitaires ont un fort pourcentage d'acides gras polyinsaturés au sein de leur membrane plasmique et sont particulièrement sensibles aux changements du statut antioxydant car de nombreuses réactions se font à partir des radicaux libres de l'oxygène (Ganesan et al., 2010). En effet, les ERO peuvent induire des facteurs de transcription redox-

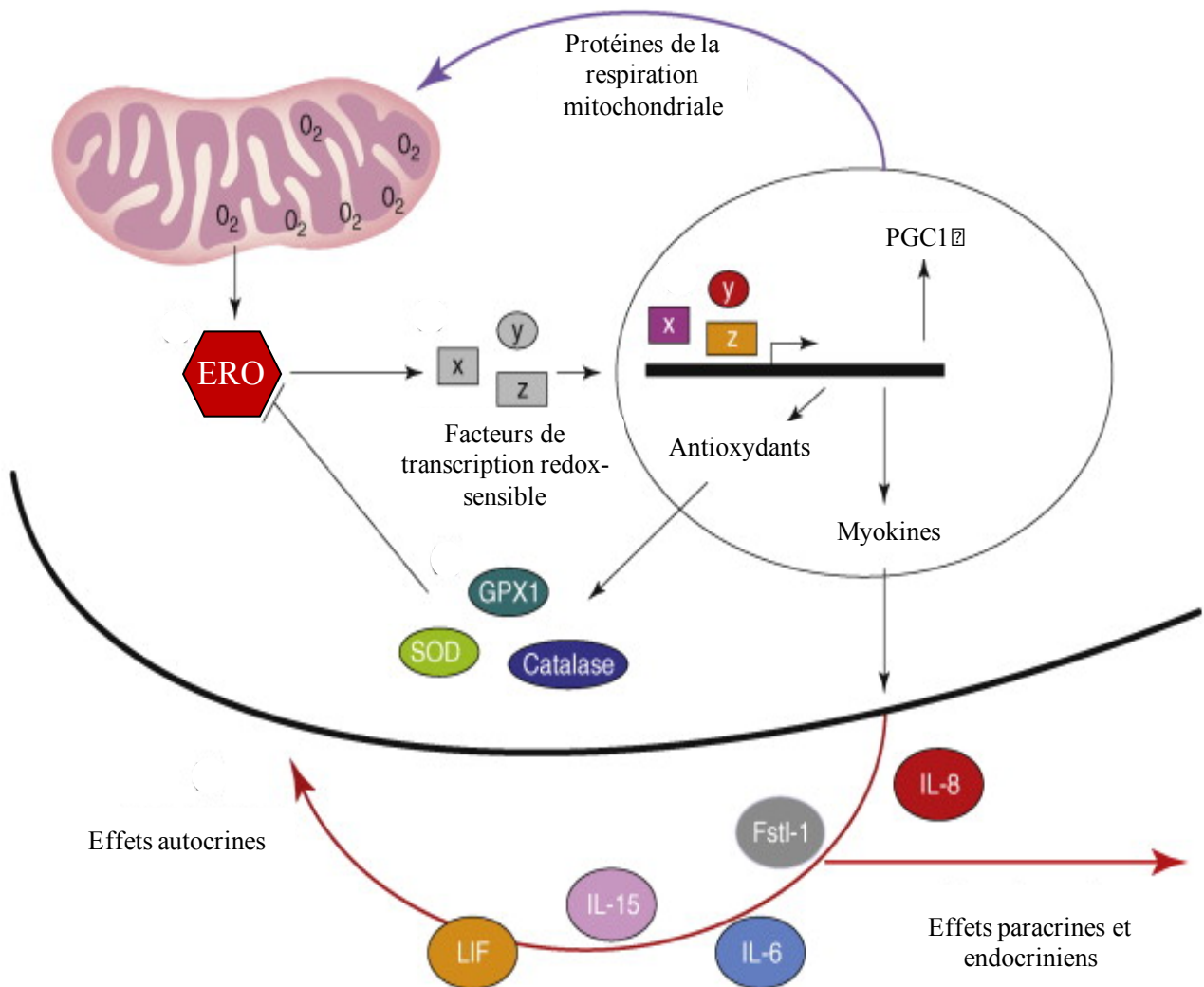


Figure 23. Activation de la signalisation par les ERO dans le muscle squelettique en réponse à un exercice (Scheele et al., 2009)

sensibles, ce qui a pour résultat l'activation de cytokines inflammatoires par le muscle durant l'exercice (Pedersen & Febbraio, 2008) et peuvent avoir un rôle de médiateurs de la signalisation cellulaire au sein du muscle squelettique (Scheele et al., 2009). D'un côté, l'infiltration des cellules immunitaires dans les tissus adipeux blancs et l'inflammation qui suit, sont positivement corrélées avec le développement de certaines pathologies (Haffner, 2006; Hotamisligil, 2006). D'un autre côté, certaines cytokines induites par l'exercice, produites et secrétées par le muscle squelettique semblent avoir des effets anti-inflammatoires et modifient le métabolisme cellulaire (Pedersen et al., 2003).

3.1.2. □ Les effets de l'activité physique sur l'initiation et la progression tumorale du cancer du poumon

□ □ □ □ / □ □ □ □ □ □ □ □

Des études longitudinales ont permis de mettre en évidence l'effet de l'activité physique (AP) sur le risque d'avoir un cancer du poumon. Il semblerait que la pratique d'activité physique soit inversement associée à l'incidence du cancer du poumon et ce d'autant plus si c'est une AP d'intensité modérée ou élevée (Friedenreich & Orenstein, 2002; Sinner et al., 2006; Sprague et al., 2008; Steindorf et al., 2006; Tardon et al., 2005). Ainsi, l'intensité de l'activité physique de loisir serait inversement associée avec le risque de mort prématurée par cancer, chez les hommes. Des auteurs ont montré que l'AP permettait une diminution du risque de cancer du poumon chez les femmes (âgées) (Sinner et al., 2006), tandis que d'autres affirment que cette diminution du risque n'est valable que pour les hommes (Lee et al., 1999). Lee et al. (1999) ont mis en évidence qu'une activité physique modérée sur six à huit heures dans la semaine, soit une dépense énergétique supplémentaire de 12 600 joules par semaine, pourrait réduire le risque de cancer du poumon de façon significative. Steindorf et al. (2006) ont estimé que la réduction du risque d'avoir un cancer du poumon n'était significative qu'en pratiquant des activités sportives quelles qu'elles soient chez les hommes, du vélo et des activités physiques vigoureuses non-professionnelles chez les femmes. L'AP diminuerait le risque de cancer notamment grâce à : une augmentation de la fonction pulmonaire, une diminution des concentrations d'agents carcinogènes dans les poumons, une amélioration de la fonction immunitaire, une réduction de l'inflammation, une amélioration de la capacité de réparation de l'ADN et d'une diminution du niveau des hormones de croissance (dont IGF-1) (Anzuini et al., 2011; Emaus & Thune, 2011).

L'activité physique permettrait également de maintenir un Indice de Masse Corporelle (IMC) bas en réduisant la résistance à l'insuline et en augmentant le cholestérol HDL, cela étant associé à une diminution du risque de cancer mais aussi en diminuant les taux plasmatiques d'insuline et d'IGF-1 (ceci favorisant la prolifération cellulaire) (Friedenreich & Orenstein, 2002).

Même si dans un premier temps, l'AP de type aérobie produit des espèces réactives dérivées de l'oxygène (ERO), il semblerait que des adaptations physiologiques (Radák et al., 1999) (régulation de la synthèse et de l'activité des composés antioxydants et anti-inflammatoires) permettent par la suite de supprimer ces effets délétères et d'engendrer des effets bénéfiques en termes de préventions du cancer du poumon (Gonçalves & Novaes, 2012). En effet, l'AP de type aérobie permettrait d'améliorer l'activité antioxydante et des enzymes de phase II dans le poumon, ce qui aurait des effets anti-cancer (Duncan et al., 1997; Teixeira et al., 2009). L'AP aurait également un impact sur des hormones peptidiques tels que les Insulin-like Growth Factor (IGFs) (H. Yu & Rohan, 2000) et leurs protéines de liaison (IGFBPs) ; une augmentation de IGFBP-3 (Insulin-like Growth Factor Binding Protein-3) serait notamment un facteur de diminution du risque de cancer (Mao et al., 2003).

2.2.2.2. L'impact de l'activité physique sur la croissance tumorale

L'activité physique joue également un rôle dans la prévention secondaire de nombreuses maladies telles que le diabète, le cancer, l'hypertension ou d'autres maladies cardiovasculaires (Gomez-Cabrera, 2014). Bien qu'aucun consensus sur le type, la durée ou l'intensité de l'activité n'ait été trouvé, il existe des recommandations pour les patients atteints d'un cancer (Humpel & Iverson, 2005).

Higgins et al. (2014) ont réalisé une étude chez les rats permettant de mettre en évidence que l'exercice physique (de type aérobie) ralentissait la progression tumorale pulmonaire, peut-être grâce à l'activation de p53 et à la stimulation de l'apoptose. D'autres auteurs ont également conclu que l'activité physique permettait de diminuer la croissance tumorale (foyers acidophiles moins importants dans le pancréas) (Roebuck et al., 1990). Une autre étude animale visant à montrer l'effet de l'activité physique volontaire sur la croissance tumorale a permis de mettre en évidence que ce type d'exercice induisait une suppression de la croissance tumorale, *via* notamment des mécanismes IL-6 dépendants et épinéphrine-dépendants tels que la mobilisation et la redistribution des cellules NK (Pedersen et al., 2016). En effet, l'activité physique a un

impact sur le système immunitaire notamment en augmentant le niveau de cytokines dont TNF- α qui est une cytokine pro-inflammatoire pouvant avoir un effet anti-tumoral et anti-infectieux par stimulation de l'activité phagocytaire des leucocytes. Par ailleurs, une activité physique régulière permet d'augmenter l'infiltration et l'activation des cellules NK, qui sont connues pour engendrer la mort des cellules cancéreuses (Deng et al., 2014; Pedersen et al., 2016).

Peu d'études ont comparé l'activité physique des patients atteints d'un cancer du poumon par rapport à celle de sujets « en bonne santé ». Grâce à un GPS et un accéléromètre, Granger et al. (2014) ont pu quantifier de façon précise l'activité de ces patients et ont mis en évidence qu'ils avaient une activité physique moins importante que la population contrôle (en termes de nombre de pas par jour notamment). Jones et al. (2011) est l'une des premières équipes de recherche à évaluer l'effet de l'activité physique en aérobie sur le statut oxydatif des patients atteints du cancer du poumon. L'activité physique en aérobie augmente de manière significative les taux de F2-isoprostanes urinaires des patients atteints d'un cancer du poumon non à petites cellules. Une étude humaine indique qu'un programme pré-opératoire court d'exercice en aérobie (deux semaines) augmenterait de manière significative les concentrations urinaires de F2-isoprostanes en post-opératoire (Jones et al., 2011). D'autres équipes ont mis en évidence une amélioration du système de défense antioxydant, engendrée par des exercices réguliers en endurance (Clarkson & Thompson, 2000; Radak et al., 2008). Par ailleurs, il semblerait que la pratique d'une activité physique permette une réponse adaptative au stress oxydatif (Rebillard et al., 2013).

L'activité physique aurait également des effets sur les métastases. Selon une étude de Giovannucci et al. (2005), une activité vigoureuse pratiquée plus de 3 heures par semaine permettrait de réduire le développement métastatique du cancer de la prostate. De même, l'exercice aigu permettrait de diminuer les métastases pulmonaires d'un mélanome (Davis et al., 1998). D'autres auteurs ont montré qu'une activité physique spontanée permettrait d'améliorer la fonction immunitaire naturelle (par l'intermédiaire des Natural Killers notamment) mais aucun effet n'a été relevé sur l'incidence des métastases (MacNeil & Hoffman-Goetz, 1993).

Grâce aux avancées de la médecine, le nombre de patients guérissant d'un cancer est de plus en plus important. La présence marquée de certains marqueurs inflammatoires tels que la TNF- α , IL-6 ou encore la PR-C est associée à une mauvaise santé chez les patients survivants d'un cancer (Sabiston & Brunet, 2012). Or, durant l'exercice, les cellules immunitaires de la

circulation sont mobilisées de façon intensive (Pedersen et al., 2003) et l'activité physique pourrait protéger de l'inflammatoire chronique (Fairey et al., 2002).

Le rôle de la nutrition dans la prévention du cancer

La nutrition est aujourd'hui au centre de l'attention car elle joue un rôle clé dans de nombreuses maladies chroniques telles que les cancers. Plus de 500 composés issus de la nourriture ont été identifiés comme pouvant modifier le processus du cancer *via* des modifications au niveau de la différenciation cellulaire, de la réparation de l'ADN, de la réponse inflammatoire, de la réponse hormonale, de la croissance tumorale, de l'apoptose et du métabolisme des carcinogènes (Milner, 2008). Concernant le cancer du poumon, des études font état de l'intérêt de certains micronutriments dans les trois niveaux de préventions. Ainsi, en prévention primaire, la consommation de fruits n'aurait pas d'effets protecteurs par l'intermédiaires de substances actives (vitamines, oligo-éléments, polyphénols ...) ; par contre, la consommation de légumes, et notamment de légumes à feuilles vertes ou encore la consommation de thé vert permettraient de diminuer le risque d'avoir un cancer du poumon (Tang et al., 2009; Tarrazo-Antelo et al., 2014; Yun et al., 2008). Selon d'autres auteurs, des sous-groupes botaniques spécifiques de fruits et légumes auraient un rôle protecteur et serait inversement associé au risque du cancer du poumon chez l'homme ; parmi ces sous-groupes, il y aurait les rosacées (pompes, pêches, nectarines, prunes, poires et fraises), les convolvulacées (pompes de terre douces et igname) et les ombellifères (carottes) (Wright et al., 2008).

Certains micronutriments aux propriétés antioxydantes ont un potentiel anti-cancer établi, notamment car ils permettent de réduire les dommages oxydatifs, la prolifération et l'angiogenèse et d'augmenter l'apoptose. Dans cette partie, nous allons donc voir brièvement quels micronutriments ont des propriétés bénéfiques pour la santé et nous nous intéresserons un peu plus en détail à deux micronutriments antioxydants et avec de nombreuses autres propriétés : la bétaine et la C-Phycocyanine.

3.2.1. Les vitamines

3.2.1.1. La vitamine A

L'organisation mondiale de la santé préconise un apport journalier de 5000 IU en vitamine A pour les adultes. La vitamine A et ses précurseurs jouent un rôle ambivalent dans l'initiation et la progression du cancer du poumon. Tout d'abord, les caroténoïdes (pro-vitamine A) permettraient de réduire le risque de cancer du poumon (Sommer & Vyas, 2012), notamment grâce à leur action antioxydante. En effet, les caroténoïdes interagissent avec l'oxygène singulet et peuvent ainsi empêcher l'oxydation de plusieurs substrats biologiques dont les acides gras polyinsaturés. Par contre, une supplémentation en β -carotène, précurseur de la vitamine A, augmenterait ce risque, de façon significative (Sommer & Vyas, 2012).

La vitamine A joue un rôle important dans le développement pulmonaire, la croissance et la différenciation cellulaire et la signalisation de la voie de la vitamine D (de Bittencourt et al., 2013; Poulain et al., 2009). La consommation de vitamine A augmente la concentration des métabolites actifs de la vitamine A dont l'acide rétinoïque (Arnhold et al., 1996). L'acide rétinoïque et le ligand du récepteur rétinoïde X (RXR) assistent la signalisation du récepteur de la vitamine D et suppriment la dégradation de la vitamine D circulante (Sánchez-Martínez et al., 2006). Ainsi, la vitamine A permettrait d'assister la vitamine D dans la prévention des cancers du poumon chez les fumeurs (Cheng et al., 2014).

Le rétinol joue également un rôle ambivalent et important dans l'équilibre redox. En effet, la vitamine A a un rôle antioxydant en piégeant les radicaux peroxydes (Palace et al., 1999). Cependant, la vitamine A et ses métabolites ont également un rôle pro-oxydant pouvant causer des dommages oxydatifs, une perturbation du cycle cellulaire et la mort cellulaire (de Bittencourt et al., 2013). Ce rôle pro-oxydant n'est pas toujours délétère. Une étude sur des cellules A549 (cellules tumorales pulmonaires humaines) a montré qu'un effet pro-oxydant de la vitamine A (augmentation de la peroxydation lipidique et de la carbonylation des protéines) permettaient d'activer p38 MAPK et NF- κ B (de Bittencourt et al., 2013).

2.2.2.3 Les vitamines

Les folates font partie de la famille des vitamines B. Il a été montré qu'un traitement à l'acide folique (vitamine B9) permettait d'inhiber l'augmentation de la peroxydation lipidique et la diminution des défenses antioxydantes induites par un stress psychologique (Budni et al., 2013). Les composés du métabolisme du carbone, comme les folates (vitamine B9), la cobalamine (vitamine B12), la riboflavine (vitamine B2), la pyridoxine (vitamine B6) ou la méthionine, sont impliqués dans la régulation de la réaction de la méthylation de l'ADN. La déficience en folates est l'une des carences en vitamines les plus communes (Hercberg & Galan, 1992). Une carence en folates induit et accélère la cancérogenèse à cause de perturbations de différents processus, notamment l'altération de la balance des précurseurs de l'ADN (la purine et la pyrimidine), mais également l'inhibition de la réparation de l'ADN. De plus, la méthylation de la cytosine est altérée, conduisant à une hypométhylation globale de l'ADN et/ou des changements dans la méthylation des gènes spécifiques (Duthie, 2011). Chez l'humain, une déficience en folates induit des dommages chromosomiques et est associée à une augmentation du risque de différents cancers et notamment celui du poumon (Duthie, 2011). Peu d'études concernent spécifiquement le cancer du poumon. Mais il a été mis en évidence que les concentrations en folates sont significativement basses dans les cancers du poumon à petites cellules (Piyathilake et al., 2000).

2.2.2.4 La vitamine C

La vitamine C (acide ascorbique) est présente dans les épinards et les agrumes, il est recommandé d'en consommer 110 mg par jour. En trop importante quantité, elle devient cependant pro-oxydante. Au niveau de l'organisme, elle est présente dans les fluides extra-cellulaires, piègeurs très efficaces de l'anion superoxyde, du peroxyde d'hydrogène et de l'hydroxyde. Cette vitamine peut agir en milieu aqueux pour empêcher la peroxydation lipidique et va protéger les membranes cellulaires.

La vitamine C serait associée à la diminution du risque de certains cancers dont celui du poumon. En effet, grâce à ses propriétés antioxydantes, la vitamine C serait capable de protéger les cellules contre les dommages moléculaires étant associés à la cancérogenèse et pourrait moduler la transduction et l'expression génétique (Schlueter & Johnston, 2011).

2.2.2.3 Les vitamines

Les apports journaliers recommandés en vitamine D sont de 600 IU. Un déficit en vitamine D est couramment observé chez les patients atteints d'un cancer (Harvie et al., 2014). La vitamine D est inversement associée au risque du cancer du poumon chez les non-fumeurs et les anciens fumeurs mais pas chez les fumeurs actuels (Cheng et al., 2014). La consommation de tabac est associée à de faibles apports en vitamine D. La vitamine D améliore l'immunité dans le poumon et inhibe plusieurs voies de signalisation de la cancérogenèse du poumon (Cheng et al., 2014). Elle inhibe certaines voies de signalisation du cancer du poumon dont les mutations d'EGFR, les dérégulations du système Wnt- β -catenine et les mutations de K-Ras, qui sont associées au cancer du poumon non à petites cellules (Cheng et al., 2014).

2.2.2.4 Les vitamines

La Vitamine E (tocophérol, α -tocophérol) est la principale vitamine antioxydante liposoluble. Elle est présente dans les huiles végétales, les germes de blé, les noix, certains légumes à feuilles vertes. Chez l'humain, l'apport journalier conseillé est de 12 mg. Elle est capable de piéger l'oxygène singulet et de réagir avec l'hydroxyde (le plus puissant des radicaux libres nuisibles). La vitamine E rompt la réaction en chaîne de la peroxydation lipidique, ce qui représente le moyen de défense principal des membranes cellulaires contre les dommages oxydatifs (Hanson et al., 2013). Une augmentation des apports en vitamine E permettrait une diminution du niveau des protéines carbonylées sériques et une augmentation du niveau de glutathion (de Batlle al., 2010). Présente dans les lipo-protéines et les membranes, elle se re-synthétise à partir de la vitamine C et un antioxydant endogène, le glutathion. La vitamine E peut agir seule mais agit souvent en synergie avec le sélénium, la vitamine C ou le glutathion.

Il a été montré que les tocophérols avaient des effets protecteurs et réduisaient le risque d'avoir un cancer du poumon chez les hommes et les femmes (Roswall et al., 2010). Certains auteurs notent ces observations uniquement chez les hommes fumeurs (Woodson et al., 1999) et chez les femmes non-fumeuses (Wu et al., 2014).

3.2.2. Les oligo-éléments

Différents oligo-éléments présents dans la nourriture peuvent jouer un rôle dans le système de défense antioxydant grâce à leur fonction de cofacteurs :

- le sélénium : cofacteur de la glutathion peroxydase
- le cuivre : cofacteur de la SOD et métal dit de transition dans le déclenchement des réactions conduisant à la formation de ERO
- le zinc : cofacteur de la SOD, peut protéger les groupements thiols des protéines et peut inhiber partiellement les réactions de formation d'espèces induites par le fer ou le cuivre.

Les liens entre le risque d'avoir un cancer du poumon et l'apport en minéraux dépendent de l'oligo-élément en question, du statut fumeur et du sexe des sujets. Le magnésium augmenterait le risque de cancer du poumon chez les hommes et les fumeurs, alors que le fer aurait tendance à le diminuer uniquement chez les femmes (Mahabir et al., 2010). D'autres études ont mis en évidence qu'une alimentation riche en magnésium, en zinc et en cuivre était associée à une diminution du risque de cancer du poumon (Mahabir et al., 2007, 2008). Enfin, des basses concentrations de sélénium contribueraient au développement du cancer du poumon (Gromadzińska et al., 2008)

3.2.3. La bêtaïne

La bêtaïne a été découverte il y a plus de 60 ans suite à l'extraction de saccharose dans les betteraves à sucre (*Beta Vulgaris*) (Cromwell & Rennie, 1953).

Les bêtaïnes : des ammoniums quaternaires

Les bêtaïnes sont des ammoniums quaternaires dérivés des acides aminés (Liebeke & Bundy, 2013). La glycine bêtaïne ($C_5H_{11}NO_2$) également nommée triméthylglycine (N,N,N-triméthylammonioacetate) est la forme la plus courante mais il existe beaucoup d'analogues ou dérivés: lycine, oxyneurine, proline bêtaïne, alanine bêtaïne ... (Craig, 2004).

La bêtaïne est un zwitterion avec un groupe tri-méthylammonium chargé positivement et un groupe carboxyle chargé négativement, qui est stable et hautement soluble dans l'eau. La bêtaïne a un poids moléculaire de 117.2, a pour formule moléculaire $C_5H_{11}NO_2$ et pour formule chimique est $(CH_3)_3N^+CH_2COO^-$ (Figure 24).

Des études animales ont montré une absorption rapide postprandiale de la bêtaïne dans l'intestin grêle par l'intermédiaire du duodénum (Peters-Regehr et al., 1999; Wettstein et al., 1998). Des études humaines ont également montré que l'absorption et la distribution de la bêtaïne après

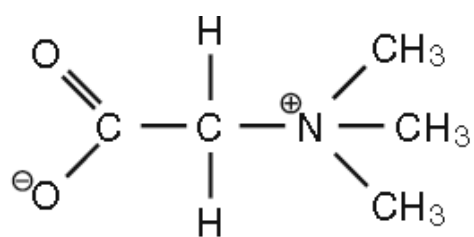


Figure 24. Structure chimique de la bétaine (Ueland, 2011)

son ingestion étaient relativement rapides, avec une augmentation du pic dans le sérum entre une et deux heures (Schwahn et al., 2003). La bétaine est éliminée par le métabolisme, même à des doses élevées ($100\text{mg.kg de poids}^{-1}$) (Schwahn et al., 2003). Une élimination par excrétion urinaire peut traduire une insuffisance rénale ou un cas de diabète (Dellow et al., 1999; Lever et al., 2012).

Des études animales ont mis en évidence qu'une ingestion de bétaine chronique ou non n'était pas toxique si les doses se situaient entre 0 et 5% de la nourriture (Hayes et al., 2003). Chez l'humain, il semblerait qu'une injection journalière de 9 à 15g de bétaine ne soit pas nocive (Craig, 2004).

La bétaine peut être obtenue par deux voies différentes. Premièrement, la bétaine est un micronutriment qui peut être obtenu par l'ingestion de nourriture (Ueland, 2010). On la retrouve abondamment dans les aliments végétaux comme le son et le germe de blé ou encore les épinards (Usda, 2004; Konstantinova et al., 2008; Ueland, 2010). La consommation moyenne journalière de bétaine oscille entre 100 à 300 mg et excède rarement 400-500 mg (Day & Kempson, 2016). Deuxièmement, la bétaine peut être formée dans le foie et les reins par l'oxydation de la choline (autre micronutriment, alcool aminé, constituant des phosphatidylcholines et de l'acétylcholine) en deux étapes enzymatiques (Konstantinova et al., 2008; Ueland, 2010). La catalysation de la choline par une enzyme mitochondriale, la choline déshydrogénase convertit la choline en bétaine aldéhyde qui elle-même est ensuite oxydée par la bétaine aldéhyde déshydrogénase dans la mitochondrie ou le cytoplasme (Chern & Pietruszko, 1999; Craig, 2004; Zeisel & Blusztajn, 1994) (Figure 25). La choline est présente dans de nombreux aliments d'origine animale (œufs, bœuf, porc, foie) et d'origine végétale (soja, germe de blé) (Zeisel et al., 2003).

La bétaine est présente dans l'ensemble des tissus mais les plus fortes concentrations ont été relevées dans le foie, les reins et les testicules. La concentration de bétaine dans le plasma humain est entre 20 et 70 $\mu\text{mol/litre}$ (Day & Kempson, 2016).

Pour nos travaux, nous avons choisi d'étudier la glycine bétaine (ou triméthylglycine) car elle est la forme la plus couramment utilisée pour les études scientifiques, elle est facilement dissoute dans l'eau et elle joue un rôle important dans le maintien de l'intégrité structurale et fonctionnelle des cellules au travers de différentes fonctions abordées ci-après.

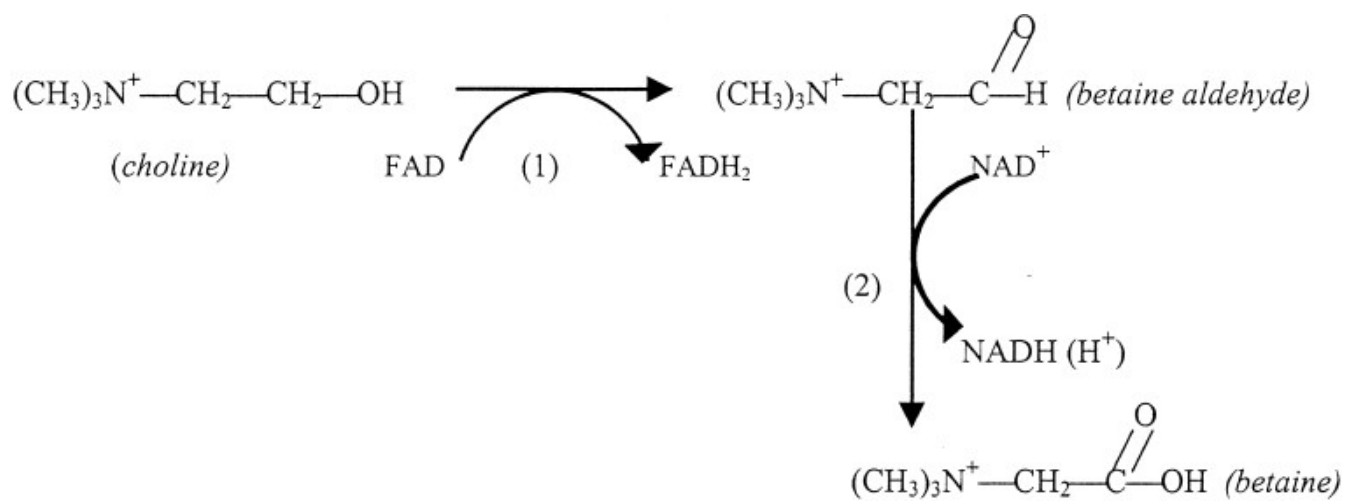


Figure 25. Synthèse de la bétaine à partir de la choline. (1) Choline déshydrogénase; (2) bétaine aldéhyde déshydrogénase. (Peluso et al., 2000)

La fonction protectrice de la bétaine

La bétaine est un osmolyte organique qui s'accumule dans divers cellules (notamment les cellules médullaires rénales) (Konstantinova et al., 2008) et sert donc à maintenir le volume des cellules, à les protéger mais également à protéger les protéines et les enzymes contre un stress environnemental (exemple : une température élevée) (Craig, 2004; Teixidó et al., 2005) et contre des conditions d'hypertonie (Delgado-Reyes & Garrow, 2005). La fonction protectrice d'un osmolyte se fait sans interaction délétère avec les macromolécules et n'interfère pas avec les fonctions cellulaires. La bétaine peut moduler la fonction immunitaire en cas de stress osmolytique au sein des macrophages hépatiques (cellules de Kupffer), *via* notamment la libération de TNF- α , et la suppression de la formation de prostaglandines et de l'expression de Cox-2 (Zhang et al., 1996a; Zhang et al., 1996b).

La bétaine et la protection antioxydante

Une supplémentation en bétaine réduit la peroxydation lipidique et l'accumulation d'oxyde nitrite (NO) induites par des traitements tels que des chimiothérapies (Hagar et al., 2015), par une contrainte (psychologique) (Ganesan et al., 2011), ou encore par la consommation d'alcool (Kim et al., 2008). Elle permet la protection des mécanismes de défenses antioxydants (Ganesan et al., 2011).

Ses propriétés antioxydantes s'expliquent par divers mécanismes. La bétaine favorise la mobilisation des graisses du foie et après ingestion, elle peut facilement traverser la membrane lipidique (Kanbak, et al, 2001). Ensuite, une supplémentation en bétaine permet de prévenir des dommages nécrotiques induits par les lipopolysaccharides par suppression de l'inhibition de l'activation des cellules de Kupffer (macrophages hépatiques) (Balkan et al., 2004; Warskulat, et al, 1996). Enfin, l'action antioxydante de la bétaine est due à son implication dans la synthèse de la méthionine, qui est le principal substrat de la cystéine cellulaire permettant la synthèse de glutathion, par voie de trans-sulfuration (Ganesan et al., 2010), le glutathion étant lui-même un antioxydant.

Enfin, certains auteurs ont montré que la bétaine était capable d'inhiber la voie redox-sensible AKT de façon dose-dépendante (Kim, 2012).

Effet de la bétaine, de la C-phycocyanine ou de l'activité physique sur la croissance tumorale du cancer du poumon chez le rat- Carmen Dupuis - 2017

La bétaine a un effet anti-inflammatoire indéniable. En effet, l'ingestion de bétaine (et de choline) a été inversement associée aux marqueurs inflammatoires de l'athérosclérose (Detopoulou et al., 2008). Dans différentes conditions pathologiques (dommages induits par l'alcool ou cancer du côlon induit par de l'azoxymethane chez le rat, et *in vitro* sur des macrophages), la bétaine inhibe l'expression de cytokines pro-inflammatoires dont TNF- α , IL-6 et Cox-2, et l'activation de NF- κ B (Jung et al., 2013; D. H. Kim et al., 2014). D'autres études *in vitro* et *in vivo* avaient montré que la bétaine inhibait, d'une part, l'activation de NF- κ B, *via* notamment une augmentation des kinases I κ B et des MAPK induites par le stress oxydatif et d'autre part, l'homéostasie redox des thiols, lors du processus de vieillissement (Go et al., 2007; Go et al., 2005).

Effet de la bétaine, de la C-phycocyanine ou de l'activité physique sur la croissance tumorale du cancer du poumon chez le rat- Carmen Dupuis - 2017

Les modifications épigénétiques sont des modifications chimiques qui se superposent au génotype pour former un épigénotype. Ces mécanismes moléculaires ont lieu au niveau des régions riches en dinucléotides CpG et sont essentiels au contrôle épigénétique de l'expression des gènes et au maintien de l'intégralité du génome (Friso & Choi, 2002). L'environnement et l'histoire individuelle peuvent influencer ces changements à caractère réversible, qui peuvent être héréditaires. La méthylation de l'ADN et les modifications des histones (acétylation, méthylation ou phosphorylation) sont des mécanismes épigénétiques qui sont capables d'initier des processus induisant une perte ou une activation de la transcription des gènes ; ceux-ci étant impliqués dans la carcinogénèse.

Le métabolisme du carbone est un réseau métabolique de voies interdépendantes compartimentées dans le cytoplasme, la mitochondrie et le noyau. Dans le noyau, le métabolisme du carbone a un rôle prépondérant dans la réplication, la réparation et la méthylation de l'ADN (Day & Kempson, 2016). Au niveau du cytoplasme des cellules rénales et hépatiques, la bétaine étant l'un des principaux donneurs de méthyles chez l'humain, transfère un groupement méthyle par l'intermédiaire de l'enzyme bétaine homocystéine methyltransferase (BHMT) pour devenir de la diméthylglycine, et permet ainsi la conversion de l'homocystéine en méthionine (Haynes, 2002; Konstantinova et al., 2008). La méthionine est un précurseur de la S-adénosylméthionine (SAM), SAM étant un donneur de méthyle

universel impliqué dans plus de 80 réactions biologiques de méthylation (Day & Kempson, 2016) (Figure 26). L'altération des concentrations en SAM peut influencer la transcription génétique, l'empreinte et la stabilité génomique (Ueland, 2010).

En 2012, les autorités de la Santé Européenne ont déclaré que les produits contenant de la bétaine peuvent prétendre contribuer au métabolisme normal de l'homocystéine si et seulement si, ils contiennent au moins 500 mg de bétaine par portion. Un effet est néanmoins observé à partir d'une consommation quotidienne égale ou supérieure à 100 à 300 mg / kg de poids de corps de bétaine (Bidulescu et al., 2009; Detopoulou et al., 2008).

Effet de la bétaine sur la croissance tumorale

Des apports élevés en bétaine (supérieurs à 300 mg par jour) et en choline (supérieurs à 150 mg par jour) permettraient de réduire le risque d'avoir un cancer du sein (Zhang et al., 2013), mais également du poumon (Ying et al., 2013). Cependant, cette diminution du risque ne serait pas significative pour les individus n'ayant jamais fumé (Ying et al., 2013). Une étude *in vivo* a mis en évidence que le jus de betterave (contenant entre autres de la bétaine) diminuait l'incidence des tumeurs pulmonaires induites par des substances cancérogènes (4-nitroquinoline 1-oxide + 8% glycérol) (Kapadia et al., 1996). *In vitro*, un traitement à la bétaine permettrait de diminuer la viabilité des cellules cancéreuses hépatiques (Lee et al., 2014; Oliva et al., 2012).

Par ailleurs, la bétaine agirait sur la carcinogénèse *via* son action anti-inflammatoire. Une augmentation de Cox-2 est impliquée dans la tumorigénèse à cause de son expression cellulaire et de son activité métabolique (Cao & Prescott, 2002). Une étude sur le cancer colorectal a montré que l'administration de bétaine permettait une diminution de l'expression de Cox-2 et de NF-κB et permettrait de réduire la survenue des cancers colorectaux dépendant de l'inflammation (Kim et al., 2014). *Via* la suppression de l'activation de NF-κB et d'AKT, la bétaine inhiberait également l'angiogénèse, une étape essentielle dans la formation de nouveaux vaisseaux sanguins favorisant la croissance tumorale et les métastases (Kim, 2012).

D'autre part, la bétaine aurait un effet sur la croissance tumorale du cancer du poumon *via* sa fonction de donneur de méthyle. En effet, la privation de donneurs de méthyle cause une hypométhylation de l'ADN (Ying et al., 2013). L'analyse globale des marqueurs épigénétiques, incluant les histones, la méthylation de l'ADN (Goto et al., 2009) et les profils micro-ARN (Landi et al., 2010), commencent à démontrer des profils distincts entre les types de cellules

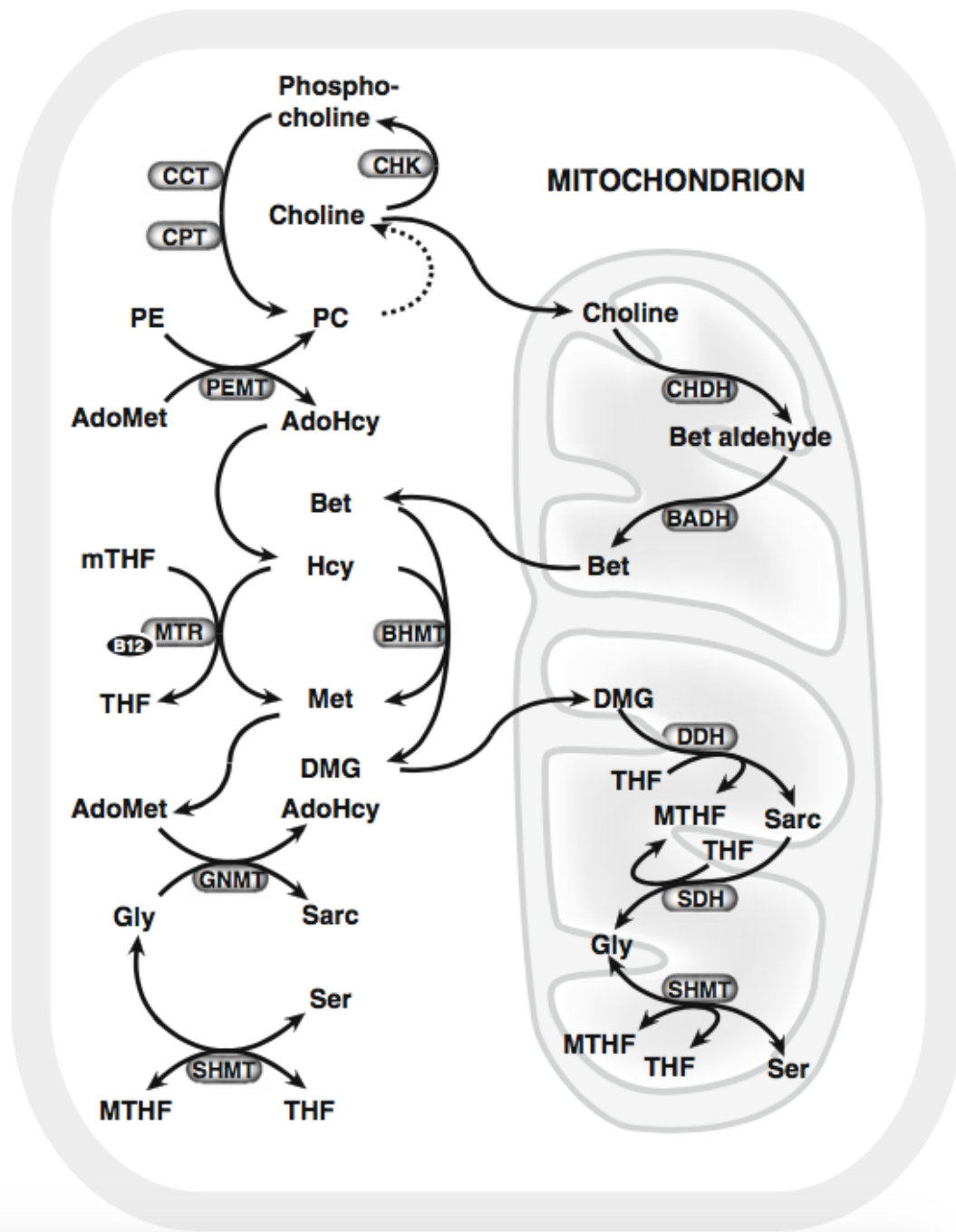


Figure 26. Métabolisme de la choline et de la betaine et leur lien avec le métabolisme du carbone. (Ueland 2010) AdoHcy : S-adenosylhomocysteine, AdoMet : S-adenosylmethionine, BADH : betaine aldehyde dehydrogenase, Bet : betaine, BHMT : betaine-homocysteine S-methyltransferase, CCT : CTP-phosphocholine cytidyltransferase, CHK : choline kinase, CHDH : choline dehydrogenase, CPT : diacylglycerol cholinephosphotransferase (cytidine 5-diphosphate (CDP) choline), DDH : dimethylglycine dehydrogenase, DMG : dimethylglycine, Gly : glycine, GNMT : glycine N-methyltransferase, Hcy : homocysteine, Met : methionine, mTHF : 5-methyltetrahydrofolate, MTHF : methylenetetrahydrofolate, MTR : methionine synthase, PC : phosphatidylcholine, PE : phosphatidylethanolamine, PEMT : phosphatidylethanolamine N-methyltransferase, Sarc : sarcosine (monomethylglycine), SDH : sarcosine dehydrogenase, Ser : serine, SHMT : serine hydroxymethyltransferase, THF : tetrahydrofolate.

cancéreuses. Des anomalies dans le processus de méthylation de l'ADN se traduisent par l'activation d'oncogènes et l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs et elles sont souvent présentes dans les lésions précancéreuses et dans les cellules histologiquement normales épithéliales bronchiques (Sato et al., 2007). Le carcinome squameux du poumon résulte de l'accumulation de multiples anomalies génétiques et épigénétiques indépendantes, y compris des modifications de séquences d'ADN, les changements du nombre de copies, et une hyperméthylation aberrante des promoteurs (Sato et al., 2007). Les mutations du promoteur O₆-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) sont des événements communs dans les carcinomes pulmonaires primaires (Esteller et al., 1999). Dans le cancer du poumon, l'inactivation de MGMT par la méthylation du promoteur entraînerait des changements G:C→A:T dans les mutations du gène p53 (Wolf, et al, 2001) mais augmenterait également l'apparition des mutations du gène p53 dans la tumeur pulmonaire (Wu et al., 2008). La méthylation du promoteur MGMT se produit plus couramment dans les adénocarcinomes, tant chez les non-fumeurs que chez les fumeurs et ceci est associé à la progression tumorale (Pulling et al., 2003). Ainsi, une hypométhylation globale de l'ADN, une hyperméthylation régionale de gènes suppresseurs de tumeurs et une hypométhylation régionale des oncogènes et gènes pro-métastatiques sont associées au cancer et notamment à celui du sein (Katz-Brull et al., 2002), de l'ovaire (Iorio et al., 2010), du colon (Dueck et al., 1996; Nakagami et al., 1999) et du poumon (Esteller et al., 1999). La bétaine, en tant que donneur de méthyle, permet d'inhiber les changements, tels que l'inactivation des gènes suppresseurs de tumeurs (p16) et l'activation de proto-oncogène (c-myc) induits par un carcinogène (Du et al., 2009).

Enfin, la bétaine pourrait agir sur la carcinogénèse pulmonaire *via* sa fonction de régulateur de la respiration mitochondriale. Dans plus de 90% des cancers, une diminution voire une suppression de l'activité d'O₂PHOS et une augmentation de la glycolyse anaérobie (effet Warburg) ont été reportées (Hüttemann et al., 2012) ; c'est pourquoi, certaines approches thérapeutiques visent à améliorer l'O₂PHOS mitochondriale. Certains auteurs font l'hypothèse que la diminution de l'activité du COX (cytochrome c oxidase) induite notamment par une augmentation de l'expression d'EGFR pourrait être à l'origine de l'inhibition de l'apoptose dans les cellules tumorales (Hüttemann et al., 2012). Un traitement à la bétaine pourrait supprimer l'inhibition de l'apoptose *via* une augmentation de l'activité du COX et du niveau d'ATP, et la stimulation de la respiration mitochondriale et cellulaire (Lee, 2015).

3.2.4.□La C-phycocyanine (C-PC)

??P??/?Pb?/?ns é?m?bems ??m?élm???

Aucune étude n'a été réalisée sur sa biodisponibilité. Des études ont montré que la C-PC n'était pas toxique et n'engendrait pas de symptômes (Sabarinathan & Ganesan, 2008). La C-PC est un colorant naturel bleu, fréquemment utilisé dans l'industrie alimentaire (Thangam et al., 2013).

??y??/? u??P??P??mm?

Effet de la bétaine, de la C-phycocyanine ou de l'activité physique sur la croissance tumorale du cancer du poumon chez le rat- Carmen Dupuis - 2017

Il a également été montré que la C-PC est capable d'activer Nrf2. L'activation de Nrf2 pourrait ainsi contribuer à l'activation d'enzymes de phase II détoxifiantes (e.g. glutathion S transférases (GST), méthyltransférases (MT), N-acétyltransférase (NT)) (Reuland et al., 2013) et protéger les cellules contre l'apoptose induite par les ERO (Gao, Liu, et al., 2016) (Figure 27). Cette activation de Nrf2 par la C-PC pourrait également expliquer le rôle de régulateur positif de C-PC sur l'hème oxygénase 1 (HO-1). L'induction transcriptionnelle du gène HO-1 se fait dans la région StRE (stress response element ou MARE (Maf response element)), soit par l'intermédiaire du facteur AP1 (hétérodimère cJun/Fos) ; soit *via* Nrf2. Après phosphorylation, Nrf2 migre vers le noyau et forme un complexe par dimérisation avec une des protéines bZip (ATF4 ou cFos). Ce complexe se lie au StRE et active la transcription du gène HO-1 (Figure 28) (Lyoumi et al., 2007). HO-1 est également considéré comme ayant un rôle antioxydant. Son augmentation permet l'élimination de l'hème (Lyoumi et al., 2007) et ainsi, diminue la production de superoxyde *via* l'inhibition de la maturation de la NADPH-oxydase (Taillé et al., 2004).

Par ailleurs, les phycocyanobilines contenues dans la C-PC sont des inhibiteurs puissants de NADPH oxydase, participant à la génération de superoxyde dans les neutrophiles (Terry et al., 1993).

De plus, la C-PC peut également inhiber les dommages à l'ADN, *via* une régulation à la baisse de l'expression du gène Fas (Fatty acid synthase) et une diminution du pourcentage de fragmentation d'ADN (Hassan et al., 2012). Le gène Fas est un membre de la famille des récepteurs de TNF et il a été montré que des dommages à l'ADN pouvaient être le résultat d'une augmentation de son expression (Müller et al., 1997).

Effet de la C-PC sur l'immunité

La C-PC exerce une activité immunomodulatrice et anti-inflammatoire, *via* notamment la régulation de cytokines, dont les interleukines pro-inflammatoires IL-1 β et IL6 et les interleukines anti-inflammatoires IL-4 et IL-10 (Ali et al., 2015; Mao et al., 2000; Shokri, et al., 2014).

Le rôle anti-inflammatoire de la C-PC serait en partie dû à son habilité à inhiber l'enzyme pro-inflammatoire Cox-2. En effet, la C-PC posséderait des propriétés sélectives inhibitrices de Cox-2 (Reddy et al., 2003). De plus, Pentón-Rol et al. (2011) ont montré, lors d'une étude *in*

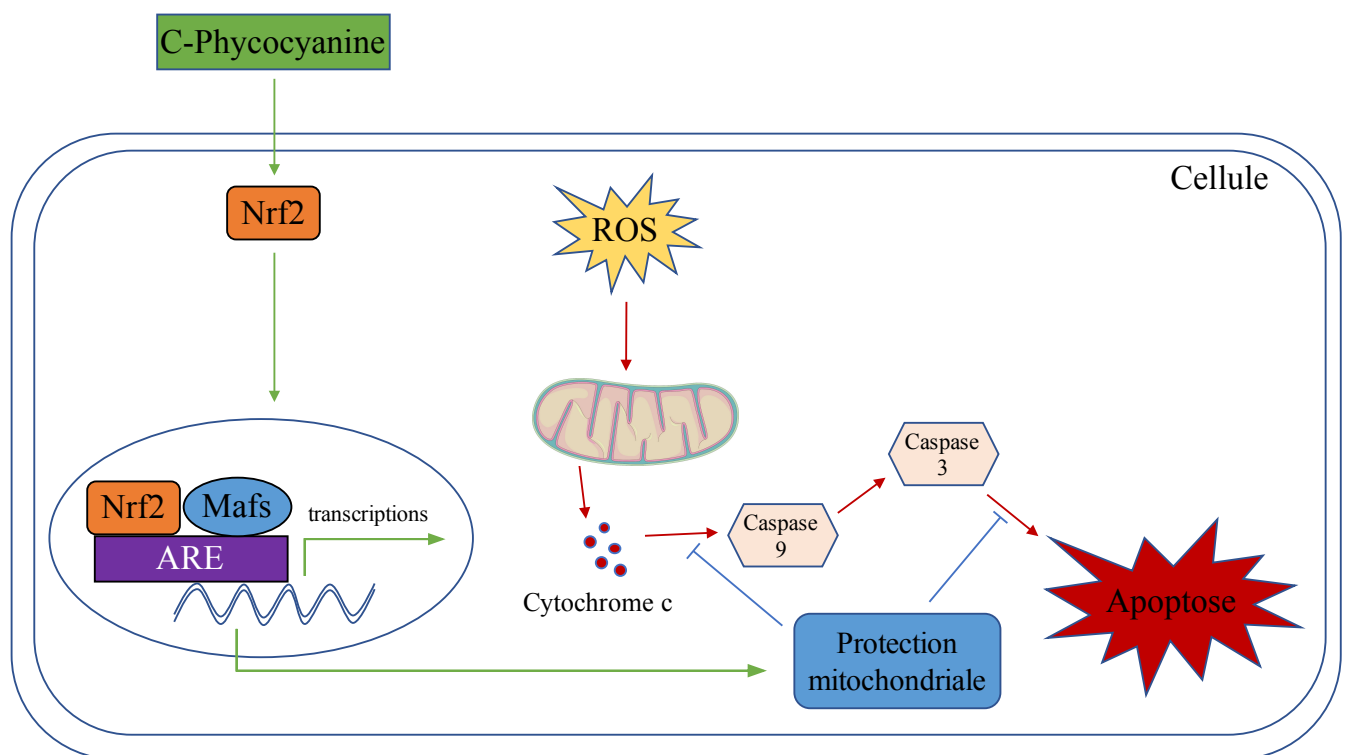


Figure 27. Rôle protecteur antioxydant de la C-Phycocyanine via l'activation de Nrf2. Adaptée de (Gao, Liu, et al. 2016)

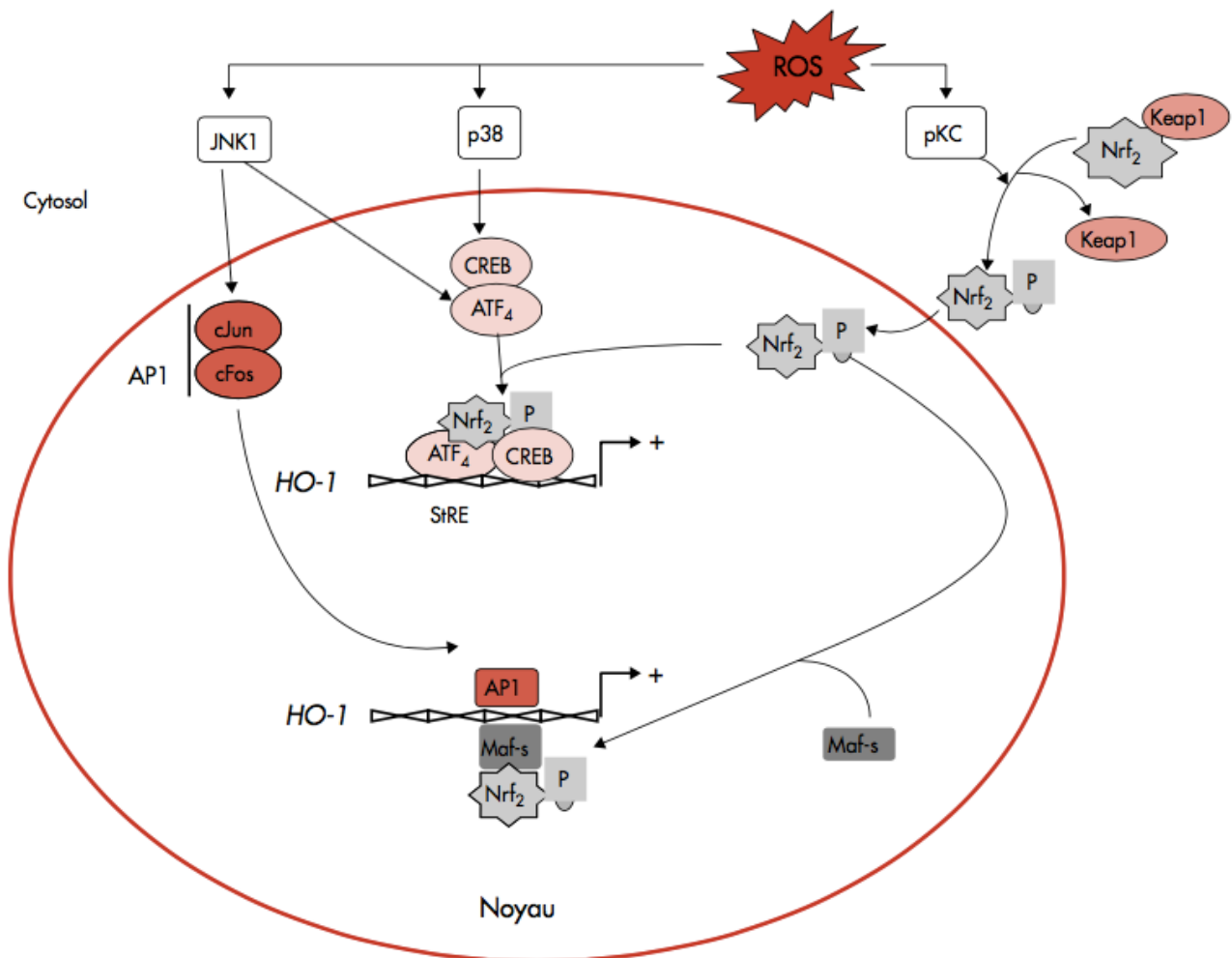


Figure 28. Signalisation cellulaire et facteurs transcriptionnels impliqués dans l'induction de HO-1 par les ROS. (Lyoumi et al. 2007)

vitro, qu'un traitement à la C-PC augmentait des marqueurs des lymphocytes T régulateurs (Treg), dont TGF- β et l'interleukine anti-inflammatoire IL-10.

2.2.2.2. Impact de la C-PC sur la voie PI3K/Akt

➤ PI3K/AKT

PI3K/Akt/FoxO1 est une voie modulée par la C-PC. Plus précisément, un traitement à la C-PC limite la déphosphorylation d'AKT et de FoxO1, induite par le méthylglyoxal (sous-produits de certaines voies métaboliques) (Gao et al., 2016). L'activité transcriptionnelle des facteurs FoxO est régulée par la phosphorylation d'AKT. La C-PC protégerait la fonction de FoxO et permettrait le maintien de l'homéostasie cellulaire. Ces facteurs peuvent être impliqués dans la prolifération cellulaire et dans l'apoptose. Ils peuvent également jouer un rôle de suppresseur de tumeur dans deux nombreux cancers (Greer & Brunet, 2005) et peuvent réguler à la hausse de nombreux gènes impliqués dans la réparation de l'ADN (Tran et al., 2002).

➤ P38 MAPK

C-PC est capable de réguler à la hausse la voie de signalisation MAPK/ERK et plus particulièrement p38 MAPK, ce qui induit la dégradation de MIF1 (microphthalmia-associated transcription factor) qui est un facteur associé au développement et la survie cellulaire. C-PC induit également une suppression de l'activation de CREB, qui est le facteur de transcription de MITF, *via* une régulation à la baisse de p38 MAPK (Wu et al., 2011).

2.2.2.3. Impact de la C-PC sur le cancer du poumon

Peu d'études ont abordé l'effet de la C-PC sur le cancer du poumon, que ce soit en prévention primaire, secondaire ou tertiaire.

C-PC agirait sur la carcinogénèse grâce à ses différentes fonctions précédemment nommées. A notre connaissance, aucune étude n'a investigué l'effet d'une supplémentation en C-PC sur le risque d'avoir un cancer. L'ensemble des études concernant les liens entre C-PC et cancer ont étudié soit ses effets dans la prévention des effets secondaires au traitement contre le cancer (i.e. cisplatine), soit ses effets sur l'initiation et la progression tumorale, souvent *in vitro* et parfois *in vivo*.

Ainsi, il a été rapporté que la C-PC pouvait prévenir la diminution des défenses antioxydantes rénales et l'augmentation des dommages oxydatifs rénaux induits par un traitement à la cisplatine (Fernández-Rojas et al., 2014).

Une activité anti-carcinogène de la C-PC a été montrée sur différents types de cellules cancéreuses : histiocytaires (Pardhasaradhi et al., 2003), hépatiques (Basha et al., 2008), prostatiques (Gantar et al., 2012), ovariennes (Pan et al., 2015) et leucémiques (Niu et al., 2006). Très récemment, Li et al. (2015) ont étudié les effets de C-PC combinée à l'ATRA (all-trans retinol acid) sur les cellules cancéreuses pulmonaires (A549), *in vitro* et *in vivo*. Cette équipe a montré que, suite à un traitement à la C-PC, la viabilité des cellules A549 était diminuée *in vitro* et les tumeurs étaient plus petites *in vivo*. Ce ralentissement tumoral était associé à une augmentation de l'expression de caspase-3 au sein des tumeurs du groupe supplémenté en C-PC. L'activation des voies de la mort cellulaire programmée caspase-dépendante (Chu et al., 2010; Li et al., 2006; Pardhasaradhi et al., 2003) est l'une des principales explications du pouvoir pro-apoptotique de la C-PC.

Malgré les nombreuses propriétés de la C-PC (antioxydantes, anti-inflammatoires et anti-prolifératives), peu d'études se sont intéressées à ses effets dans la cancérogenèse pulmonaire, c'est pourquoi nous avons choisi de l'étudier.

□ □ m l e □ □ □ □ □ □ b R d A □ □

Objectifs de thèse

Le cancer du poumon est la première cause de décès par cancer dans le monde. C'est une pathologie multifactorielle de mauvais pronostic du fait de son diagnostic tardif. Parmi les facteurs de ce cancer, le stress oxydatif semble jouer un rôle important *via* des mécanismes directs ou indirects. Le stress oxydatif peut être modulé à travers les facteurs nutritionnels suivants : l'alimentation et l'activité physique. Une revue écrite par notre équipe fait état du lien entre cancer du poumon, activité physique, nutrition et stress oxydatif (*Annexe 1*).

L'activité physique engendre des adaptations physiologiques permettant d'induire des effets bénéfiques chez les sujets sains mais également en termes de préventions du cancer du poumon (Gonçalves & Novaes, 2012). L'AP diminuerait le risque de cancer notamment grâce à : une augmentation de la fonction pulmonaire, une diminution des concentrations d'agents carcinogènes dans les poumons, une amélioration de la fonction immunitaire, une réduction de l'inflammation, une amélioration de la capacité de réparation de l'ADN et d'un changement du niveau des hormones de croissance (Emaus & Thune, 2011). Plus particulièrement, l'AP de type aérobie permettrait d'améliorer l'activité antioxydante et des enzymes de phase II dans le poumon, ce qui aurait des effets anti-cancers (Duncan et al., 1997; Teixeira et al., 2009). *In vivo* (chez la souris), il a été montré que l'activité physique spontanée (roue d'activité accessible *at libitum*) ralentissaient la progression tumorale pulmonaire, peut-être grâce à l'activation de p53 et à la stimulation de l'apoptose (Higgins et al., 2014).

Afin de déterminer les mécanismes sous-jacents des effets positifs de l'activité physique sur la santé, certaines équipes ont utilisé des tapis de course, des exercices de force ou la natation comme modèle d'activité physique (Cavalié et al., 2003; Ma et al., 2013; Petersen et al., 2013). Ces modèles sont des programmes d'exercice involontaire et peuvent induire des adaptations physiologiques, signes de stress chronique (Hong et al., 2015). L'utilisation de la roue d'activité comme modèle d'activité physique est une alternative intéressante car les rats ont accès librement à la roue d'activité et cela est représentatif de l'activité physique spontanée chez l'humain (Filaire et al., 2009).

De nombreuses études ont montré le rôle de certains micronutriments dans la survenue et le développement du cancer du poumon. Lors des étapes de ce cancer multifactorielle, il a été observé des perturbations des défenses antioxydantes, des mutations de gènes impliqués dans la signalisation de voies redox-sensibles, et une modification de la méthylation de l'ADN et de la réponse inflammatoire.

Objectifs de thèse

Etant donné les caractéristiques de la bétaine (donneur de méthyle, régulateur de la respiration mitochondriale, propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires) et de la C-phycocyanine (propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires et antiprolifératives), notre équipe s'est intéressée à l'effet de ces deux micronutriments.

Elle est la première à avoir travaillé sur l'effet la bétaine et/ou la C-Phycocyanine sur la croissance des cellules tumorales pulmonaires A549, que ce soit *in vitro* ou *in vivo*. L'effet de la bétaine, de la C-Phycocyanine et de leur utilisation combinée sur la croissance des cellules tumorales pulmonaires A549, *in vitro* et *in vivo* a été étudié par notre équipe (Bingula et al., 2016). Des cellules A549 ont été co-incubées avec de la bétaine et/ou de la C-Phycocyanine. Nous avons montré qu'une supplémentation en bétaine induisait une diminution de la viabilité des cellules A549 de 50% de façon dose-dépendante et que la combinaison des deux suppléments induisait une diminution de 60%. En effet, l'association des deux micronutriments a réduit l'expression de NF- κ B stimulée par TNF- α et a augmenté la quantité du pro-apoptotique p38 MAPK. Il est intéressant de noter que la bétaine associée à la phycocyanine a induit un arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M pour environ 60% des cellules (*Annexe 3*).

L'objectif général de ce travail de thèse était d'évaluer l'effet de facteurs nutritionnels (bétaine, C-PC ou activité physique) sur la croissance tumorale de cellules A549 implantées chez le rat Nude et de déterminer les mécanismes sous-jacents explicatifs de cet effet.

Pour répondre à cet objectif principal, le projet de thèse s'est divisé en 3 parties. Dans une première étude, l'effet d'une supplémentation en bétaine ou en C-Phycocyanine, associée ou non à une activité physique sur l'équilibre redox et l'inflammation a été évalué *in vivo* sur des rats sains. Trente Sprague-Dawley ont été divisés en 6 groupes : contrôle, bétaine, C-Phycocyanine, activité physique spontanée, bétaine + activité physique spontanée, et C-Phycocyanine + activité physique spontanée. Au terme de six semaines d'observation, nous avons étudié les activités antioxydante, pro-oxydante et pro-inflammatoire au niveau plasmatique et musculaire. Nous avons émis les hypothèses suivantes : 1) une supplémentation en bétaine ou en C-Phycocyanine ou/et la pratique d'une activité physique volontaire augmenterait la réponse antioxydante, 2) la bétaine et l'activité physique auraient un effet synergique, 3) l'irisine serait positivement corrélée avec les marqueurs antioxydants.

Objectifs de thèse

Une deuxième étude avait pour objectif de déterminer si la bétaine et/ou la C-Phycocyanine avai(en)t un effet sur la croissance des cellules A549 implantées chez des rats et de déterminer certains mécanismes sous-jacents. Après avoir injecté des cellules A549 en sous-cutanée et avoir laissé les tumeurs se former durant 10 jours, nous avons supplémenté les rats Nude en bétaine et/ou C-phycocyanine. Après 28 jours de supplémentation, nous avons sacrifié les rats et étudié les marqueurs antioxydants et pro-oxydants au niveau circulant et tumoral, ainsi que des marqueurs inflammatoires et apoptotiques au sein des tumeurs. Nous avons émis l'hypothèse qu'une supplémentation en bétaine ou/et en C-Phycocyanine permettrait de ralentir la croissance tumorale pulmonaire *via* la modulation du stress oxydatif et des mécanismes redox-sensibles tels que l'inflammation et l'apoptose.

La dernière étude consistait à évaluer l'effet de l'activité physique spontanée sur la croissance tumorale des cellules A549 implantées chez des rats Nude et déterminer si des mécanismes redox-sensibles pouvaient être impliqués. Après avoir injecté des cellules A549 en sous-cutanée et avoir laissé les tumeurs se former et atteindre un volume tumoral supérieur à 500 mm³, nous avons constitué deux groupes : un groupe contrôle observé dans des conditions basiques et un groupe ayant une roue d'activité à disposition 24h/24 et 7j/7. Aux termes de 28 jours d'observation, nous avons analysé les échantillons sanguins, musculaires et tumoraux recueillis le jour du sacrifice. Les analyses consistaient à évaluer des marqueurs de l'équilibre redox, inflammatoires, et apoptotiques. Nous avons émis l'hypothèse que la pratique d'une activité physique spontanée permettrait de ralentir la croissance tumorale pulmonaire au travers la modulation du stress oxydatif et des mécanismes redox-sensibles tels que l'inflammation et l'apoptose.

□ □ **b** e □ r A □ □ b c | b R n □ □ A □

□□□□ □ **Ae** i □□□□ **nù** **bé** □□□□

□□□□ □ né ðé □□□b□neAAni □

Effet de la bétaine, de la C-phycocyanine ou de l'activité physique sur la croissance tumorale du cancer du poumon chez le rat- Carmen Dupuis - 2017

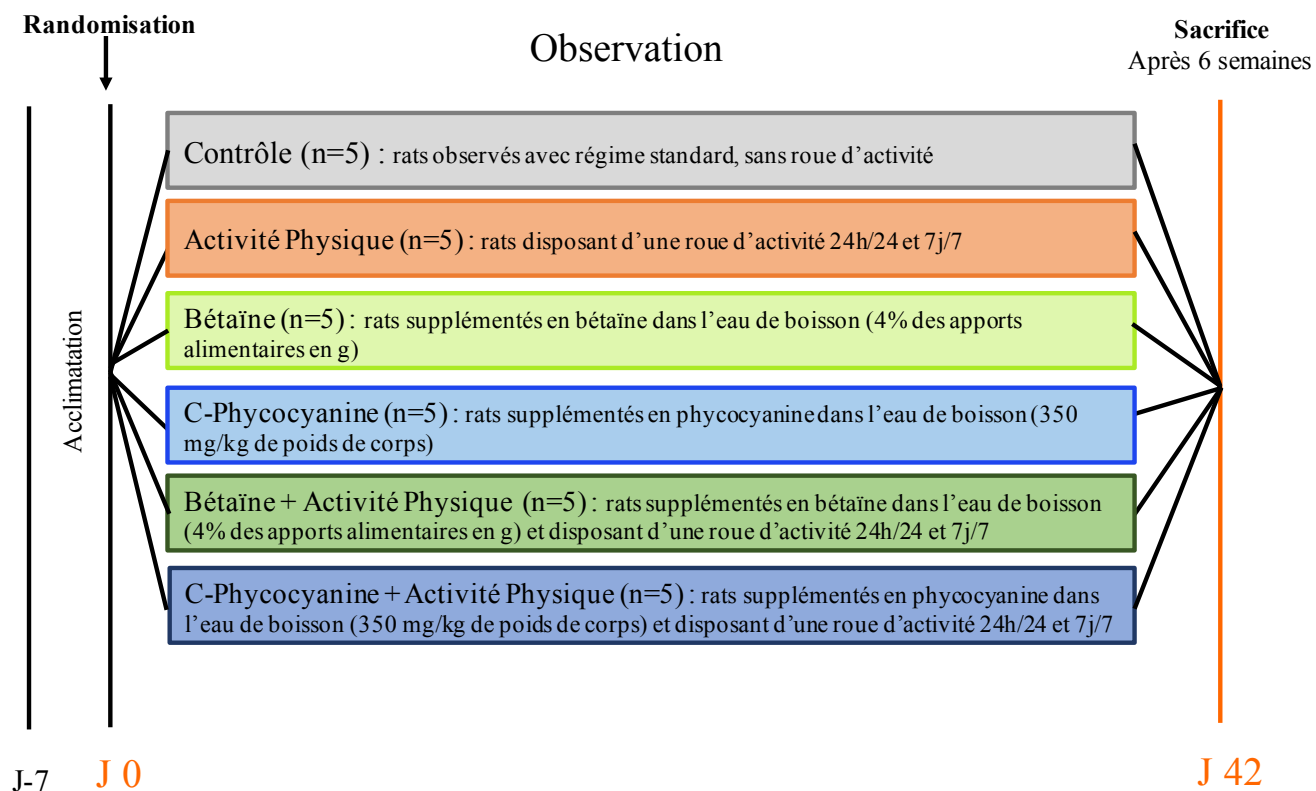


Figure 29. Schéma expérimental de l'étude I.

Matériels et méthodes

biberons et des croquettes restantes. Les biberons étaient réalisés tous les deux jours. Les apports en bétaine et en C-PC étaient ajustés en fonction des apports alimentaires et hydriques ainsi que le poids de chaque rat.

□□□□ □u□bvd t RoAsé□□

Les rats des groupes « activité physique » avaient à disposition une roue d'activité 7j/7 et 24h/24. Les roues étaient équipées de capteurs connectés à un logiciel permettant la mesure et l'enregistrement du nombre de tour, de la durée d'activité et de la distance parcourue par chaque rat (Intellibio, Nancy, France). L'enregistrement des données était réalisé sur 24h correspondant à chaque jour d'observation.

□□□□ □ d c i b □ A □ Ab n i l c e i A □

Lors de l'euthanasie, le gastrocnémien droit de chaque rat a été isolé, pesé et stocké à -80°C. Pour les analyses, les gastrocnémiens maintenus dans de la glace ont été broyés avec du tampon A (10 mM 2-amino-2-hydroxyméthyl-1,3-propanediol (TRIS), 10 mM potassium chloride (KCl), 10 mM magnesium chloride (MgCl₂), 1 mM DL-dithiothreitol (DTT), 0.1mM EDTA and, 1% de cocktail avec des inhibiteurs de protéases (P8340-1ml, Sigma-Aldrich, France), pendant 10 secondes, puis 5 x 20 secondes. Une fois broyés, les échantillons étaient transférés dans des tubes et centrifugés (5 min, 15000xg, 4°C). Le surnageant (partie cytosolique) était récupéré, aliquoté et stocké à -80°C. Chaque culot était re-suspendu dans du tampon A et centrifugé (5 min, 15000xg, 4°C). Le surnageant était jeté et le culot était de nouveau suspendu avec du tampon B (50 mM TRIS, 50 mM KCl, 150 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, and 0.5% de cocktail avec des inhibiteurs de protéases (P8340-1ml, Sigma-Aldrich), puis a subi trois cycles d'ultrasons (1 min) et d'agitation dans de la glace 10 minutes) et centrifugé (5 min, 15000xg, 4°C). Le surnageant (partie péri-nucléaire et nucléaire) a été récupéré, aliquoté et congelé à -80°C.

□□□□ □i □roA□A□

1.5.1. □ Concentrations hormonales

La corticostérone produite par le cortex surrénal en réponse à un stress a été mesurée à l'aide d'un kit ELISA (Cayman Chemical, Interchim, Montluçon, France). La production d'une réaction enzymatique entre la corticostérone et un corticostérone-acétylcholinestérase (AChE)

Matériels et méthodes

conjugué (tracer de la corticostérone) a été mesuré dans le sérum *via* une mesure colorimétrique à 420 nm (Photomètre Multiskan FC ThermoScientific, MC2Lab, Clermont-Ferrand, France).

1.5.2. □ Concentrations protéiques

Les concentrations protéiques de l'ensemble des échantillons (plasma, fraction totale, cytosolique et nucléaire des tumeurs et des gastrocnémiens) ont été déterminées avec un kit de quantification protéique nommé « BC Assay » (Interchim, Montluçon France). Les concentrations étaient mesurées, à 560 nm, suite à la formation d'une coloration violette après réduction du Cu^{2+} en Cu^{+} par les protéines (Photomètre Multiskan FC ThermoScientific, MC2Lab, Clermont-Ferrand, France).

1.5.3. □ La peroxydation lipidique

Le niveau de substances réagissant à l'acide thiobarbiturique (TBARS) qui sont produits lors de la peroxydation lipidique, a été déterminé par un kit enzymatique (Cayman Chemicals, Interchim, Montluçon, France) en accord avec les instructions du fabricant, dans le sérum et dans la fraction cytosolique du gastrocnémien. L'adduit MDA-TBA formé par la réaction colorimétrique du MDA et du TBA sous haute température (entre 90 et 100 °C) et en conditions acides a été mesurée à 520 nm (Photomètre Multiskan FC ThermoScientific, MC2Lab, Clermont-Ferrand, France).

1.5.4. □ Les marqueurs antioxydants

□ Evaluation de l'activité de la SOD

L'évaluation de la SOD a été réalisée à l'aide d'un kit enzymatique (Cayman Chemicals, Interchim, Montluçon, France), dans le plasma et la fraction cytosolique des gastrocnémiens. Ce kit utilise un sel de trétazolum pour la détection des radicaux superoxydes générés par la xanthine oxydase et l'hypoxanthine et mesure trois types de SOD (Cu/Zn-SOD, Mn-SOD et Fe-SOD) à 450 nm (Photomètre Multiskan FC ThermoScientific, MC2Lab, Clermont-Ferrand, France).

??/?go??

qul/qs ePmxoo

gulfstreams in mid-ocean

Effet de la bétaine, de la C-phycocyanine ou de l'activité physique sur la croissance tumorale du cancer du poumon chez le rat- Carmen Dupuis - 2017

Matériels et méthodes

Dionex (Version 6.80, Dionex SA, Courtaboeuf, France). La concentration de GSH a été calculée grâce à l'utilisation de la courbe standard établie dans les mêmes conditions.

1.5.4. Absorbance

La concentration d'irisine plasmatique a été évaluée par un kit ELISA par compétition (Cayman Chemicals, Interchim, Montluçon, France). Un anticorps polyclonal reconnaissant l'irisine native a réagi avec une série d'échantillons prédéterminés d'irisine recombinants en compétition sur la plaque pré-induite. (Adipogen, COGER, Paris, France). Cette réaction était mesurée à 450 nm (Photometer Multiskan FC ThermoScientific, MC2Lab, Clermont-Ferrand, France).

1.5.5. Cox-2 comme marqueur pro-inflammatoire

La quantité de Cox-2 a été évaluée au sein de la partie périnucléaire et nucléaire musculaire par un kit enzymatique (Cayman Chemicals, Interchim, Montluçon, France) avec la mesure de l'activité peroxydase de la Cox. Un inhibiteur spécifique à l'isoenzyme permettait de distinguer l'activité de Cox-2 de l'activité de Cox-1. L'activité a été analysée colorimétriquement par le suivi de l'apparence de TMPD oxydé (N,N,N',N'-tetramethyl-p-phenylenediamine) à 590 nm (Photomètre Multiskan FC ThermoScientific, MC2Lab, Clermont-Ferrand, France).

1.5.6. Absorbance

Les résultats ont été traités grâce au logiciel SPSS (version 19.0) et reportés en moyenne $\pm$ erreur standard de la moyenne (SEM). L'analyse de la variance (ANOVA) a permis de déterminer les différences entre les groupes. Les relations entre irisine et les paramètres antioxydants ont été évaluées *via* la corrélation de Pearson. Un $p < 0.05$ était considéré comme significatif.

1.5.7. Résultats

L'objectif de l'étude II était d'évaluer l'effet d'une supplémentation en bétaine et/ou en C-PC sur la croissance de tumeur pulmonaire induite (suite à une injection de cellules A549) *in vivo*.

Matériels et méthodes

Matériels et méthodes

Les cellules A549 du cancer du poumon humain (ATCC® CCL-185™) ont été maintenues en culture à Cellvax Pharma, dans un milieu de culture DMEM complet, 10 % FBS (Foetal Bovin Serum), 5mM L-Glutamine, 1 % Penicillin/Streptomycin, dans un incubateur de culture cellulaire 95 % air et 5 % de dioxyde de carbone (CO₂). Les cellules A549 ont été mises en culture jusqu'à une confluence d'environ 80%.

Le jour de l'injection, les cellules ont été récupérées *via* la procédure suivante :

- lavées 2 fois avec du PBS
- détachées par la trypsine
- re-suspendues avec du milieu DMEM puis centrifugées (500 x g pendant 5 min)
- le culot cellulaire a été repris dans du milieu DMEM sans sérum puis les cellules ont été énumérées par la méthode du bleu de Trypan.
- les cellules ont été par la suite diluées dans du milieu DMEM sans sérum à raison de 10×10^6 cellules / 200 μ L
- la suspension cellulaire a été, par la suite, mélangée (50 : 50) avec du matrigel (Matrigel) et maintenue à 4°C pendant au moins 1 heure avant l'injection des cellules
- les cellules ont été injectées par voie sous-cutanée dans le flanc droit du rat.

Matériels et méthodes

Trente-trois rats Nude rats (Harlan, France), âgés de 42 jours ont été utilisés. Après une semaine d'acclimatation et dix jours d'induction des tumeurs, la randomisation a eu lieu. Les rats étaient alors hébergés individuellement dans une cage. La température était maintenue à $21.6 \pm 0.5^\circ\text{C}$, avec un cycle de 12 heures d'obscurité et 12 heures de lumière. L'ensemble de l'expérimentation a été réalisée en suivant les recommandations de la législation en vigueur concernant les animaux de laboratoire en France. L'ensemble de l'expérience a été approuvé le comité d'éthique de l'Anses de Maisons-Alfort (France).

Lors de la randomisation, les rats ont été divisés en quatre groupes comme indiqué sur le schéma ci-contre (Figure 30).

Les rats ont été euthanasiés en suivant les recommandations institutionnelles. Après une injection d'analgésiques (Ketamine1000 (Vibrac, France): 75 mg.kg⁻¹+ Xylazine (Bayer,

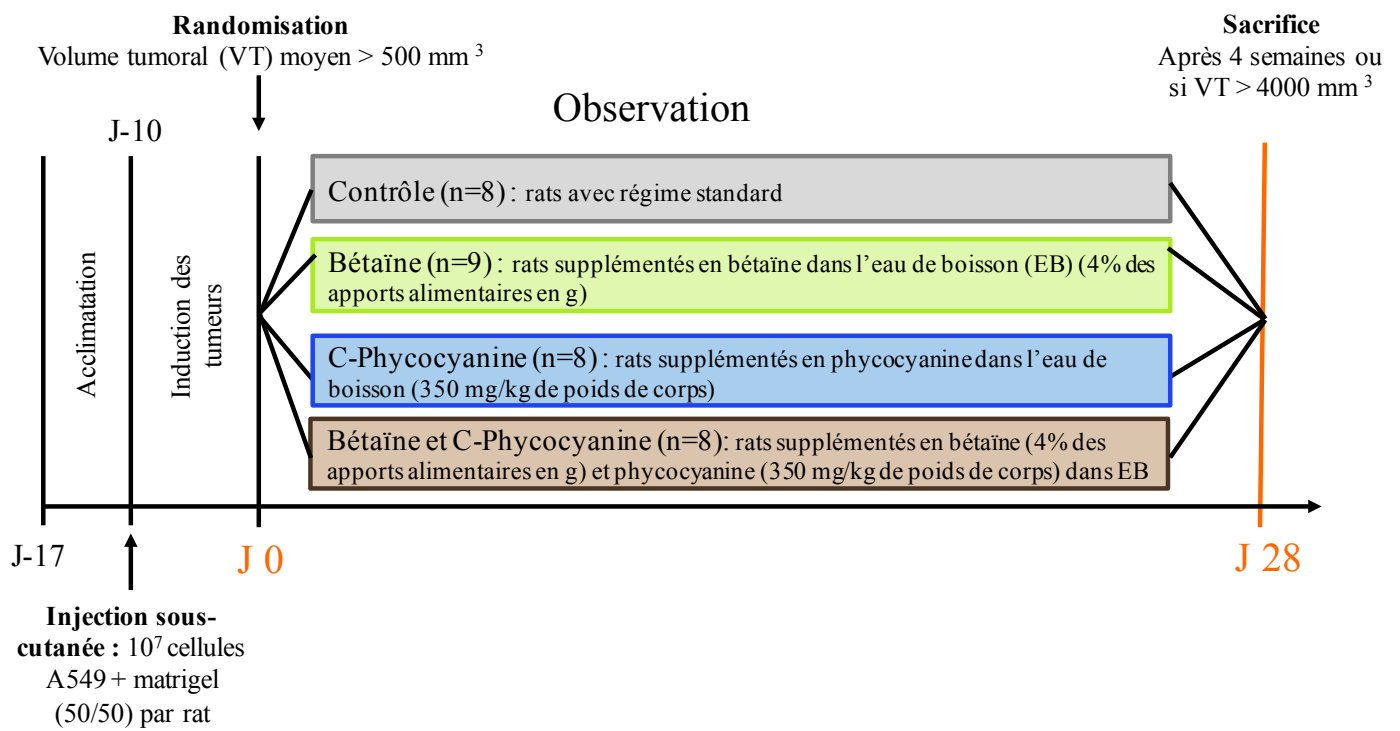


Figure 30. Schéma expérimental de l'étude II.

Matériels et méthodes

France): 8 mg.kg⁻¹), une ponction aortique a été réalisée. Le sang était collecté dans trois tubes différents (Venosafe, France) permettant d'obtenir le plasma : K2 EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid), lithium heparin et d'obtenir le sérum (tube avec gel). Après centrifugation (3000 rpm, 15 min, 4°C), le plasma et le sérum ont été aliquotés et conservés à -80°C jusqu'à analyse.

□□□□ □né dé □□b□néAni □

L'ensemble des rats avait à disposition *at libitum* de l'eau de boisson et de la nourriture standard (A03, Society Safe-diet, Augy, France), contenant 25.2% de protéines, 13.5% de lipides et le reste en glucides. La bétaine (B2754, Sigma, France) et la C-PC (Greentech) étaient sous forme de poudre dissoute dans l'eau de boisson, à hauteur de 4% des apports alimentaires (en grammes) pour la bétaine et de 350 mg.kg de poids corporel⁻¹ pour la C-PC. Chaque jour, à la même heure, les apports hydriques et les apports alimentaires étaient mesurés *via* la pesée des biberons et des croquettes restantes. Les biberons étaient réalisés tous les deux jours. Les apports en bétaine et en C-PC étaient ajustés en fonction des apports alimentaires et hydriques ainsi que le poids de chaque rat.

□□□□ □v□ré□bni □□Abéc □é A□

Une semaine après l'injection des cellules, les tumeurs étaient mesurées grâce à un pied à coulisse et le volume tumoral (VT) (mm³) était calculé selon la formule suivante : longueur x largeur²/2. La croissance tumorale était enregistrée pour chaque rat. Le volume relatif du TV (mm³) au jour X (TVx) était calculé selon la formule suivante : TVx (%) = TVx/TV0 x100. (TV0 étant le volume tumoral au jour 0, jour de la randomisation).

□□□□ □ □b□c □i b□□Abéc □é A□

Le jour de l'euthanasie, la tumeur de chaque rat é été isolée, pesée et stockée à -80°C. Pour les analyses, les tumeurs ont subi deux protocoles différents.

Le premier protocole d'extraction consistait à broyer les tumeurs dans de la glace, avec du tampon A (10 mM 2-amino-2-hydroxyméthyl-1,3-propanediol (TRIS), 10 mM potassium chloride (KCl), 10 mM magnesium chloride (MgCl₂), 1 mM DL-dithiothreitol (DTT), 0.1mM EDTA and, 1% de cocktail avec des inhibiteurs de protéases (P8340-1ml, Sigma-Aldrich, France), pendant 10 secondes, puis 5 x 20 secondes. Une fois broyés, les échantillons étaient

Matériels et méthodes

transférés dans des tubes et centrifugés (5 min, 15000xg, 4°C). Le surnageant (partie cytosolique) était récupéré, aliquoté et stocké à -80°C. Chaque culot était re-suspendu dans du tampon A et centrifugé (5 min, 15000xg, 4°C). Le surnageant était jeté et le culot était de nouveau suspendu avec du tampon B (50 mM TRIS, 50 mM KCl, 150 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, and 0.5% de cocktail avec des inhibiteurs de protéases (P8340-1ml, Sigma-Aldrich), puis a subi trois cycles d'ultrasons (1 min) et d'agitation dans de la glace 10 minutes) et centrifugé (5 min, 15000xg, 4°C). Le surnageant (partie péri-nucléaire et nucléaire) a été récupéré, aliquoté et congelé à -80°C.

Pour le second protocole, les tumeurs étaient broyées dans du tampon RIPA (R0278-500ml, Sigma-Aldrich) avec 1% de cocktail contenant des inhibiteurs de protéases (P8340-1ml, Sigma-Aldrich) et 1% de cocktail contenant des inhibiteurs de phosphatases (P5726-1ml, Sigma-Aldrich), pendant 10 secondes puis 5 x 20 secondes. Après avoir été broyées, les échantillons étaient transférés dans des tubes et centrifugés (5 min, 15000xg, 4°C). Enfin, le surnageant (protéine totale) était récupéré, aliquoté et stocké à -80°C.

□□□□ □i □roA□A□

2.6.1. □ Concentrations hormonales

La corticostérone produite par le cortex surrénal en réponse à un stress a été mesurée à l'aide d'un kit ELISA (Cayman Chemical, Interchim, Montluçon, France). La production d'une réaction enzymatique entre la corticostérone et un corticostérone-acétylcholinestérase (AChE) conjugué (tracer de la corticostérone) a été mesuré dans le sérum *via* une mesure colorimétrique à 420 nm (Photomètre Multiskan FC ThermoScientific, MC2Lab, Clermont-Ferrand, France).

2.6.2. □ Concentrations protéiques

Les concentrations protéiques de l'ensemble des échantillons (plasma, fraction totale, cytosolique et nucléaire des tumeurs) ont été déterminées avec un kit de quantification protéique nommé « BC Assay » (Interchim, Montluçon France). Les concentrations étaient mesurées, à 560 nm, suite à la formation d'une coloration violette après réduction du Cu²⁺ en Cu⁺ par les protéines (Photomètre Multiskan FC ThermoScientific, MC2Lab, Clermont-Ferrand, France).

2.6.3. □ La peroxydation lipidique

Le niveau de substances réagissant à l'acide thiobarbiturique (TBARS) qui sont produits lors de la peroxydation lipidique, a été déterminé par un kit enzymatique (Cayman Chemicals, Interchim, Montluçon, France) en accord avec les instructions du fabricant, dans le sérum et dans la fraction cytosolique de la tumeur. L'adduit MDA-TBA formé par la réaction colorimétrique du MDA et du TBA sous haute température (entre 90 et 100 °C) et en conditions acides a été mesurée à 520 nm (Photomètre Multiskan FC ThermoScientific, MC2Lab, Clermont-Ferrand, France).

2.6.4. □ Les marqueurs antioxydants

□ Evaluation de la SOD

L'évaluation de la SOD a été réalisée à l'aide d'un kit enzymatique (Cayman Chemicals, Interchim, Montluçon, France), dans le plasma et la fraction cytosolique des tumeurs. Ce kit utilise un sel de trétazolum pour la détection des radicaux superoxydes générés par la xanthine oxydase et l'hypoxanthine et mesure trois types de SOD (Cu/Zn-SOD, Mn-SOD et Fe-SOD) à 450 nm (Photomètre Multiskan FC ThermoScientific, MC2Lab, Clermont-Ferrand, France).

□ Evaluation de la catalase

L'activité de la catalase au niveau plasmatique et tumorale a été déterminée par l'utilisation de la fonction peroxydase de la catalase. Cette méthode est basée sur la réaction de cette enzyme avec le méthanol en présence d'une concentration optimale en H₂O₂. Le formaldéhyde produit est mesuré colorimétriquement avec 4-amino-3-hydrazino-5-mercapto-1,2,4-triazole (Purpald) comme chromogène, à 540 nm (Photomètre Multiskan FC ThermoScientific, MC2Lab, Clermont-Ferrand, France).

□ Evaluation de la glutathion peroxydase (GPx)

L'activité du glutathion peroxydase (GPx) a été évaluée au niveau plasmatique et tumorale par une réaction indirecte de couplage avec le glutathion réductase (GR) (Cayman Chemicals, Interchim, Montluçon, France). Le glutathion oxydé, produit par réduction de l'hydroperoxyde

Matériels et méthodes

par le GPx, est recyclé à son état réduit par le GR and NADPH. L'oxydation de NADPH en NADP⁺ est accompagnée d'une baisse à 340 nm (Photomètre Multiskan FC ThermoScientific, MC2Lab, Clermont-Ferrand, France).

gulfstreams 1mlg

Les concentrations en glutathion total (T-GSH) dans le plasma, la fraction cytosolique des tumeurs ont été déterminées grâce à la méthode de Cereser et al. (Cereser et al., 2001). Brièvement, le plasma et les lysats ont été réduits par du dithiothreitol (DTT) (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) (incubation de 10 minutes, à température ambiante) et du GEE (glutathion ethyl ester) a été ajouté, servant de contrôle interne. Après la précipitation protéique, le surnageant a été dérivé par addition d'OPA (ortho-phthal-aldehyde) (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France). Une séparation par chromatographie en phase liquide à haute performance des adduits GSH-OPA a été réalisée avec une colonne en phase inverse UP3 HDO C-18 (150x3.60 mm; 3µm particle size) de Phenomenex (Interchim, Montluçon, France) maintenue à 37°C, suivie d'une détection fluorimétrique à 420 nm après excitation à 340 nm (Summit HPLC system, Dionex SA, Courtaboeuf, France). Les dérivés ont été évalués en utilisant un gradient d'acétonitrile de 10% à 50% dans 25 mM d'acétate d'ammonium, pH 6 pendant 5 minutes. Le débit moyen était de 0.5 ml.min⁻¹ pour une durée d'élution de 15 minutes. L'intégration des chromatogrammes a été réalisée grâce au logiciel Chromelon de Dionex (Version 6.80, Dionex SA, Courtaboeuf, France). La concentration de T-GSH a été calculée grâce à l'utilisation de la courbe standard établie dans les mêmes conditions.

PL

Nrf2 a été évalué dans les extractions totales des tumeurs par un kit ELISA par compétition (Cayman Chemicals, Interchim, Montluçon, France). Nrf2 a été détecté par l'addition d'un anticorps primaire. L'anticorps secondaire s'est lié à l'anticorps primaire spécifique et a permis une lecture colorimétrique sensible à 450 nm (Photometer Multiskan FC ThermoScientific, MC2Lab, Clermont-Ferrand, France).

2.6.3. Les marqueurs de l'apoptose

La concentration d'irisine plasmatique a été évaluée par un kit ELISA par compétition (Cayman Chemicals, Interchim, Montluçon, France). Un anticorps polyclonal reconnaissant l'irisine native a réagi avec une série d'échantillons prédéterminés d'irisine recombinants en compétition sur la plaque pré-induite. (Adipogen, COGER, Paris, France). Cette réaction était mesurée à 450 nm (Photometer Multiskan FC ThermoScientific, MC2Lab, Clermont-Ferrand, France).

2.6.5. Les marqueurs inflammatoires

2.6.5.1. L'activité de la Cox-2

La quantité de Cox-2 a été évaluée au sein de la partie périnucléaire et nucléaire tumorale par un kit enzymatique (Cayman Chemicals, Interchim, Montluçon, France) avec la mesure de l'activité peroxydase de la Cox. L'activité a été analysée colorimétriquement par le suivi de l'apparence de TMPD oxydé (N,N,N',N'-tetramethyl-p-phenylenediamine) à 590 nm (Photomètre Multiskan FC ThermoScientific, MC2Lab, Clermont-Ferrand, France). Un inhibiteur spécifique à l'isoenzyme permettait de distinguer l'activité de Cox-2 de l'activité de Cox-1.

2.6.5.2. Les concentrations de cytokines

Les concentrations en IL-1 β , -4, -6 and -10, et TNF- α ont été évaluées dans la fraction cytosolique des extractions tumorales par kit ELISA (Abcam, Cambridge, United Kingdom). L'analyse utilisait des puits pré-induits d'anticorps spécifiques. Après l'ajout d'un réactif, la réaction colorimétrique était lue à 450 nm (Photometer Multiskan FC ThermoScientific, MC2Lab, Clermont-Ferrand, France).

2.6.6. Les marqueurs apoptotiques

2.6.6.1. L'activité de la caspase-3

Matériels et méthodes

AKT phosphorylé (SerS473) et AKT total, p38- α -phosphorylé (Thr180/Tyr182) et p38- α ont été mesurés sur la fraction protéique totale des tumeurs, par un kit ELISA en sandwich (Abcam, Cambridge, United Kingdom). Des plaques pré-induits d'anticorps spécifiques ont été utilisés. Les activités ont été mesurées après une réaction colorimétrique lue à 450 nm (Photomètre Multiskan FC ThermoScientific, MC2Lab, Clermont-Ferrand, France). Les ratios AKT phosphorylé / AKT total et p38- α -phosphorylé / p38- α ont été calculés.

2.6.6. β -actine et Caspase-3

Le ratio Caspase-3/Pro-Caspase-3 a été mesuré sur l'extraction protéique totale des tumeurs par Western Blot. Les anticorps primaires utilisés (1 :1000) étaient l'anticorps polyclonal Caspase-3 (#9662, CellSignaling Technology, Ozyme, France) and l'anticorps monoclonal β -actine (clone 4C2) (45 kDa, #MABT825, Millipore, France). Les anticorps secondaires utilisés (1:1000) étaient les suivants : goat anti-rabbit IgG (H+L), HRP conjugate (#32460, Thermo Scientific, USA) et goat anti-mouse IgG (H+L), HRP conjugate (#32430, Thermo Scientific, USA). L'anticorps primaire reconnaissait la pro-caspase-3 (35 kDa) et la caspase-3 (17 et 19 kDa). L'activation de la caspase-3 a été évaluée par le ratio caspase-3/pro-caspase-3, après normalisation par l'expression de β -actine.

2.6.7. I κ B

La détection de l'expression a été réalisée dans l'extraction protéique totale des tumeurs par Western Blot. Les anticorps primaires (1:1000) étaient l'anticorps monoclonal I κ B- α (L35A5) (39 kDa, #4814, CellSignaling Technology, Ozyme, France) et l'anticorps monoclonal β -actin (45 kDa, #MABT825, Millipore, France). Les anticorps secondaires utilisés (1:1000) étaient les suivants : goat anti-rabbit IgG (H+L), HRP conjugate (#32460, Thermo Scientific, USA) et goat anti-mouse IgG (H+L), HRP conjugate (#32430, Thermo Scientific, USA)..

2.6.7. Western Blot

Le jour de l'analyse, les échantillons ont été décongelés, environ 50 μ g de chaque échantillon a été dénaturé avec du tampon Laemmli 5x (10min, 90 °C), chargé sur un gel à 12% de polyacrylamide, et migré à 110 V par électrophorèse SDS-PAGE (Mini-PROTEAN® Tetra Cell Systems, Bio-Rad). Le transfert sur membrane PVDF a été réalisé pendant 1h à 90 V (Bio-

Matériels et méthodes

Rad PowerPac HC Power). Suite au transfert, les membranes ont été lavées une fois dans du TBST (Tris-buffered saline pH7.6, 1% Tween 20), puis les sites aspécifiques ont été bloquées grâce à une incubation dans du TBST contenant 5% de lait en poudre écrémé, pendant une heure. Les membranes ont été lavées dans du TBST (3 x 5 min) sur agitateur puis incubés sous agitation toute la nuit à 4°C avec l'anticorps primaire dilué dans du TBST contenant 5% de BSA (bovin serum albumin). Après incubation, les membranes ont été lavées dans du TBST (3 x 5 min) et incubées avec un anticorps secondaire dilué dans du TBST contenant 1% de de lait en poudre écrémé, pendant 1h à température ambiante. Les membranes ont été alors lavées avec du TBST (3 x 5 min) puis du TBS 1x (2 x 10 min). 3 mL de solution de détection (Amersham™ ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagent, RPN2232, GE Healthcare) ont été ajoutés sur chaque membrane et elles ont été incubées pendant 5 min. Les marques ont été visualisées grâce au système ChemiDoc™ XRS+ et au logiciel Image Lab™ (Bio-Rad). Après visualisation d'I κ B- α or caspase-3, les membranes ont été incubées (2 x 10 min) dans un tampon de déshybridation fait maison, puis dans du TBS 1x (2 x 10 min) et enfin (2 x 5 min) dans du TBST. Après ça, le protocole a été recommencé à partir du blocage des sites aspécifiques afin de détecter la β -actine. Les bandes de β -actine ont été détectées sur la même membrane que l'I κ B- α ou la caspase-3. La quantification des signaux a été réalisée grâce à l'utilisation du logiciel Image J (Système ChemiDoc™ XRS + System avec le logiciel Image Lab™).

□□□□ □ **b le Abs é** □ **A** □

Les résultats ont été traités grâce au logiciel SPSS (version 19.0) et reportés en moyenne $\pm$ erreur standard de la moyenne. Les tests non-paramétriques de Kruskal-Wallis et de Mann-Whitney ont été utilisés pour déterminer les différences significatives des variables biologiques. Un $p < 0.05$ était considéré comme significatif.

□□□□ □□□□□□□□

L'objectif de l'étude III était d'évaluer l'effet d'une activité physique spontanée (roue d'activité) sur la croissance de tumeur pulmonaire induite (suite à une injection de cellules A549) *in vivo*.

Matériels et méthodes

Matériel et méthodes

Les cellules A549 du cancer du poumon humain (ATCC® CCL-185™) ont été maintenues en culture à Cellvax Pharma, dans un milieu de culture DMEM complet, 10 % FBS (Foetal Bovin Serum), 5mM L-Glutamine, 1 % Penicillin/Streptomycin, dans un incubateur de culture cellulaire 95 % air et 5 % de dioxyde de carbone (CO₂). Les cellules A549 ont été mises en culture jusqu'à une confluence d'environ 80%.

Le jour de l'injection, les cellules ont été récupérées *via* la procédure suivante :

- lavées 2 fois avec du PBS
- détachées par la trypsine
- re-suspendues avec du milieu DMEM puis centrifugées (500 x g pendant 5 min)
- le culot cellulaire a été repris dans du milieu DMEM sans sérum puis les cellules ont été énumérées par la méthode du bleu de Trypan.
- les cellules ont été par la suite diluées dans du milieu DMEM sans sérum à raison de 10×10^6 cellules / 200 μ L
- la suspension cellulaire a été, par la suite, mélangée (50 : 50) avec du matrigel (Matrigel) et maintenue à 4°C pendant au moins 1 heure avant l'injection des cellules
- les cellules ont été injectées par voie sous-cutanée dans le flanc droit du rat.

Matériel et méthodes

Treize rats Nude rats (Harlan, France), âgés de 42 jours ont été utilisés. Après une semaine d'acclimatation et dix jours d'induction des tumeurs, la randomisation a eu lieu. Les rats étaient alors hébergés individuellement dans une cage. La température était maintenue à $21.6 \pm 0.5^\circ\text{C}$, avec un cycle de 12 heures d'obscurité et 12 heures de lumière. L'ensemble de l'expérimentation a été réalisée en suivant les recommandations de la législation en vigueur concernant les animaux de laboratoire en France. L'ensemble de l'expérience a été approuvé le comité d'éthique de l'Anses de Maisons-Alfort (France).

Lors de la randomisation, les rats ont été divisés en deux groupes comme indiqué sur le schéma ci-contre (Figure 31).

Les rats ont été euthanasiés en suivant les recommandations institutionnelles. Après une injection d'analgésiques (Ketamine1000 (Vibrac, France): 75 mg.kg⁻¹+ Xylazine (Bayer,

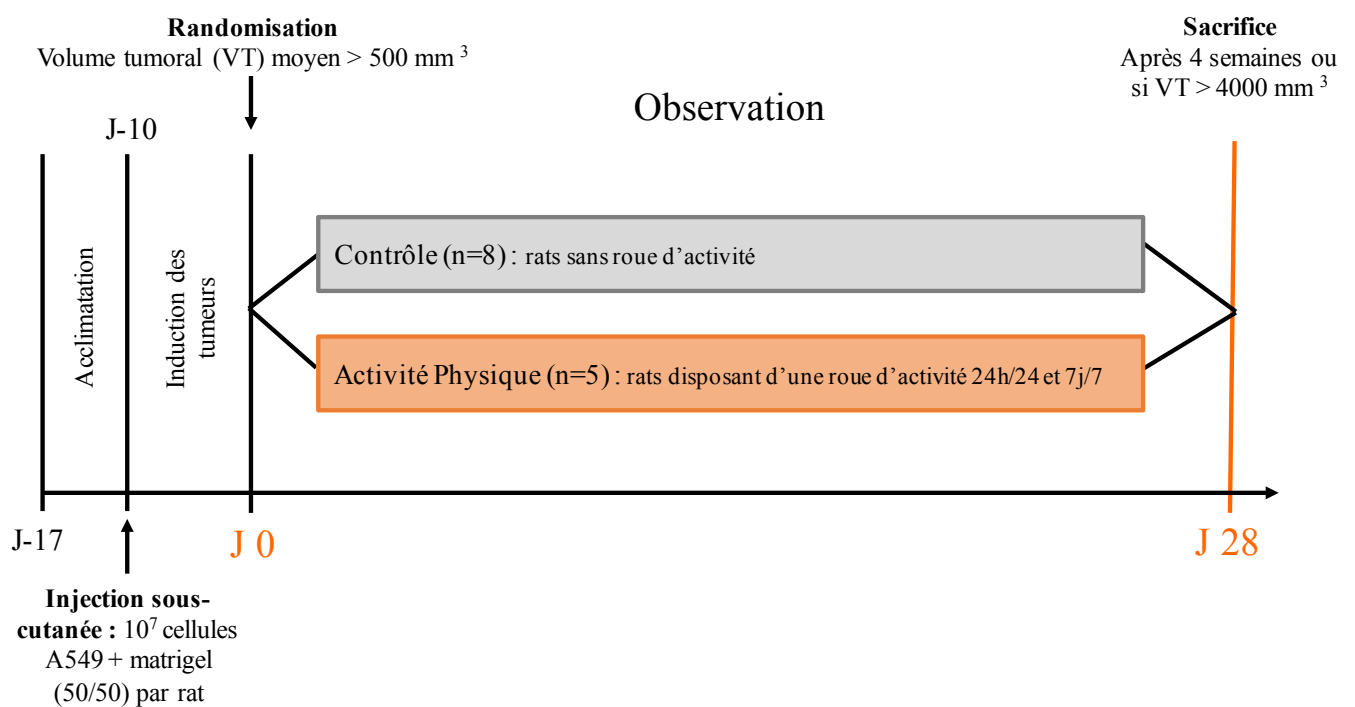


Figure 31. Schéma expérimental de l'étude III.

France): 8 mg.kg⁻¹), une ponction aortique a été réalisée. Le sang était collecté dans trois tubes différents (Venosafe, France) permettant d'obtenir le plasma : K2 EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid), lithium heparin et d'obtenir le sérum (tube avec gel). Après centrifugation (3000 rpm, 15 min, 4°C), le plasma et le sérum ont été aliquotés et conservés à -80°C jusqu'à analyse.

L'ensemble des rats avait à disposition *at libitum* de l'eau de boisson et de la nourriture standard (A03, Society Safe-diet, Augy, France), contenant 25.2% de protéines, 13.5% de lipides et le reste en glucides.

Les rats du groupe « activité physique » avait à disposition une roue d'activité 7j/7 et 24h/24. Les roues étaient équipées de capteurs connectés à un logiciel permettant la mesure et l'enregistrement du nombre de tour, de la durée d'activité et de la distance parcourue par chaque rat (Intellibio, Nancy, France). L'enregistrement des données était réalisé sur 24h correspondant à chaque jour d'observation.

Une semaine après l'injection des cellules, les tumeurs étaient mesurées grâce à un pied à coulisse et le volume tumoral (VT) (mm³) était calculé selon la formule suivante : longueur x largeur²/2. La croissance tumorale était enregistrée pour chaque rat. Le volume relatif du TV (mm³) au jour X (TVx) était calculé selon la formule suivante : TVx (%) = TVx/TV0 x100. (TV0 étant le volume tumoral au jour 0, jour de la randomisation).

La tumeur de chaque rat a été isolée, pesée et stockée à -80°C. Pour les analyses, les tumeurs ont subi deux protocoles différents.

Le premier protocole d'extraction consistait à broyer les tumeurs dans de la glace, avec du tampon A (10 mM 2-amino-2-hydroxyméthyl-1,3-propanediol (TRIS), 10 mM potassium chloride (KCl), 10 mM magnesium chloride (MgCl₂), 1 mM DL-dithiothreitol (DTT), 0.1mM

Matériels et méthodes

EDTA and, 1% de cocktail avec des inhibiteurs de protéases (P8340-1ml, Sigma-Aldrich, France), pendant 10 secondes, puis 5 x 20 secondes. Une fois broyés, les échantillons étaient transférés dans des tubes et centrifugés (5 min, 15000xg, 4°C). Le surnageant (partie cytosolique) était récupéré, aliquoté et stocké à -80°C. Chaque culot était re-suspendu dans du tampon A et centrifugé (5 min, 15000xg, 4°C). Le surnageant était jeté et le culot était de nouveau suspendu avec du tampon B (50 mM TRIS, 50 mM KCl, 150 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, and 0.5% de cocktail avec des inhibiteurs de protéases (P8340-1ml, Sigma-Aldrich), puis a subi trois cycles d'ultrasons (1 min) et d'agitation dans de la glace 10 minutes) et centrifugé (5 min, 15000xg, 4°C). Le surnageant (partie péri-nucléaire et nucléaire) a été récupéré, aliquoté et congelé à -80°C.

Pour le second protocole, les tumeurs étaient broyées dans du tampon RIPA (R0278-500ml, Sigma-Aldrich) avec 1% de cocktail contenant des inhibiteurs de protéases (P8340-1ml, Sigma-Aldrich) et 1% de cocktail contenant des inhibiteurs de phosphatases (P5726-1ml, Sigma-Aldrich), pendant 10 secondes puis 5 x 20 secondes. Après avoir été broyés, les échantillons étaient transférés dans des tubes et centrifugés (5 min, 15000xg, 4°C). Enfin, le surnageant (protéine totale) était récupéré, aliquoté et stocké à -80°C.

□□□□ □i □roA□A□

3.7.1. □ Concentrations hormonales

La corticostérone produite par le cortex surrénal en réponse à un stress a été mesurée à l'aide d'un kit ELISA (Cayman Chemical, Interchim, Montluçon, France). La production d'une réaction enzymatique entre la corticostérone et un corticostérone-acétylcholinestérase (AChE) conjugué (tracer de la corticostérone) a été mesuré dans le sérum via une mesure colorimétrique à 420 nm (Photomètre Multiskan FC ThermoScientific, MC2Lab, Clermont-Ferrand, France).

3.7.2. □ Concentrations protéiques

Les concentrations protéiques de l'ensemble des échantillons (plasma, fraction totale, cytosolique et nucléaire des tumeurs) ont été déterminées avec un kit de quantification protéique nommé « BC Assay » (Interchim, Montluçon France). Les concentrations étaient mesurées, à 560 nm, suite à la formation d'une coloration violette après réduction du Cu²⁺ en Cu⁺ par les protéines (Photomètre Multiskan FC ThermoScientific, MC2Lab, Clermont-Ferrand, France).

3.7.3. La peroxydation lipidique

Le niveau de substances réagissant à l'acide thiobarbiturique (TBARS) qui sont produits lors de la peroxydation lipidique, a été déterminé par un kit enzymatique (Cayman Chemicals, Interchim, Montluçon, France) en accord avec les instructions du fabricant, dans le sérum et dans la fraction cytosolique de la tumeur. L'adduit MDA-TBA formé par la réaction colorimétrique du MDA et du TBA sous haute température (entre 90 et 100 °C) et en conditions acides a été mesurée à 520 nm (Photomètre Multiskan FC ThermoScientific, MC2Lab, Clermont-Ferrand, France).

3.7.4. Les marqueurs antioxydants

4.1.1. Superoxydase (SOD)

L'évaluation de la SOD a été réalisée à l'aide d'un kit enzymatique (Cayman Chemicals, Interchim, Montluçon, France), dans le plasma et la fraction cytosolique des tumeurs. Ce kit utilise un sel de trétazolum pour la détection des radicaux superoxydes générés par la xanthine oxydase et l'hypoxanthine et mesure trois types de SOD (Cu/Zn-SOD, Mn-SOD et Fe-SOD) à 450 nm (Photomètre Multiskan FC ThermoScientific, MC2Lab, Clermont-Ferrand, France).

4.1.2. Catalase (CAT)

L'activité de la catalase au niveau plasmatique et tumorale a été déterminée par l'utilisation de la fonction peroxydase de la catalase. Cette méthode est basée sur la réaction de cette enzyme avec le méthanol en présence d'une concentration optimale en H₂O₂. Le formaldéhyde produit est mesuré colorimétriquement avec 4-amino-3-hydrazino-5-mercapto-1,2,4-triazole (Purpald) comme chromogène, à 540 nm (Photomètre Multiskan FC ThermoScientific, MC2Lab, Clermont-Ferrand, France).

4.1.3. Glutathion peroxydase (GPx)

L'activité du glutathion peroxydase (GPx) a été évaluée au niveau plasmatique et tumorale par une réaction indirecte de couplage avec le glutathion réductase (GR) (Cayman Chemicals, Interchim, Montluçon, France). Le glutathion oxydé, produit par réduction de l'hydroperoxyde

Matériels et méthodes

par le GPx, est recyclé à son état réduit par le GR and NADPH. L'oxydation de NADPH en NADP⁺ est accompagnée d'une baisse à 340 nm (Photomètre Multiskan FC ThermoScientific, MC2Lab, Clermont-Ferrand, France).

gulfstreams 1m/g

Les concentrations en glutathion total (T-GSH) dans le plasma, la fraction cytosolique des tumeurs ont été déterminées grâce à la méthode de Cereser et al. (Cereser et al., 2001). Brièvement, le plasma et les lysats ont été réduits par du dithiothreitol (DTT) (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) (incubation de 10 minutes, à température ambiante) et du GEE (glutathion ethyl ester) a été ajouté, servant de contrôle interne. Après la précipitation protéique, le surnageant a été dérivé par addition d'OPA (ortho-phthal-aldehyde) (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France). Une séparation par chromatographie en phase liquide à haute performance des adduits GSH-OPA a été réalisée avec une colonne en phase inverse UP3 HDO C-18 (150x3.60 mm; 3µm particle size) de Phenomenex (Interchim, Montluçon, France) maintenue à 37°C, suivie d'une détection fluorimétrique à 420 nm après excitation à 340 nm (Summit HPLC system, Dionex SA, Courtaboeuf, France). Les dérivés ont été évalués en utilisant un gradient d'acétonitrile de 10% à 50% dans 25 mM d'acétate d'ammonium, pH 6 pendant 5 minutes. Le débit moyen était de 0.5 ml.min⁻¹ pour une durée d'élution de 15 minutes. L'intégration des chromatogrammes a été réalisée grâce au logiciel Chromelon de Dionex (Version 6.80, Dionex SA, Courtaboeuf, France). La concentration de T-GSH a été calculée grâce à l'utilisation de la courbe standard établie dans les mêmes conditions.

PL

Nrf2 a été évalué dans les extractions totales des tumeurs par un kit ELISA par compétition (Cayman Chemicals, Interchim, Montluçon, France). Nrf2 a été détecté par l'addition d'un anticorps primaire. L'anticorps secondaire s'est lié à l'anticorps primaire spécifique et a permis une lecture colorimétrique sensible à 450 nm Photometer Multiskan FC ThermoScientific, MC2Lab, Clermont-Ferrand, France).

3.7.1. Les marqueurs inflammatoires

La concentration d'irisine plasmatique a été évaluée par un kit ELISA par compétition (Cayman Chemicals, Interchim, Montluçon, France). Un anticorps polyclonal reconnaissant l'irisine native a réagi avec une série d'échantillons prédéterminés d'irisine recombinants en compétition sur la plaque pré-induite. (Adipogen, COGER, Paris, France). Cette réaction était mesurée à 450 nm (Photometer Multiskan FC ThermoScientific, MC2Lab, Clermont-Ferrand, France).

3.7.1. Les marqueurs inflammatoires

La quantité de Cox-2 a été évaluée au sein de la partie périnucléaire et nucléaire tumorale par un kit enzymatique (Cayman Chemicals, Interchim, Montluçon, France) avec la mesure de l'activité peroxydase de la Cox. L'activité a été analysée colorimétriquement par le suivi de l'apparence de TMPD oxydé (N,N,N',N'-tetramethyl-p-phenylenediamine) à 590 nm (Photomètre Multiskan FC ThermoScientific, MC2Lab, Clermont-Ferrand, France). Un inhibiteur spécifique à l'isoenzyme permettait de distinguer l'activité de Cox-2 de l'activité de Cox-1.

3.7.1. Les marqueurs inflammatoires

Les concentrations en IL-1 β , -4, -6 and -10, et TNF- α ont été évaluées dans la fraction cytosolique des extractions tumorales par kit ELISA (Abcam, Cambridge, United Kingdom). L'analyse utilisait des puits pré-induits d'anticorps spécifiques. Après l'ajout d'un réactif, la réaction colorimétrique était lue à 450 nm (Photometer Multiskan FC ThermoScientific, MC2Lab, Clermont-Ferrand, France).

3.7.2. Les marqueurs apoptotiques

Les marqueurs apoptotiques p38- α phosphorylé (p38- α -P) et p38- α total, AKT phosphorylé (AKT-P) et AKT total ont été mesurés sur la fraction protéique totale des tumeurs, par un kit ELISA en sandwich (Abcam, Cambridge, United Kingdom). Des plaques pré-induits d'anticorps spécifiques ont été utilisés. Les activités ont été mesurées après une réaction colorimétrique lue à 450 nm (Photomètre Multiskan FC ThermoScientific, MC2Lab, Clermont-Ferrand, France). Les ratios AKT phosphorylé / AKT total et p38- α -P / p38- α ont été calculés.

Le ratio Caspase-3/Pro-Caspase-3 a été mesuré sur l'extraction protéique totale des tumeurs par Western Blot. Les anticorps primaires utilisés (1 :1000) étaient l'anticorps polyclonal Caspase-3 (#9662, CellSignaling Technology, Ozyme, France) and l'anticorps monoclonal β -actine (clone 4C2) (45 kDa, #MABT825, Millipore, France). Les anticorps secondaires utilisés (1:1000) étaient les suivants : goat anti-rabbit IgG (H+L), HRP conjugate (#32460, Thermo Scientific, USA) et goat anti-mouse IgG (H+L), HRP conjugate (#32430, Thermo Scientific, USA). L'anticorps primaire reconnaissait la pro-caspase-3 (35 kDa) et la caspase-3 (17 et 19 kDa). L'activation de la caspase-3 a été évaluée par le ratio caspase-3/pro-caspase-3, après normalisation par l'expression de β -actine.

La détection de l'expression a été réalisée dans l'extraction protéique totale des tumeurs par Western Blot. Les anticorps primaires (1:1000) étaient l'anticorps monoclonal I κ B- α (L35A5) (39 kDa, #4814, CellSignaling Technology, Ozyme, France) et l'anticorps monoclonal β -actin (45 kDa, #MABT825, Millipore, France). Les anticorps secondaires utilisés (1:1000) étaient les suivants : goat anti-rabbit IgG (H+L), HRP conjugate (#32460, Thermo Scientific, USA) et goat anti-mouse IgG (H+L), HRP conjugate (#32430, Thermo Scientific, USA)..

3.7.3. Western Blot

Le jour de l'analyse, les échantillons ont été décongelés, environ 50 µg de chaque échantillon a été dénaturé avec du tampon Laemmli 5x (10min, 90 °C), chargé sur un gel à 12% de polyacrylamide, et migré à 110 V par électrophorèse SDS-PAGE (Mini-PROTEAN® Tetra Cell Systems, Bio-Rad). Le transfert sur membrane PVDF a été réalisé pendant 1h à 90 V (Bio-Rad PowerPac HC Power). Suite au transfert, les membranes ont été lavées une fois dans du TBST (Tris-buffered saline pH7.6, 1% Tween 20), puis les sites aspécifiques ont été bloquées grâce à une incubation dans du TBST contenant 5% de lait en poudre écrémé, pendant une heure. Les membranes ont été lavées dans du TBST (3 x 5 min) sur agitateur puis incubés sous agitation toute la nuit à 4°C avec l'anticorps primaire dilué dans du TBST contenant 5% de BSA (bovin serum albumin). Après incubation, les membranes ont été lavées dans du TBST (3 x 5 min) et incubées avec un anticorps secondaire dilué dans du TBST contenant 1% de de lait en poudre écrémé, pendant 1h à température ambiante. Les membranes ont été alors lavées avec du TBST (3 x 5 min) puis du TBS 1x (2 x 10 min). 3 mL de solution de détection (Amersham™ ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagent, RPN2232, GE Healthcare) ont été ajoutés sur chaque membrane et elles ont été incubées pendant 5 min. Les marques ont été visualisées grâce au système ChemiDoc™ XRS+ et au logiciel Image Lab™ (Bio-Rad). Après visualisation d'IκB-α or caspase-3, les membranes ont été incubées (2 x 10 min) dans un tampon de déshybridation fait maison, puis dans du TBS 1x (2 x 10 min) et enfin (2 x 5 min) dans du TBST. Après ça, le protocole a été recommencé à partir du blocage des sites aspécifiques afin de détecter la β-actine. Les bandes de β-actine ont été détectées sur la même membrane que l'IκB-α ou la caspase-3. La quantification des signaux a été réalisée grâce à l'utilisation du logiciel Image J (Système ChemiDoc™ XRS + System avec le logiciel Image Lab™).

□□□□ □ **b la Act é A** □

Les résultats ont été traités grâce au logiciel SPSS (version 19.0) et reportés en moyenne ± erreur standard de la moyenne. Le test non-paramétrique de Mann-Whitney a été utilisé pour déterminer les différences significatives des variables biologiques. Un $p < 0.05$ était considéré comme significatif. □

□ | **Aérob** □

Thé

Effets de 6 semaines de supplémentation en bétaine, en C-phycocyanine et d'activité physique volontaire sur le statut redox chez le rat

Carmen Dupuis^{1,2}, Adrien Rossary^{1,2}, Jean-Yves Berthon³, Jacques Larue^{4,5}, Stéphanie Rougé^{1,2}, Marie-Paule Vasson^{1,2,6}, Marc Filaire^{1,2,7}, Edith Filaire^{2,4,5}

¹Université d'Auvergne, Faculté de Médecine et de Pharmacie, Clermont Ferrand, France

²INRA, UMR 1019, UNH, Equipe ECREIN, Clermont-Ferrand, France

³Société GREENTECH SA, Biopôle Clermont-Limagne, Saint-Beauzire, France

⁴CIAMS, Université Paris-Sud, Université Paris-Saclay, Orsay Cedex, France

⁵CIAMS, Université d'Orléans, Orléans, France

⁶Centre Jean Perrin, Centre Hospitalier Universitaire, Unité de Nutrition, Centre de Recherche en Nutrition Humaine, Clermont-Ferrand, France

⁷Centre Jean Perrin, Service de chirurgie thoracique, Clermont-Ferrand, France

Article soumis dans « Science et Sports », 23 février 2017

□ I Aéc I □

Introduction :

L'activité physique régulière est reconnue pour prévenir les maladies chroniques (Brown et al. 2012), *via* notamment des modifications de la composition corporelle, des réponses hormonales, de changements dans la transcription génétique, la régulation à la hausse du système de défenses antioxydant endogène et la modulation de l'immunité (Halpern 2016, Parker et al. 2014, Koelwyn et al. 2015). L'irisine, une myokine découverte dans les années 60, jouerait notamment un rôle dans les effets bénéfiques de l'exercice (Halpern 2016) et serait impliquée dans la régulation à la hausse la transcription des gènes des enzymes antioxydantes (Lu et al. 2015). Outre l'activité physique, la bétaine, qui est un micronutriment, semble améliorer les défenses antioxydantes de l'organisme et réduire l'inflammation (Hagar et al. 2015) tout comme la C-Phycocyanine qui est connu pour piéger certains radicaux libres et stimuler l'immunité (Kuddus et al. 2013). Même si l'activité physique et la nutrition sont des facteurs clés dans le maintien de la santé (OMS, 2016), peu d'études se sont consacrées aux effets spécifiques de l'activité physique spontanée et des suppléments en bétaine et/ou C-Phycocyanine. Chez le rat, l'activité physique spontanée correspond à une activité physique réalisée avec une roue d'activité disponible *at libitum* et reflète l'activité physique modérée réalisée chez l'humain (e.g. marche). Utilisant un modèle animal, les objectifs de cette étude étaient donc de déterminer : 1) les effets d'une supplémentation en bétaine ou en C-Phycocyanine associées ou non à une activité physique spontanée et modérée sur l'équilibre redox systémique et musculaire, et 2) la relation entre l'irisine et le statut redox. En se basant sur les études précédentes (Başaran-Küçükgergin et al. 2014; Fernández-Rojas et al. 2014; Mohammadi et al. 2013), nos principales hypothèses étaient que la bétaine ou la C-Phycocyanine ou l'activité physique augmentait la réponse anti-oxydante, et l'exercice et la bétaine ou la C-PC interagissaient ensemble. Selon les résultats de Samy et al. (2015), nous attendions à ce que l'irisine soit positivement corrélée aux marqueurs antioxydants.

Résultats :

Effet de la roue d'activité

Comparativement au groupe contrôle, l'activité physique spontanée a diminué les concentrations en corticostérone (-22%, $p < 0.05$) et augmenté les concentrations en irisine

(+185%, $p<0.05$). Aucun changement des marqueurs de l'équilibre redox n'a été observé. Par contre, une augmentation de la réponse pro-inflammatoire (Cox-2) a été notée (+80%, $p<0.05$).

Effet des suppléments

Comparativement au groupe contrôle, la bétaine ou la C-Phycocyanine ont diminué les concentrations en corticostérone (respectivement - 42% et - 34%, $p<0.05$) et une augmentation des concentrations en irisine (respectivement + 287% et + 297%, $p<0.05$).

Les concentrations sériques et musculaires en TBARS n'ont pas été affecté par la bétaine ou la C-PC. Par contre, les suppléments en bétaine et la C-PC ont augmenté la réponse antioxydante. Dans le plasma, la bétaine et la C-PC ont induit une augmentation de l'activité de SOD (respectivement + 35% et + 38%, $p<0.05$), de l'activité de GPx (respectivement + 90% et + 60%, $p<0.05$) et des concentrations en T-GSH (respectivement, + 30% et + 28%). Dans le gastrocnémien, la supplémentation en C-PC a augmenté l'activité de CAT (+ 53%, $p<0.05$). Cette observation a également été rapportée pour la supplémentation en bétaine sans atteindre le niveau de significativité recherché.

C-PC a induit une diminution des concentrations musculaires de Cox-2, comparé au groupe contrôle (- 26%, $p<0.05$).

Effets cumulés des suppléments et la roue d'activité

L'activité physique couplée aux suppléments a induit une diminution des TBARS sériques AP + bétaine : - 42%, AP + C-PC : - 50%), plus importante que celle obtenue par les suppléments seules.

Corrélations entre irisine et les variables de l'équilibre redox

Aucune corrélation significative n'a été observé aussi bien entre irisine et peroxydation lipidique qu'entre irisine et variables antioxydantes.

Discussion :

Le stress oxydatif peut induire une inflammation chronique, induisant des altérations au niveau des fonctions cellulaires et contribuant au développement de pathologie. L'exercice régulier et certains micronutriments peuvent réduire l'inflammation et les dommages oxydatifs (Ganesan

et al. 2011). Cette étude a évalué l'effet d'une supplémentation en bêtaïne ou en C-Phycocyanine associée ou non à la pratique d'une activité physique durant 6 semaines sur l'équilibre redox et l'inflammation au niveau systémique et musculaire. La principale conclusion est que l'activité physique volontaire n'induit pas de modifications de l'équilibre redox comparativement à des rats sédentaires. Par contre, la bêtaïne et la C-Phycocyanine ont induit une augmentation des marqueurs antioxydants. Enfin, l'association de l'activité physique volontaire à une supplémentation a induit une diminution de la peroxydation lipidique.

L'utilisation de la roue d'activité est un modèle d'activité intéressant. L'absence d'activité physique forcée permet de ne pas induire d'adaptations physiologiques indiquant un stress chronique (Servais et al., 2003). L'activité physique avec roue d'activité est représentative de l'activité physique spontanée chez l'humain.

Le lien entre activité physique et antioxydants n'est pas clairement établi et dépendrait du mode, de l'intensité et de la durée de l'activité physique (Pingitore et al. 2015). Cependant, plusieurs mécanismes pourraient expliquer comment l'exercice améliore les défenses antioxydantes. Parmi eux, une augmentation de la phosphorylation de Nrf2 suite à un exercice a été reportée, ce qui activerait une réponse antioxydante *via* l'action des ARE. Enfin, l'exercice modéré n'induirait qu'un stress oxydatif modéré qui pourrait être compensé par les antioxydants produits en plus. Ainsi, la durée et l'intensité de notre traitement pourraient ne pas permettre d'augmentation de la peroxydation lipidique, ni des marqueurs antioxydants (Filaire et al., 2009).

Dans cette étude, la C-Phycocyanine a induit une augmentation de certains marqueurs antioxydants au niveau plasmatique (SOD, GPx, T-GSH) et musculaire (CAT). Ces résultats sont en accord avec les études précédentes qui avait mis en évidence que la C-PC pouvait avoir un effet protecteur contre les dommages oxydatifs en conditions pathologiques (diabète) (Zheng et al. 2013). Associée à l'activité physique, la C-PC induit une diminution de la peroxydation lipidique, ce qui est conforme aux travaux de Carfagna et al. (2015). D'autres auteurs ont montré que la C-Phycocyanine pouvait piéger l'anion superoxyde, l'oxygène singulet et les radicaux peroxydes (Bhat et al. 2000, Fernández-Rojas et al. 2014).

Concernant la bêtaïne, elle n'interagit pas directement avec les espèces pro-oxydantes mais interagit avec SAM (S-adenosyl methionine), qui a une activité antioxydante directe. La bêtaïne

protégerait les membranes cellulaires, notamment à travers son pouvoir lipotrope (Balkan et al. 2005).

Comparativement au groupe contrôle, tous les groupes avaient des concentrations en irisine plus importantes. Par contre, aucune corrélation n'a été observée entre l'irisine et les variables de l'équilibre redox. Nous sommes les premiers à montrer qu'une supplémentation en bêtaïne ou en C-Phycocyanine augmente les concentrations en irisine. Par contre, la stimulation de l'irisine par l'exercice a déjà été montrée. L'irisine est une myokine PCG-1 α dépendante. PCG-1 α pourrait avoir un rôle clé dans les adaptations suite à un exercice et pourrait contrôler les ERO à travers la régulation de l'expression de gènes impliqués dans la détoxification des ERO (Handschin et al. 2008). Ainsi, l'irisine pourrait être associée comme un marqueur antioxydant (Samy et al. 2015). De futures recherches semblent nécessaires pour mieux comprendre le rôle de cette myokine dans la régulation de l'équilibre redox.

L'inflammation est un processus physiologique complexe qui fournit à l'organisme une réponse aux lésions tissulaires causées par une action mécanique, chimique ou microbienne. Les ERO peuvent initier et perpétuer des cascades inflammatoires et provoquer des dommages subséquents aux tissus. La C-PC est capable d'inhiber l'inflammation de manière dose dépendante et la C-PC est particulièrement connue pour être un sélectif de Cox-2 (M. C. Reddy et al., 2003). Notre étude a montré qu'une supplémentation en C-PC induisait une diminution non significative de Cox-2. Cette observation a également été reportée lorsque la roue d'activité était associée à une supplémentation C-PC (tableau 3). Précédemment, il avait également été montré que la bêtaïne supprimait les molécules pro-inflammatoires telles que Cox-2 (Go et al., 2007). Cette observation n'a pas été rapportée dans notre étude.

Conclusion :

Contrairement à notre hypothèse, les suppléments nutritionnelles en bêtaïne et en C-Phycocyanine seules semblent avoir plus d'effets sur l'équilibre redox que l'activité physique seule. Récemment, dans une étude *in vitro* (Bingula et al. 2016), nous avons montré que la bêtaïne et/ou la C-Phycocyanine réduisaient la viabilité des cellules A549 et stimulaient les voies pro-apoptotiques. Etant donné que le stress oxydatif peut jouer un rôle dans les maladies telles que le cancer, il serait intéressant d'évaluer si nos résultats trouvés *in vivo* chez les rats sains et *in vitro* sur les cellules cancéreuses pulmonaires A549 pourraient être transposés dans un modèle de rats Nude ayant subi une injection de cellules A549.



Effects of 6 weeks of betaine or C-phycocyanin supplementation and wheel running on redox status

Carmen Dupuis^{1,2}, Adrien Rossary^{1,2}, Jean-Yves Berthon³, Jacques Larue^{4,5}, Stéphanie Rougé^{1,2}, Marie-Paule Vasson^{1,2,6}, Marc Filaire^{1,2,7}, Edith Filaire^{2,4,5}

¹Université d'Auvergne, Faculté de Médecine et de Pharmacie, Clermont Ferrand, France

²INRA, UMR 1019, UNH, Equipe ECREIN, Clermont-Ferrand, France

³Société GREENTECH SA, Biopôle Clermont-Limagne, Saint-Beauzire, France

⁴CIAMS, Université Paris-Sud, Université Paris-Saclay, Orsay Cedex, France

⁵CIAMS, Université d'Orléans, Orléans, France

⁶Centre Jean Perrin, Centre Hospitalier Universitaire, Unité de Nutrition, Centre de Recherche en Nutrition Humaine, Clermont-Ferrand, France

⁷Centre Jean Perrin, Service de chirurgie thoracique, Clermont-Ferrand, France

Article soumis dans « Science et Sports », le 23 février 2017

Abstract

The effect of 6 weeks of betaine (3.88 ± 0.49 g by kg of body weight per day) or C-phycocyanin (0.34 ± 0.0 g by kg of body weight per day) supplementation alone or in association with voluntary wheel running was tested on redox status. Thirty Sprague-Dawley rats were randomly assigned to 6 groups: control, wheel activity, betaine with and without wheel activity, C-phycocyanin with and without wheel activity. At the end of the treatment, gastrocnemius, plasma and serum were collected on sacrificed animals. The levels of antioxidant enzyme activity and the myokine irisin were evaluated. Furthermore, the oxidative stress was quantified through the thiobarbituric acid reaction, and inflammation through Cyclooxygenase-2. Results showed no effect of wheel running on antioxidant markers and oxidative stress, but an increased inflammation. Elevated activity of antioxidant enzymes was observed in betaine- or C-phycocyanin-treated rats both in serum and gastrocnemius; however the Thiobarbituric acid reactive substance levels remained stable. For the wheel-running-coupled-to-diet group, the reduction of serum lipid peroxidation was stronger than the reduction observed in the diet-alone group. In any of the 6 groups, there were no correlations between irisin concentrations and lipid peroxidation or antioxidant parameters. The diet supplementations alone appear to have stronger effects on redox balance than the exercise training alone. Therefore, diet supplementation could be a powerful treatment when oxidative stress is augmented such as in diseases, including cancer.

Key words: betaine; C-Phycocyanin; wheel running; protective effect; redox status; inflammation

Introduction

The role of regular physical activity in preventing chronic diseases is well recognized (Brown et al. 2012). Physical activity benefits to lean body composition (Halpern 2016), hormonal responses (Kraemer et al. 2005), transient change in gene transcription, upregulation of the endogenous antioxidant defence system (Parker et al. 2014), and modulation of numerous cell subsets involved in innate and adaptive immunity (Koelwyn et al. 2015).

In animal studies, it is usual to use treadmill running, isometric force strength-exercise or swimming in order to evaluate the influence of exercise on metabolism. However, these exercise models can cause chronic stress (Servais et al. 2003). Allowing the animals to exercise freely would provide a more representative model of normal physical activity in humans. In rats, this could be done by giving free access to the exercise wheel. Using this model, Pedersen et al. (2016) recently linked exercise, cancer and immunity; they showed that exercise decreases tumour incidence and growth by over 60% in several mouse tumour models. This effect seemed to occur through Natural Killer (NK) cells mobilization by epinephrine action, and NK redistribution by Interleukin-6 (IL- 6).

Irisin, a newly discovered myokine, is thought to play a role in the beneficial effects of exercise (Halpern 2016). It was identified as a proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 α (PGC-1 α)-dependent and exercise-responsive myokines. Circulating irisin is temporarily increased after either an acute exercise bout or chronic training, moreover it is correlated with exercise intensity (Tsuchiya et al. 2015). Oxidative stress is known to stimulate p38 mitogen-activated protein kinase and extracellular regulated protein kinase that activate the transcriptional factor PGC-1 α , leading to cleavage of the irisin precursor fibronectin type III domain containing protein 5 (FNDC5) into circulating irisin (Sanchis-Gomar and Perez-Quilis 2014). Recently, Lu et al. (2015) showed that irisin prevented Reactive Oxygen Species (ROS) overproduction in aortic ring segments and suppressed high glucose-induced ROS generation in the human endothelial cells of the umbilical vein. Furthermore, irisin up-regulated the messenger ribonucleic acid expression of antioxidant enzymes (GPX-1, CAT and SOD). According to Samy et al. (2015), irisin may serve as a myokine with antioxidant action. Therefore, oxidative damages might be reduced by voluntary physical activity. Indeed, wheel

running decreased lipid peroxidation (plasmatic malondialdehyde (MDA) concentrations and increased the antioxidant activity (Filaire et al. 2009). Antioxidants play an important protective role against ROS; high ROS concentrations can have deleterious effects on cells, proteins, lipids and DNA (deoxyribonucleic acid) and, inflammation. Antioxidant administration reduces oxidative damage and inflammation, especially betaine which seems to improve antioxidant in several tissues (Hagar et al. 2015). Betaine is a major methyl donor that maintains normal DNA methylation patterns (Ueland et al. 2005); it is involved in the synthesis of methionine which is a major source of cellular cysteine via transsulfuration pathway for the reduced-glutathione synthesis that is cells protection against ROS (Lever et al. 2010). Betaine supplement seems to induced anti-inflammatory effect, and to attenuate oxidative stress; a decrease of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and MDA have been observed after 6 weeks of supplementation in rats (Başaran-Küçükgergin et al. 2014).

Besides betaine, the rich protein, lipid, vitamin, mineral, chlorophyll, β -carotene and polysaccharide contents of phycocyanin, all have beneficial effects on many diseases. C-Phycocyanin (C-PC) (from cyanobacteria) is anti-oxidant and stimulate immunity (Kuddus et al. 2013). Also, C-PC scavenges many radicals (such as peroxyl radicals, hydroxyl radicals, superoxide anions, singlet oxygen and hydrogen peroxide) and prevents the decrease of antioxidants induced by cisplatin. C-PC is also a selective Cox-2 inhibitor (Fernández-Rojas et al. 2014).

Even though physical activity and nutrition are key factors in human health (OMS, 2016), little is known regarding the specific effects of voluntary wheel running and supplementation in betaine and/or C-PC on antioxidant status and oxidative stress. In the animal model of voluntary exercise, the animal has free access to a running wheel and uses the wheel according his physiology threshold for physical activity. So, voluntary exercise is ranged in mild /moderate exercise. Accordingly, this study examined: (1) the effects of betaine/or C-PC administration associated with 6 weeks of moderate exercise on redox status in plasma and gastrocnemius tissue; and (2) the relationship between irisin and redox status. Based on previous studies (Başaran-Küçükgergin et al. 2014; Fernández-Rojas et al. 2014; Mohammadi et al. 2013), our main hypothesis was that betaine or C-PC treatment or physical activity increase the antioxidant responses, and that exercise and betaine supplementation interact together. Based on Samy et al. (2015) results, we expected that irisin will be positively correlated to antioxidants markers.

Materials and methods
Study design

Thirty males Sprague-Dawley rats (Harlan, France), 42 days old, weighing 180–200 g were tested. The daily light cycle extended from 7 a.m. to 7 p.m. and the room temperature was maintained at $21.6 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$. The experiment was carried out following the guidelines of the current legislation on animal experiments in France, and approved by the Institutional Animal Ethics Committee (Anses) of Maisons-Alfort (France). The "Principles of laboratory animal care" (NIH publication No. 86-23, revised 1985; Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (1996, published by National Academy Press, 2101 Constitution Ave. NW, Washington, DC 20055, USA) were followed.

After one week of acclimatization, rats were housed in individual cages and were randomly assigned to 6 groups:

- Control group (C, n=5, weight: 185.40 ± 4.19 g) received the standard diet;
- Physical activity group (PA, n=5, weight: 188.60 ± 3.68 g), received the standard diet and had access to the wheel ad libitum;
- Betaine treatment group (B, n=5, weight: 186.80 ± 4.06 g) received the standard diet and were orally administered with betaine (4.56 ± 0.06 % of daily food intake, daily dissolved in distilled water, that to say 3.88 ± 0.49 g by kg of body weight);
- C-Phycocyanin treatment group (C-PC, n=5, weight: 183.2 ± 4.05 g) received the standard diet and were orally administered with phycocyanin (0.348 ± 0.007 g by kg of body weight, daily dissolved in distilled water);
- Physical activity and betaine treatment group (PA + B, n=5, weight: 188.80 ± 4.10 g) received the standard diet and were orally administered with betaine (4.66 ± 0.14 % of daily food intake, daily dissolved in distilled water, that to say 4.21 ± 0.33 g by kg of body weight). They had access to the wheel ad libitum;
- Physical activity and C-Phycocyanin treatment group (PA + C-PC), n=5, weight: 185.6 ± 4.43 g) received the standard diet and were orally administered with phycocyanin (0.387 ± 0.008 g by kg of body weight, daily dissolved in distilled water). They had access to the wheel ad libitum.

The food used contained 25.2% of proteins, 13.5% of lipids, the remainder consisted in carbohydrate (A03, Society Safe-diet, Augy, France).

For each rat, betaine (B2754, Sigma-Aldrich, France) and C-PC (Greentech, France) supplementations were adjusted to food and water intakes and body weight. The daily food, water and betaine or C-PC intakes were evaluated for each rat, by weighing of food cups and any spilled food, and bibbers at the same time. Physical activity was measured using sensors (Intellibio, Nancy, France) connected to each wheel; number of laps, laps per minute, duration of activity were automatically recorded on a computer for each 360 s intervals over 24 hours a day for the whole 6 weeks.

As required by institutional guidelines, the rats were killed after 6 weeks of observation; they were anesthetized through aortic puncture using analgesic injection (Ketamine1000 (Vibrac, France): 75 mg.kg⁻¹+ Xylazine (Bayer, France): 8 mg.kg⁻¹). Blood was collected in three polyethylene tubes (Venosafe, France): K2 EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid), lithium heparin to obtain plasma and silicone gel to obtain serum. After centrifugation (3000 rpm, 15 min, 4°C), plasma and serum samples were stored at -80°C until analysis. Right gastrocnemius was dissected, weighed and, stored at -80°C. For analysis, the gastrocnemius was broiled in ice with buffer A (10 mM 2-amino-2-hydroxyméthyl-1,3-propanediol (TRIS), 10 mM potassium chloride (KCl), 10 mM magnesium chloride (MgCl₂), 1 mM DL-dithiothreitol (DTT), 0.1mM EDTA and, 1% of protease inhibitors cocktail (P8340-1ml, Sigma-Aldrich, France): 10 seconds, 5 x 20 seconds in ice, then centrifuged (5 min, 15000xg, 4°C). The supernatant (cytosol protein) was recovered and frozen at -80°C. The pellet was suspended in buffer A and centrifuged (5 min, 15000xg, 4°C). The supernatant was discarded and the pellet was suspended in buffer B (50 mM TRIS, 50 mM KCl, 150 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, and 0.5% of protease inhibitors cocktail (P8340-1ml, Sigma-Aldrich) and centrifuged (5 min, 15000xg, 4°C). The supernatant (perinuclear and nuclear protein) was recovered and frozen at -80°C.

Biochemical assays

Plasmatic protein concentrations, cytosol, perinuclear and nuclear fraction of gastrocnemius were determined with BC Assay, Proteins Quantification Kit (Interchim, Montluçon France). Plasmatic corticosterone was measured using commercially available kits (Cayman Chemical, Interchim, Montluçon, France), and plasmatic irisin expression by Competitive ELISA kit (Adipogen, COGER, Paris, France).

The levels of TBARS, superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and glutathione peroxidase (GPx) were determined with the enzymatic assay kits (Cayman Chemical, Interchim, Montluçon, France) according to the manufacturer's instructions, in serum (TBARS) or plasma (others), and cytosol protein extraction of gastrocnemius. Concentrations of total glutathione (T-GSH) in plasma and in cytosol protein extraction of gastrocnemius were determined by the method of Cereser et al. (2001). The amount of Cox-2 in perinuclear and nuclear protein extraction of the gastrocnemius was obtained using enzymatic assay kit accordingly to the manufacturer's instructions (Cayman Chemical, Interchim, Montluçon France).

Statistical analysis

The results were statistically tested using the SPSS statistical package (version 19.0) and reported as means $\pm$ standard error of the mean (SEM). Changes in body weight and biological parameters within and between groups were assessed using 6(Group) X 2(Test; pr- & post-) ANOVA with repeated measures on the last factor. Hund-Felt adjustments were applied to compensate any violation of sphericity condition. A level of $p < 0.05$ was accepted as significant correction. Relations between irisin and antioxidant parameters were tested using Pearson's correlation tests with a significance level set at $p < 0.05$.

Results

Effect of voluntary wheel running

Wheel running induced a significant decrease in corticosterone concentrations (-22%) and an increase in irisin concentrations (185%) (Table 1). No changes of TBARS in serum and gastrocnemius tissue were observed compared with the Control Group (Fig. 1a, 1b).

Table 1. Comparison of corticosterone and irisin concentrations between controls and others experimental groups

	<i>Control</i>	<i>Physical Activity (PA)</i>	<i>Betaine (B)</i>	<i>Phycocyanin (C-PC)</i>	<i>PA+B</i>	<i>PA+C-PC</i>
Corticosterone ($ng.l^{-1}$)	116.20 $\pm$ 12.68	90.18 $\pm$ 3.53*	67.73 $\pm$ 7.04*	76.47 $\pm$ 2.45*	60.62 $\pm$ 7.53*	113.52 $\pm$ 7.58
Irisin ($\mu g.ml^{-1}$)	4.19 $\pm$ 1.23	11.95 $\pm$ 1.60*	16.25 $\pm$ 3.93*	16.68 $\pm$ 4.84*	12.86 $\pm$ 1.40*	11.67 $\pm$ 1.86*

Mean $\pm$ SEM.

* = $p < 0.05$, significant effects of diet or physical activity, compared to control group, determined by ANOVA.

Antioxidant enzyme activities in blood and gastrocnemius tissue were unaffected by voluntary wheel running (Fig 2 and 3).

Wheel running also induced an inflammatory response in gastrocnemius, with an increase of Cox-2 concentrations (+80%) (Fig. 1c).

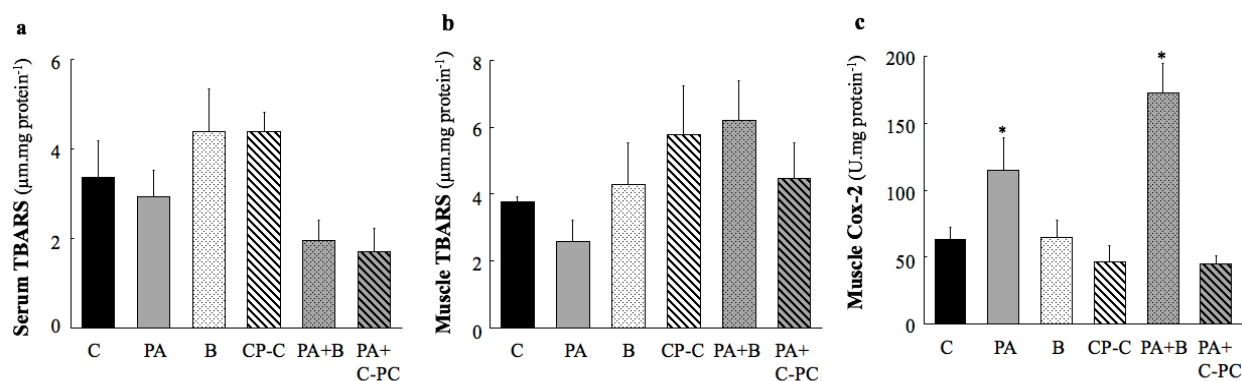
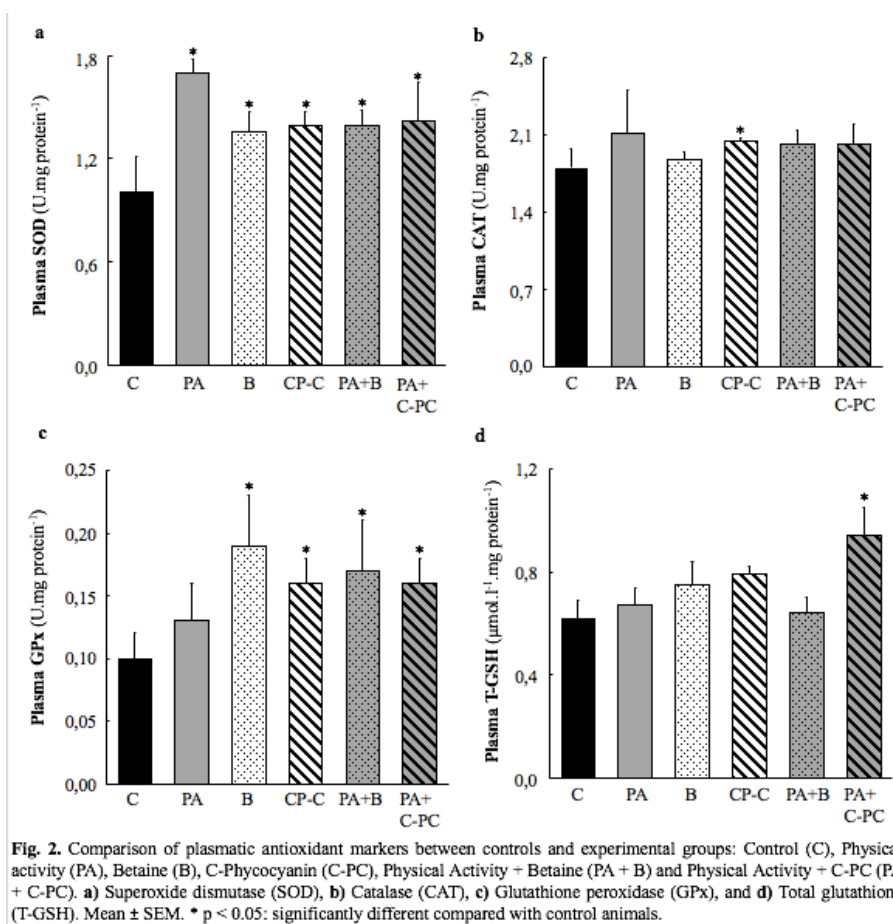


Fig. 1. Comparison of (a) serum and (b) gastrocnemius lipid peroxidation, and (c) gastrocnemius inflammation between controls and experimental groups: Control (C), Physical activity (PA), Betaine (B), C-Phycocyanin (C-PC), Physical Activity + Betaine (PA + B) and Physical Activity + C-PC (PA + C-PC), expressed in Mean $\pm$ SEM. * $p < 0.05$: significantly different compared with control animals

Effect of diet

Betaine or C-PC induced a decrease in corticosterone concentrations (respectively, -41 % and, - 34%) and an increase of irisin levels (respectively, +287% and, +297%) (Table 1).

The serum and gastrocnemius TBARS were not affected by betaine or C-PC (Fig 1a, 1b). Betaine and C-PC involved the antioxidant activity. In plasma, betaine and C-phycocyanin increase the SOD activity (+35%, and +38% respectively), the GPx activity (+90%, and +60%) and the GSH content (+30%, and +28%,) (Fig. 2a, 2c, 2d). In gastrocnemius, C-PC treatment significantly increased CAT activity. This observation was also reported for betaine but did not reach significance level (Fig. 3b).



C-PC induced a decrease of Cox-2 concentrations compared to the control group (-26%) (Fig. 1c).

Cumulative effect of voluntary wheel running and diet

Wheel running coupled to diet treatment induced a reduction in lipid peroxidation only in serum, which was lower than those obtained by diet treatment alone (Fig. 1a).

Correlations between irisin and oxidative stress

There were no significant correlations between irisin concentrations and lipid peroxidation, nor antioxidant parameters in any of the 6 groups of rats.

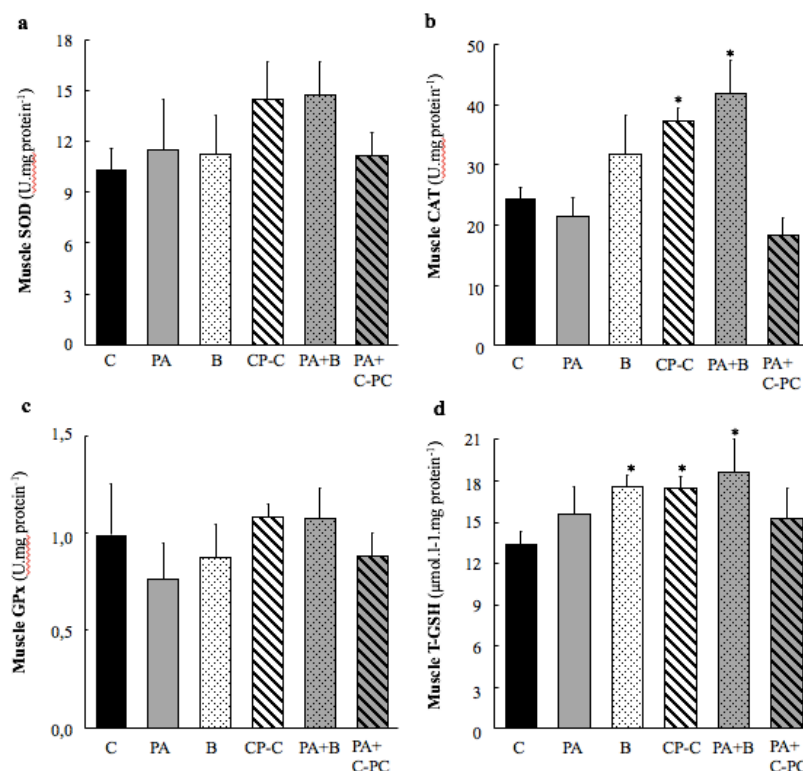


Fig. 3. Comparison of gastrocnemius antioxidant markers between controls and experimental groups: Control (C), Physical activity (PA), Betaine (B), C-Phycocyanin (C-PC), Physical Activity + Betaine (PA + B) and Physical Activity + C-PC (PA + C-PC). **a)** Superoxide dismutase (SOD), **b)** Catalase (CAT), **c)** Glutathione peroxidase (GPx), and **d)** Total glutathione (T-GSH). Mean ± SEM. * $p < 0.05$: significantly different compared with control animals.

Discussion

Oxidative stress leads to chronic inflammation, which, in turn, induces alteration of cell functions, and thus contributes to diseases. Since regular exercise induces adaptations protecting against oxidative stress, and because some micronutrients reduce oxidative damage and inflammation (Ganesan et al. 2011), this study investigated the effects of betaine/or C-PC administration associated with 6 weeks of moderate exercise on redox status and inflammation in plasma and gastrocnemius tissue. The major findings of the current study were that voluntary wheel exercise induced no modification in antioxidant enzyme activities, and in oxidative stress, neither in plasma nor muscle, when compared with sedentary rats. However, betaine or C-PC-treated rats showed elevated activity of antioxidant enzymes associated with no changes on TBARS levels. Wheel running coupled to the antioxidant diet treatment induced a lower reduction in lipid peroxidation only in serum as compared with diet treatment alone.

Diet and/or wheel running reduced corticosterone which indicates no chronic stress. This point must be emphasized because chronic stress may impair antioxidant defences, leading to oxidative damage (Ganesan et al. 2011).

Our data show that free wheel running did not elicit any increase in antioxidant enzyme activities, or lipid peroxidation in plasma and gastrocnemius tissue. Despite a considerable body of work on the consequences of various exercise regimes on oxidative and antioxidant parameters, very few have examined these parameters using a model of voluntary exercise. Moreover, since antioxidant enzymes may be activated selectively during exercise depending on the oxidative stress imposed as well as the intrinsic antioxidant defense capacity, there are conflicting data about relationship between exercise and the changes of antioxidant enzyme activities. Six weeks of wheel running allows to limit pathologies-induced lipid peroxidation (Mohammadi et al. 2013). A short-term voluntary wheel running (1 and 7 days) did not modify the antioxidant activities (GPx and CAT) in skeletal muscle and heart (Selman et al. 2002). Long-term elevations in voluntary exercise did not result in elevations in antioxidant enzyme activities (Vaanholt et al. 2008). The difference between the exercise protocols may explain these discordant results. Several possible physiological mechanisms can be put forward to explain how exercise improves these antioxidant enzyme activities. Among them, the increase of phosphorylation of Nrf-2 by exercise was reported, this activation providing a mechanism of antioxidant protection by binding to the antioxidant response elements (ARE), which are present in the promoter regions of several antioxidant enzymes. As suggested by Pingitore et al. (2015), the link between oxidative stress and exercise depends on the mode, the intensity and the duration of physical activity. Moreover, Marin et al. (1990), reported that moderate exercise induced moderate oxidative stress that can be compensated by antioxidants produced in addition. Thus, one can put forward the hypothesis that the duration and the intensity of our treatment not allowed a raise of lipid peroxidation, neither an upregulation of antioxidant activity.

In the present study, C-PC increased activity of antioxidant enzymes both in plasma (T-GSH, SOD, and GPx) and gastrocnemius tissue (CAT), without changes in TBARS expression. These results are in agreement with previous studies where it was noted that C-PC supplementation could have a protective effect against oxidative stress induced by many pathological conditions like diabetes, sclerosis, and renal, brain and lung injuries (Zheng et al. 2013). When C-PC was associated with wheel running exercise, we observed lower serum lipid peroxidation, compared with C-PC alone. (Carfagna et al. 2015) also had noted C-PC could inhibit exercise-oxidative stress. It has been shown that C-PC could scavenge peroxyl radical in vitro and in vivo (Bhat et al. 2000). More recently, Fernández-Rojas et al. (2014) noted that C-PC scavenges numerous radicals such as superoxide anions, singlet oxygen and peroxyl radicals (LOO•). LOO• are

generated in large amounts due to decomposition of oxidizing lipids and are intermediates in enzymatic lipid peroxidation processes (Spiteller 2006). The transfer of radical reactions from one cell to an adjacent one is interrupted by antioxidants, notably glutathione (Spiteller 2006). Glutathione is considered to be one of the most important scavengers of ROS, which plays many crucial roles in the control of signalling processes, detoxifying certain xenobiotics and heavy metals, as well as other functions (Zitka et al. 2012). Furthermore, SOD is considered as the first line of defence against the deleterious effects of oxygen radicals in the cells where it scavenges ROS by catalyzing the dismutation of superoxide to H₂O₂ and O₂. CAT is a home protein which catalyses the reduction of H₂O₂ to water and oxygen and thus protects the cell from oxidative damage by H₂O₂ and OH. Thus, it appears that C-PC stimulates the activity of antioxidant enzymes even though it is not possible to exclude the fact that it can influence on the reduction of ROS production; however, no modifications of TBARS levels were noted in our study. ROS can initiate and, also perpetuate inflammatory cascades and induce subsequent tissue damage. It seems that C-PC inhibited the inflammation proportionally to its dosage (Fig 3C), this is in agreement with the reports stating that C-PC is selective Cox-2 inhibitor (Fernández-Rojas et al. 2014).

We had also shown betaine increased antioxidant defences in plasma (SOD and GPx), as previously noted by Ganesan et al (2011). When betaine was associated with wheel running exercise, we observed lower serum lipid peroxidation, compared with betaine alone. In previous human study, it has been noted that chronic betaine supplementation didn't induce changes in MDA concentrations (Trepanowski et al. 2011). Betaine does not directly interact with oxidants but interacts with S-adenosyl methionine (SAM) which has a direct antioxidant activity. Betaine scavenges ROS and chelates iron ions and, ultimately, inhibits hydroxyl radical generation (Caro and Cederbaum 2004). Betaine supplementation protects cell membranes, particularly their structural and functional integrity, by counteracting ROS-mediated lipid peroxidation and protein carbonyl formation, notably through its lipotropic power (Balkan et al. 2005).

All groups showed irisin increases in comparison to the control group (Table 1). Whatever the group of rats, there were no correlations neither with lipid peroxidation nor the antioxidant parameters. We are the first to show betaine or C-Phycocyanin supplementation increased irisin concentrations. In human study, Park et al. (2014) didn't found association between dietary and irisin activity. On the contrary, the stimulation of irisin production by chronic exercise was also observed. Irisin is a PGC-1 α dependent myokine that elevates UCP-1. The interaction between

PGC-1 α and PPAR- γ allows the interaction with several transcription factors. C-PC raised PPAR- γ this nuclear receptor protein being involved in cell cycle and inflammatory responses (Saini et al. 2014). PGC-1 α should have a key role in exercise adaptations and may also control ROS through mediated gene expression playing a role in ROS detoxification (Handschin et al. 2008). Depletion of PGC-1 α in mouse increased scavenger enzymes: SOD2, Trx2 (thioredoxin reductase-2) and CAT (Lu et al. 2010). Irisin content is associated to oxidative stress markers in muscle and can be considered like an antioxidant marker (Samy et al. 2015). Further investigations seem necessary to better understand the role of this myokine in redox status regulation.

Conclusion

Contrary to our hypothesis, the diet supplementations alone appear to have stronger effects on redox balance than the exercise training alone. Recently, *in vitro* study (Bingula et al. 2016), we had shown C-PC and/or betaine reduced the cell viability of lung cancer A549 cells and enhanced the proapoptotic pathways. Considering that oxidative stress could play a role in disease, such as cancer, it could be interesting to evaluate whether our results found *in vivo* on healthy rats and *in vitro* on lung cancer A549 cells can be transposed to pathogen-free male nude rats with subcutaneous injection of A549 cells, oxidative stress playing key role in lung cancer progression.

Author disclosure Statement

No competing financial interests exist.

Acknowledgments

The technical support of Dr Adda Berkane (Cellvax) is greatly appreciated.

References

- Balkan, J., Parldar, F.H., Doğru-Abbasoğlu, S., Aykaç-Toker, G., and Uysal, M. 2005. The effect of taurine or betaine pretreatment on hepatotoxicity and prooxidant status induced by lipopolysaccharide treatment in the liver of rats. *Europ. J. Gastroent. Hepatol.* 17(9): 917–921. PMID: 16093868.
- Başaran-Küçükgergin, C., Bingül, I., Soluk Tekkeşin, M., Olgaç, V., Doğru-Abbasoğlu, S., and Uysal, M. 2014. Effects of carnosine, taurine, and betaine pretreatments on diethylnitrosamine-induced oxidative stress and tissue injury in rat liver. *Toxicol. Ind. Health.* 32(8):1405-1413. doi:10.1177/0748233714563432. PMID: 25552536.

- Bhat, V.B., and Madyastha, K. M. 2000. C-Phycocyanin: a potent peroxy radical scavenger in vivo and in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 275(1): 20–25. doi:10.1006/bbrc.2000.3270. PMID: 10944434.
- Bingula, R., Dupuis, C., Pichon, C., Berthon, J.Y., Filaire, M., Pigeon, L., and Filaire, E. 2016. Study of the effects of betaine and/or C-Phycocyanin on the growth of lung cancer A549 cells in vitro and in vivo. *J. Oncol.* 2016: e8162952. doi:10.1155/2016/8162952. PMCID: PMC5011231.
- Brown, J.C., Winters-Stone, K., Lee, A., and Schmitz, K.H. 2012. Cancer, physical activity, and exercise. *Comprehensive Physiol.* 2(4): 2775–2809. doi:10.1002/cphy.c120005. PMCID: PMC4122430.
- Carfagna, S., Napolitano, G., Barone, D., Pinto, G., Pollio, A., and Venditti, P. 2015. Dietary supplementation with the microalga *Galdieria Sulphuraria* (Rhodophyta) reduces prolonged exercise-induced oxidative stress in rat tissues. *Oxidative Med. Cellular Longevity* 2015: 732090. doi:10.1155/2015/732090. PMCID: PMC4385680.
- Caro, A.A., and Cederbaum, A.I. 2004. Antioxidant properties of S-Adenosyl-L-Methionine in Fe(2+)-initiated oxidations. *Free Rad. Biol. Med.* 36(10): 1303–1316. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2004.02.015. PMID: 15110395.
- Cereser, C., Guichard, J., Draï, J., Bannier, E., Garcia, I., Boget, S., Parvaz, P., and Revol, A. 2001. Quantitation of reduced and total glutathione at the femtomole level by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection: application to red blood cells and cultured fibroblasts. *J. Chromatogr. Biomed. Sci. Appl.* 752(1):123–132. PMID: 11254186.
- Fernández-Rojas, B., Medina-Campos, O.N., Hernández-Pando, R., Negrette-Guzmán, M., Huerta-Yepez, S., and Pedraza-Chaverri, J. 2014. C-Phycocyanin prevents cisplatin-induced nephrotoxicity through inhibition of oxidative stress. *Food Funct.* 5(3): 480–490. doi:10.1039/c3fo60501a. PMID: 24503583.
- Filaire, E., Rouveix, M., Massart, A., Gladine, C., Davicco, M.J. and Durand, D. 2009. Lipid peroxidation and antioxidant status in rat: effect of food restriction and wheel running. *Europ. J. Applied Physiol.* 107(2): 243–250. doi:10.1007/s00421-009-1121-7. PMID: 19568764.
- Ganesan, B., Anandan, R. and Lakshmanan, P.T. 2011. Studies on the protective effects of betaine against oxidative damage during experimentally induced restraint stress in wistar albino rats. *Cell Stress Chaperones.* 16(6): 641–652. doi:10.1007/s12192-011-0276-4. PMCID: PMC3220389.
- Hagar, H., El Medany, A., Salam, R., El Medany, G., and Nayal, O.A. 2015. Betaine supplementation mitigates cisplatin-Induced nephrotoxicity by abrogation of oxidative/nitrosative stress and suppression of inflammation and apoptosis in rats. *Exp. Toxicol. Pathol* 67(2): 133–141. doi:10.1016/j.etp.2014.11.001. PMID: 25488130.
- Halpern, B. 2016. Elevated irisin and alanine aminotransferase levels in hypothyroidism: role of oxidative stress? *Arch. Endocrinol. Metabolism.* 60(2): 89–91. doi:10.1590/2359-3997000000166. PMID: 27191044.
- Handschin, C., and Spiegelman, B.M. 2008. The role of exercise and PGC1 α in inflammation and chronic disease. *Nature.* 454(7203): 463–469. doi:10.1038/nature07206. PMCID: PMC2587487.
- Koelwyn, G.J., Wennerberg, E., Demaria, S., and Jones, L.W. 2015. Exercise in regulation of inflammation-immune axis function in cancer initiation and progression. *Oncology.* 29 (12): 908–920. PMCID: PMC4909049.
- Kraemer, W.J., and Ratamess, N.A. 2005. Hormonal responses and adaptations to resistance exercise and training. *Sports Med.* 35 (4): 339–361. PMID: 15831061.
- Kuddus, M., Singh, P., Thomas, G., and Al-Hazimi, A. 2013. Recent developments in production and biotechnological applications of C-Phycocyanin. *BioMed. Res. Int.* 2013: 1–9. doi:10.1155/2013/742859. PMCID: PMC3770014.
- Lever, M., and Slow, S. 2010. The clinical significance of betaine, an osmolyte with a key role in methyl group metabolism. *Clin. Biochem.* 43(9): 732–744. doi:10.1016/j.clinbiochem.2010.03.009. PMID: 20346934.

Lu, J., Xiang, G., Liu, M., Mei, W., Xiang, L., and Dong, J. 2015. Irisin protects against endothelial injury and ameliorates atherosclerosis in apolipoprotein e-null diabetic mice. *Atherosclerosis*. 243(2): 438–448. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2015.10.020. PMID: 26520898.

Lu, Z., Xu, X., Hu, X., Fassett, J., Zhu, G., Tao, Y., Li, J. et al. 2010. PGC-1 α regulates expression of myocardial mitochondrial antioxidants and myocardial oxidative stress after chronic systolic overload. *Antiox. Redox Signal*. 13(7): 1011–1022. doi:10.1089/ars.2009.2940. PMCID: PMC2959178.

Marin, E., Hänninen, O., Müller, D. and Klinger, W. 1990. Influence of acute physical exercise on glutathione and lipid peroxides in blood of rat and man. *Acta. Physiologica Hungarica*. 76 (1): 71–76. PMID: 2088013

Mohammadi, M., Ghaznavi, R., Keyhanmanesh, R., Sadeghipour, H.R., Naderi, R., and Mohammadi, H. 2013. Voluntary exercise prevents lead-induced elevation of oxidative stress and inflammation markers in male rat blood. *Scientific W. J.* 2013: 320704. doi:10.1155/2013/320704. PMCID: PMC3814097.

OMS. 2016. Stratégie mondiale pour l'alimentation, l'exercice physique et la santé [en ligne]. WHO. Disponible à <http://www.who.int/dietphysicalactivity/strategy/eb11344/9241592222/fr/> [cité le 4 février 2017].

Park, K.H., Zaichenko, L., Peter, P., Davis, C.R., Crowell, J.A., and Mantzoros, C.S. 2014. Diet quality is associated with circulating C-reactive protein but not irisin levels in humans. *Metabolism*. 63(2): 233–241. doi:10.1016/j.metabol.2013.10.011. PMCID: PMC4373656.

Parker, L., McGuckin, T.A., and Leicht, A.S. 2014. Influence of exercise intensity on systemic oxidative stress and antioxidant capacity. *Clin. Physiol. Funct. Imag.* 34(5): 377–383. doi:10.1111/cpf.12108. PMID: 24283399.

Pedersen, L., Idorn, M., Olofsson, G.H., Lauenborg, B., Nookaew, I., Hansen, R.H., Johannesen, H.H. et al. 2016. Voluntary running suppresses tumor growth through epinephrine- and IL-6-dependent NK cell mobilization and redistribution. *Cell Metab.* 23(3): 554–562. doi:10.1016/j.cmet.2016.01.011. PMID: 26895752.

Pingitore, A., Lima, G.P., Mastorci, F., Quinones, A., Iervasi, G., and Vassalle, C. 2015. Exercise and oxidative stress: potential effects of antioxidant dietary strategies in sports. *Nutrition*. 31(7–8): 916–922. doi:10.1016/j.nut.2015.02.005. PMID: 26059364.

Saini, M.K., and Sanyal, S.N. 2014. Piroxicam and C-Phycocyanin prevent colon carcinogenesis by inhibition of membrane fluidity and canonical Wnt/ β -Catenin signaling while up-regulating ligand dependent transcription factor PPAR γ . *Biomed. Pharmacoth.* 68(5): 537–550. doi:10.1016/j.biopha.2014.03.007. PMID: 24721324.

Samy, D.M., Ismail, C.A., and Nassra, R.A. 2015. Circulating irisin concentrations in rat models of thyroid dysfunction — effect of exercise. *Metab.* 64(7): 804–13. doi:10.1016/j.metabol.2015.01.001. PMID: 25720940.

Sanchis-Gomar, F., and Perez-Quilis, C. 2014. The p38–PGC-1 α –irisin–betatrophin axis. *Adipocyte*. 3(1): 67–68. doi:10.4161/adip.27370. PMCID: PMC3917937.

Selman, C., McLaren, J.S., Collins, A.R., Duthie, G.G., and Speakman, J.R. 2002. Antioxidant enzyme activities, lipid peroxidation, and DNA oxidative damage: the effects of short-term voluntary wheel running. *Archives Biochem. Biophysics*. 401(2): 255–261. doi:10.1016/S0003-9861(02)00050-4. PMID: 12054476.

Servais, S., Couturier, K., Koubi, H., Rouanet, J.L., Desplanches, D., Sornay-Mayet, M.H., Sempore, B., Lavoie, J.M. and Favier, R. 2003. Effect of voluntary exercise on H₂O₂ release by subsarcolemmal and intermyofibrillar mitochondria. *Free Rad. Biol. Med.* 35(1): 24–32. doi:10.1016/S0891-5849(03)00177-1. PMID: 12826253

Spiteller, G. 2006. Peroxyl Radicals: Inductors of neurodegenerative and other inflammatory diseases. Their origin and how they transform cholesterol, phospholipids, plasmalogens, polyunsaturated fatty acids, sugars, and proteins into deleterious products. *Free Rad. Biol. Med.* 41(3): 362–387. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2006.03.013.

Trepanowski, J.F., Farney, T.M., McCarthy, C.G., Schilling, B.K., Craig, S.A., and Bloomer, R.J. 2011. The effects of chronic betaine supplementation on exercise performance, skeletal muscle oxygen saturation and associated

biochemical parameters in resistance trained men. *J. Strength Conditioning Res.* 25(12): 3461–3471. doi:10.1519/JSC.0b013e318217d48d.

Tsuchiya, Y., Ando, D., Takamatsu, K., and Goto, K. 2015. Resistance exercise induces a greater irisin response than endurance exercise. *Metab. Clin. Experimental.* 64(9): 1042–1050. doi:10.1016/j.metabol.2015.05.010. PMID: 26081427.

Ueland, P.M., Holm, P.A. and Hustad, S. 2005. Betaine: a key modulator of one-carbon metabolism and homocysteine status. *Clin. Chem. Labor. Med.* 43(10): 1069–1075. doi:10.1515/CCLM.2005.187. PMID: 16197300.

Vaanholt, L.M., Speakman, J.R., Garland, T., Loble, G.E., and Visser, G.H. 2008. Protein synthesis and antioxidant capacity in aging mice: effects of long-term voluntary exercise. *Physiol. Biochem. Zool.* 81(2): 148–157. doi:10.1086/525289. PMID: 18199000.

Zheng, J., Inoguchi, T., Sasaki, S., Maeda, Y., McCarty, M.F., Fujii, M., Ikeda, N., Kobayashi, K., Sonoda, N., and Takayanagi, R. 2013. Phycocyanin and phycocyanobilin from spirulina platensis protect against diabetic nephropathy by inhibiting oxidative stress. *Am. J. Physiol.* 304(2): R110–120. doi:10.1152/ajpregu.00648.2011. PMID: 23115122.

Zitka, O., Skalickova, S., Gumule, J., Masarik, M., Adam, V., Hubalek, J., Trnkova, L., Kruseova, J., Eckschlager, T., and Kizek, R. 2012. Redox status expressed as GSH:GSSG ratio as a marker for oxidative stress in paediatric tumour patients. *Oncol. Lett.* 4(6): 1247–1253. doi:10.3892/ol.2012.931. PMCID: PMC3506742.

Thé

Une supplémentation en bêtaïne et/ou en C-Phycocyanine ralentit la croissance tumorale du cancer du poumon *in vivo*

Carmen Dupuis¹, Marc Filaire^{1,2}, Adrien Rossary¹, Jean-Yves Berthon³, Ming Wei⁴, Jeremie Talvas¹, Edith Filaire^{1,5,6}

¹Université Clermont Auvergne, UMR 1019 INRA-UcA, UNH (Human Nutrition Unity), ECREIN Team, 63000 Clermont-Ferrand, France

²Centre Jean Perrin, Service of thoracic surgery, 58 rue Mont Alembert, 63011 Clermont-Ferrand, France

³Greentech SA, Biopôle Clermont-Limagne, 63360 Saint-Beauzire, France

⁴Cellvax, SAS, Parc Biocitech, 102 Avenue Gaston Roussel, 93230 Romainville, France

⁵CIAMS, Université Paris-Sud, Université Paris-Saclay, 91405 Orsay Cedex, France

⁶CIAMS, Université d'Orléans, 45067, Orléans, France.

Article soumis dans « Journal of Oncology », le 23 mars 2017

□ I Aéc I □

Introduction :

Le cancer du poumon non-à-petites cellules (CPNPC) est le cancer du poumon le plus fréquent et est la première cause de décès par cancer dans le monde (Siegel et al., 2013). Le développement et la progression du cancer impliquent des modifications anormales dans le processus de méthylation de l'ADN. Certains micronutriments affectent la synthèse de l'ADN grâce à des processus de reméthylation (Takata et al., 2012). La bétaine est l'un de ces micronutriments considérés comme donneur de méthyle, impliqués dans la synthèse de la méthionine et dans la synthèse du glutathion réduit permettant de protéger les cellules contre les ERO (Balaraman Ganesan et al., 2011). Un traitement en bétaine peut atténuer le stress oxydatif (Hagar & Al Malki, 2014; Oliva et al., 2011) et avoir un effet anti-inflammatoire *via* la modulation de NF- κ B et la réduction de l'expression de cytokines pro-inflammatoires telles que TNF- α , IL-6 et de Cox-2 (Detopoulou et al., 2008; Kim et al., 2014). En plus de la bétaine, la C-PC, l'un des composants majeurs de la spiruline, possède de nombreuses fonctions biologiques dont une fonction antioxydante et immunitaire (Gao, Liu, et al., 2016; Thangam et al., 2013). La C-PC a également un potentiel effet anti-cancer observé *in vitro* et *in vivo* sur une variété de types de cellules cancéreuses : pulmonaire (Bingula et al., 2016), colorectal (Xinhan et al., 1995) et mammaire (Li et al., 2010). La C-PC aurait un effet anti-cancer en modulant l'apoptose et la prolifération cellulaire (Thangam et al., 2013). D'une part, la C-PC induirait l'apoptose des cellules tumorales grâce à une production d'ERO, une augmentation des capases-3 et -8 et une activation de p38 et JNK (Li et al., 2006; Liao et al., 2016). D'autre part, la C-PC participerait à l'inhibition des phénomènes anti-apoptotiques *via* une diminution de Bcl-2 et une inhibition de la voie PI3K/AKT (Gao et al., 2016; Osaki et al., 2004).

Actuellement, peu d'études ont investigué le rôle de la bétaine et de la C-PC dans la cancérogenèse pulmonaire. Notre équipe a récemment montré que la bétaine et la C-PC ralentissaient la croissance tumorale des cellules A549 *in vitro* et avaient un effet synergique sur la diminution de NF- κ B (induit par TNF- α) et sur l'augmentation du pro-apoptotique p38. Dans cette étude, nous avons investigué l'effet anti-cancer de la bétaine et de la C-PC sur des tumeurs pulmonaires induites (injection de cellules A549 en sous-cutané) *in vivo*, après un traitement oral de quatre semaines. Puisque la bétaine et la C-PC ont des effets antioxydants anti-inflammatoires et antiprolifératifs sur de nombreuses lignées cellulaires (Başaran-

Küçükgergin et al., 2014; Basha et al., 2008; Kim et al., 2014; Oliva et al., 2012; Thangam et al., 2013), nous avons émis l'hypothèse qu'une supplémentation en bêtaïne et/ou en C-PC pourraient permettre de ralentir la croissance tumorale pulmonaire, par modulation des voies de signalisation impliquées dans l'apoptose et des marqueurs pro-inflammatoires.

Résultats :

Effets de la bêtaïne et/ou la C-PC sur la croissance tumorale

Comparés avec la groupe contrôle, tous les groupes traités (bêtaïne, C-PC et bêtaïne + C-PC) avaient un ralentissement de la croissance tumorale à partir de la seconde semaine. Le jour de l'euthanasie, les volumes tumoraux moyens et les poids tumoraux étaient significativement inférieurs pour les groupes bêtaïne, C-PC et bêtaïne + C-PC par rapport au groupe contrôle. Aucune diminution additionnelle n'a été observée avec le traitement combiné.

Comparativement au groupe bêtaïne, les groupes C-PC et bêtaïne + C-PC avaient une diminution du volume tumoral plus importante.

Balance redox dans le plasma/sérum

Comparativement au contrôle, les supplémentations ont induit une diminution non-significative des concentrations en TBARS, quel que soit le traitement (bêtaïne : - 23 %, C-PC : - 15 % et bêtaïne + C-PC : - 31 %).

La bêtaïne n'avait pas d'effet sur les concentrations en SOD et T-GSH. A contrario, la C-PC seule ou associée à la bêtaïne a significativement augmenté les concentrations en SOD (respectivement + 86 % et + 126 %) et T-GSH (respectivement + 85 % et + 79 %).

Balance redox dans la tumeur

Comparativement au contrôle, les supplémentations ont induit une augmentation significative des concentrations en TBARS, quel que soit le traitement (bêtaïne : + 173 %, C-PC : 259 % et bêtaïne + C-PC : 252 %). Aucune augmentation additionnelle n'a été observée avec le traitement combiné.

Les concentrations tumorales en T-GSH étaient significativement inférieures pour l'ensemble des groupes supplémentés (bétaine : - 37 %, C-PC : - 66 % et bétaine + C-PC : - 60 %). Aucune diminution additionnelle n'a été observée avec le traitement combiné.

Au sein de la tumeur, comparé au groupe contrôle, nous avons observé une diminution significative de l'activité du SOD (- 30 %) et une augmentation significative de Nrf2 (+ 100 %) dans le groupe bétaine.

La C-PC seule ou associée à la bétaine a augmenté les concentrations en CAT (respectivement + 180 % et + 107 %), sans effet additionnel avec la combinaison des deux micronutriments.

Marqueurs pro-inflammatoires dans la tumeur

Comparativement au groupe contrôle, tous les traitements ont induit une augmentation significative de l'activité de Cox-2 au niveau tumoral (bétaine : + 83 %, C-PC : + 57 % et bétaine + C-PC : + 33%).

La C-PC a induit une augmentation non-significative d'IL-1 α (+ 90 %), IL-6 (+ 33 %) et TNF- α (+ 36 %), tandis que l'association de la bétaine et la C-PC ont augmenté significativement IL-6 (+ 83 %) et TNF- α (+ 52 %).

Marqueurs anti-inflammatoires dans la tumeur

Comparativement au groupe contrôle, la bétaine et la C-PC seule n'ont pas eu d'effets sur les cytokines anti-inflammatoires, tandis que le traitement combiné a significativement augmenté IL-4 (+ 91 %) et IL-10 (+ 143 %).

Marqueurs anti-apoptotiques dans la tumeur

Comparativement au groupe contrôle, la C-PC seule a diminué non-significativement le ratio AKT phosphorylé / AKT total. Par contre, l'association des deux traitements a significativement diminué le ratio AKT phosphorylé / AKT total.

Marqueurs pro-apoptotiques dans la tumeur

Comparativement au groupe contrôle, la C-PC a augmenté le ratio p38 phosphorylé / p38 total (+ 98 %, $p < 0.05$) et a diminué l'expression d'I κ B (- 70 %, $p < 0.05$). Cette dernière observation

a également été notée pour le traitement associant bétaine et C-PC (- 63 %, $p < 0.05$), sans effet additionnel.

L'association de la bétaine et la C-PC a augmenté le ratio caspase-3 / pro-caspase-3 (+ 149 %, $p < 0.05$) *via* l'augmentation du clivage de caspase-3.

Discussion :

La communauté scientifique s'intéresse de plus en plus aux nutriments ayant un effet anti-tumeur potentiel. Parmi eux, la C-PC semble avoir la capacité d'inhiber la croissance des cellules tumorales pancréatiques *in vitro* et *in vivo* (Liao et al., 2016). Il est également suggéré que la bétaine peut avoir certains effets thérapeutiques notamment en activant des gènes suppresseurs de tumeur (tels que p16) et en inactivant des oncogènes (e.g. c-myc) mais peut également avoir des effets anti-angiogéniques et anti-inflammatoires (Kim, 2012).

Dans cette étude, nous avons investigué l'effet de ces deux substances sur la croissance d'une tumeur pulmonaire. Les supplémentations (bétaine, C-PC et bétaine + C-PC) ont ralenti la croissance tumorale et ont également induit une réduction du volume tumoral et du poids tumoral le jour de l'euthanasie. Aucun effet supplémentaire du traitement combiné n'a été observé. Par contre, il semblerait que l'association de la bétaine et de la C-PC ait renforcé les mécanismes impliqués dans la diminution de la tumeur.

Un traitement en C-PC peut induire l'apoptose des cellules tumorales pancréatiques à travers la production d'ERO, la diminution de l'expression de Bcl-2 et l'augmentation de l'activité de la caspase-3 (G. Liao et al., 2016; Pardhasaradhi et al., 2003; H. Wang et al., 2007). Caspase-3 est connu pour jouer un rôle prédominant dans la mort cellulaire induite par apoptose. Dans la tumeur, nous avons observé une augmentation significative de caspase-3 après un traitement associant bétaine et en C-PC et une augmentation significative des TBARS après un traitement en bétaine ou en C-PC. La peroxydation lipidique peut induire la mort des cellules cancéreuses en affectant la fonction mitochondriale. Le ralentissement de la croissance tumorale pourrait être en partie due aux produits d'oxydation capable d'induire l'apoptose des tissus tumoraux (Pardhasaradhi et al., 2003).

Afin de déterminer les mécanismes moléculaires de la mort cellulaire induite par les deux traitements, nous avons étudié leurs effets sur p38, AKT et NF- κ B. Comme montré

précédemment (Liao et al., 2016), nous avons montré que la C-PC seule activait la voie p38 MAPK, voie impliquée dans l'apoptose. La C-PC pourrait également induire la mort cellulaire par autophagie. Comme l'ont montré récemment, Liao et al. (2016), l'autophagie serait responsable de l'inhibition de la croissance des cellules cancéreuses induite par la C-PC. La C-PC serait notamment capable d'inhiber la voie AKT/mTOR/p70S6K, pouvant contribuer à l'autophagie. Nos résultats ont montré que la C-PC diminuait le ratio AKT phosphorylé / AKT total et que l'effet est d'autant plus significatif quand la C-PC était associée avec la bétaine. De plus, l'autophagie et l'apoptose seraient contrôlées par les mêmes régulateurs dont NF- κ B (Thorburn, 2008). Dans notre étude, la diminution d'I κ B observée serait le reflet de l'activation et de la translocation nucléaire de NF- κ B. Basé sur les résultats de Liao et al. (2016), nous pouvons supposé que la C-PC associée ou non à la bétaine crée une interaction entre l'autophagie et l'apoptose pouvant avoir un impact sur l'activation de NF- κ B. Cependant, d'autres études sont nécessaires afin de déterminer si l'autophagie joue réellement un rôle dans l'inhibition de la croissance tumorale et la mort cellulaire des cellules A549 par l'intermédiaire d'un traitement à la C-PC.

Conclusion :

La bétaine seule et la C-PC seule semble inhiber efficacement la croissance des cellules A549 *in vivo*, sans diminution additionnelle lors du traitement combiné. Bien que les cibles de la C-PC ne soient pas clairement identifiées, nous suggérons que la génération d'ERO et l'activation de voie de signalisation p38 induisant l'apoptose pourraient expliquer l'effet protecteur de la C-PC. La bétaine combinée à la C-PC a augmenté l'expression de TNF- α et l'activation de caspase-3, facteurs impliqués dans l'apoptose. Nos résultats révèlent des mécanismes de signalisation importants par lesquels la bétaine ou/et la C-PC induisent la mort cellulaire apoptotique, et être autophagique des cellules cancéreuses à travers la régulation complexe des voies de signalisation impliquant p38, AKT et NF- κ B. En conclusion, c'est la première étude a noté que la C-PC, associée ou non à la bétaine, a un effet thérapeutique sur la croissance tumorale des cellules A549 *in vivo*.



Betaine or/and C-phycocyanin supplementation slowed down lung cancer A549 cell growth *in vivo*.

Carmen Dupuis¹, Marc Filaire^{1,2}, Adrien Rossary¹, Jean-Yves Berthon³, Ming Wei⁴, Stéphanie Rougé¹, Jeremie Talvas¹, Edith Filaire^{1,5,6}

¹Université Clermont Auvergne, UMR 1019 INRA-UcA, UNH (Human Nutrition Unity), ECREIN Team, 63000 Clermont-Ferrand, France

²Centre Jean Perrin, Service of thoracic surgery, 58 rue Montalembert, 63011 Clermont-Ferrand, France

³Greentech SA, Biopôle Clermont-Limagne, 63360 Saint-Beauzire, France

⁴Cellvax, SAS, Parc Biocitech, 102 Avenue Gaston Roussel, 93230 Romainville, France

⁵CIAMS, Université Paris-Sud, Université Paris-Saclay, 91405 Orsay Cedex, France

⁶CIAMS, Université d'Orléans, 45067, Orléans, France.

Article soumis dans « Journal of Oncology », le 23 mars 2017

Abstract

We investigated the effect of betaine, C-Phycocyanin (C-PC), and both combined, on the growth of A549 lung cancer. After subcutaneous injection of A549 cells, and when the mean tumour volume reached 500 mm³, pathogen-free male nude rats were supplemented with either betaine, C-PC, both or neither. On the 29th day, blood and tumour cells were collected from euthanized rats. We evaluated the redox balance in the plasma/serum and the tumour. To determine the molecular mechanism of cell death, we investigated their effects on p38, Akt and NF-κB pathways. Compared to the control group, tumour weights and volumes were significantly reduced in either betaine- or C-PC-treated groups, without a further decrease with combined treatment. Mechanistically, the reduction in tumour weight and volume induced by C-PC is the result of a dialogue between p38, Akt, and NF-κB pathways. C-PC can induce apoptosis by activating p38 signalling pathways, as well as by increasing TNF-α, caspase-3 and lipid peroxidation in a tumour. On the other hand, C-PC and betaine induced nuclear translocation of NF-κB and a decrease in the phosphorylated AKT/ total AKT ratio. This is the first study to observe that C-PC, whether combined with betaine or not, possesses a therapeutic effect on tumour growth in lung cancer A549 cells *in vivo*.

Key words: Lung cancer, A549 cells, nude rats, betaine, C-Phycocyanin

1. Introduction

Non-small-cell lung cancer (NSCLC) is the most common type of lung cancer and the leading cause of cancer death worldwide [1]. The development and progression of cancer involves abnormal changes in DNA methylation. Some dietary components affect DNA synthesis through the remethylation process [2]. It appears that is the case for betaine, which is present in a variety of food sources including sugar beet, spinach, beetroot, seafood and cereals. Betaine can also be obtained by synthesis through choline metabolism within the liver and kidney [3]. It is involved in the synthesis of methionine, which supplies cellular cysteine for the synthesis of reduced glutathione that protects the cell from reactive oxygen species [4]. Betaine plays an important role in cellular protection against environmental stress, such as high temperatures and osmotic imbalance, as well as by acting as a methyl-group donor in several biochemical pathways. Betaine treatment was able to attenuate oxidative stress [4–8], and to have an anti-inflammatory effect through NF-KB modulation and reduction of the expression of pro-inflammatory cytokines such as TNF- α , IL-6 et Cox-2 [9–11].

Cancer is a pathological condition associated with decreased mitochondrial oxidative phosphorylation OXPHOS activity, and 90% of cancers show the Warburg effect of suppressed mitochondrial respiration and increased aerobic glycolysis. Alteration of OXPHOS has an effect on cell apoptosis and cancer metastasis, and cancer cell growth can be inhibited by elevating OXPHOS content [12]. It has been shown that betaine delays cancer cell growth and its intake has an inverse correlation with cancer incidence in humans [13–15]. The anti-oncogenic effect of betaine might in part be explained by a reversal of the Warburg effect.

In addition to betaine, phycocyanin (C-PC), one of the major pigment constituents of spirulina microalgae, is used in many countries as a dietary supplement and its nutritional values have been very well documented. In fact, accumulating evidence shows that C-PC has many biological functions such as antioxidant, immune stimulation, and as a scavenger [16–19]. It also has a potent anticancer effect, both *in vitro* and *in vivo*, on a variety of cancer cell types, such as lung cancer [20], colon cancer [21], breast cancer [22]. Mechanistically, C-PC exerts its anticancer effect by modulating apoptosis and cell proliferation [16]. In fact, C-PC has been demonstrated to induce apoptosis in tumour cells through the production of ROS and by down-regulating the expression of Bcl-2, an anti-apoptotic molecule. Phycocyanin can also induce apoptotic cell death by up-regulating Caspase-3 and Caspase-8 activities [23]. It has recently been reported that C-PC is able to induce apoptosis of the pancreatic cancer cell by activating p38 and JNK signalling pathways, while inhibiting the Erk pathway. Furthermore, it promotes

the activation and nuclear translocation of NF- κ B, which plays an important role in balancing phycocyanin mediated apoptosis and autosis. Phycocyanin's anti-cell proliferative effects are mediated by the downstream PI3K/Akt pathway [24,25].

To date, few studies have investigated the role of C-PC and betaine in lung cancer. Ying et al. [26] reported that betaine may decrease the risk of lung cancer. Li et al. [27] noted that the combination of C-PC with all-trans-retinoic acid could up-regulate TNF alpha, and down-regulate Bcl-2 and Cyclin D1 genes on the lung cancer A549 cells *in vitro*. More recently, our team [20] reported a synergistic activity in betaine and C-PC treatment with a reduction of the stimulation of NF- κ B expression by TNF- α and an increase in the amount of proapoptotic p38 MAPK in A549 cells. Combined treatment also induced a cell cycle arrest in the G2/M phase in ~60% of cells.

These few studies were all carried out using the *in vitro* protocol. In this study, we investigated the anti-lung cancer effect of C-PC and betaine on the A459 tumour *in vivo* after oral treatment of nude rats over a 4-week period (following the injection of A459 cells and tumour establishment).

Since betaine and C-Phycocyanin have an antioxidant, anti-inflammatory and anti-proliferative effect on a variety of tumour cells lines [11,16,28–30], we put forward the hypothesis that betaine or/and C-phycocyanin supplementation would prevent the growth of lung cancer tumour, by modulating signalling pathways implicated in apoptosis, and inflammatory biomarkers.

2. □ Materials and methods

a. □ Cell culture

A549 cells (ATCC® CCL-185™, human lung carcinoma) were maintained in culture by Cellvax Pharma, in a DNEM environment, 10% Foetal Bovin Serum (FBS), 5mM L-Glutamine, 1 % Penicillin/Streptomycin. A549 cells were grown to a confluence of 80%. For injection, A549 cells were suspended in Matrigel (Basement Membrane High Concentration, Corning Life Sciences, Amsterdam, Netherlands) (50:50).

b. □ Study design

Thirty-three nude male rats (Charles River, France), aged 6-7 weeks, weighing 239.8 ± 6 g, were acclimatized for one week before study initiation. All animal work procedures were

approved by the Institutional Animal Care and Use Committee (Anses) of Maisons-Alfort (France).

The daily light cycle ran from 7 a.m. to 7 p.m. and room temperature was maintained between $21.6 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$. The nutritional breakdown of food was 25.2 % proteins, 13.5 % lipids and 61.3% carbohydrates (A03, Society Safe-diet, Augy, France). Throughout the study, rats had free access to food and water. Following acclimatization, the rats were given a subcutaneous injection of 107 A549 cells into the right flank. Ten days after tumour implantation, and once mean tumour volumes (MTV) had reached 500 mm³, the animals were all randomly assigned to 4 groups:

- Non-intervention control group (n = 8, tumour volume: $568.8 \pm 98.9 \text{ mm}^3$)
- Betaine treatment group (n = 9, tumour volume: $568.5 \pm 133.8 \text{ mm}^3$)
- C-PC treatment group (n = 8, tumour volume: $597.0 \pm 136.4 \text{ mm}^3$)
- Betaine and C-PC treatment (n = 8, tumour volume: $703.48 \pm 111.3 \text{ mm}^3$).

c. □ Betaine or/and C-PC treatment

Betaine (B2754 Sigma-Aldrich) and C-PC (Greentech, Saint-Beauzire, France) were administered in drinking water and corresponded to 4 % of daily food intake ($2.93 \pm 0.3\text{g}$ by kg of body weight and $370.0 \pm 0.03 \text{ mg.}$ by kg of body weight, respectively). Every two days, betaine and C-PC supplementation was adjusted according to the food and water intake of each rat. The daily food, water, C-PC and betaine intakes, and food efficiency ratio (daily gain weight/ daily food intakes) were evaluated for each rat.

d. □ Evaluation of tumour growth

After one week of tumour cell injection, tumour growth was measured (tumour length, width and volume) twice a week by using an external calliper. Tumour volume (TV) was calculated using the following formula: $\text{TV} = \text{Length} \times \text{Width}^2/2$. Tumour growth data were recorded for each individually identified rat. The relative volume of an individual tumour volume on day X (TVX) was calculated by dividing the absolute volume (mm³) of the respective tumour volume on day X (TVX) by the absolute volume of the same tumour on the day of randomization, i.e. on day 0 (TV0) and multiplied by 100, as shown in the following equation: $\text{RTV}_x [\%] = \text{TV}_x/\text{T0} \times 100$.

The observation period lasted 28 days. In line with institutional guidelines [31], all test animals were euthanized if during that period tumour volume reached 4,000 mm³.

e. □ Blood and tumour sampling

On the 29th day, rats were removed from their cage, taken to an adjacent room and, within 30 seconds of removal from the cage, were euthanized using anesthetic + analgesic (Ketamine: 75 mg.kg⁻¹ + Xylazine: 8 mg.kg⁻¹) and an aortic puncture.

Blood was collected in three 4 ml polyethylene tubes: one containing 1.95 mg/ml of spray-coated K2 EDTA (Venosafe, France) and a second containing 15 USP.U.ml⁻¹ of lithium heparin (Venosafe, France) - these were stored on ice until centrifugation (3000 rpm, 15 min, 4°C); the third tube contained clot activator and silicone gel to obtain serum (Venosafe, France). After thirty minutes at room temperature, serum samples were obtained by centrifugation (3000 rpm, 15 min, 4°C). After centrifugation, plasma and serum samples were aliquoted and stored at -80°C until analysis.

Tumour tissues were immediately excised, weighed, and snap-frozen in nitrogen liquid, and stored at -80°C.

f. □ Tumour protein extractions

For analysis, tumours were treated in two ways. The first involved grinding one part tumour in ice with buffer A (10 mM TRIS, 10 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0.1mM EDTA and 1% of protease inhibitors cocktail (P8340-1ml, Sigma-Aldrich)) for 10 seconds, 5 x 20 seconds, followed by centrifugation for 5 minutes at 15000xg at 4°C. The supernatant (cytosol protein) was recovered, aliquoted and frozen at -80°C. The pellet was suspended in buffer A and centrifuged (5 min, 15000xg, 4°C). The supernatant was discarded and the pellet was suspended in buffer B (50 mM TRIS, 50 mM KCl, 150 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, and 0.5% of protease inhibitors cocktail (P8340-1ml, Sigma-Aldrich)), followed by 3 1-minute cycles of ultrasound and 10 minutes of agitation in ice, and centrifugation (5 min, 15000xg, 4°C). The supernatant (perinuclear and nuclear protein) was recovered and frozen at -80°C.

The second method involved grinding the remaining tumour in ice with RIPA Buffer (R0278-500ml, Sigma-Aldrich), 1% of protease inhibitors cocktail (P8340-1ml, Sigma-Aldrich) and 1% of phosphatase inhibitors cocktail (P5726-1ml, Sigma-Aldrich) for 10 seconds and 5 x 20 seconds, followed by centrifugation (5 min, 15000xg, 4°C). The supernatant (total protein) was recovered, aliquoted and frozen at -80°C.

g. □ Analysis

i. □ Plasma and tumour protein content

Protein concentrations in plasma, total, cytosol and nuclear fraction of the tumour were determined using a BC Assay Proteins Quantification Kit (Interchim, Montluçon France).

ii. □ Lipid peroxidation by thiobarbituric acid reactive substances

The level of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) was determined using enzymatic assay kits (Cayman Chemical, Interchim, Montluçon France) in serum and cytosol protein extraction from the tumour. The MDA-TBA adduct formed by the reaction of MDA and TBA at high temperatures between 90-100°C and in acidic conditions, is measured colorimetrically at 520 nm (Photometer Multiskan FC ThermoScientific, MC2Lab, Clermont-Ferrand, France).

iii. □ Antioxidant markers

Superoxide dismutase

The superoxide dismutase (SOD) assay kits (Cayman Chemicals, Interchim, Montluçon, France) were used to measure SOD activity in plasma and cytosol extraction from the tumour. This kit utilizes a tetrazolium salt for detection of superoxide radicals generated by xanthine oxidase and hypoxanthine and measures all three types of SOD (Cu/ZN, Mn and FeSOD) at 450 nm (Photometer Multiskan FC ThermoScientific, MC2Lab, Clermont-Ferrand, France).

Catalase

The catalase (CAT) activity of plasma and tumour cytosol protein extraction was determined by utilization of the peroxidatic function of CAT. This method is based on the reaction of the enzyme with methanol in the presence of an optimal concentration of H₂O₂. The formaldehyde produced is measured colorimetrically with 4-amino-3-hydrazino-5-mercapto-1,2,4-triazpme (Purpald) as the chromogen (Cayman Chemicals, Interchim, Montluçon, France). The CAT activity is measured colorimetrically at 540 nm.

Glutathione Peroxidase

Glutathione Peroxidase (GPx) activity was measured in plasma and tumour cytosol protein extraction by the indirect coupling reaction with glutathione reductase (GR) (Cayman Chemicals, Interchim, Montluçon, France). Oxidized glutathione, produced upon reduction of hydroperoxide by GPx, is recycled to its reduced state by GR and NADPH. The oxidation of NADPH to NADP⁺ is accompanied by a decrease in absorbance at 340 nm (Photometer Multiskan FC ThermoScientific, MC2Lab, Clermont-Ferrand, France).

Total Glutathione

Total glutathione concentrations (T-GSH) in plasma and tumour cytosol protein extraction were determined using the Cereser et al. [32] method. Briefly, the sample was reduced by dithiothreitol for 10 minutes at room temperature, and glutathione ethyl ester was added as an internal standard. After protein precipitation, supernatant was derived through the addition of ortho-phthal-aldehyde (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France). The High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) separation of GSH-OPA adducts was achieved on a UP3 HDO C-18 reversed-phase silica column (150x3.60 mm; 3 μ particle size) from Phenomenex (Interchim, Montluçon, France) maintained at 37°C, followed by fluorimetric detection at 420 nm after excitation at 340 nm (Summit HPLC system, Dionex SA, Courtaboeuf, France). Derivatives were eluted using an acetonitrile gradient from 10% to 50% in 25 mM ammonium acetate, pH 6, for 5 min. The flow-rate was 0.5 ml/min for a 15-minute elution. Chromatogram integration was performed using Chromeleon software from Dionex (Version 6.80, Dionex SA, Courtaboeuf, France). GSH content was calculated using a standard curve established under the same conditions.

Nrf2

Nrf2 was evaluated in tumour extraction using a competitive ELISA kit (Cayman Chemicals, Interchim, Montluçon, France). Nrf2 is detected by addition of a primary antibody. The secondary antibody binds to the specific primary antibody and provides a sensitive colorimetric readout at 450 nm (Photometer Multiskan FC ThermoScientific, MC2Lab, Clermont-Ferrand, France).

iv. □ Inflammatory markers

The amount of Cyclooxygenase-2 (Cox-2) was evaluated by nuclear fraction of the tumour using an enzymatic assay kit (Cayman Chemical, Interchim, Montluçon France) that measured the peroxidase activity of Cox. This activity is assayed colorimetrically by monitoring the appearance of oxidized N,N,N',N'-tetramethyl-p-phenylenediamine (TMPD) at 590 nm (Photometer Multiskan FC ThermoScientific, MC2Lab, Clermont-Ferrand, France), with isozyme-specific inhibitor distinguishing Cox-2 activity from Cox-1 activity.

The content of interleukin (IL)-1 β , -4, -6 and -10, and Tumour Necrosis Factor- α (TNF- α) were evaluated in tumour cytosol protein extraction using an ELISA Kit (Abcam, Cambridge, United Kingdom).

v. □ Apoptosis markers

Phosphorylated AKT (SerS473) and total AKT, and phospho-p38- α (Thr180/Tyr182) and total p38- α , were measured in total tumour extraction using Sandwich ELISA kits (Abcam, Cambridge, United Kingdom). The activation of AKT and p38 was evaluated by Phosphorylated AKT (SerS473) / total AKT ratio and the phospho-p38- α (Thr180/Tyr182) / total p38- α ratio.

The Caspase-3/Pro-Caspase-3 ratio was measured in total tumour extraction using Western Blot. The primary antibodies (1:1000) used were Caspase-3 rabbit polyclonal antibody (#9662, Cell Signalling Technology, Ozyme, France) and β -actin (clone 4C2) mouse monoclonal IgG1 κ (#MABT825, Millipore, France). The secondary antibody (1:1000) used was goat anti-rabbit IgG (H+L), HRP conjugate (#32460, Thermo Scientific, USA).

The primary antibody recognized pro-caspase-3 (35 kDa) and caspase-3 (17 and 19 kDa). Activation of caspase-3 was evaluated by caspase-3/pro-caspase-3 ratio, after normalization by β -actin expression.

Detection of I κ B- α expression was done in total tumour extraction using Western Blot. The primary antibodies (1:1000) used were I κ B- α (L35A5) mouse mAb (Amino-terminal Antigen) monoclonal antibody (#4814, Cell Signalling Technology, Ozyme, France), and β -actin (clone 4C2) mouse monoclonal IgG1 κ (#MABT825, Millipore, France). The secondary antibodies (1:1000) used were goat anti-rabbit IgG (H+L), HRP conjugate (#32460, Thermo Scientific, USA) and goat anti-mouse IgG (H+L), HRP conjugate (#32430, Thermo Scientific, USA).

vi. □ Western Blot protocol

For Western Blot, we used the protocol described by Talvas et al [33].

3. □ Materials and methods

All statistical tests were performed using the statistical package program SPSS 19 (SPSS Inc., Chicago, IL). All values were expressed as means $\pm$ standard error of mean (SE). Non-parametric (Kruskal-Wallis test and Mann-Whitney U test) were used in the statistical computation of all variables. A level of $p < 0.05$ was considered significant.

4. □ Results

a. □ Effects of betaine and/or C-PC on tumour weight and volume

Compared with the control group, all treatment groups (Betaine (B), C-phycocyanin (C-PC), B + C-PC) had a slowdown of tumour volume from the second week (Figure 1).

On the day of euthanasia, compared with the control group, tumour weight, and tumour volume were significantly lower in betaine, C-PC -and B + C-PC groups. No further decrease was reported as a result of the combined treatment (Table 1). Compared with betaine, both C-Phycocyanin and B+C-PC had a higher level of decrease.

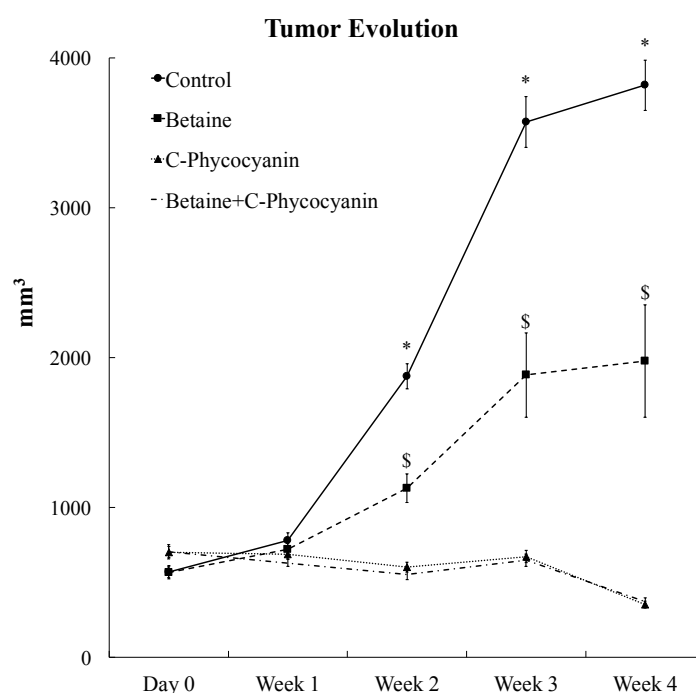


Figure 1: Evolution of mean tumour volume per week per group. Mean $\pm$ SE. Compared with Control group: * $p < 0.05$, compared with Betaine group: \$ $p < 0.05$.

Table 1: Tumour volume in cubic millimetre (mm³), tumour weight in absolute value (grammes (g)) and relative value (per cent of body weight, %BW)) per group on the day of euthanasia. Mean $\pm$ SE.

Tumour weight	Control	Betaine (B)	C-Phycocyanin (C-PC)	B + C-PC
g	2.92 $\pm$ 0.17	1.63 $\pm$ 0.31**	0.20 $\pm$ 0.02***\$\$\$	0.20 $\pm$ 0.02***\$\$\$
%BW	0.79 $\pm$ 0.1	0.48 $\pm$ 0.28**	0.06 $\pm$ 0.02***\$\$\$	0.06 $\pm$ 0.02***\$\$\$

Compared with Control group: ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; Compared with Betaine group: \$\$\$ $p < 0.001$

b. □ Redox balance in blood

Compared with the control group, nutritional treatment induced a non-significant decrease in TBARS concentrations, whatever the treatment (Figure 2A).

Betaine treatment had no effect on SOD, and T-GSH concentrations. On the contrary, C-PC only significantly increased the concentrations of SOD and T-GSH (Figure 3A, 3B).

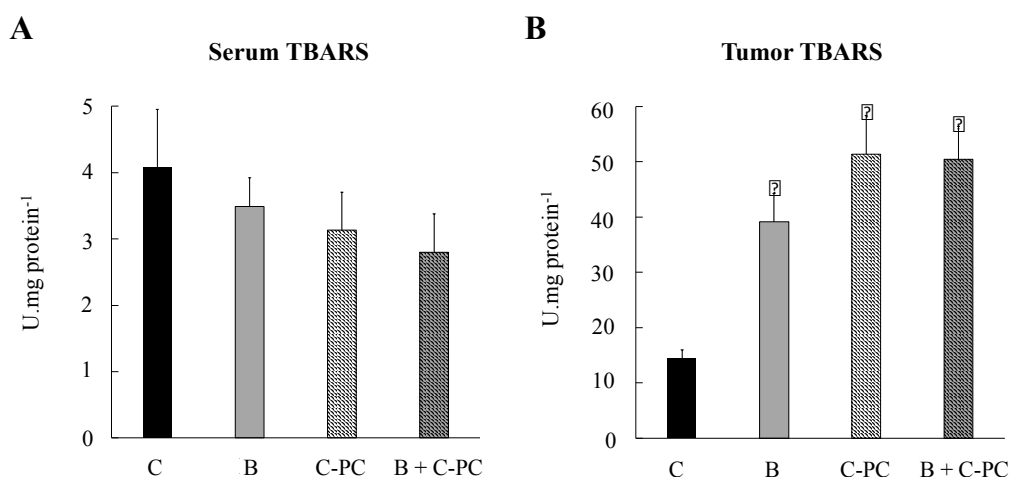


Figure 2: Effect of betaine and/or C-PC on TBARS (A) Serum and (B) Tumour. Groups: C= Control, B= Betaine, C-PC= C-Phycocyanin and, B+C-PC= Betaine + C-Phycocyanin. Mean $\pm$ SE. Compared with control group: * $p < 0.05$.

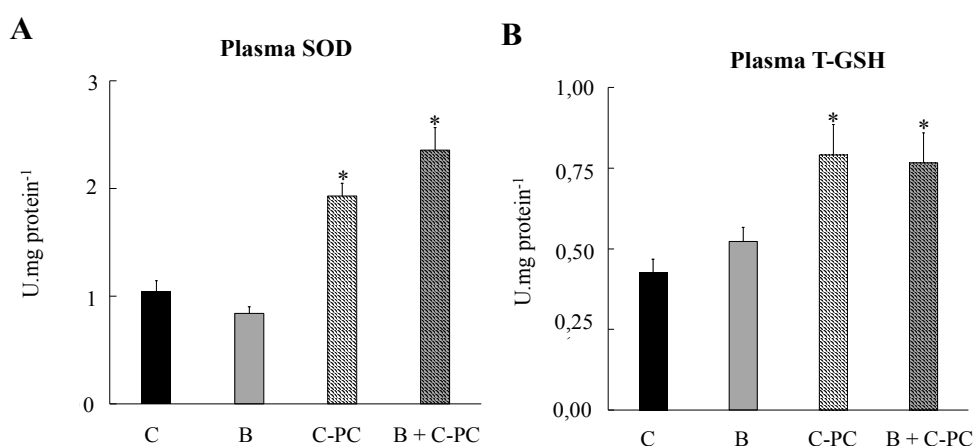


Figure 3: Effect of betaine and/or C-PC on (A) superoxide dismutase (SOD), and (B) total glutathione (T-GSH) concentrations. Groups: C= Control, B= Betaine, C-PC= C-Phycocyanin and B+C-PC= Betaine + C-Phycocyanin. Mean $\pm$ SE. Compared with control group: * $p < 0.05$.

c. □ Tumeur redox balance

Compared with the control group, tumour TBARS concentrations were significantly higher in all supplemented groups (Figure 2B). No further increased effect was noted with the combined treatment.

Tumour T-GSH content was significantly lower in all supplemented groups (Figure 4C). No further increased effect was noted in the combined treatment.

Compared with the control group, we observed a significant decrease of tumour SOD activity and a significant increase of tumour Nrf2 concentrations only in the betaine group (Figure 4A, 4D). Whether or not combined with betaine, C-PC increased tumour CAT contents (Figure 4B), even if no further increased effect was noted in the combined treatment.

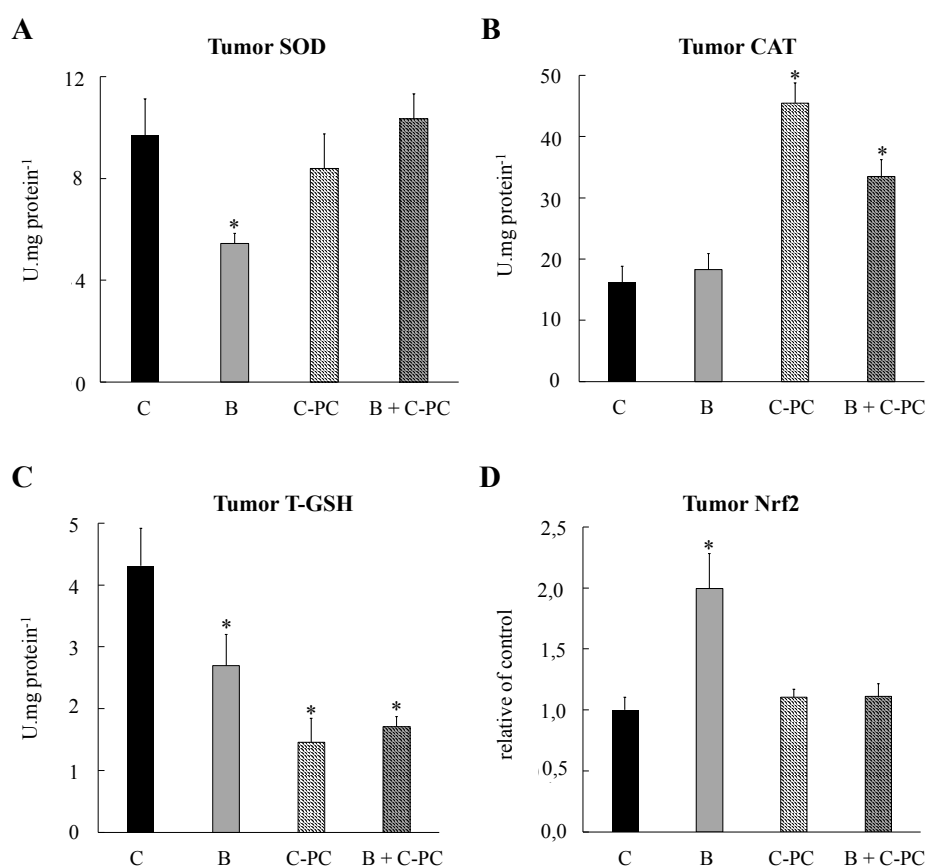


Figure 4: Effect of betaine and/or C-PC on: (A) superoxide dismutase (SOD), (B) catalase (CAT), (C) total glutathione (T-GSH), and (D) Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 (Nrf2) in lung tumour Groups: C= Control, B= Betaine, C-PC= C-Phycocyanin and, B+C-PC= Betaine + C-Phycocyanin. Mean $\pm$ SE. Compared with control group: * $p < 0.05$.

d. Inflammatory tumour markers

Pro-inflammatory markers

Compared with the control group, all treatment increased tumour Cox-2 activity ($p < 0.05$) (Figure 5F).

C-PC treatment induced a non-significant increase of IL-1 β , IL-6 and TNF- α , whereas combined treatment induced significant effects in IL-6 (+83%, $p < 0.05$), TNF- α (+52%; $p < 0.05$) and Cox-2 (+33%, $p < 0.05$) (Figure 5A, 5C, 5E, 5F).

Anti-inflammatory markers

Compared with the control group, betaine or C-PC alone had no effect on anti-inflammatory cytokines in the tumour, whereas combined treatment significantly increased IL-4 (+ 91%: $p < 0.05$), and IL-10 (+143%: $p < 0.05$) (Figure 5B, 5D).

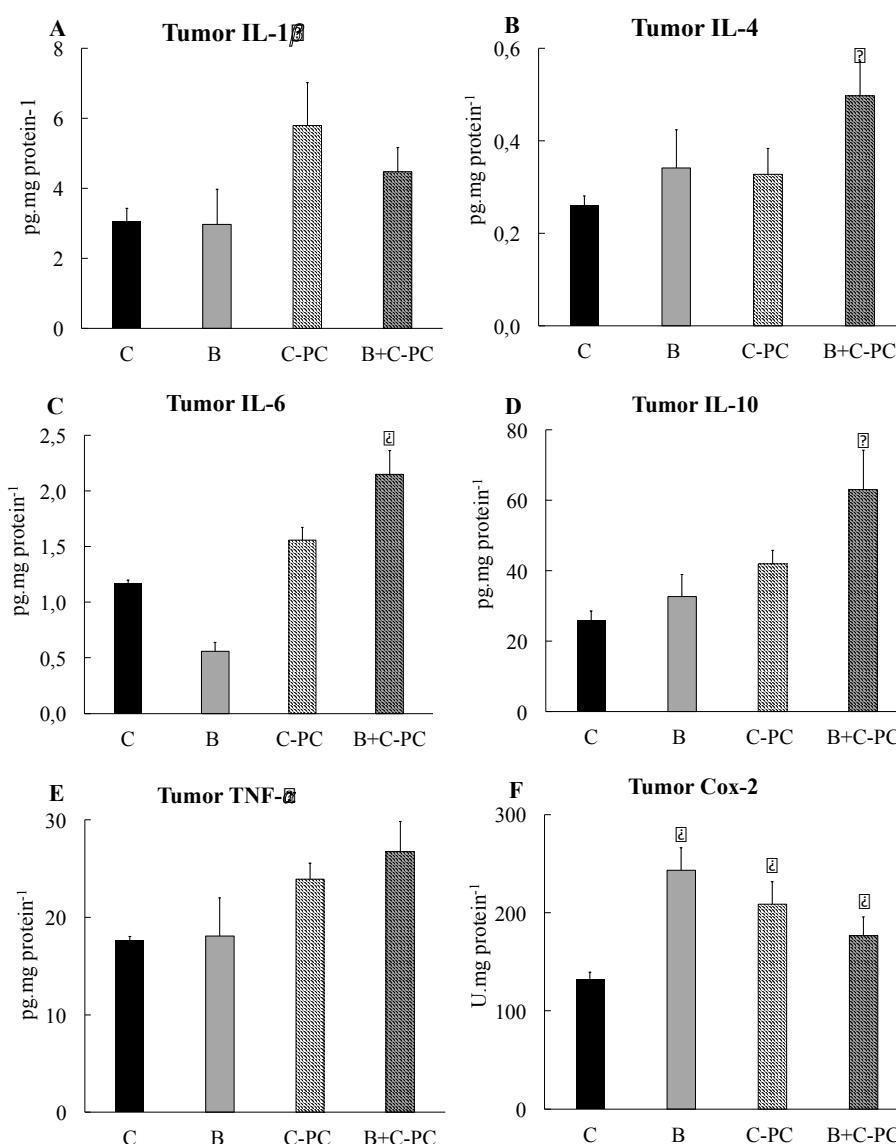


Figure 5: Effect of Betaine and/or C-PC Treatment on: (A) Tumour Interleukin (IL)-1 β , (B) Tumour IL-4, (C) Tumour IL-6, (D) Tumour IL-10, (E) Tumour Necrosis Factor- α (TNF- α), (F) Tumour Cyclooxygenase-2 (Cox-2). Groups: C= Control, B= Betaine, C-PC= C-Phycocyanin and, B+C-PC= Betaine + C-Phycocyanin. Mean $\pm$ SE. Compared with control group: * $p < 0.05$.

e. □ Apoptotic tumour markers

Anti-apoptotic markers

Compared with the control group, C-PC treatment alone induced a non-significant decrease of the phosphorylated AKT/ total AKT ratio. Combination of both treatments induced a further significant decrease of this ratio (Figure 6A).

Pro-apoptotic markers

Compared with the control group, C-PC significantly increased ($p < 0.05$) the phosphorylated p38/ total p38 ratio and reduced ($p < 0.05$) tumour I κ B- α expression (Figure 6B, 6D). This last observation was also noted for the combination treatment, without any further decrease.

The combination of betaine and C-PC treatment significantly increased the caspase-3 / pro-caspase-3 ratio by increasing cleaving of caspase-3 (Figure 6C).

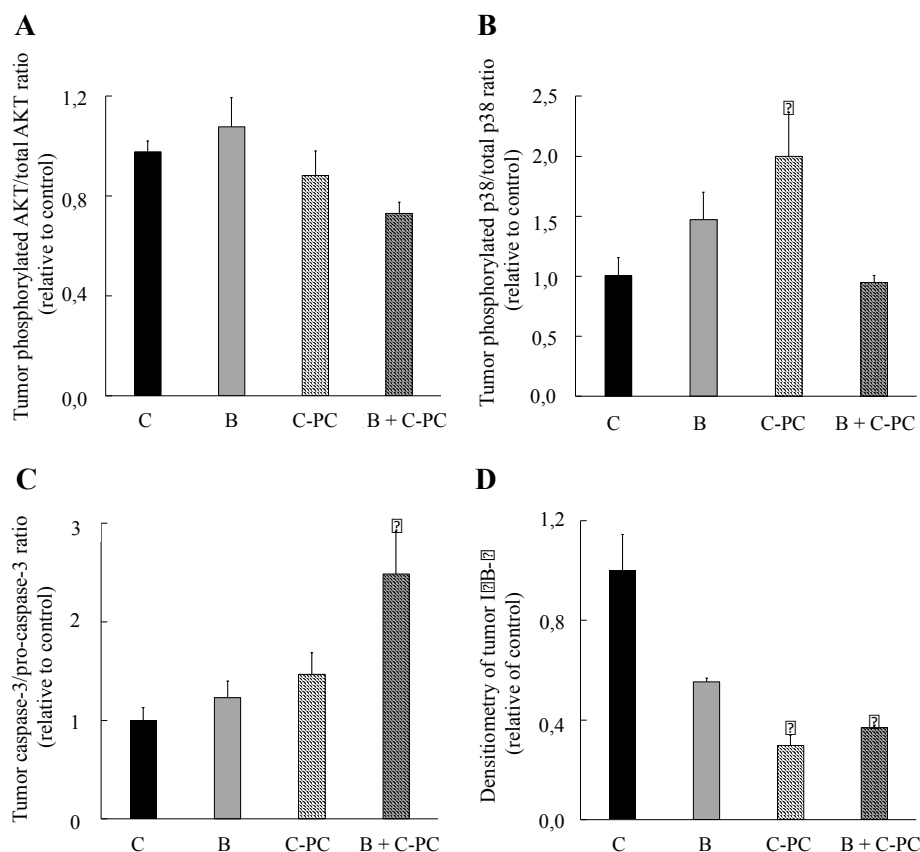


Figure 6: (A) Tumour ratio phosphorylated (Ser473)/total AKT, (B) Tumour ratio phosphorylated (Tyr180/Tyr182)/total p38, (C) Tumour ratio pro-caspase-3/caspase-3, and (D) Tumour I κ B- α expression after nutritional treatment. Groups: C= Control, B= Betaine, C-PC= C-Phycocyanin and B+C-PC= Betaine + C-Phycocyanin. Mean $\pm$ SE. Compared with the control group: * $p < 0.05$.

5. Discussion

Science is becoming ever more interest in nutrients, which can have a potentially anti-tumour effect. Among these, C-PC seems to have the ability to inhibit the growth of pancreatic cancer cells *in vitro* and *in vivo* [34]. It has also been suggested that betaine has several therapeutic benefits that enable the activation of tumour suppression genes (p16) and the inactivation of oncogenes (such as c-myc) by stabilizing their methylation patterns, and that it also has antiangiogenic and anti-inflammatory effects [35].

In this study, we investigated the effects of these two substances on the growth of lung tumour. Even though we noted not only a slowdown in tumour growth through betaine or/and C-PC

treatment but also a reduction in tumour weight and volume after treatment, no synergistic effect was observed for combined treatment when considering tumour volume and weight (Table 1 and Figure 1). On the other hand, the combined nutritional strategies seem to reinforce the mechanisms implicated in tumour decrease.

The action of C-PC could be due to several factors. Its anti-cancer properties are linked to cell apoptosis and cell cycle arrest [36]. Indeed, Liao et al. [34] showed that C-PC blocked G2/M cell cycle progression and induced apoptosis in PANC-1 cells. It also induced apoptosis in tumour cells through the production of ROS, by down-regulating the expression of Bcl-2, an anti-apoptotic molecule, and by up-regulation of caspase-3 activities, caspase-3 being recognized as a predominant player in the execution of cell death caused by apoptosis [27,37–39]. In the tumour, we observed a significant increase of TBARS after betaine or C-PC treatment and a significant increase of caspase-3 after combined C-PC and betaine treatment (Figures 5E, 6C). Lipid peroxidation can induce cancer cell death by affecting mitochondrial function. Fahrman and Hardman [40] reported that *in vitro* cytotoxicity of omega-3 was due to the increase of lipid peroxidation or the decrease of glutathione contents in cancer cells [9–11,26], these two observations were also observed in the tumour in our study (Figure 2B, 4C) following betaine or C-PC treatment. We would argue the hypothesis that the slowdown of tumour growth could in part be led by oxidation products that enable apoptosis in tumour tissues, and through the depletion of GSH inducing apoptosis [41].

To determine the molecular mechanism of C-PC and betaine-mediated cell death, we investigated their effects on p38 and Akt and NF- κ B pathways. p38 is a MAPK signalling pathway, and is involved in apoptosis. Consistent with previous literature [42], our findings showed that only C-PC activated the p38 pathways. In addition to apoptosis, it has been proposed that autophagy may also contribute to cell damage, one of the key regulators of autophagy being the mammalian target of rapamycin (mTOR) [43]. Degtyarev, et al. [44] noted that the triggering of autophagy in cancer cells is associated with inhibition of the mTOR pathway, with Akt inhibition decreasing mTOR activity and promoting autophagy. Recently, Liao et al. [34] demonstrated that autophagy is responsible for phycocyanin-induced growth inhibition and death of PANC-1 cells. They noted that C-PC inhibited the Akt/mTOR/p70S6K signal pathway, which may contribute to phycocyanin-induced autophagy, whose activation counteracts the pro-survival effects of NF- κ B activation on gene expression in response to DNA damage. mTOR deficiency or inactivation increases phosphorylation and nuclear

translocation of nuclear factor NF- κ B, which results in enhanced NF- κ B activation. Our results showed that C-PC decreases the phosphorylated AKT/ total AKT ratio (Figure 6A), this effect being more significant when C-PC was combined with betaine. Thorburn [45] mentioned that autophagy and apoptosis are controlled by the same regulators, the NF- κ B signalling pathway being one. NF- κ B activates two stress activated MAPK pathways mediated by JNK and p38, with both having a proapoptotic role by activating caspase 3 of the intrinsic apoptotic pathway [46]. In its inactive form, NF- κ B is sequestered in cytosol by its inhibitor I κ B- α . I κ B- α degradation by I κ B kinase complex and NF- κ B inducing kinases allow for the nucleus translocation of NF- κ B. In the nucleus, NF- κ B induces the expression of numerous genes, encoding anti-apoptotic responses as well as pro-apoptotic responses [47]. Since NF- κ B is one of the transcription factors for Beclin 1, a key initiator of cellular autophagy, phycocyanin-induced nuclear translocation of NF- κ B may play an important role during this process [34]. The decrease of I κ B- α observed in our study (Figure 6D) reflects NF- κ B activation. Moreover, C-PC as well as C-PC combined with betaine, enhanced NF- κ B, which, based on Liao et al. results *in vitro* [34], suggests that C-PC, whether or not combined with betaine-mediated complex, creates an interplay between autophagy and apoptosis that may impact on NF- κ B activation. However, further investigations are needed to determine whether autophagy plays a real role in phycocyanin-mediated growth inhibition and cell death in A549 cells.

One of the roles of betaine is as a methyl donor, modulating gene expression by targeting different elements of epigenetic mechanisms [48]. *In vitro*, Lee [49] reported that in H2.35 cells incubated with betaine, an up-regulation of mitochondrial respiration and cytochrome c oxidase activity was noted. For these authors, the anti-proliferative effects of betaine on cancer cells may be due to enhanced mitochondrial function contributing to a reversal of the Warburg effect. The Akt signalling pathway is known to be associated with the promotion of mitochondrial oxidative phosphorylation (OXPHOS) [49] and thus of mitochondrial respiration. As mentioned earlier, we noted that betaine combined with C-PC induced a decrease in the phosphorylated AKT/ total AKT ratio (Figure 6A). Nevertheless, today, the mitochondrial respiration role is controversial, even if it appears to be one of the key factors in lung cancer progression.

6. □ Conclusion

Both C-PC and betaine alone could successfully inhibit tumour growth of lung cancer A549 cells *in vivo*. No further decrease resulted from the combined treatment. Although the true target

of C-PC is unclear, we suggest that ROS generation, the activation of p38 signalling pathways to induce apoptosis, may account for the protective effect of C-PC. C-PC combined with betaine increased the TNF- α and caspase-3 factors implicated in apoptosis. Our results also reveal an important signalling mechanism whereby phycocyanin and/or betaine induce apoptotic, and perhaps autophagic, cancer cell death by balancing the complex regulation of the p38, Akt/mTOR and NF- κ B signalling pathways. In conclusion, this is the first study to note that C-PC, whether or not combined with betaine, has a therapeutic effect on tumour growth of lung cancer A549 cells *in vivo*.

Competing interests

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as potential competing interests.

Acknowledgments

This study was supported by the Ligue contre le cancer.

References

1. R. Siegel, D. Naishadham, and A. Jemal, "Cancer statistics, 2013," *Cancer Journal for Clinicians*, vol. 63, no. 1, pp. 11–30, 2013.
2. Q.-C. Takata, A. Beeghly-Fadiel, H. Li, et al, "Dietary B vitamin and methionine intakes and lung cancer risk among female never smokers in china," *Cancer Causes & Control*, vol. 23, no. 12, pp. 1965–1975, 2012.
3. S.-A.-S. Craig, "Betaine in human nutrition," *American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 80, no. 3, pp. 539–549, 2004.
4. B. Ganesan, R. Anandan, and P.-T. Lakshmanan, "Studies on the protective effects of betaine against oxidative damage during experimentally induced restraint stress in wistar albino rats," *Cell Stress & Chaperones*, vol. 16 no. 6, pp. 641–652, 2011.
5. E.-K. Go, K.-J. Jung, J.-Y. Kim, et al, "Betaine suppresses proinflammatory signalling during aging: the involvement of nuclear factor- κ B via nuclear factor-inducing kinase/I κ B kinase and mitogen-activated protein kinases," *Journals of Gerontology*, vol. 60, no. 10, pp. 1252–1264, 2005.
6. H. Hagar, and W. Al Malki, "Betaine supplementation protects against renal injury induced by cadmium intoxication in rats: role of oxidative stress and caspase-3," *Environmental Toxicology and Pharmacology*, vol. 37, no. 2, pp. 803–811, 2014.
7. J. Oliva, F. Bardag-Gorce, B. Tillman, and S.-W. French, "Protective effect of quercetin, EGCG, catechin and betaine against oxidative stress induced by ethanol in vitro," *Experimental and Molecular Pathology*, vol. 90, no. 3, pp. 295–299, 2011.
8. M. Alirezaei, G. Jelodar, P. Niknam, et al, "Betaine prevents ethanol-induced oxidative stress and reduces total homocysteine in the rat cerebellum," *Journal of Physiology and Biochemistry*, vol. 67, no. 4, pp. 605–612, 2011.

9. P. Detopoulou, D.-B. Panagiotakos, S. Antonopoulou, et al, "Dietary choline and betaine intakes in relation to concentrations of inflammatory markers in healthy adults: the ATTICA study," *American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 87, no. 2, pp. 424–430, 2008.
10. Y.-S. Jung, S.-J. Kim, D.-Y. Kwon, et al, "Alleviation of alcoholic liver injury by betaine involves an enhancement of antioxidant defense via regulation of sulfur amino acid metabolism," *Food and Chemical Toxicology*, vol. 62, pp. 292–298, 2013.
11. D.-H. Kim, B. Sung, Y.-J. Kang, et al, "Anti-inflammatory effects of betaine on AOM/DSS-induced colon tumorigenesis in ICR male mice," *International Journal of Oncology*, vol. 45, no. 3, pp. 1250–1256, 2014.
12. O. Catalina-Rodriguez, V.-K. Kolukula, Y. Tomita, et al, "The mitochondrial citrate transporter, CIC, is essential for mitochondrial homeostasis," *Oncotarget*, vol. 3, no. 10, 1220–1235, 2012.
13. Y.-P. Du, J.-S. Peng, A. Sun, et al, "Assessment of the effect of betaine on p16 and c-Myc DNA methylation and mRNA expression in a chemical induced rat liver cancer model," *BMC Cancer*, vol. 9, no. 261, pp. 1-9, 2009.
14. M. Nitter, B. Norgård, S. de Vogel, et al, "Plasma methionine, choline, betaine, and dimethylglycine, in relation to colorectal cancer risk in the european prospective investigation into cancer and nutrition (EPIC)," *Annals of Oncology*, vol. 25, no. 8, pp. 1609-1615, 2014.
15. C.-X. Zhang, M.-X. Pan, B. Li, et al, "Choline and betaine intake is inversely associated with breast cancer risk: a two-stage case-control study in china," *Cancer Science*, vol. 104, no. 2, pp. 250–258, 2013.
16. R. Thangam, V. Suresh, W. Asenath Princy, et al. "C-Phycocyanin from *Oscillatoria Tenuis* Exhibited an antioxidant and in vitro antiproliferative activity through induction of apoptosis and G0/G1 cell cycle arrest," *Food Chemistry*, vol. 140, no. 1–2, pp. 262–272, 2013.
17. Y. Gao, C. Liu, G. Wan, et al, "Phycocyanin prevents methylglyoxal-induced mitochondrial-dependent apoptosis in INS-1 cells by Nrf2," *Food Function*, vol. 7, no. 2, pp. 1129–1137, 2016.
18. D.-J. Reuland, S. Khademi, C.-J. Castle, et al, "Upregulation of Phase ii enzymes through phytochemical activation of Nrf2 protects cardiomyocytes against oxidant stress," *Free Radical Biology & Medicine*, vol. 56, pp.102–111, 2013.
19. M.-J. Terry, M.-D. Maines, and J.-C. Lagarias, "Inactivation of phytochrome- and phycobiliprotein-chromophore precursors by rat liver biliverdin reductase," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 268, no. 35, pp. 26099–26106, 1993.
20. R. Bingula, C. Dupuis, C. Pichon, "Study of the effects of betaine and/or c-phycocyanin on the growth of lung cancer A549 cells in vitro and in vivo," *Journal of Oncology* vol. 2016, no. 1, pp. 1-11, 2016.
21. C. Xinhan, Z. Shu, H. Liming, et al, "The experimental study of application of phycocyanin in cancer laser therapy," *Chinese Journal of Marine Drugs* vol. 1, no. 1, pp. 1-4, 1995.
22. B. Li, X. Chu, M. Gao, and W. Li, "Apoptotic mechanism of MCF-7 breast cells in vivo and in vitro induced by photodynamic therapy with c-phycocyanin," *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, vol. 42, no. 1, pp. 80–89, 2010.
23. B. Li, M.-H. Gao, X.-C. Zhang, and X.-M. Chu, "Molecular immune mechanism of c-phycocyanin from spirulina platensis induces apoptosis in HeLa cells in vitro," *Biotechnology and Applied Biochemistry*, vol. 43, no. 3, pp. 155–164, 2006.
24. M. Osaki, M. Oshimura, and H. Ito, "PI3K-Akt pathway: its functions and alterations in human cancer," *Apoptosis*, vol. 9, no. 6, pp. 667–676, 2004.

25. Y. Gao, G. Liao, C. Xiang, et al, "Effects of phycocyanin on INS-1 pancreatic β -Cell mediated by PI3K/Akt/FoxO1 signalling pathway," *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 83, no. 1, pp. 185–194, 2016.
26. J. Ying, M.-H. Rahbar, D.-M. Hallman, et al, "Associations between dietary intake of choline and betaine and lung cancer risk," *PLoS ONE* vol. 8, n. 2, pp. e54561, 2013.
27. B. Li, M.-H. Gao, X.-M. Chu, et al, "The synergistic antitumor effects of all-trans retinoic acid and c-phycocyanin on the lung cancer A549 cells in vitro and in vivo," *European Journal of Pharmacology*, vol. 749, no. 1, pp. 107–114, 2015.
28. C. Başaran-Küçükgergin, I. Bingöl, M. Soluk Tekkeşin, et al, "Effects of Carnosine, Taurine, and Betaine Pretreatments on Diethylnitrosamine-Induced Oxidative Stress and Tissue Injury in Rat Liver," *Toxicology and Industrial Health*, vol. 32, no. 8, pp. 1405–1413, 2014.
29. J. Oliva, J. Zhong, V.-S. Buslon, and S.-W. French, "The effect of SAME and betaine on Hepa 1–6, C34 and E47 liver cell survival in vitro," *Experimental and Molecular Pathology*, vol. 92, no. 1, pp. 126–130, 2012.
30. O.-M. Basha, R.-A. Hafez, Y.-M. El-Ayouty, et al, "C-Phycocyanin inhibits cell proliferation and may induce apoptosis in human HepG2 cells," *Egyptian Journal of Immunology*, vol. 15, no. 2, pp. 161–167, 2008.
31. N.-K. Aaronson, S. Ahmedzai, B. Bergman, et al, "The european organization for research and treatment of cancer QLQ-C30: a quality-of-life instrument for use in international clinical trials in oncology," *Journal of the National Cancer Institut*, vol. 85, no. 5, pp. 365–376, 1993.
32. C. Cereser, J. Guichard, J. Drai, et al, "Quantitation of reduced and total glutathione at the femtomole level by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection: application to red blood cells and cultured fibroblasts," *Journal of Chromatography*, vol. 752, no. 1, pp. 123–132, 2001.
33. J. Talvas, A. Obled, P. Fafournoux, and S. Mordier, "Regulation of protein synthesis by leucine starvation involves distinct mechanisms in mouse C2C12 myoblasts and myotubes," *Journal of Nutrition*, vol. 136, no. 6, pp. 1466–1471, 2006.
34. G. Liao, B. Gao, Y. Gao, et al, "Phycocyanin inhibits tumorigenic potential of pancreatic cancer cells: role of apoptosis and autophagy," *Scientific Reports*, vol. 6, no. 34564, pp. 1–12, 2016.
35. Y. Ey, Y.-J. Kim, "Betaine inhibits in vitro and in vivo angiogenesis through suppression of the NF- κ B and Akt signalling pathways," *International Journal of Oncology*, vol. 41, no. 5, pp. 1879–1885, 2012.
36. P. Tantirapan, and Y. Suwanwong, "Anti-proliferative effects of c-phycocyanin on a human leukemic cell line and induction of apoptosis via the PI3K/AKT pathway," *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, vol. 6, no. 5, pp. 1295–1301, 2014.
37. B.-V.-V. Pardhasaradhi, A.-M. Ali, A.-L. Kumari, et al, "Phycocyanin-mediated apoptosis in AK-5 tumor cells involves down-regulation of Bcl-2 and generation of ROS," *Molecular Cancer Therapeutics*, vol. 2, no. 11, pp. 1165–1170, 2003.
38. H. Wang, Y. Liu, X. Gao, et al, "The recombinant beta subunit of c-phycocyanin inhibits cell proliferation and induces apoptosis," *Cancer Letters*, vol. 247, no. 1, pp. 150–158, 2007.
39. G. Hughes, M.-P. Murphy, and E.-C. Ledgerwood, "Mitochondrial reactive oxygen species regulate the temporal activation of nuclear factor kappaB to modulate tumour necrosis factor-induced apoptosis: evidence from mitochondria-targeted antioxidants," *Biochemical Journal*, vol. 389, no. 1, pp. 83–89, 2005.
40. J.-F. Fahrmann, and W.-E. Hardman, "Omega 3 fatty acids increase the chemo-sensitivity of B-CLL-derived cell lines EHEB and MEC-2 and of B-PLL-derived cell line JVM-2 to anti-cancer drugs doxorubicin, vincristine and fludarabine," *Lipids in Health and Disease*, vol. 12, no. 36, pp. 1–13, 2013.

41. L. Ghibelli, S. Coppola, C. Fanelli, et al, "Glutathione depletion causes cytochrome c release even in the absence of cell commitment to apoptosis," *The FASEB Journal*, vol. 13, no. 14, pp. 2031–2036, 1999.
42. S.-M. Chuang, I.-C. Wang, and J. L. Yang, "Roles of JNK, p38 and ERK mitogen-activated protein kinases in the growth inhibition and apoptosis induced by cadmium," *Carcinogenesis*, vol. 21, no. 7, pp. 1423–1432, 2000.
43. E. White, and R.-S. DiPaola, "The double-edged sword of autophagy modulation in cancer," *Clinical Cancer Research*, vol. 15, no. 17, pp. 5308–5316, 2009.
44. M. Degtyarev, A. De Mazière, C. Orr, et al, "Akt inhibition promotes autophagy and sensitizes pten-null tumors to lysosomotropic agents," *Journal of Cell Biology*, vol. 183, no. 1, pp. 101–116, 2008.
45. A. Thorburn, "Apoptosis and autophagy: regulatory connections between two supposedly different processes," *Apoptosis*, vol. 13, no. 1, pp. 1–9, 2008.
46. G. Chen, and D.-V. Goeddel, "TNF-R1 signalling: a beautiful pathway," *Science*, vol. 296, no. 5573, pp. 1634–1635, 2002.
47. M. Karin, and A. Lin, "NF-kappaB at the crossroads of life and death," *Nature Immunology*, vol. 3, no. 3, pp. 221–227, 2002.
48. B. Stefanska, H. Karlic, F. Varga, et al, "Epigenetic mechanisms in anti-cancer actions of bioactive food components - the implications in cancer prevention," *British Journal of Pharmacology*, vol. 167, no. 2, pp. 279–297, 2012.
49. I. Lee, "Betaine is a positive regulator of mitochondrial respiration," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 456, no. 2, pp. 621–625, 2015.

L'activité physique volontaire ralentit la croissance tumorale des cellules A549 chez le rat : explications mécanistiques

□ I Aéc I □

Introduction :

Le rôle de l'activité physique régulière dans la prévention des pathologies chroniques telles que le diabète, les maladies cardio-vasculaires est reconnu (Brown et al., 2012). L'effet de l'activité physique et de l'exercice dans la prévention du cancer est un sujet de recherche considérable ayant un intérêt clinique. L'activité physique peut influencer le risque de cancer dont le cancer du côlon, du pancréas, des ovaires et de la prostate (Wolin et al., 2009). Toutefois, on connaît moins l'association entre cancer du poumon et activité physique et les résultats sont controversés (Emaus & Thune, 2011; Gonçalves & Novaes, 2012; Granger et al., 2014; Na & Oliynyk, 2011). Les divers points de vue s'expliquent notamment par la définition du terme « activité physique ». L'activité physique occupationnelles (APO) peut être définie comme des périodes longues (e.g. des heures) d'activité à un faible niveau de dépenses énergétiques (Filaire et al., 2013). De nombreux mécanismes ont été proposés pour expliquer comment l'APO peut réduire le risque de cancer du poumon (Lee et al., 1999). Il semblerait que l'APO augmente la fonction cardiopulmonaire, réduisant le temps d'interaction avec les agents carcinogènes de l'air, bien que l'exposition aux polluants pourrait être augmentée avec l'augmentation de la respiration. L'exercice pourrait également jouer un rôle protecteur par l'augmentation de la fonction immunitaire (Koelwyn et al., 2015). Des changements transitoires de la transcription génétique et l'augmentation des défenses antioxydantes endogènes, permettant d'améliorer la capacité de réparation de l'ADN et de moduler des facteurs de croissance (Parker et al., 2014), sont également des mécanismes pouvant expliquer les changements physiologiques bénéfiques de l'activité physique, induisant une diminution du risque de cancer du poumon (Emaus & Thune, 2011). L'activité physique peut également induire une surexpression de PGC-1 α , un coactivateur transcriptionnel impliqué dans les adaptations à long terme induites par l'exercice. Une perte de PGC-1 α réduit notamment l'expression des piègeurs d'ERO (Olsen et al., 2008). L'irisine est une myokine PGC-1 α -dépendante, reflétant l'activité de PGC-1 α (Samy et al., 2015). Récemment, Shao et al. (2017) a montré qu'un traitement à l'irisine réduisait l'invasion, la prolifération et la migration des cellules A549 *via* une inhibition de la transition épithélio-mésenchymateuse et de la voie PI3K/AKT.

L'effet de l'activité physique après le diagnostic du cancer du poumon est le moins étudié et les mécanismes sous-jacents ne sont pas clairement élucidés. Higgins et al. (2014) a montré que

l'activité physique *via* une roue d'activité chez la souris réduisait la croissance d'une tumeur pulmonaire induite (après injection de cellules A549 chez le rat), grâce à une activation de p53 et la stimulation de l'apoptose. Pedersen et al. (2016) a reporté que l'activité physique induisait un ralentissement de la croissance tumorale de mélanome (B16F10) chez des souris femelles *via* la stimulation de l'immunité.

Dans cette étude *in vivo*, nous avons évalué l'effet de l'activité physique volontaire quotidienne sur la croissance des cellules A549 implantées en sous-cutané, chez le rat Nude. Nous avons étudié les mécanismes biologiques sous-jacents potentiels de l'activité physique par l'évaluation du stress oxydatif et de marqueurs de l'apoptose. Nous avons émis l'hypothèse que l'activité physique volontaire pouvait ralentir la croissance tumorale à travers la modulation du stress oxydatif et de mécanismes redox-sensibles tels que l'apoptose.

Résultats :

Croissance tumorale

A partir de la deuxième semaine, comparativement au groupe contrôle, le groupe activité physique volontaire avait un volume tumoral moyen significativement inférieur. 4 semaines d'activité physique a réduit le poids tumoral (-94%, $p < 0.01$) et le volume tumoral (-89%, $p < 0.01$).

Balance redox dans la tumeur

Comparativement au groupe contrôle, l'activité physique a augmenté significativement les TBARS tumoraux (+ 316 %, $p < 0.01$). Nous avons également observé une diminution significative du T-GSH (- 50 %, $p < 0.05$) et une augmentation significative des concentrations d'irisine (+ 143 %, $p < 0.05$).

Marqueurs pro-apoptotiques dans la tumeur

Une augmentation significative du ratio p38 phosphorylé / p38 total (+438 %, $p < 0.01$), par une augmentation de p38 phosphorylé a été noté dans le groupe activité physique. L'activité physique volontaire a également diminué significativement l'expression I κ B, induisant une activation de NF- κ B (-69%, $p < 0.05$). Nous avons également noté une augmentation non significative du ratio caspase-3 / pro-caspase-3)

Marqueurs anti-apoptotiques dans la tumeur

L'activité physique volontaire a diminué le ratio AKT phosphorylé / AKT total, (-28%, $p < 0.05$), par une diminution de la phosphorylation d'AKT.

Discussion :

De nombreuses études ont mis en évidence que l'activité physique était liée à la réduction du risque de développer une variété de cancer dont les cancers du côlon, du sein et des ovaires (Ballard-Barbash et al., 2012). Les effets protecteurs induits par l'activité physique sont multifactoriels et sont le résultat, entre autres, d'une diminution du stress oxydatif et de la modulation de l'inflammation et de l'apoptose (Filaire et al., 2013). Pour le cancer du poumon, l'influence de l'exercice est moins définie et les mécanismes permettant d'expliquer l'action protecteur sont à élucider. Dans cette étude, nous avons observé un ralentissement de la croissance tumorale pulmonaire. Ce résultat est en accord avec l'étude récente de Higgins et al. (2014) qui avait reporté que l'activité physique ralentissait la croissance tumorale des cellules A549 implantées chez le rat, montrant une association entre l'exercice et l'apoptose. Il est connu que les ERO peuvent jouer un rôle dans la réponse apoptotique (Abraham et al., 2012). En effet, la peroxydation lipidique notamment, peut induire la mort des cellules cancéreuses en affectant la fonction mitochondriale. De plus, l'accumulation de MDA est mutagène et génotoxique pour les cellules mammifères et réagit avec les bases d'ADN (Erejuwa et al., 2013). Dans notre étude, l'activité physique volontaire a notamment augmenté les concentrations en TBARS, l'activation de p38 et de caspase-3, tous ces mécanismes étant impliqués dans l'apoptose. En plus de la stimulation apoptotique, l'autophagie pourrait également contribuer aux dommages cellulaires, l'un des régulateurs clés étant mTOR (White & DiPaola, 2009). Degtyarev et al. (2008) ont noté que le déclenchement de l'autophagie dans les cellules cancéreuses est associé à une inhibition de mTOR, induite par une inhibition d'AKT. AKT est un facteur anti-apoptotique phosphorylant ou inactivant les protéines pro-apoptotiques (Brunet et al., 1999). L'activité d'AKT est notamment inhibée grâce à PTEN. Précédemment, il a été montré que l'activité physique induisait une augmentation des protéines telles que PTEN, induisant par la suite une activation de p53 (Freeman et al., 2003; Higgins et al., 2014). De plus, un déficit en mTOR augmente la phosphorylation et la translocation nucléaire de NF- κ B, résultat reporté dans notre étude. Il a été également montré que l'irisine réduisait l'invasion, la prolifération et la migration des cellules A549 notamment grâce à l'inhibition de la voie PI3K/AKT. (Shao et

al., 2017). Dans notre étude, nous avons noté une augmentation de l'activité de l'irisine dans tumeur qui pourrait être expliquée en partie par l'inhibition d'AKT également observée.

Conclusion :

Notre étude montre des effets inhibiteurs de l'activité physique sur la croissance d'adénocarcinome pulmonaire chez le rat. L'activité physique a stimulé la mort cellulaire *via* l'activation d'une réponse pro-oxydante et de p38 et une inhibition d'AKT, stimulant simultanément l'apoptose et l'autophagie. Toutefois, d'autres études sont nécessaires afin de déterminer plus précisément les mécanismes sous-jacents.



Wheel running slowed down the Growth of Lung Cancer A549 Cells in rats: mechanistic explanations

Carmen Dupuis¹, Marc Filaire^{1,2}, Marie-Paule Vasson^{1,3}, Ming Wei⁴, Jeremie Talvas¹, Edith Filaire^{1,5,6}

¹University of Clermont Auvergne, INRA, UNH, Unity of human nutrition, CRNH Auvergne, F-63000 Clermont-Ferrand, France

²Centre Jean Perrin, department of thoracic surgery, 58 rue Montalembert, 63011 Clermont-Ferrand, France

³Centre Jean Perrin, department of nutrition, 58 rue Montalembert, 63011 Clermont-Ferrand, France

⁴Cellvax, SAS, Parc Biocitech, 102 Avenue Gaston Roussel, 93230 Romainville, France

⁵CIAMS, University of Paris-Sud, Université Paris-Saclay, 91405 Orsay Cedex, France

⁶CIAMS, University of Orléans, 45067, Orléans, France.

Article soumis dans « Medicine and Science in Sports and Exercise », le 21 avril 2017

Abstract:

Physical activity may influence the risk for cancer at several sites, and the evidence is most consistent for colon, breast and prostate cancer. We investigated the effect of long-term voluntary wheel running (4 weeks) on growth and progression of A549 lung cancer in pathogen-free male nude rats. We also examined effects on the central features of tumour physiology, including markers of inflammation, apoptosis and oxidative stress. After subcutaneous injection of A549 cells and when the mean tumour volume reached 500 mm³, the rats were randomized to daily wheel running versus no wheel running. After 4 weeks, all rats were killed, and the lung tumours, were collected. To determine the molecular mechanism of wheel running-mediated cell death, we investigated its effects on p38, Akt and NF-κB pathways. Lung tumours in exercising rat grew significantly more slowly relative to sedentary rat and tumour weights (-94%) and volumes (-89%) were significantly reduced in wheel running group. Wheel running activated p38 signaling pathways, increased lipid peroxidation and irisin concentrations in tumour, and induced nuclear translocation of NF-κB and a decrease in the phosphorylated AKT/total AKT ratio. In conclusion, daily exercise appears to mitigate the growth of lung adenocarcinoma tumour, *via* activation of pro-oxidant response; p38 and inhibition of AKT inducing likely stimulation of apoptosis and autophagy. However, further studies are needed to determine more precisely the mechanism behind exercise-induced this tumor reduction.

Key words: nude rats, physical activity, oxidative stress, apoptosis, autophagy

1. Introduction

The role of regular physical activity in preventing chronic diseases such as diabetes and cardiovascular disease is well recognised (4). Current World Health Organisation recommendations include at least 150 minutes of moderate-intensity aerobic physical activity per week for adults aged 18 to 64, to promote cardiorespiratory and muscular fitness and bone health. The effect of physical activity and exercise in the prevention of cancer has also been the subject of considerable research and clinical interest over the past several decades. Physical activity may influence the risk of cancer at several sites, and the evidence is most consistent for colon cancer, pancreatic cancer, endometrial cancer and prostate cancer (32). However, little is known about whether physical activity is associated with similar risk reductions in lung cancer (15,22) and the data are under debate (9,14). This controversial point of view is often connected to definition of the term "physical activity". In fact, physical activity can be defined as bodily movement produced by the skeletal muscles, resulting in a quantifiable level of energy expenditure. It is associated with daily living, work, and leisure-time activities. Leisure-time physical activity (LPA) is often characterised by short-term, intensive energy expenditure, whereas occupational physical activity (OPA) is more likely to occur over longer periods (e.g. hours) at lower rates of energy expenditure (11). Several mechanisms have been proposed to explain how OPA may, in particular, reduce the risk of lung cancer (21). It seems that OPA increases cardiopulmonary function and perfusion, reducing the interaction time with the carcinogenic agents in the airways, although exposure to air pollutants might also increase with increased respiration. Another mechanism is the effect of exercise on the immune system. Immune function is enhanced by long-term moderate-intensity exercise through increases in the number and activity of macrophages, natural killer cells, as well as through increased mitogen-induced lymphocyte proliferation rates (20). Transient change in gene transcription and upregulation of the endogenous antioxidant defence system, which improve DNA repair capacity, and modulation of growth factors (24) are also proposed to explain the beneficial physiological changes of physical activity in the prevention of lung cancer (9). Physical activity can also induce the overexpression of PGC-1 α , a transcription coactivator involved in exercise-induced long-term changes (16). A loss of PGC-1 α decreased Radical Oxygen Species (ROS) scavengers (superoxide dismutase (SOD2), thioredoxin (Thxr2), catalase (CAT) (23), and also induced transcriptional induction of genes involved in systemic inflammation (16). PGC-1 α plays a role in ROS control by increasing the expression of genes involved in ROS detoxification, by increasing the expression of uncoupling proteins (UCP) able to attenuate

ROS production, and by modulation of tumour suppressor gene p53, which plays an important role in a multitude of biologic pathways, including DNA repair, cell-cycle arrest, apoptosis, senescence, autophagy, and metabolism (12,13,27). Irisin is a myokine PGC-1 α -dependent that reflects PGC-1 α activity (26). Recently, Shao et al. (28) showed that irisin treatment reduced the invasion, proliferation and migration of A549 cells through the inhibition of EMT (epithelial-to-mesenchymal transition) and PI3K/AKT signalling.

The effect of physical activity following a diagnosis of lung cancer is less studied, and the molecular mechanisms that can play a role are not clearly elucidated (17). Higgins et al. (17) investigated the effect of voluntary wheel running on lung cancer growth in mice and showed a reduction of lung cancer growth (injected A549 cells in rats) through p53 activation and apoptosis stimulation. Pedersen et al. (25) reported that exercise-induced slowdown of tumour growth (B16F10 melanoma model) in female mice via the induction of immune-related pathways.

The current study examined the effects of daily exercise on a rat model of lung carcinoma, examining the growth and progression of lung tumour over 4 weeks using a subcutaneous implantation of A459 cells model. Furthermore, we explored the potential biologic mechanisms underlying the tumour-mitgating effects of exercise through the evaluation of oxidative stress, inflammatory and apoptosis markers. We hypothesised that exercise would inhibit lung cancer growth and progression.

2. □ Materials and methods

2.1. Cell culture

A549 cells (ATCC® CCL-185™, human lung carcinoma) were maintained in culture by Cellvax Pharma, in DNEM environment, 10% Foetal Bovin Serum (FBS), 5mM L-Glutamine, 1 % Penicillin/Streptomycin. A549 cells were grown to a confluence of 80%. For injection, A549 cells were suspended in Matrigel (Basement Membrane High Concentration, Corning Life Sciences, Amsterdam, Netherlands) (50:50).

2.2. Study design

Ten nude male rats (Charles River, France), aged 6-7 weeks, weighing 239.8 ± 6 g, were acclimatised for one week before study initiation. All animal work procedures were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee (Anses) of Maisons-Alfort (France). The study was conducted in conformance with the policy statement of the American College of Sports Medicine.

The daily light cycle ran from 7 a.m. to 7 p.m. and room temperature was maintained between $21.6 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$. The nutritional breakdown of food was 25.2 % proteins, 13.5 % lipids and 61.3% carbohydrates (A03, Society Safe-diet, Augy, France). Throughout the study, rats had free access to food and water. Following acclimatisation, the rats were given a subcutaneous injection of 107 A549 cells into the right flank. Ten days after tumour implantation, and once mean tumour volumes (MTV) had reached 500 mm^3 , the animals were all randomly assigned to 2 groups:

- Control group ($n = 5$, tumour volume: $568.8 \pm 98.9 \text{ mm}^3$),
- Wheel running group ($n = 5$, tumour volume: $704.55 \pm 111.39 \text{ mm}^3$)

2.3. Exercise protocol.

The exercise modality in this experiment was voluntary wheel running as opposed to forced exercise paradigms such as treadmill running, which reflects normal as well as individual exercise behaviour in rats. It is less stressful; and a higher and more variable dose of exercise can be investigated (18). Murine voluntary wheel running is characterised by intermittent exercise performed for relatively short time periods at high speed, against a low load, throughout the entire dark cycle. Voluntary wheel activity was measured using sensors (Intellibio, Nancy, France) connected to each wheel; number of laps, laps per minute, and duration of activity were automatically recorded on a computer for each 360 s interval for 24 hours a day over the whole 4 weeks.

2.4. Evaluation of tumour growth

After one week of tumour cell injection, tumour growth was measured (tumour length, width and volume) twice a week by using an external calliper. Tumour volume (TV) was calculated using the following formula: $\text{TV} = \text{Length} \times \text{Width}^2 / 2$. Tumour growth data were recorded for each individually identified rat. The relative volume of an individual tumour volume on day X (TVX) was calculated by dividing the absolute volume (mm^3) of the respective tumour volume on day X (TVX) by the absolute volume of the same tumour on the day of randomisation, i.e. on day 0 (TV0) and multiplied by 100, as shown in the following equation: $\text{RTVx} [\%] = \text{TVx} / \text{T0} \times 100$.

The observation period lasted 28 days. In line with institutional guidelines (1), all test animals were euthanized when tumour volume reached $4,000 \text{ mm}^3$ during that period.

2.5. Tumeur sampling

On the 29th day, rats were removed from their cages, taken to an adjacent room and were euthanized within 30 seconds of removal from the cage, using anaesthetic + analgesic (Ketamine: 75 mg.kg⁻¹ + Xylazine: 8 mg.kg⁻¹) and an aortic puncture.

Tumour tissues were immediately excised, weighed, and snap-frozen in nitrogen liquid, and stored at -80°C.

2.6. Protein extractions of tumour

For analysis, tumours were treated in two ways. The first involved grinding one part tumour in ice with buffer A (10 mM TRIS, 10 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0.1mM EDTA and 1% of protease inhibitors cocktail (P8340-1ml, Sigma-Aldrich)) for 10 seconds, 5 x 20 seconds, followed by centrifugation for 5 minutes at 15000xg at 4°C. The supernatant (cytosol protein) was recovered, aliquoted and frozen at -80°C. The pellet was suspended in buffer A and centrifuged (5 min, 15000xg, 4°C). The supernatant was discarded and the pellet was suspended in buffer B (50 mM TRIS, 50 mM KCl, 150 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, and 0.5% of protease inhibitors cocktail (P8340-1ml, Sigma-Aldrich), followed by 3 1-minute cycles of ultrasound and 10 minutes of agitation in ice, and centrifugation (5 min, 15000xg, 4°C). The supernatant (perinuclear and nuclear protein) was recovered and frozen at -80°C.

The second method involved grinding the remaining tumour in ice with RIPA Buffer (R0278-500ml, Sigma-Aldrich), 1% of protease inhibitors cocktail (P8340-1ml, Sigma-Aldrich) and 1% of phosphatase inhibitors cocktail (P5726-1ml, Sigma-Aldrich) for 10 seconds and 5 x 20 seconds, followed by centrifugation (5 min, 15000xg, 4°C). The supernatant (total protein) was recovered, aliquoted and frozen at -80°C.

2.7. Analysis

2.7.1. □ Tumour protein content

Total protein concentrations, cytosol and nuclear fraction of the tumour were determined using a BC Assay Proteins Quantification Kit (Interchim, Montluçon France).

2.7.2. □ Lipid peroxidation by thiobarbituric acid reactive substances

The level of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) was determined using enzymatic assay kits (Cayman Chemical, Interchim, Montluçon France) and cytosol protein extraction from the tumour. The MDA-TBA adduct formed by the reaction of MDA and TBA at high

temperatures between 90-100°C, and in acidic conditions, is measured colorimetrically at 520 nm (Photometer Multiskan FC ThermoScientific, MC2Lab, Clermont-Ferrand, France).

2.7.3. □ Antioxidant markers

Irisine

Plasmatic irisin expression was evaluated by Competitive ELISA kit (Adipogen, COGER, Paris, France).

Superoxide dismutase

The superoxide dismutase (SOD) assay kits (Cayman Chemicals, Interchim, Montluçon, France) were used to measure SOD activity in cytosol extraction from the tumour. This kit utilises tetrazolium salt for the detection of superoxide radicals generated by xanthine oxidase and hypoxanthine, and measures all three types of SOD (Cu/ZN, Mn and FeSOD) at 450 nm (Photometer Multiskan FC ThermoScientific, MC2Lab, Clermont-Ferrand, France).

Catalase

The catalase (CAT) activity of tumour cytosol protein extraction was determined by utilisation of the peroxidatic function of CAT. This method is based on the reaction of the enzyme with methanol in the presence of an optimal concentration of H₂O₂. The formaldehyde produced is measured colorimetrically with 4-amino-3-hydrazino-5-mercapto-1,2,4-triazpme (Purpald) as the chromogen (Cayman Chemicals, Interchim, Montluçon, France). The CAT activity is measured colorimetrically at 540 nm.

Glutathione Peroxidase

Glutathione Peroxidase (GPx) activity was measured in tumour cytosol protein extraction by the indirect coupling reaction with glutathione reductase (GR) (Cayman Chemicals, Interchim, Montluçon, France). Oxidised glutathione, produced upon reduction of hydroperoxide by GPx, is recycled to its reduced state by GR and NADPH. The oxidation of NADPH to NADP⁺ is accompanied by a decrease in absorbance at 340 nm (Photometer Multiskan FC ThermoScientific, MC2Lab, Clermont-Ferrand, France).

Total Glutathione

Total glutathione concentrations (T-GSH) in tumour cytosol protein extraction were determined using the Cereser et al. (6) method. Briefly, the sample was reduced by dithiothreitol for 10 minutes at room temperature, and glutathione ethyl ester was added as an internal standard.

After protein precipitation, supernatant was derived through the addition of ortho-phthalaldehyde (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France). The High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) separation of GSH–OPA adducts was achieved on a UP3 HDO C-18 reversed-phase silica column (150x3.60 mm; 3 μ particle size) from Phenomenex (Interchim, Montluçon, France) maintained at 37°C, followed by fluorimetric detection at 420 nm after excitation at 340 nm (Summit HPLC system, Dionex SA, Courtaboeuf, France). Derivatives were eluted using an acetonitrile gradient from 10% to 50% in 25 mM ammonium acetate, pH 6, for 5 min. The flow-rate was 0.5 ml.min⁻¹ for a 15-minute elution. Chromatogram integration was performed using Chromeleon software from Dionex (Version 6.80, Dionex SA, Courtaboeuf, France). GSH content was calculated using a standard curve established under the same conditions.

2.7.4. □ Apoptosis markers

Phosphorylated AKT (SerS473) and total AKT, and phospho-p38- α (Thr180/Tyr182) and total p38- α were measured in total extraction of tumour, by Sandwich ELISA kits (Abcam, Cambridge, United Kingdom). The activation of AKT and p38 was evaluated by Phosphorylated AKT (SerS473) / total AKT ratio and the phospho-p38- α (Thr180/Tyr182) / total p38- α ratio.

Caspase-3/Pro-Caspase-3 ratio was carried out in total extraction of tumour by Western blotting. The primary antibodies (1:1000) used were Caspase-3 rabbit polyclonal antibody (#9662, Cell Signalling Technology, Ozyme, France) and β -actin (clone 4C2) mouse monoclonal IgG1 κ (#MABT825, Millipore, France). The secondary antibody (1:1000) used was goat anti-rabbit IgG (H+L), HRP conjugate (#32460, Thermo Scientific, USA).

The primary antibody recognised the pro-caspase-3 (35 kDa) and caspase-3 (17 and 19 kDa). The activation of caspase-3 was evaluated by caspase-3/pro-caspase-3 ratio, after normalisation by β -actin expression.

Detection of I κ B- α expression was done in total extraction of tumour by Western blotting. The primary antibodies (1:1000) used were I κ B- α (L35A5) mouse mAb (Amino-terminal Antigen) monoclonal antibody (#4814, Cell Signaling Technology, Ozyme, France), and β -actin (clone 4C2) mouse monoclonal IgG1 κ (#MABT825, Millipore, France). The secondary antibodies (1:1000) used were goat anti-rabbit IgG (H+L), HRP conjugate (#32460, Thermo Scientific, USA) and goat anti-mouse IgG (H+L), HRP conjugate (#32430, Thermo Scientific, USA).

2.7.5. □ Western Blot protocol

For Western blotting, we used the protocol described by Talvas and al. (29).

3. □ Statistical analysis

All statistical tests were performed using the statistical package programme SPSS 19 (SPSS Inc., Chicago, IL). All values were expressed as the mean $\pm$ standard error of mean (SEM). The non-parametric Mann-Whitney U test was used for the statistical computation of all variables. A level of $p < 0.05$ was considered as significant.

4. □ Results

4.1. Lung cancer progression

Compared with the control group, the wheel running group showed a slowdown of tumour volume from the second week (Figure 1). Four weeks of wheel running reduced tumour weight (Table 1, -94%, $p < 0.01$) and tumour volume (-89%, $p < 0.05$).

Figure 1: Physical activity slows down tumour evolution. Mean $\pm$ SEM. * $p < 0.05$

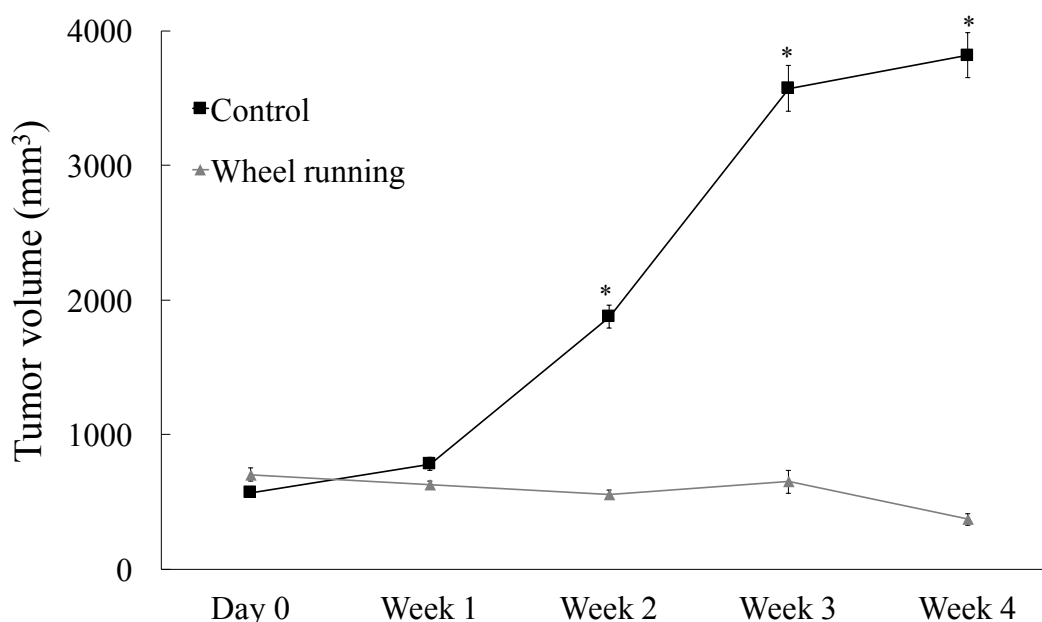


Table 1: Tumour weight in absolute value (grams (g)) and in relative value (pour cent of body weight (% BW)) in control group and wheel running group Mean $\pm$ SEM. Compared to control group: **= $p < 0.01$.

	Control (n = 5)	Wheel running group (n = 5)
Tumor weight (g)	2.92 $\pm$ 0.17	0.18 $\pm$ 0.02**
Tumor weight (% BW)	0.79 $\pm$ 0.04	0.06 $\pm$ 0.00**

Tumour redox balance

Running increased TBARS concentrations in the tumour (C: 14.32 U/mg de protein VS WR: 59.57 U/mg de protein; + 316%; $p < 0.01$). We also observed a significant decrease of T-GSH (- 50%, $p < 0.05$), (Figure 2D) and a significant increase of irisin concentrations +143%, $p < 0.05$) (Figure 2E).

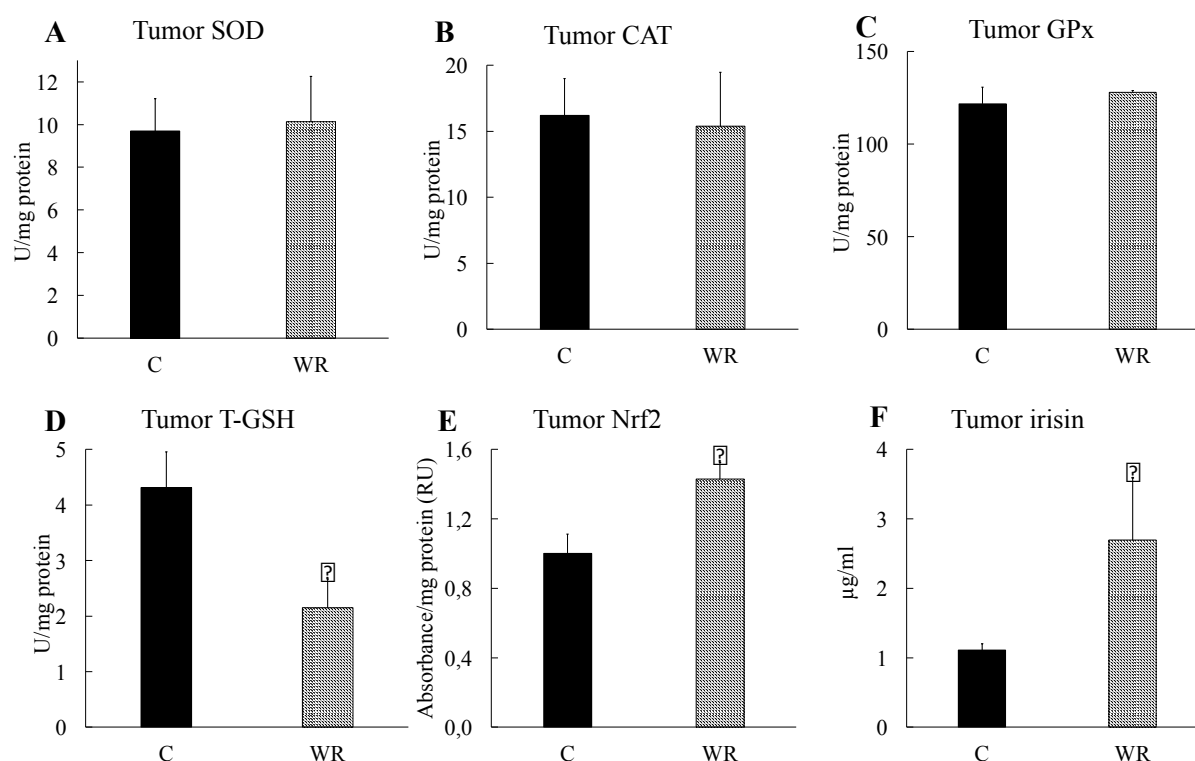


Figure 2: (A) superoxide dismutase (SOD), (B) catalase (CAT), (C) glutathione peroxidase (GPx), (D) total glutathione (T-GSH), and (E) Nrf-2 and (F) irisin concentrations in tumour. Groups: C= Control, and WR = Wheel running. Mean $\pm$ SEM. Compared to control group: * $p < 0.05$.

4.2. Apoptotic markers

4.2.1. □ Pro-apoptotic markers

An increase in the phosphorylated p38 / total p38 ratio (+ 438, $p < 0.01$), by stimulation of p38 phosphorylation (Figure 3B) was noted in the wheel running group. Wheel running decreased I κ B expression, inducing an activation of NF- κ B (- 69%, $p < 0.05$) (Figure 3D). We also noted a non-significant increase in ratio caspase-3 / pro-caspase-3 (Figure 3C).

4.2.2. □ Anti-apoptotic markers

Voluntary wheel running decreased phosphorylated AKT / total AKT ratio (- 28%, $p < 0.05$), by suppressing AKT phosphorylation (Figure 3A).

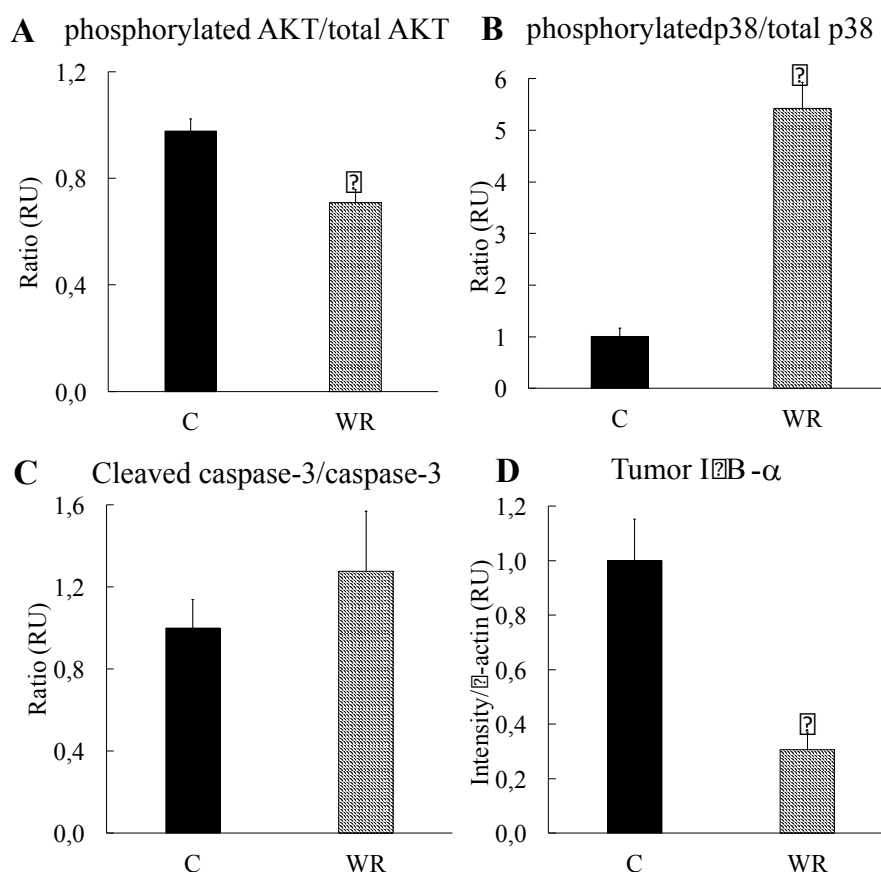


Figure 3: Tumour ratio phosphorylated (Ser473)/total AKT, **(B)** Tumour ratio phosphorylated (Tyr180/Tyr182)/total p38, **(C)** Tumour ratio pro-caspase-3/caspase-3, and **(D)** Tumour I κ B- α expression. Groups: C= Control, and WR = Wheel running. Mean $\pm$ SEM. Compared to control group: * $< p < 0.05$.

5. Discussion

Recent studies have provided evidence that regular exercise may be linked to a reduction in the risk of developing a variety of cancers, including colon, breast, and ovarian cancers (3). Exercise-induced protective actions are multifactorial, including a reduction in oxidative stress by exercise-induced antioxidants, and the modulation of inflammation and apoptosis (11). In lung cancer, the influence of exercise on cancer-related mortality is less defined, and the mechanisms behind this protection have yet to be elucidated. In the current study, we reported that daily exercise using wheel running significantly reduces local tumour growth in a rat model of lung cancer. This result is in line with those of Pedersen et al. (25), which noted that wheel running decreases tumour growth by over 60% across subcutaneous B16F10 melanoma model in female mice. Recently, Higgins et al. (17) also reported that lung tumours in exercising mice grew significantly more slowly relative to sedentary mice, showing an association between exercise and tumour apoptosis. It is well known that ROS play a role in apoptotic response (2). In fact, lipid peroxidation can induce cancer cell death by affecting mitochondrial function. Moreover, MDA accumulation is mutagenic and genotoxic in mammalian cells and reacts with DNA bases (10). In our study, tumours from the wheel running group exhibit higher levels of lipid peroxidation, an increase of p38 activation and a non-significant increase of caspase-3, with all these mechanisms being involved in apoptosis (Figures 2F, 3B, 3C). Previously, it was also shown that wheel running in mice induced an increase of p53, with p53 acting as a tumour suppressor gene by inducing cell-cycle arrest, apoptosis and senescence (17). In addition to apoptosis, it has been proposed that autophagy may also contribute to cell damage, one of the key regulators of autophagy being the mammalian target of rapamycin (mTOR) (White & DiPaola, 2009). Degtyarev, et al. (8) noted that the triggering of autophagy in cancer cells is associated with inhibition of the mTOR pathway, with Akt inhibition decreasing mTOR activity and promoting autophagy. AKT is an anti-apoptotic factor through phosphorylation or inactivation of pro-apoptotic proteins (5). AKT activity is regulated by a signalling cascade including PDK-1, mTOR, and PI3K. The latter generates PIP₃, itself regulated by PTEN, inducing a decrease of AKT. It was previously shown that exercise induced an increase of p53-transcriptioned proteins such as PTEN, PTEN, this being a tumour suppressor gene (33). Moreover, mTOR deficiency or inactivation increases phosphorylation and nuclear translocation of nuclear factor NF-κB, which results in enhanced NF-κB activation, which results we reported in this study (Figure 3D). It has also been shown that irisin reduced the invasion, proliferation and migration of A549 cells notably through the inhibition of PI3K/AKT

signalling (28). In our study, we noted an increase of irisin concentrations in tumour that could be partially explain the AKT inhibition.

Thorburn (30) mentioned that autophagy and apoptosis are controlled by the same regulators, the NF- κ B signalling pathway being one. NF- κ B activates two stress activated MAPK pathways mediated by JNK and p38, with both having a proapoptotic role by activating caspase 3 on the intrinsic apoptotic pathway (7). In its inactive form, NF- κ B is sequestered in cytosol by its inhibitor I κ B- α . I κ B- α degradation by I κ B kinase complex and NF- κ B inducing kinases allow for the nucleus translocation of NF- κ B. In the nucleus, NF- κ B induces the expression of numerous genes, encoding anti-apoptotic responses as well as pro-apoptotic responses (19). However, further studies are needed to determine the mechanistic role of exercise-mediated growth inhibition and cell death in A549 cells, including inflammatory markers and signalling pathways.

6. Conclusion

Our study demonstrates the beneficial effects of exercise on lung adenocarcinoma tumour growth in rats. Exercise promoted cell death notably *via* the activation of a pro-oxidant response; p38 and inhibition of AKT inducing a likely stimulation of apoptosis and autophagy. However, further studies are needed to more precisely determine the mechanism behind exercise-induced tumour reduction. Future research directions include exploratory studies in humans to examine the effects of OPA on lung cancer progression.

Acknowledgments

This study was supported by the Ligue contre le cancer.

Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as potential competing interests. The authors state that the results of the present study do not constitute endorsement by ACSM, and they declare that the results of the study are presented clearly, honestly, and without fabrication, falsification, or inappropriate data manipulation.

References

1. Aaronson NK, Ahmedzai S, Bergman B, et al. The European Organization for Research and Treatment of Cancer QLQ-C30: a quality-of-life instrument for use in international clinical trials in oncology. *J Natl Cancer Inst.* 1993;85(5):365-376.

2. Abraham NN, Kanthimathi MS, Abdul-Aziz A. Piper betle shows antioxidant activities, inhibits MCF-7 cell proliferation and increases activities of catalase and superoxide dismutase. *BMC Complement Altern Med*. 2012;12:220.
3. Ballard-Barbash R, Friedenreich CM, Courneya KS, Siddiqi SM, McTiernan A, Alfano CM. Physical activity, biomarkers, and disease outcomes in cancer survivors: a systematic review. *J Natl Cancer Inst*. 2012;104(11):815-840.
4. Brown JC, Winters-Stone K, Lee A, Schmitz KH. Cancer, Physical Activity, and Exercise. *Compr Physiol*. 2012;2(4):2775-2809.
5. Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, et al. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell*. 1999;96(6):857-868.
6. Cereser C, Guichard J, Draï J, et al. Quantitation of reduced and total glutathione at the femtomole level by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection: application to red blood cells and cultured fibroblasts. *J Chromatogr B Biomed Sci App*. 2001;752(1):123-132.
7. Chen G, Goeddel DV. TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Science*. 2002;296(5573):1634-1635.
8. Degtyarev M, De Mazière A, Orr C, et al. Akt inhibition promotes autophagy and sensitizes PTEN-null tumors to lysosomotropic agents. *J Cell Biol*. 2008;183(1):101-116.
9. Emaus A, Thune I. Physical activity and lung cancer prevention. *Cancer Res*. 2011;186:101-133.
10. Erejuwa OO, Sulaiman SA, Ab Wahab MS. Evidence in support of potential applications of lipid peroxidation products in cancer treatment. *Oxid Med Cell Longev*. 2013;2013:931251.
11. Filaire E, Dupuis C, Galvaing G, et al. Lung cancer: What are the links with oxidative stress, physical activity and nutrition. *Lung Cancer Amst Neth*. 2013;82(3):383-389.
12. Fu X, Yao K, Du X, et al. PGC-1 α regulates the cell cycle through ATP and ROS in CH1 cells. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2016;17(2):136-146.
13. García-Quintans N, Sánchez-Ramos C, Tierrez A, et al. Control of endothelial function and angiogenesis by PGC-1 α relies on ROS control of vascular stability. *Free Radic Biol Med*. 2014;75 Suppl 1:S5.
14. Gonçalves RV, Novaes RD. The influence of physical activity in the progression of experimental lung cancer in mice. *Pathol Res Pract*. 2012;208(11):677-678.
15. Granger CL, Denehy L, McDonald CF, Irving L, Clark RA. Physical Activity Measured Using Global Positioning System Tracking in Non-Small Cell Lung Cancer An Observational Study. *Integr Cancer Ther*. 2014;1534735414542484.
16. Handschin C, Spiegelman BM. The role of exercise and PGC1 α in inflammation and chronic disease. *Nature*. 2008;454(7203):463-469.
17. Higgins KA, Park D, Lee GY, Curran WJ, Deng X. Exercise-induced lung cancer regression: Mechanistic findings from a mouse model. *Cancer*. 2014;120(21):3302-3310.
18. Jones LW, Viglianti BL, Tashjian JA, et al. Effect of aerobic exercise on tumor physiology in an animal model of human breast cancer. *J Appl Physiol*. 2010;108(2):343-348.
19. Karin M, Lin A. NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nat Immunol*. 2002;3(3):221-227.
20. Koelwyn GJ, Wennerberg E, Demaria S, Jones LW. Exercise in Regulation of Inflammation-Immune Axis Function in Cancer Initiation and Progression. *Oncol*. 2015;29(12):908-920.
21. Lee IM, Sesso HD, Paffenbarger RS. Physical activity and risk of lung cancer. *Int J Epidemiol*. 1999;28(4):620-625.
22. Na H-K, Oliynyk S. Effects of physical activity on cancer prevention. *Ann Acad Sci*. 2011;1229(1):176-183.
23. Olsen RH, Krogh-Madsen R, Thomsen C, Booth FW, Pedersen BK. Metabolic responses to reduced daily steps in healthy nonexercising men. *JAMA*. 2008;299(11):1261-1263.

24. Parker L, McGuckin TA, Leicht AS. Influence of exercise intensity on systemic oxidative stress and antioxidant capacity. *Clin Physiol Funct Imaging*. 2014;34(5):377-383.
25. Pedersen L, Idorn M, Olofsson GH, et al. Voluntary Running Suppresses Tumor Growth through Epinephrine- and IL-6-Dependent NK Cell Mobilization and Redistribution. *Cell Metab*. 2016;23(3):554-562.
26. Samy DM, Ismail CA, Nassra RA. Circulating Irisin Concentrations in Rat Models of Thyroid Dysfunction — Effect of Exercise. *Metabolism*. 2015;64(7):804-813.
27. Sen N, Satija YK, Das S. PGC-1 α , a key modulator of p53, promotes cell survival upon metabolic stress. *Mol Cell*. 2011;44(4):621-634.
28. Shao L, Li H, Chen J, et al. Irisin suppresses the migration, proliferation, and invasion of lung cancer cells via inhibition of epithelial-to-mesenchymal transition. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017;485(3):598-605.
29. Talvas J, Obled A, Fafournoux P, Mordier S. Regulation of protein synthesis by leucine starvation involves distinct mechanisms in mouse C2C12 myoblasts and myotubes. *J Nutr*. 2006;136(6):1466-1471.
30. Thorburn A. Apoptosis and autophagy: regulatory connections between two supposedly different processes. *Apoptosis*. 2008;13(1):1-9.
31. White E, DiPaola RS. The double-edged sword of autophagy modulation in cancer. *Clin Cancer Res*. 2009;15(17):5308-5316.
32. Wolin KY, Yan Y, Colditz GA, Lee I-M. Physical activity and colon cancer prevention: a meta-analysis. *Br J Cancer*. 2009;100(4):611-616.
33. Yu M, King B, Ewert E, et al. Exercise Activates p53 and Negatively Regulates IGF-1 Pathway in Epidermis within a Skin Cancer Model. *PLOS ONE*. 2016;11(8):e0160939.

□ eA □ éAAeni □ □ □ l i l □ r □ □ □ bt □ At □ □ bœ □ A □

Discussion générale et perspectives

l'expression de l'irisine peut être le reflet de l'action de PGC-1 α et pourrait en partie expliquer leur action antioxydante. En effet, PGC-1 α peut promouvoir un environnement antioxydant, d'une part en coactivant Nrf2 qui stimule l'expression de gènes antioxydants, et d'autre part en coactivant ERR α qui induit Sirt3 impliqué dans la détoxification des ERO *via* l'augmentation de l'activité de SOD, GSH et GPX (Scarpulla et al., 2012).

A contrario, l'activité physique spontanée réalisée par les rats sains n'a pas induit de modification de l'équilibre redox, comparativement au groupe contrôle. D'autres auteurs avaient montré qu'un programme de six semaines d'activité physique spontanée chez le rat permettait de limiter l'augmentation de la peroxydation lipidique induite par une pathologie (Mohammadi et al., 2013). Les différences de résultats entre les études peuvent être expliquées par les dissimilitudes de protocole d'activité physique (temps et intensité d'activité, durée du protocole). L'absence de modifications de l'équilibre redox pourrait être due à la faible intensité d'exercice et la durée de l'étude ainsi qu'aux conditions non pathologiques de notre étude.

L'activité physique peut jouer un rôle protecteur contre le stress oxydatif par l'intermédiaire de différentes voies. D'une part, l'activité physique peut augmenter les défenses antioxydantes notamment *via* l'augmentation de la phosphorylation de Nrf2, se liant ainsi aux ARE (antioxidant response elements) et codant l'expression génétique d'antioxydants (Figure 32). D'autre part, elle peut activer PGC-1 α , engendrant la stimulation de l'expression d'antioxydants (GPx, SOD, CAT) (St-Pierre et al., 2006) et la détoxification des ERO par l'intermédiaire de FOXO et d'UCP (Fu et al., 2016; García-Quintans et al., 2014).

Conclusion : L'activité physique agit comme un facteur protecteur contre le stress oxydatif et l'inflammation. Elle agit à travers plusieurs mécanismes, notamment en augmentant l'expression de facteurs antioxydants et en activant des voies de signalisation impliquées dans la réponse au stress oxydatif.

Lors de l'étude I, nous avons observé une augmentation de l'inflammation (Cox-2) au niveau musculaire, dans les groupes activité physique seule et activité physique + bétaïne. Par contre, dans le groupe activité physique + C-PC, aucune augmentation de l'inflammation musculaire n'a été observée. **La C-PC permettrait donc d'inhiber l'inflammation induite par l'activité physique.** Ces résultats concordent avec les précédentes études montrant que la C-PC était un inhibiteur sélectif de la Cox-2 (Reddy et al., 2000) et que ses propriétés anti-inflammatoires pourraient être, en partie, expliquées par son rôle d'inhibiteur de Cox-2 (Marnett & Kalgutkar, 1999).

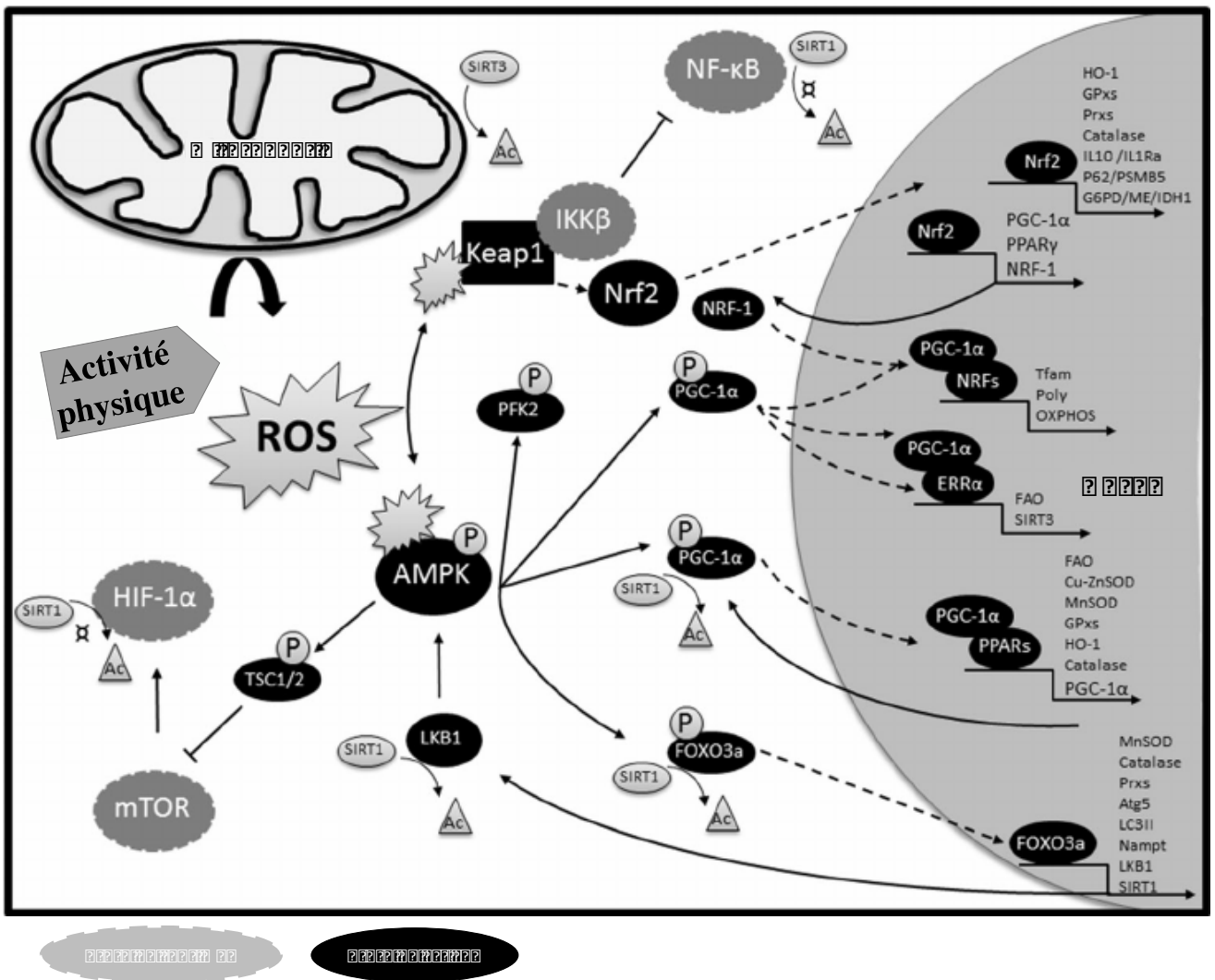


Figure 32. Réponses antioxydantes suite à l'augmentation des ERO induite par une activité physique. Adaptée de (R. K. J. Olsen, Cornelius, & Gregersen, 2015)

Les effets de la bétanine et de la C-PC sur la croissance tumorale du cancer du poumon chez le rat

Dans une précédente étude *in vitro*, notre équipe a montré qu'un traitement à la bétanine induisait une diminution de la viabilité des cellules A549 de 50% de façon dose-dépendante et que la combinaison de la bétanine et de la C-PC induisait une diminution de 60%. L'association de ces deux micronutriments avait influencé deux facteurs redox-sensibles : réduction de l'expression de NF- κ B induite par TNF- α et augmentation de la quantité du pro-apoptotique p38 MAPK (Bingula et al., 2016).

Auparavant, aucune étude n'avait évalué l'effet d'une supplémentation en bétanine ou en C-PC sur la croissance tumorale pulmonaire *in vivo*. Seule une étude avait montré que le jus de betterave (dont l'un des composés est la bétanine) diminuait l'incidence des tumeurs pulmonaires (Kapadia et al., 1996). Lors de l'étude II, **nous avons montré que la bétanine ou/et la C-PC ralentissaient la croissance tumorale pulmonaire (tumeur induite suite à une injection sous-cutanée de cellules A549).** Contrairement à ce que nous avons pu observer *in vitro* (Bingula et al., 2016), aucun effet synergique n'a été observé entre ces deux micronutriments.

Les effets de la bétanine et de la C-PC sur la croissance tumorale du cancer du poumon chez le rat

D'une part, **nous avons mis en évidence des modifications de l'équilibre redox induites par la bétanine et la C-PC, autrement dit une augmentation de la peroxydation lipidique et une diminution des concentrations de T-GSH au sein de la tumeur.** Ces modifications pourraient participer au ralentissement de la croissance tumorale. Précédemment, une étude *in vitro* sur des cellules cancéreuses avait montré que la cytotoxicité des omega-3 était due à une augmentation de la peroxydation lipidique et une diminution des concentrations de T-GSH (Fahrman & Hardman, 2013). Par ailleurs, les cytokines telles que TNF- α et IL-1 β sont connues pour stimuler la production d'ERO dont O $_2^{\cdot-}$ et H $_2$ O $_2$ (Meier et al., 1989). **La C-PC associée ou non à la bétanine a induit une augmentation non significative des marqueurs pro-inflammatoires : IL-1 β et TNF- α .** Les ERO notamment induits par des cytokines pro-

Discussion générale et perspectives

inflammatoires sont des facteurs pouvant conduire à l'apoptose notamment *via* la déplétion de GSH et l'activation du cytochrome c (Ghibelli et al., 1995, 1999; Qiu et al., 2015) (Figure 33).

Par ailleurs, **nous avons observé une augmentation de la Cox-2 dans l'ensemble des tumeurs des groupes traités (bétaine, C-PC et bétaine + C-PC)**. Le microenvironnement tumoral est composé de cellules immunitaires innées (i.e. macrophages, neutrophiles, cellules NK ...) et des cellules immunitaires adaptatives (i.e. lymphocytes T et B) (de Visser & Coussens, 2006). Par contact direct ou suite à la production de cytokines, ces cellules peuvent communiquer entre elles et peuvent induire une immunité anti-tumorale ou *a contrario* promouvoir le développement du cancer (Grivennikov et al., 2010). Il est donc très difficile d'interpréter les résultats relatifs à l'inflammation. Précédemment, il a été montré qu'un traitement en bétaine inhibait les cytokines pro-inflammatoires TNF- α , IL-6 et Cox-2 lors d'un cancer colorectal (Kim et al., 2014). Il a également été noté que la C-PC était un inhibiteur sélectif de Cox-2 (Reddy et al., 2003). Nos résultats ne correspondent pas aux études précédentes. L'augmentation de Cox-2 au niveau tumoral pourrait s'expliquer par la diminution de l'expression I κ B, reflétant probablement une augmentation de l'activation de NF- κ B. En effet, la translocation nucléaire de NF- κ B induit, entre autres, l'expression de Cox-2 (Hai et al., 2011).

D'autre part, **nous avons observé une augmentation de la phosphorylation de p38 dans le groupe supplémenté en C-PC**. Précédemment, Liao et al. (2016) avaient observé que la C-PC engendrait une augmentation de la phosphorylation p38 et JNK ainsi qu'une inhibition de Erk, suggérant que la voie des MAPK jouait un rôle important dans l'apoptose induite par C-PC. L'activation de p38 MAPK peut induire un arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M en supprimant des kinases cycline-dépendantes (CDK-2) (Bulavin et al., 2001). Les propriétés anti-cancéreuses de la C-PC peuvent donc également être dues à son rôle dans le cycle cellulaire. En effet, Liao et al. (2016) ont montré qu'un traitement en C-PC sur des cellules cancéreuses pancréatiques bloquait la progression du cycle cellulaire en phase G2/M. Notre équipe a également observé qu'un traitement en C-PC + bétaine sur des cellules cancéreuses pulmonaires permettait un arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M (Bingula et al., 2016). En induisant l'arrêt du cycle cellulaire, les cellules sont plus susceptibles d'entrer en apoptose, une mort cellulaire ne provoquant pas d'excès de cellules inflammatoires et de mort nécrotique dans les tissus environnants.

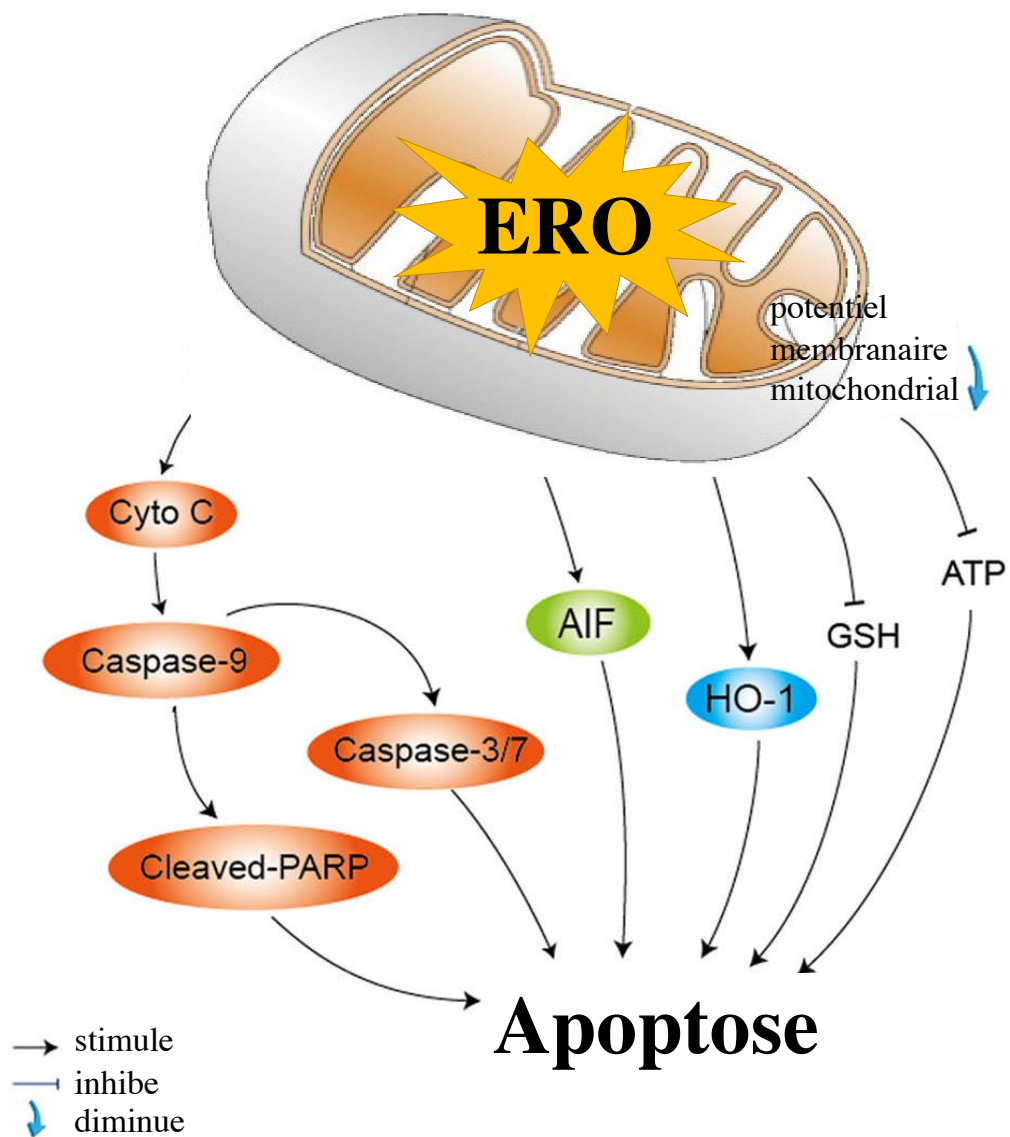


Figure 33. Production de ERO pouvant conduire à l'apoptose. (M. Qiu et al., 2015) Cyto c : cytochrome c ; AIF : Apoptosis-inducing factor

Discussion générale et perspectives

Dans notre étude, **une augmentation de l'activité de caspase-3 a seulement été observée dans le groupe bétaine + C-PC**. Or, d'autres études avaient mis en évidence une diminution de l'expression rénale de caspase-3 suite à une supplémentation en bétaine seule (Hagar & Al Malki, 2014) et une augmentation de l'expression tumorale de caspase-3 suite à une supplémentation en C-PC seule (Li et al., 2015). Cette différence de résultats peut s'expliquer par la nature et la dose des micronutriments utilisés, par les dissimilitudes concernant les conditions pathologiques et les tissus étudiés. L'activation de caspase-3 est un événement apoptotique majeur mais n'est pas le seul mécanisme impliqué dans la mort cellulaire. En effet, outre l'apoptose, l'autophagie est également un processus induisant des dommages cellulaires et pouvant conduire à la mort, consistant en la dégradation du cytoplasme cellulaire par ses propres lysosomes. La C-PC est connue pour promouvoir l'activation et la translocation nucléaire de NF- κ B *via* une inactivation de mTOR, jouant un rôle important dans l'apoptose et l'autophagie médiées par la C-PC (Liao et al., 2016). La diminution de l'activité de mTOR est associée à une inhibition d'AKT et promeut l'autophagie (Degtyarev et al., 2008). **Nos résultats montrent que la C-PC associée ou non à la bétaine diminue le ratio AKT phosphorylé / AKT total** et nous permettent d'émettre l'hypothèse que la C-PC associée ou non à la bétaine promeut l'autophagie. Thorburn (2008) a indiqué que l'apoptose et l'autophagie étaient contrôlées par des régulateurs similaires dont NF- κ B. Lors de notre étude, nous avons observé qu'une supplémentation en bétaine ou/et en C-PC induisait une diminution de l'expression I κ B, reflétant certainement une augmentation de la translocation nucléaire de NF- κ B. La C-PC associée ou non à la bétaine pourrait créer une interaction entre l'autophagie et l'apoptose ayant un impact sur l'activation de NF- κ B (Liao et al., 2016).

Le cancer est une condition pathologique à laquelle est associée une diminution de l'activité de phosphorylation oxydative mitochondriale (OXPHOS). Dans 90% des cancers, on observe un effet Warburg caractérisé par la suppression de la respiration mitochondriale, une augmentation de la glycolyse aérobie et une production de lactate élevée (Brandon et al., 2006). La croissance tumorale pourrait être inhibée par OXPHOS (Catalina-Rodriguez et al., 2012). *In vitro*, sur des cellules H2.35, il a été reporté que la bétaine régulait à la hausse la respiration mitochondriale et l'activité du cytochrome c oxydase des cellules (Lee, 2015). Ces auteurs ont émis l'hypothèse que les effets antiprolifératifs de la bétaine pourraient être dus à l'amélioration de la fonction mitochondriale contribuant au renversement de l'effet Warburg.

Effet de la bétanine, de la C-phycocyanine ou de l'activité physique sur la croissance tumorale du cancer du poumon chez le rat- Carmen Dupuis - 2017

Lors de l'étude III, nous avons montré que l'activité physique spontanée induisait un **ralentissement de la croissance des cellules A549**. Ces résultats confirment une étude précédente chez la souris montrant que la pratique d'une activité physique spontanée ralentissait la croissance d'une tumeur induite dans le poumon par une xénogreffe de cellules A549 (Higgins et al., 2014).

Effet de la bétanine, de la C-phycocyanine ou de l'activité physique sur la croissance tumorale du cancer du poumon chez le rat- Carmen Dupuis - 2017

L'activité physique est connue pour augmenter les défenses antioxydantes suite à des adaptations physiologiques (Clarkson & Thompson, 2000). Nous avons également observé que l'activité physique permettait une augmentation des marqueurs antioxydants au niveau plasmatique et musculaire. Cela nous permet de conclure qu'à priori l'activité physique volontaire n'engendre pas d'effet délétère sur les cellules saines et aurait un effet protecteur.

De façon plus intéressante, nous avons montré que l'activité physique volontaire pouvait moduler des facteurs en faveur de la mort des cellules tumorales. Dans notre étude, nous avons mis évidence que l'activité physique volontaire pouvait stimuler l'apoptose. Nous avons montré que **l'activité physique spontanée augmentait les concentrations en TBARS au sein de la tumeur**. Les ERO sont connus pour jouer un rôle dans la réponse apoptotique (Abraham et al., 2012). Thorburn et al. (2008) a mentionné que l'apoptose et l'autophagie étaient contrôlées par les mêmes régulateurs dont NF- κ B. NF- κ B active les voies MAPK médiées par JNK et p38, ces deux derniers ayant un rôle pro-apoptotique *via* l'activation de caspase-3. Dans notre étude, **nous avons montré que l'activité physique volontaire augmentait le ratio caspase-3 / pro-caspase-3, reflétant l'activation de la caspase-3 et le ratio p38 phosphorylé / p38 total, traduisant une augmentation de l'activation de p38**. D'autres auteurs avaient mis en évidence une augmentation de l'activation de p38 suite à un exercice en endurance (Zbinden-Foncea et al., 2012). p38 est une MAPK qui peut notamment phosphoryler Bcl-2, facteur clé de l'apoptose (Cai et al., 2006). Enfin, **nous avons observé que l'activité physique volontaire diminuait le ratio AKT phosphorylé / AKT total au niveau tumoral, reflétant une**

Discussion générale et perspectives

inhibition d'AKT, mécanisme en faveur de l'apoptose. Standard et al. (2014) avaient également montré qu'une activité physique (entraînement sur tapis) inhibait la voie PI3K/AKT. Considérant l'activation de NF- κ B et l'inhibition d'AKT observées dans notre étude, nous pouvons supposer que l'activité physique déclencherait également l'autophagie des cellules tumorales. En effet, la principale conséquence de l'inhibition d'AKT est l'autophagie (Degtyarev et al., 2008).

L'apoptose est un mécanisme de mort cellulaire dénué de réaction inflammatoire tandis que la nécrose est un mécanisme de mort cellulaire induisant une réaction inflammatoire. Dans notre étude, **nous avons observé une augmentation de marqueurs pro-inflammatoires (Cox-2 et TNF- α)**. Précédemment, dans le cadre d'une étude *in vivo* portant sur le diabète, il a été montré que la pratique d'une activité physique (roue d'activité motorisée) induisait la nécrose des cellules cardiaques (Golbidi et al., 2014). Nous pouvons supposer que l'activité physique induirait également la nécrose des cellules tumorales.



Afin de compléter les mécanismes explicatifs du ralentissement de la croissance tumorale des cellules A549 grâce à la bétaine, la C-PC ou l'activité physique spontanée, il serait intéressant d'étudier l'ensemble des voies de signalisation (PI3K/ATK/mTOR, Ras/Raf/MAPK) et les dommages à l'ADN (8-OH-dG). Il serait également judicieux d'évaluer l'implication du récepteur à tyrosine kinase EGFR, altéré dans environ 30% des cas de cancer du poumon (Harris & McCormick, 2010).

Lors d'une étude *in vitro*, Guo et al. (2015) ont montré que la bétaine permettait une diminution de la viabilité des cellules cancéreuses HeLa, probablement due à l'activation du gène suppresseur de tumeur p53. Etant donné l'absence de modification des marqueurs redox-sensibles MAPK, AKT et caspase-3 par la bétaine seule dans notre étude, il serait intéressant de doser p53.

Outre l'approfondissement des marqueurs concernant les mécanismes de mort cellulaire, il serait intéressant d'évaluer d'autres mécanismes impliqués dans la cancérogenèse pulmonaire tels que la prolifération cellulaire et l'angiogenèse. Dans une étude *in vivo* traitant du diabète, il a été montré que la bétaine était capable d'inhiber VEGF et HIF-1 (marqueurs de l'angiogenèse) *via* la suppression de l'activation d'AKT (Kim et al., 2015). Il a également été

Discussion générale et perspectives

montré *in vitro* sur des cellules tumorales ovariennes que la C-PC régulait à la baisse VEGF (Ying et al., 2016). VEGF et HIF-1 peuvent être évalués par Western Blot.

Par ailleurs, des mutations du promoteur O₆-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) sont des événements communs dans les carcinomes pulmonaires primaires et des phénomènes d'hypométhylation régionale des oncogènes et gènes pro-métastatiques ont été observés (Esteller, et al. 1999). La bétaine étant un donneur de méthyle, il serait opportun d'évaluer MGMT par une méthode standard de MS-PCR (methylation-specific polymerase chain reaction) et quantitative de MS-PCR (qMS-PCR) ainsi que la méthylation globale de l'ADN en immunohistochimie avec des anticorps monoclonaux spécifiques anti 5-méthylcytidine (5-mc) (Kitange et al., 2009; Millot et al., 2008).

Ce travail pourrait être complété par une autre étude *in vivo*, visant à évaluer l'effet de l'association de micronutriments (bétaine ou C-PC) et de l'activité physique spontanée sur la croissance tumorale des cellules A549 implantées en sous-cutané chez le rat Nude. Il pourrait également être intéressant de commencer les supplémentations avant l'injection des cellules tumorales afin d'évaluer leur effet sur l'initiation tumorale.

Par la suite, afin de confirmer les résultats obtenus, il serait intéressant d'évaluer l'effet de ces facteurs nutritionnels avec une tumeur induite *in situ*, avec un modèle de tumeur spontanée ou un modèle de greffe orthotopique, sur des périodes plus longues que quatre semaines, soit jusqu'à ce que le volume maximal éthique soit atteint.

A terme, il serait intéressant de proposer une étude clinique visant à étudier l'effet des facteurs nutritionnels (bétaine, C-PC et activité physique spontanée) sur l'évolution des cancers du poumon. Dans un premier, l'étude pourrait ne concerner que les patients atteints d'un cancer du poumon éligibles à une résection pulmonaire car ce sont les stades les moins avancés. De plus, il s'écoule souvent quelques mois entre le diagnostic et l'opération, ce qui permettrait de proposer l'étude sans entraver le parcours de soins.

ni réAni l i l r

Conclusion générale

Le cancer du poumon est la première cause de décès par an en France et est un réel problème de santé publique (Ferlay et al., 2013). Outre la consommation de tabac, il existe de nombreux facteurs contribuant à la cancérogenèse pulmonaire dont le manque d'activité physique et l'alimentation déséquilibrée. La pratique d'une activité physique a des effets protecteurs (e.g. augmentation de la capacité antioxydante et amélioration de la capacité de réparation de l'ADN) et agit à tous les stades du cancer du poumon (Emaus & Thune, 2011; Gonçalves & Novaes, 2012). De même, certains nutriments auraient un effet anti-tumeur potentiel. Parmi eux, la C-PC semble avoir la capacité d'inhiber la croissance des cellules tumorales pancréatiques *in vitro* et *in vivo* (Liao et al., 2016). Il est également suggéré que la bétaine peut avoir certains effets thérapeutiques notamment en activant des gènes suppresseurs de tumeur (tels que p16) et en inactivant les oncogènes (e.g. c-myc) mais également des effets anti-angiogéniques et anti-inflammatoires (Kim, 2012).

Dans un premier temps, dans un cadre non pathologique, nous avons montré que la bétaine et la C-phycocyanine augmentaient les défenses antioxydantes tandis que l'activité physique volontaire n'avait pas d'effet si elle n'était pas couplée à une supplémentation. Nous avons également mis en évidence que C-phycocyanine inhibait l'augmentation de Cox-2 musculaire induite par l'activité physique. Ces premiers résultats nous permettent de conclure que ces deux micronutriments (aux doses utilisées) et l'activité physique volontaire n'ont pas d'effet délétère sur les cellules saines et pourraient être utilisés en prévention primaire.

Dans un second temps, ces travaux de thèse démontrent pour la première fois *in vivo* que la bétaine et/ou la C-phycocyanine ralentissent la croissance tumorale d'un adénocarcinome pulmonaire. Grâce à cette étude, nous avons pu déterminer certains mécanismes impliqués dans ce ralentissement dont une stimulation de l'apoptose et de l'autophagie. Ces résultats permettent de conclure qu'une supplémentation nutritionnelle en bétaine et/ou en C-phycocyanine pourrait être pertinente dans le cadre de la prise en charge des patients atteints d'un cancer du poumon.

Enfin, nous avons également montré que l'activité physique volontaire induisait un ralentissement de la croissance tumorale dans la même mesure que les supplémentations nutritionnelles étudiées et *via* l'activation de mécanismes similaires (apoptose et autophagie).

Bien que les résultats obtenus doivent être confirmés par d'autres études, ils montrent l'importance du suivi nutritionnel dans la prise en charge des patients atteints d'un cancer du poumon ainsi que l'importance de la prescription médicale de l'activité physique. A terme, les

Conclusion générale

résultats obtenus pourraient permettre de mettre en place des règles hygiéno-diététiques et des programmes d'activités physiques adaptées chez les patients atteints d'un cancer du poumon. Pour le moment, d'autres études sont nécessaires afin de déterminer l'intensité optimale d'exercice, le type et le temps d'exercice, le dosage optimal des micronutriments ainsi que les mécanismes sous-jacents.

□ | □ | □ i □ □ A □

Références

- Aaronson, N. K., Ahmedzai, S., Bergman, B., Bullinger, M., Cull, A., Duez, N. J., ... de Haes, J. C. (1993). The European Organization for Research and Treatment of Cancer QLQ-C30: a quality-of-life instrument for use in international clinical trials in oncology. *Journal of the National Cancer Institute*, 85(5), 365–376.
- Abraham, N. N., Kanthimathi, M. S., & Abdul-Aziz, A. (2012). Piper betle shows antioxidant activities, inhibits MCF-7 cell proliferation and increases activities of catalase and superoxide dismutase. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 12, 220. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-12-220>
- Adcock, I. M., Caramori, G., & Barnes, P. J. (2011). Chronic Obstructive Pulmonary Disease and Lung Cancer: New Molecular Insights. *Respiration*, 81(4), 265–284. <https://doi.org/10.1159/000324601>
- Ali, E. A. I., Barakat, B. M., & Hassan, R. (2015). Antioxidant and Angiostatic Effect of *Spirulina platensis* Suspension in Complete Freund's Adjuvant-Induced Arthritis in Rats. *PLOS ONE*, 10(4), e0121523. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121523>
- Alirezaei, M., Khoshdel, Z., Dezfoulan, O., Rashidipour, M., & Taghadosi, V. (2015). Beneficial antioxidant properties of betaine against oxidative stress mediated by levodopa/benserazide in the brain of rats. *The Journal of Physiological Sciences: JPS*, 65(3), 243–252. <https://doi.org/10.1007/s12576-015-0360-0>
- Anestakis, D., Petanidis, S., Kalyvas, S., Nday, C. M., Tsave, O., Kioseoglou, E., & Salifoglou, A. (2015). Mechanisms and applications of interleukins in cancer immunotherapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(1), 1691–1710. <https://doi.org/10.3390/ijms16011691>
- Anzuini, F., Battistella, A., & Izzotti, A. (2011). Physical activity and cancer prevention: a review of current evidence and biological mechanisms. *Journal of Preventive Medicine and Hygiene*, 52(4), 174–180.
- Aoi, W., Naito, Y., Takagi, T., Tanimura, Y., Takanami, Y., Kawai, Y., ... Yoshikawa, T. (2013). A novel myokine, secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC), suppresses colon tumorigenesis via regular exercise. *Gut*, 62(6), 882–889. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2011-300776>
- Arnhold, T., Tzimas, G., Wittfoht, W., Plonait, S., & Nau, H. (1996). Identification of 9-cis-retinoic acid, 9,13-di-cis-retinoic acid, and 14-hydroxy-4,14-retro-retinol in human plasma after liver consumption. *Life Sciences*, 59(12), PL169-177.
- Arthur, J. R. (2000). The glutathione peroxidases. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 57(13–14), 1825–1835.
- Ayala, A., Muñoz, M. F., & Argüelles, S. (2014). Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2014, 360438. <https://doi.org/10.1155/2014/360438>
- Azad, N., Rojanasakul, Y., & Vallyathan, V. (2008). Inflammation and lung cancer: roles of reactive oxygen/nitrogen species. *Journal of Toxicology and Environmental Health. Part B, Critical Reviews*, 11(1), 1–15. <https://doi.org/10.1080/10937400701436460>
- Baldi, I., & Lebailly, P. (2007). [Cancers and pesticides]. *La Revue Du Praticien*, 57(11 Suppl), 40–44.
- Balkan, J., Oztezcan, S., Küçük, M., Cevikbaş, U., Koçak-Toker, N., & Uysal, M. (2004). The effect of betaine treatment on triglyceride levels and oxidative stress in the liver of ethanol-treated guinea pigs. *Experimental and Toxicologic Pathology: Official Journal of the Gesellschaft Fur Toxikologische Pathologie*, 55(6), 505–509. <https://doi.org/10.1078/0940-2993-00347>

Références

- Ballard-Barbash, R., Friedenreich, C. M., Courneya, K. S., Siddiqi, S. M., McTiernan, A., & Alfano, C. M. (2012). Physical activity, biomarkers, and disease outcomes in cancer survivors: a systematic review. *Journal of the National Cancer Institute*, 104(11), 815–840. <https://doi.org/10.1093/jnci/djs207>
- Ballatori, N., Krance, S. M., Notenboom, S., Shi, S., Tieu, K., & Hammond, C. L. (2009). Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases. *Biological Chemistry*, 390(3), 191–214. <https://doi.org/10.1515/BC.2009.033>
- Başaran-Küçükgergin, C., Bingöl, I., Tekkeşin, M. S., Olgaç, V., Doğru-Abbasoğlu, S., & Uysal, M. (2014). Effects of carnosine, taurine, and betaine pretreatments on diethylnitrosamine-induced oxidative stress and tissue injury in rat liver. *Toxicology and Industrial Health*. <https://doi.org/10.1177/0748233714563432>
- Basha, O. M., Hafez, R. A., El-Ayouty, Y. M., Mahrous, K. F., Bareedy, M. H., & Salama, A. M. (2008). C-Phycocyanin inhibits cell proliferation and may induce apoptosis in human HepG2 cells. *The Egyptian Journal of Immunology*, 15(2), 161–167.
- Basu, S., & Helmersson, J. (2009). [Bioactive isoprostanes. New markers of oxidative stress and inflammation-related diseases]. *Lakartidningen*, 106(5), 274–278.
- Baud, V., & Karin, M. (2001). Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends in Cell Biology*, 11(9), 372–377.
- Benedetti, S., Rinalducci, S., Benvenuti, F., Francogli, S., Pagliarani, S., Giorgi, L., ... Canestrari, F. (2006). Purification and characterization of phycocyanin from the blue-green alga *Aphanizomenon flos-aquae*. *Journal of Chromatography B*, 833(1), 12–18. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2005.10.010>
- Ben-Zaken Cohen, S., Paré, P. D., Man, S. F. P., & Sin, D. D. (2007). The Growing Burden of Chronic Obstructive Pulmonary Disease and Lung Cancer in Women: Examining Sex Differences in Cigarette Smoke Metabolism. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 176(2), 113–120. <https://doi.org/10.1164/rccm.200611-1655PP>
- Bernard W. Stewart, & Paul Kleihues. (2005). *Le cancer dans le monde*. IARC Press. Retrieved from <https://www.iarc.fr/fr/publications/pdfs-online/wcr/2003/LeCancerdansleMonde.pdf>
- Bhat, I. A., Rasool, R., Qasim, I., Masoodi, K. Z., Paul, S. A., Bhat, B. A., ... Shah, Z. A. (2014). COX-2 overexpression and -8473 T/C polymorphism in 3' UTR in non-small cell lung cancer. *Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 35(11), 11209–11218. <https://doi.org/10.1007/s13277-014-2420-0>
- Bidulescu, A., Chambless, L. E., Siega-Riz, A. M., Zeisel, S. H., & Heiss, G. (2009). Repeatability and measurement error in the assessment of choline and betaine dietary intake: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *Nutrition Journal*, 8, 14. <https://doi.org/10.1186/1475-2891-8-14>
- Bingula, R., Dupuis, C., Pichon, C., Berthon, J.-Y., Filaire, M., Pigeon, L., & Filaire, E. (2016). Study of the Effects of Betaine and/or C-Phycocyanin on the Growth of Lung Cancer A549 Cells In Vitro and In Vivo. *Journal of Oncology*, 2016, e8162952. <https://doi.org/10.1155/2016/8162952>
- Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S., & Kalayci, O. (2012). Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *The World Allergy Organization Journal*, 5(1), 9–19. <https://doi.org/10.1097/WOX.0b013e3182439613>
- Blandine Garait. (2006). *Le stress oxydant induit par voie métabolique (régimes alimentaires) ou par voie gazeuse (hyperoxie) et effet de la Glisodin*. Université Joseph-Fourier, Grenoble 1.
- Blaser, H., Dostert, C., Mak, T. W., & Brenner, D. (2016). TNF and ROS Crosstalk in Inflammation. *Trends in Cell Biology*, 26(4), 249–261.

Références

<https://doi.org/10.1016/j.tcb.2015.12.002>

Bonassi, S., Cellai, F., Munnia, A., Ugolini, D., Cristaudo, A., Neri, M., ... Peluso, M. E. M. (2017). 3-(2-deoxy- β -d-erythro-pentafuranosyl)pyrimido[1,2- α]purin-10(3H)-one deoxyguanosine adducts of workers exposed to asbestos fibers. *Toxicology Letters*, 270, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2017.02.008>

Booth, F. W., Laye, M. J., Lees, S. J., Rector, R. S., & Thyfault, J. P. (2008). Reduced physical activity and risk of chronic disease: the biology behind the consequences. *European Journal of Applied Physiology*, 102(4), 381–390. <https://doi.org/10.1007/s00421-007-0606-5>

Boström, P., Wu, J., Jedrychowski, M. P., Korde, A., Ye, L., Lo, J. C., ... Spiegelman, B. M. (2012). A PGC1- α -dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. *Nature*, 481(7382), 463–468. <https://doi.org/10.1038/nature10777>

Brandon, M., Baldi, P., & Wallace, D. C. (2006). Mitochondrial mutations in cancer. *Oncogene*, 25(34), 4647–4662. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209607>

Brown, J. C., Winters-Stone, K., Lee, A., & Schmitz, K. H. (2012). Cancer, Physical Activity, and Exercise. *Comprehensive Physiology*, 2(4), 2775–2809. <https://doi.org/10.1002/cphy.c120005>

Brunet, A., Bonni, A., Zigmond, M. J., Lin, M. Z., Juo, P., Hu, L. S., ... Greenberg, M. E. (1999). Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell*, 96(6), 857–868.

Brustugun, O. T., Khattak, A. M., Trømborg, A. K., Beigi, M., Beiske, K., Lund-Iversen, M., & Helland, Å. (2014). BRAF-mutations in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer (Amsterdam, Netherlands)*, 84(1), 36–38. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2014.01.023>

Budni, J., Zomkowski, A. D., Engel, D., Santos, D. B., dos Santos, A. A., Moretti, M., ... Rodrigues, A. L. S. (2013). Folic acid prevents depressive-like behavior and hippocampal antioxidant imbalance induced by restraint stress in mice. *Experimental Neurology*, 240, 112–121. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2012.10.024>

Bulavin, D. V., Higashimoto, Y., Popoff, I. J., Gaarde, W. A., Basrur, V., Potapova, O., ... Fornace, A. J. (2001). Initiation of a G2/M checkpoint after ultraviolet radiation requires p38 kinase. *Nature*, 411(6833), 102–107. <https://doi.org/10.1038/35075107>

Burgel, P., & Nadel, J. (2004). Roles of epidermal growth factor receptor activation in epithelial cell repair and mucin production in airway epithelium. *Thorax*, 59(11), 992–996. <https://doi.org/10.1136/thx.2003.018879>

Cai, B., Chang, S. H., Becker, E. B. E., Bonni, A., & Xia, Z. (2006). p38 MAP Kinase Mediates Apoptosis through Phosphorylation of BimEL at Ser-65. *Journal of Biological Chemistry*, 281(35), 25215–25222. <https://doi.org/10.1074/jbc.M512627200>

Cao, H., Wang, G., Meng, L., Shen, H., Feng, Z., Liu, Q., & Du, J. (2012). Association between circulating levels of IGF-1 and IGFBP-3 and lung cancer risk: a meta-analysis. *PloS One*, 7(11), e49884. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049884>

Cao, Y., & Prescott, S. M. (2002). Many actions of cyclooxygenase-2 in cellular dynamics and in cancer. *Journal of Cellular Physiology*, 190(3), 279–286. <https://doi.org/10.1002/jcp.10068>

Carmen Gomez-Cabrera, M. (2014). Antioxidants in skeletal muscle physiology, a radically different approach. *Free Radical Biology and Medicine*, 75, Supplement 1, S1–S2. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.10.596>

Carpenter, R. L., & Jiang, B.-H. (2013). Roles of EGFR, PI3K, AKT, and mTOR in heavy metal-induced cancer. *Current Cancer Drug Targets*, 13(3), 252–266.

Catala, A. (Ed.). (2012). *Lipid Peroxidation*. InTech. <https://doi.org/10.5772/2929>

Catalina-Rodriguez, O., Kolukula, V. K., Tomita, Y., Preet, A., Palmieri, F., Wellstein, A., ...

Références

- Avantaggiati, M. L. (2012). The mitochondrial citrate transporter, CIC, is essential for mitochondrial homeostasis. *Oncotarget*, 3(10), 1220–1235. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3717962/>
- Cavalié, H., Horcajada-Molteni, M. N., Lebecque, P., Davicco, M. J., Coxam, V., Lac, G., & Barlet, J. P. (2003). Progressive isometric force training and bone mass in rats. *Journal of Musculoskeletal & Neuronal Interactions*, 3(1), 47–52.
- centreonberard.fr. (2017, January 25). Expositions professionnelles :vue d'ensemble. Retrieved from <http://www.cancer-environnement.fr/165-Vue-densemble.ce.aspx>
- Cereser, C., Guichard, J., Draï, J., Bannier, E., Garcia, I., Boget, S., ... Revol, A. (2001). Quantitation of reduced and total glutathione at the femtomole level by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection: application to red blood cells and cultured fibroblasts. *Journal of Chromatography. B, Biomedical Sciences and Applications*, 752(1), 123–132.
- Chalhoub, N., & Baker, S. J. (2009). PTEN and the PI3-kinase pathway in cancer. *Annual Review of Pathology*, 4, 127–150. <https://doi.org/10.1146/annurev.pathol.4.110807.092311>
- Chandrasekharan, N. V., Dai, H., Roos, K. L. T., Evanson, N. K., Tomsik, J., Elton, T. S., & Simmons, D. L. (2002). COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(21), 13926–13931. <https://doi.org/10.1073/pnas.162468699>
- Chartoumpekis, D. V., Wakabayashi, N., & Kensler, T. W. (2015). Keap1/Nrf2 pathway in the frontiers of cancer and non-cancer cell metabolism. *Biochemical Society Transactions*, 43(4), 639–644. <https://doi.org/10.1042/BST20150049>
- Chen, B., Liu, S., Xu, W., Wang, X., Zhao, W., & Wu, J. (2009). IGF-I and IGFBP-3 and the risk of lung cancer: A meta-analysis based on nested case-control studies. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 28(1), 89. <https://doi.org/10.1186/1756-9966-28-89>
- Chen, G., & Goeddel, D. V. (2002). TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Science (New York, N.Y.)*, 296(5573), 1634–1635. <https://doi.org/10.1126/science.1071924>
- Chen, Q., Jiao, D., Wu, Y., Chen, J., Wang, J., Tang, X., ... Wang, Z. (2016). MiR-206 inhibits HGF-induced epithelial-mesenchymal transition and angiogenesis in non-small cell lung cancer via c-Met /PI3k/Akt/mTOR pathway. *Oncotarget*, 7(14), 18247–18261. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7570>
- Chen, Z., Xu, Z., Sun, S., Yu, Y., Lv, D., Cao, C., & Deng, Z. (2014). TGF- β 1, IL-6, and TNF- α in bronchoalveolar lavage fluid: useful markers for lung cancer? *Scientific Reports*, 4, 5595. <https://doi.org/10.1038/srep05595>
- Chen, Z., Zhang, Y., Yang, J., Jin, M., Wang, X.-W., Shen, Z.-Q., ... Li, J.-W. (2011). Estrogen promotes benzo[a]pyrene-induced lung carcinogenesis through oxidative stress damage and cytochrome c-mediated caspase-3 activation pathways in female mice. *Cancer Letters*, 308(1), 14–22. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2011.04.007>
- Cheng, K. C., Cahill, D. S., Kasai, H., Nishimura, S., & Loeb, L. A. (1992). 8-Hydroxyguanine, an abundant form of oxidative DNA damage, causes G----T and A----C substitutions. *The Journal of Biological Chemistry*, 267(1), 166–172.
- Cheng, T.-Y. D., Goodman, G. E., Thornquist, M. D., Barnett, M. J., Beresford, S. A. A., LaCroix, A. Z., ... Neuhausser, M. L. (2014). Estimated intake of vitamin D and its interaction with vitamin A on lung cancer risk among smokers. *International Journal of Cancer*, 135(9), 2135–2145. <https://doi.org/10.1002/ijc.28846>

Références

- Chern, M. K., & Pietruszko, R. (1999). Evidence for mitochondrial localization of betaine aldehyde dehydrogenase in rat liver: purification, characterization, and comparison with human cytoplasmic E3 isozyme. *Biochemistry and Cell Biology = Biochimie Et Biologie Cellulaire*, 77(3), 179–187.
- Chin, L. P., Soo, R. A., Soong, R., & Ou, S.-H. I. (2012). Targeting ROS1 with anaplastic lymphoma kinase inhibitors: a promising therapeutic strategy for a newly defined molecular subset of non-small-cell lung cancer. *Journal of Thoracic Oncology: Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*, 7(11), 1625–1630. <https://doi.org/10.1097/JTO.0b013e31826baf83>
- Cho, H.-Y., Reddy, S. P., & Kleeberger, S. R. (2006). Nrf2 defends the lung from oxidative stress. *Antioxidants & Redox Signaling*, 8(1–2), 76–87. <https://doi.org/10.1089/ars.2006.8.76>
- Choi, K. E., Hwang, C. J., Gu, S. M., Park, M. H., Kim, J. H., Park, J. H., ... Hong, J. T. (2014). Cancer cell growth inhibitory effect of bee venom via increase of death receptor 3 expression and inactivation of NF-kappa B in NSCLC cells. *Toxins*, 6(8), 2210–2228. <https://doi.org/10.3390/toxins6082210>
- Choi, S.-J., Paek, H.-J., & Yu, J. (2015). Oxidative stress by layered double hydroxide nanoparticles via an SFK-JNK and p38-NF-κB signaling pathway mediates induction of interleukin-6 and interleukin-8 in human lung epithelial cells. *International Journal of Nanomedicine*, 10, 3217–3229. <https://doi.org/10.2147/IJN.S82061>
- Chung, K. F., & Adcock, I. M. (2008). Multifaceted mechanisms in COPD: inflammation, immunity, and tissue repair and destruction. *European Respiratory Journal*, 31(6), 1334–1356. <https://doi.org/10.1183/09031936.00018908>
- Clària, J., & Romano, M. (2005). Pharmacological intervention of cyclooxygenase-2 and 5-lipoxygenase pathways. Impact on inflammation and cancer. *Current Pharmaceutical Design*, 11(26), 3431–3447.
- Clarkson, P. M., & Thompson, H. S. (2000). Antioxidants: what role do they play in physical activity and health? *The American Journal of Clinical Nutrition*, 72(2 Suppl), 637S–46S.
- Cobanoglu, U., Demir, H., Cebi, A., Sayir, F., Alp, H. H., Akan, Z., ... Bakan, E. (2011). Lipid Peroxidation, DNA Damage and CoenzymeQ10 in Lung Cancer Patients-Markers for Risk Assessment? *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 12, 1399–1403. Retrieved from http://www.apocpcontrol.net/paper_file/issue_abs/Volume12_No6/1399-1403%20c%203.22%20Ufuk%20Cobanoglu.pdf
- Collège Français des Pathologistes. (2012). Cellule cancéreuse et tissu cancéreux. Retrieved from http://campus.cerimes.fr/anatomie-pathologique/enseignement/anapath_8/site/html/cours.pdf
- Collet, J.-F., & Messens, J. (2010). Structure, function, and mechanism of thioredoxin proteins. *Antioxidants & Redox Signaling*, 13(8), 1205–1216. <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3114>
- Conaway, C. C., Nie, G., Hussain, N. S., & Fiala, E. S. (1991). Comparison of oxidative damage to rat liver DNA and RNA by primary nitroalkanes, secondary nitroalkanes, cyclopentanone oxime, and related compounds. *Cancer Research*, 51(12), 3143–3147.
- Conway, E. M., Pikor, L. A., Kung, S. H. Y., Hamilton, M. J., Lam, S., Lam, W. L., & Bennewith, K. L. (2016). Macrophages, Inflammation, and Lung Cancer. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 193(2), 116–130. <https://doi.org/10.1164/rccm.201508-1545CI>
- Cooper, W. A., Lam, D. C. L., O'Toole, S. A., & Minna, J. D. (2013). Molecular biology of lung cancer. *Journal of Thoracic Disease*, 5(Suppl 5), S479–S490. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2072-1439.2013.08.03>

Références

- Corcoran, C. A., He, Q., Huang, Y., & Sheikh, M. S. (2005). Cyclooxygenase-2 interacts with p53 and interferes with p53-dependent transcription and apoptosis. *Oncogene*, 24(9), 1634–1640. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208353>
- Cote, M. L., Chen, W., Smith, D. W., Benhamou, S., Bouchardy, C., Butkiewicz, D., ... Taioli, E. (2009). Meta- and Pooled Analysis of GSTP1 Polymorphism and Lung Cancer: A HuGE-GSEC Review. *American Journal of Epidemiology*, 169(7), 802–814. <https://doi.org/10.1093/aje/kwn417>
- Coulthard, L. R., White, D. E., Jones, D. L., McDermott, M. F., & Burchill, S. A. (2009). p38(MAPK): stress responses from molecular mechanisms to therapeutics. *Trends in Molecular Medicine*, 15(8), 369–379. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2009.06.005>
- Coussens, L. M., & Werb, Z. (2002). Inflammation and cancer. *Nature*, 420(6917), 860–867. <https://doi.org/10.1038/nature01322>
- Coux, O. (2011). *Protéasome, ubiquitine et protéines apparentées à l'ubiquitine*. Paris: Tec & Doc Lavoisier.
- Craig, S. A. S. (2004). Betaine in human nutrition. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 80(3), 539–549.
- Cromwell, B. T., & Rennie, S. D. (1953). The biosynthesis and metabolism of betaines in plants. 1. The estimation and distribution of glycinebetaine (betaine) in *Beta vulgaris* L. and other plants. *Biochemical Journal*, 55(1), 189–192. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1269156/>
- Dalaveris, E., Kerenidi, T., Katsabeki-Katsafli, A., Kiropoulos, T., Tanou, K., Gourgoulanis, K. I., & Kostikas, K. (2009). VEGF, TNF- α and 8-isoprostane levels in exhaled breath condensate and serum of patients with lung cancer. *Lung Cancer*, 64(2), 219–225. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2008.08.015>
- Dannenberg, A. J., Altorki, N. K., Boyle, J. O., Dang, C., Howe, L. R., Weksler, B. B., & Subbaramaiah, K. (2001). Cyclo-oxygenase 2: a pharmacological target for the prevention of cancer. *The Lancet Oncology*, 2(9), 544–551. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(01\)00488-0](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(01)00488-0)
- Dautzenberg, B., & Garelik, D. (2016). Patients with lung cancer: Are electronic cigarettes harmful or useful? *Lung Cancer (Amsterdam, Netherlands)*. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2016.05.011>
- Davis, J. M., Kohut, M. L., Jackson, D. A., Colbert, L. H., Mayer, E. P., & Ghaffar, A. (1998). Exercise effects on lung tumor metastases and in vitro alveolar macrophage antitumor cytotoxicity. *The American Journal of Physiology*, 274(5 Pt 2), R1454–1459.
- Day, C. R., & Kempson, S. A. (2016). Betaine chemistry, roles, and potential use in liver disease. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1860(6), 1098–1106. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2016.02.001>
- DCEM modules en schémas: Module 10, cancérologie et oncohématologie. TALAGAS Matthieu, LEDUC Joséphine. (n.d.). Retrieved March 28, 2017, from https://www.lavoisier.fr/livre/medecine/dcem-modules-en-schemas-module-10-cancerologie-et-oncohematologie/talagas/descriptif_2174740
- de Batlle, J., Barreiro, E., Romieu, I., Mendez, M., Gómez, F. P., Balcells, E., ... Garcia-Aymerich, J. (2010). Dietary modulation of oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease patients. *Free Radical Research*, 44(11), 1296–1303. <https://doi.org/10.3109/10715762.2010.500667>
- de Bittencourt Pasquali, M. A., Gelain, D. P., Zeidán-Chuliá, F., Pires, A. S., Gasparotto, J., Terra, S. R., & Moreira, J. C. F. (2013). Vitamin A (retinol) downregulates the receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) by oxidant-dependent activation of p38 MAPK and

Références

- NF- κ B in human lung cancer A549 cells. *Cellular Signalling*, 25(4), 939–954. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2013.01.013>
- de Visser, K. E., & Coussens, L. M. (2006). The inflammatory tumor microenvironment and its impact on cancer development. *Contributions to Microbiology*, 13, 118–137. <https://doi.org/10.1159/000092969>
- De Vita, F., Orditura, M., Auriemma, A., Infusino, S., & Catalano, G. (1998). Serum concentrations of proinflammatory cytokines in advanced non small cell lung cancer patients. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research: CR*, 17(4), 413–417.
- DeCotiis, C., Hu, Y., Greenberg, A. K., Huie, M., Tsay, J.-C. J., Pass, H., ... Rom, W. N. (2016). Inflammatory cytokines and non-small cell lung cancer in a CT-scan screening cohort: Background review of the literature. *Cancer Biomarkers: Section A of Disease Markers*, 16(2), 219–233. <https://doi.org/10.3233/CBM-150559>
- Degtyarev, M., De Mazière, A., Orr, C., Lin, J., Lee, B. B., Tien, J. Y., ... Lin, K. (2008). Akt inhibition promotes autophagy and sensitizes PTEN-null tumors to lysosomotropic agents. *The Journal of Cell Biology*, 183(1), 101–116. <https://doi.org/10.1083/jcb.200801099>
- Delattre, J., Beaudeau, J.-L., & Bonnefont-Rousselot, D. (2005). *Radicaux libres et stress oxydant: aspects biologiques et pathologiques*. Paris: Éditions Tec & doc : Éditions médicales internationales.
- Delgado-Reyes, C. V., & Garrow, T. A. (2005). High sodium chloride intake decreases betaine-homocysteine S-methyltransferase expression in guinea pig liver and kidney. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 288(1), R182–187. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00406.2004>
- Dellow, W. J., Chambers, S. T., Lever, M., Lunt, H., & Robson, R. A. (1999). Elevated glycine betaine excretion in diabetes mellitus patients is associated with proximal tubular dysfunction and hyperglycemia. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 43(2), 91–99. [https://doi.org/10.1016/S0168-8227\(98\)00115-6](https://doi.org/10.1016/S0168-8227(98)00115-6)
- Deng, X., Terunuma, H., Terunuma, A., Takane, T., & Nieda, M. (2014). Ex vivo-expanded natural killer cells kill cancer cells more effectively than ex vivo-expanded $\gamma\delta$ T cells or $\alpha\beta$ T cells. *International Immunopharmacology*, 22(2), 486–491. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2014.07.036>
- Detopoulou, P., Panagiotakos, D. B., Antonopoulou, S., Pitsavos, C., & Stefanadis, C. (2008). Dietary choline and betaine intakes in relation to concentrations of inflammatory markers in healthy adults: the ATTICA study. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 87(2), 424–430.
- Ding, L., Getz, G., Wheeler, D. A., Mardis, E. R., McLellan, M. D., Cibulskis, K., ... Wilson, R. K. (2008). Somatic mutations affect key pathways in lung adenocarcinoma. *Nature*, 455(7216), 1069–1075. <https://doi.org/10.1038/nature07423>
- Donaldson, M. S. (2004). Nutrition and cancer: A review of the evidence for an anti-cancer diet. *Nutrition Journal*, 3, 19. <https://doi.org/10.1186/1475-2891-3-19>
- Dougan, M., Li, D., Neubergh, D., Mihm, M., Googe, P., Wong, K.-K., & Dranoff, G. (2011). A dual role for the immune response in a mouse model of inflammation-associated lung cancer. *The Journal of Clinical Investigation*, 121(6), 2436–2446. <https://doi.org/10.1172/JCI44796>
- Dröge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews*, 82(1), 47–95. <https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2001>
- Du, Y., Peng, J., Sun, A., Tang, Z., Ling, W., & Zhu, H. (2009). Assessment of the effect of betaine on p16 and c-myc DNA methylation and mRNA expression in a chemical induced rat liver cancer model. *BMC Cancer*, 9, 261. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-9-261>

Références

- Dueck, D. A., Chan, M., Tran, K., Wong, J. T., Jay, F. T., Littman, C., ... Choy, P. C. (1996). The modulation of choline phosphoglyceride metabolism in human colon cancer. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 162(2), 97–103.
- Duncan, K., Harris, S., & Murray Ardies, C. (1997). Running exercise may reduce risk for lung and liver cancer by inducing activity of antioxidant and phase II enzymes. *Cancer Letters*, 116(2), 151–158. [https://doi.org/10.1016/S0304-3835\(97\)00189-4](https://doi.org/10.1016/S0304-3835(97)00189-4)
- Dupuy, C., Virion, A., Ohayon, R., Kaniewski, J., Dème, D., & Pommier, J. (1991). Mechanism of hydrogen peroxide formation catalyzed by NADPH oxidase in thyroid plasma membrane. *The Journal of Biological Chemistry*, 266(6), 3739–3743.
- Duracková, Z. (2010). Some current insights into oxidative stress. *Physiological Research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca*, 59(4), 459–469.
- Duthie, S. J. (2011). Folate and cancer: how DNA damage, repair and methylation impact on colon carcinogenesis. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 34(1), 101–109. <https://doi.org/10.1007/s10545-010-9128-0>
- Eismann, E. A., Lush, E., & Sephton, S. E. (2010). Circadian effects in cancer-relevant psychoneuroendocrine and immune pathways. *Psychoneuroendocrinology*, 35(7), 963–976. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2009.12.011>
- Emaus, A., & Thune, I. (2011). Physical activity and lung cancer prevention. *Recent Results in Cancer Research. Fortschritte Der Krebsforschung. Progrès Dans Les Recherches Sur Le Cancer*, 186, 101–133. https://doi.org/10.1007/978-3-642-04231-7_5
- Engelman, J. A., Luo, J., & Cantley, L. C. (2006). The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nature Reviews. Genetics*, 7(8), 606–619. <https://doi.org/10.1038/nrg1879>
- Erejuwa, O. O., Sulaiman, S. A., & Ab Wahab, M. S. (2013). Evidence in support of potential applications of lipid peroxidation products in cancer treatment. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2013, 931251. <https://doi.org/10.1155/2013/931251>
- Esme, H., Cemek, M., Sezer, M., Saglam, H., Demir, A., Melek, H., & Unlu, M. (2008). High levels of oxidative stress in patients with advanced lung cancer. *Respirology (Carlton, Vic.)*, 13(1), 112–116. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1843.2007.01212.x>
- Esteller, M., Hamilton, S. R., Burger, P. C., Baylin, S. B., & Herman, J. G. (1999). Inactivation of the DNA Repair Gene O6-Methylguanine-DNA Methyltransferase by Promoter Hypermethylation is a Common Event in Primary Human Neoplasia. *Cancer Research*, 59(4), 793–797. Retrieved from <http://cancerres.aacrjournals.org/content/59/4/793>
- Esteller, M., Sanchez-Cespedes, M., Rosell, R., Sidransky, D., Baylin, S. B., & Herman, J. G. (1999). Detection of Aberrant Promoter Hypermethylation of Tumor Suppressor Genes in Serum DNA from Non-Small Cell Lung Cancer Patients. *Cancer Research*, 59(1), 67–70. Retrieved from <http://cancerres.aacrjournals.org/content/59/1/67>
- Esterbauer, H., Schaur, R. J., & Zollner, H. (1991). Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radical Biology & Medicine*, 11(1), 81–128.
- F. Michel, D. Bonnefont-Rousselot, E. Mas, J. Draï, P. Thérond. (2008). Biomarkers of lipid peroxidation : Analytical aspects. *Annales De Biologie Clinique*, 66(6), 605–20.
- Fahrman, J. F., & Hardman, W. E. (2013). Omega 3 fatty acids increase the chemo-sensitivity of B-CLL-derived cell lines EHEB and MEC-2 and of B-PLL-derived cell line JVM-2 to anti-cancer drugs doxorubicin, vincristine and fludarabine. *Lipids in Health and Disease*, 12, 36. <https://doi.org/10.1186/1476-511X-12-36>
- Fairey, A. S., Courneya, K. S., Field, C. J., & Mackey, J. R. (2002). Physical exercise and

Références

- immune system function in cancer survivors: a comprehensive review and future directions. *Cancer*, 94(2), 539–551. <https://doi.org/10.1002/cncr.10244>
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Ervik, M., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., ... Bray, F. (2013). GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11. International Agency for Research on Cancer, Lyon, France. Retrieved from <http://globocan.iarc.fr>, accessed on 08/02/2017
- Fernández-Rojas, B., Medina-Campos, O. N., Hernández-Pando, R., Negrette-Guzmán, M., Huerta-Yepez, S., & Pedraza-Chaverri, J. (2014). C-phycoerythrin prevents cisplatin-induced nephrotoxicity through inhibition of oxidative stress. *Food & Function*, 5(3), 480–490. <https://doi.org/10.1039/c3fo60501a>
- Fiers, W., Beyaert, R., Declercq, W., & Vandenabeele, P. (1999). More than one way to die: apoptosis, necrosis and reactive oxygen damage. *Oncogene*, 18(54), 7719–7730. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203249>
- Filaire, E., Dupuis, C., Galvaing, G., Aubreton, S., Laurent, H., Richard, R., & Filaire, M. (2013). Lung cancer: What are the links with oxidative stress, physical activity and nutrition. *Lung Cancer (Amsterdam, Netherlands)*, 82(3), 383–389. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2013.09.009>
- Filaire, E., Rouveix, M., Massart, A., Gladine, C., Davicco, M. J., & Durand, D. (2009). Lipid peroxidation and antioxidant status in rat: effect of food restriction and wheel running. *European Journal of Applied Physiology*, 107(2), 243–250. <https://doi.org/10.1007/s00421-009-1121-7>
- Fitzpatrick, F. A. (2001). Inflammation, carcinogenesis and cancer. *International Immunopharmacology*, 1(9–10), 1651–1667.
- Franklin, W. A., Gazdar, A. F., Haney, J., Wistuba, I. I., La Rosa, F. G., Kennedy, T., ... Miller, Y. E. (1997). Widely dispersed p53 mutation in respiratory epithelium. A novel mechanism for field carcinogenesis. *Journal of Clinical Investigation*, 100(8), 2133–2137. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC508406/>
- Franklin, W. A., Veve, R., Hirsch, F. R., Helfrich, B. A., & Bunn, P. A., Jr. (2002). Epidermal growth factor receptor family in lung cancer and premalignancy. *Seminars in Oncology*, 29(1 Suppl 4), 3–14.
- Freeman, D. J., Li, A. G., Wei, G., Li, H.-H., Kertesz, N., Lesche, R., ... Wu, H. (2003). PTEN tumor suppressor regulates p53 protein levels and activity through phosphatase-dependent and -independent mechanisms. *Cancer Cell*, 3(2), 117–130.
- Friedenreich, C. M., & Orenstein, M. R. (2002). Physical Activity and Cancer Prevention: Etiologic Evidence and Biological Mechanisms. *The Journal of Nutrition*, 132(11), 3456S–3464S. Retrieved from <http://jn.nutrition.org/content/132/11/3456S>
- Friso, S., & Choi, S.-W. (2002). Gene-Nutrient Interactions and DNA Methylation. *The Journal of Nutrition*, 132(8), 2382S–2387S. Retrieved from <http://jn.nutrition.org/content/132/8/2382S>
- Fu, X., Yao, K., Du, X., Li, Y., Yang, X., Yu, M., ... Cui, Q. (2016). PGC-1 α regulates the cell cycle through ATP and ROS in CH1 cells. *Journal of Zhejiang University. Science. B*, 17(2), 136–146. <https://doi.org/10.1631/jzus.B1500158>
- Fumarola, C., Bonelli, M. A., Petronini, P. G., & Alfieri, R. R. (2014). Targeting PI3K/AKT/mTOR pathway in non small cell lung cancer. *Biochemical Pharmacology*, 90(3), 197–207. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2014.05.011>
- Gañán-Gómez, I., Wei, Y., Yang, H., Boyano-Adánez, M. C., & García-Manero, G. (2013). Oncogenic functions of the transcription factor Nrf2. *Free Radical Biology and Medicine*, 65, 750–764. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.06.041>

Références

- Ganesan, B., Anandan, R., & Lakshmanan, P. T. (2011). Studies on the protective effects of betaine against oxidative damage during experimentally induced restraint stress in Wistar albino rats. *Cell Stress & Chaperones*, 16(6), 641–652. <https://doi.org/10.1007/s12192-011-0276-4>
- Ganesan, B., Buddhan, S., Anandan, R., Sivakumar, R., & AnbinEzhilan, R. (2010). Antioxidant defense of betaine against isoprenaline-induced myocardial infarction in rats. *Molecular Biology Reports*, 37(3), 1319–1327. <https://doi.org/10.1007/s11033-009-9508-4>
- Gannon, N. P., Vaughan, R. A., Garcia-Smith, R., Bisoffi, M., & Trujillo, K. A. (2015). Effects of the exercise-inducible myokine irisin on malignant and non-malignant breast epithelial cell behavior in vitro. *International Journal of Cancer*, 136(4), E197–202. <https://doi.org/10.1002/ijc.29142>
- Gantar, M., Dhandayuthapani, S., & Rathinavelu, A. (2012). Phycocyanin induces apoptosis and enhances the effect of topotecan on prostate cell line LNCaP. *Journal of Medicinal Food*, 15(12), 1091–1095. <https://doi.org/10.1089/jmf.2012.0123>
- Gao, Y., Liao, G., Xiang, C., Yang, X., Cheng, X., & Ou, Y. (2016). Effects of phycocyanin on INS-1 pancreatic β -cell mediated by PI3K/Akt/FoxO1 signaling pathway. *International Journal of Biological Macromolecules*, 83, 185–194. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.11.054>
- Gao, Y., Liu, C., Wan, G., Wang, X., Cheng, X., & Ou, Y. (2016). Phycocyanin prevents methylglyoxal-induced mitochondrial-dependent apoptosis in INS-1 cells by Nrf2. *Food & Function*, 7(2), 1129–1137. <https://doi.org/10.1039/c5fo01548k>
- García-Quintans, N., Sánchez-Ramos, C., Tierrez, A., Olmo, Y., Luque, A., Arza, E., ... Monsalve, M. (2014). Control of endothelial function and angiogenesis by PGC-1 α relies on ROS control of vascular stability. *Free Radical Biology & Medicine*, 75 Suppl 1, S5. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.10.836>
- Ghibelli, L., Coppola, S., Fanelli, C., Rotilio, G., Civitareale, P., Scovassi, A. I., & Ciriolo, M. R. (1999). Glutathione depletion causes cytochrome c release even in the absence of cell commitment to apoptosis. *The FASEB Journal*, 13(14), 2031–2036. Retrieved from <http://www.fasebj.org/content/13/14/2031>
- Ghibelli, L., Coppola, S., Rotilio, G., Lafavia, E., Maresca, V., & Ciriolo, M. R. (1995). Non-oxidative Loss of Glutathione in Apoptosis via GSH Extrusion. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 216(1), 313–320. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1995.2626>
- Giovannucci, E. L., Liu, Y., Leitzmann, M. F., Stampfer, M. J., & Willett, W. C. (2005). A prospective study of physical activity and incident and fatal prostate cancer. *Archives of Internal Medicine*, 165(9), 1005–1010. <https://doi.org/10.1001/archinte.165.9.1005>
- Giustarini, D., Tsikas, D., Colombo, G., Milzani, A., Dalle-Donne, I., Fanti, P., & Rossi, R. (2016). Pitfalls in the analysis of the physiological antioxidant glutathione (GSH) and its disulfide (GSSG) in biological samples: An elephant in the room. *Journal of Chromatography B*, 1019, 21–28. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.02.015>
- Go, E. K., Jung, K. J., Kim, J. M., Lim, H., Lim, H. K., Yu, B. P., & Chung, H. Y. (2007). Betaine Modulates Age-Related NF- κ B by Thiol-Enhancing Action. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 30(12), 2244–2249.
- Go, E. K., Jung, K. J., Kim, J. Y., Yu, B. P., & Chung, H. Y. (2005). Betaine Suppresses Proinflammatory Signaling During Aging: The Involvement of Nuclear Factor- κ B via Nuclear Factor-Inducing Kinase/I κ B Kinase and Mitogen-Activated Protein Kinases. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, 60(10), 1252–1264. <https://doi.org/10.1093/gerona/60.10.1252>

Références

- Golbidi, S., Botta, A., Gottfred, S., Nusrat, A., Laher, I., & Ghosh, S. (2014). Glutathione administration reduces mitochondrial damage and shifts cell death from necrosis to apoptosis in ageing diabetic mice hearts during exercise. *British Journal of Pharmacology*, 171(23), 5345–5360. <https://doi.org/10.1111/bph.12847>
- Gomes, M., Coelho, A., Araújo, A., Teixeira, A. L., Catarino, R., & Medeiros, R. (2012). Influence of functional genetic polymorphism (-590C/T) in non-small cell lung cancer (NSCLC) development: the paradoxal role of IL-4. *Gene*, 504(1), 111–115. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2012.05.008>
- Gomes, M., Teixeira, A. L., Coelho, A., Araújo, A., & Medeiros, R. (2014). The role of inflammation in lung cancer. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 816, 1–23. https://doi.org/10.1007/978-3-0348-0837-8_1
- Gomez-Cabrera, M.-C., Borrás, C., Pallardó, F. V., Sastre, J., Ji, L. L., & Viña, J. (2005). Decreasing xanthine oxidase-mediated oxidative stress prevents useful cellular adaptations to exercise in rats. *The Journal of Physiology*, 567(Pt 1), 113–120. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2004.080564>
- Gomez-Cabrera, M.-C., Domenech, E., & Viña, J. (2008). Moderate exercise is an antioxidant: Upregulation of antioxidant genes by training. *Free Radical Biology and Medicine*, 44(2), 126–131. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.02.001>
- Gonçalves, R. V., & Novaes, R. D. (2012). The influence of physical activity in the progression of experimental lung cancer in mice. *Pathology - Research and Practice*, 208(11), 677–678. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2012.08.006>
- Goto, Y., Shinjo, K., Kondo, Y., Shen, L., Toyota, M., Suzuki, H., ... Sekido, Y. (2009). Epigenetic Profiles Distinguish Malignant Pleural Mesothelioma from Lung Adenocarcinoma. *Cancer Research*, 69(23), 9073–9082. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-1595>
- Granger, C. L., Denehy, L., McDonald, C. F., Irving, L., & Clark, R. A. (2014). Physical Activity Measured Using Global Positioning System Tracking in Non-Small Cell Lung Cancer An Observational Study. *Integrative Cancer Therapies*, 1534735414542484. <https://doi.org/10.1177/1534735414542484>
- Greer, E. L., & Brunet, A. (2005). FOXO transcription factors at the interface between longevity and tumor suppression. *Oncogene*, 24(50), 7410–7425. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209086>
- Gresner, P., Gromadzinska, J., & Wasowicz, W. (2007). Polymorphism of selected enzymes involved in detoxification and biotransformation in relation to lung cancer. *Lung Cancer*, 57(1), 1–25. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2007.02.002>
- Grivennikov, S. I., Greten, F. R., & Karin, M. (2010). Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*, 140(6), 883–899. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.025>
- Gromadzińska, J., Reszka, E., Bruzelius, K., Wasowicz, W., & Akesson, B. (2008). Selenium and cancer: biomarkers of selenium status and molecular action of selenium supplements. *European Journal of Nutrition*, 47 Suppl 2, 29–50. <https://doi.org/10.1007/s00394-008-2005-z>
- Guéritat, J. (2015). *Exercice physique et progression du cancer de la prostate : effets combinés avec la prise d'antioxydants naturels ou la radiothérapie externe : identification de voies de signalisation redox-dépendantes*. Université Rennes 2. Retrieved from <NNT : 2015REN20012>. <tel-01143870>.
- Guo, Y., Xu, L.-S., Zhang, D., Liao, Y.-P., Wang, H.-P., Lan, Z.-H., ... Liu, C.-Q. (2015). Betaine Effects on Morphology, Proliferation, and p53-induced Apoptosis of HeLa Cervical Carcinoma Cells in Vitro. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP*, 16(8), 3195–3201.

Références

- Haffner, S. M. (2006). The metabolic syndrome: inflammation, diabetes mellitus, and cardiovascular disease. *The American Journal of Cardiology*, 97(2A), 3A–11A. <https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2005.11.010>
- Hagar, H., & Al Malki, W. (2014). Betaine supplementation protects against renal injury induced by cadmium intoxication in rats: Role of oxidative stress and caspase-3. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 37(2), 803–811. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2014.02.013>
- Hagar, H., Medany, A. E., Salam, R., Medany, G. E., & Nayal, O. A. (2015). Betaine supplementation mitigates cisplatin-induced nephrotoxicity by abrogation of oxidative/nitrosative stress and suppression of inflammation and apoptosis in rats. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 67(2), 133–141. <https://doi.org/10.1016/j.etp.2014.11.001>
- Hai, L., Kawarabayashi, Y., Imai, Y., Honda, A., & Inoue, R. (2011). Counteracting effect of TRPC1-associated Ca²⁺ influx on TNF- α -induced COX-2-dependent prostaglandin E2 production in human colonic myofibroblasts. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 301(2), G356–G367. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00354.2010>
- Halpern, B. (2016). Elevated irisin and alanine aminotransferase levels in hypothyroidism: role of oxidative stress? *Archives of Endocrinology and Metabolism*, 60(2), 89–91. <https://doi.org/10.1590/2359-3997000000166>
- Handschin, C., & Spiegelman, B. M. (2008). The role of exercise and PGC1 α in inflammation and chronic disease. *Nature*, 454(7203), 463–469. <https://doi.org/10.1038/nature07206>
- Hanson, C., Rutten, E. P. A., Wouters, E. F. M., & Rennard, S. (2013). Diet and vitamin D as risk factors for lung impairment and COPD. *Translational Research*, 162(4), 219–236. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2013.04.004>
- Harlos, C., Musto, G., Lambert, P., Ahmed, R., & Pitz, M. W. (2015). Androgen Pathway Manipulation and Survival in Patients with Lung Cancer. *Hormones and Cancer*, 6(2–3), 120–127. <https://doi.org/10.1007/s12672-015-0218-1>
- Harris, T. J. R., & McCormick, F. (2010). The molecular pathology of cancer. *Nature Reviews. Clinical Oncology*, 7(5), 251–265. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2010.41>
- Harvie, M., PhD, & SRD. (n.d.). Nutritional Supplements and Cancer: Potential Benefits and Proven Harms. *Journal of Clinical Oncology*. Retrieved from <http://meetinglibrary.asco.org/content/11400478-144>
- Hashimoto, N. (2012). Expression of COX2 and p53 in Rat Esophageal Cancer Induced by Reflux of Duodenal Contents. *ISRN Gastroenterology*, 2012. <https://doi.org/10.5402/2012/914824>
- Hassan, A. M., Abdel-Aziem, S. H., & Abdel-Wahhab, M. A. (2012). Modulation of DNA damage and alteration of gene expression during aflatoxicosis via dietary supplementation of Spirulina (Arthrospira) and Whey protein concentrate. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 79, 294–300. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.01.017>
- Hayes, J. D., & McLellan, L. I. (1999). Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defence against oxidative stress. *Free Radical Research*, 31(4), 273–300.
- Hayes, K. C., Pronczuk, A., Cook, M. W., & Robbins, M. C. (2003). Betaine in sub-acute and sub-chronic rat studies. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 41(12), 1685–1700.
- Haynes, W. G. (2002). Hyperhomocysteinemia, vascular function and atherosclerosis: effects of vitamins. *Cardiovascular Drugs and Therapy*, 16(5), 391–399. Retrieved from <http://link.springer.com/article/10.1023/A:1022130217463>

Références

- Hecht, S. S. (2012). Lung carcinogenesis by tobacco smoke. *International Journal of Cancer*, 131(12), 2724–2732. <https://doi.org/10.1002/ijc.27816>
- Hehner, S. P., Breitzkreutz, R., Shubinsky, G., Unsoeld, H., Schulze-Osthoff, K., Schmitz, M. L., & Dröge, W. (2000). Enhancement of T cell receptor signaling by a mild oxidative shift in the intracellular thiol pool. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 165(8), 4319–4328.
- Hennet, T., Richter, C., & Peterhans, E. (1993). Tumour necrosis factor-alpha induces superoxide anion generation in mitochondria of L929 cells. *The Biochemical Journal*, 289 (Pt 2), 587–592.
- Hercberg, S., & Galan, P. (1992). Nutritional anaemias. *Baillière's Clinical Haematology*, 5(1), 143–168.
- Higgins, K. A., Park, D., Lee, G. Y., Curran, W. J., & Deng, X. (2014). Exercise-induced lung cancer regression: Mechanistic findings from a mouse model. *Cancer*, n/a-n/a. <https://doi.org/10.1002/cncr.28878>
- Hirsch, F. R., Varella-Garcia, M., Bunn, P. A., Di Maria, M. V., Veve, R., Bremmes, R. M., ... Franklin, W. A. (2003). Epidermal growth factor receptor in non-small-cell lung carcinomas: correlation between gene copy number and protein expression and impact on prognosis. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 21(20), 3798–3807. <https://doi.org/10.1200/JCO.2003.11.069>
- Hitchler, M. J., & Domann, F. E. (2007). An epigenetic perspective on the free radical theory of development. *Free Radical Biology & Medicine*, 43(7), 1023–1036. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.06.027>
- Ho, G. Y. F., Zheng, S. L., Cushman, M., Perez-Soler, R., Kim, M., Xue, X., ... Yu, H. (2016). Associations of Insulin and IGFBP-3 with Lung Cancer Susceptibility in Current Smokers. *Journal of the National Cancer Institute*, 108(7), djw012. <https://doi.org/10.1093/jnci/djw012>
- Hojman, P., Dethlefsen, C., Brandt, C., Hansen, J., Pedersen, L., & Pedersen, B. K. (2011). Exercise-induced muscle-derived cytokines inhibit mammary cancer cell growth. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 301(3), E504-510. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00520.2010>
- Hong, S.-S., Lee, J.-Y., Lee, J.-S., Lee, H.-W., Kim, H.-G., Lee, S.-K., ... Son, C.-G. (2015). The traditional drug Gongjin-Dan ameliorates chronic fatigue in a forced-stress mouse exercise model. *Journal of Ethnopharmacology*, 168, 268–278. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2015.04.001>
- Hotamisligil, G. S. (2006). Inflammation and metabolic disorders. *Nature*, 444(7121), 860–867. <https://doi.org/10.1038/nature05485>
- howe 2004 usda database for the choline content of common foods - Recherche Google. (n.d.). Retrieved January 20, 2014, from https://www.google.fr/search?q=howe+2004+usda+database+for+the+choline+content+of+common+foods&ie=utf-8&oe=utf-8&rls=org.mozilla:fr:official&client=firefox-a&channel=fflb&gws_rd=cr&ei=XyjdUr__L8-p0AWIg4HQAQ
- Huang, L., & Mellor, A. L. (2014). Metabolic control of tumor progression and anti-tumor immunity. *Current Opinion in Oncology*, 26(1), 92–99. <https://doi.org/10.1097/CCO.0000000000000035>
- Hughes, G., Murphy, M. P., & Ledgerwood, E. C. (2005). Mitochondrial reactive oxygen species regulate the temporal activation of nuclear factor kappaB to modulate tumour necrosis factor-induced apoptosis: evidence from mitochondria-targeted antioxidants. *The Biochemical Journal*, 389(Pt 1), 83–89. <https://doi.org/10.1042/BJ20050078>
- Humpel, N., & Iverson, D. C. (2005). Review and critique of the quality of exercise

Références

- recommendations for cancer patients and survivors - Springer. <https://doi.org/10.1007/s00520-005-0811-x>
- Hüttemann, M., Helling, S., Sanderson, T. H., Sinkler, C., Samavati, L., Mahapatra, G., ... Lee, I. (2012). Regulation of mitochondrial respiration and apoptosis through cell signaling: cytochrome c oxidase and cytochrome c in ischemia/reperfusion injury and inflammation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1817(4), 598–609. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2011.07.001>
- Hyman, B. T., & Yuan, J. (2012). Apoptotic and non-apoptotic roles of caspases in neuronal physiology and pathophysiology. *Nature Reviews Neuroscience*, 13(6), 395–406. <https://doi.org/10.1038/nrn3228>
- INCa. (n.d.). Cancer du poumon: Expositions professionnelles. <http://www.e-cancer.fr/Patients-et-proches/Les-cancers/Cancer-du-poumon/Facteurs-de-risque/Exposition-professionnelle>. Retrieved from <http://www.e-cancer.fr/Patients-et-proches/Les-cancers/Cancer-du-poumon/Facteurs-de-risque/Exposition-professionnelle>
- Iorio, E., Ricci, A., Bagnoli, M., Pisanu, M. E., Castellano, G., Vito, M. D., ... Podo, F. (2010). Activation of Phosphatidylcholine Cycle Enzymes in Human Epithelial Ovarian Cancer Cells. *Cancer Research*, 70(5), 2126–2135. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-3833>
- Jackson, M. J. (2005). Reactive oxygen species and redox-regulation of skeletal muscle adaptations to exercise. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 360(1464), 2285–2291. <https://doi.org/10.1098/rstb.2005.1773>
- Jana, D., Sarkar, D. K., Ganguly, S., Saha, S., Sa, G., Manna, A. K., ... Mandal, S. (2014). Role of Cyclooxygenase 2 (COX-2) in Prognosis of Breast Cancer. *Indian Journal of Surgical Oncology*, 5(1), 59–65. <https://doi.org/10.1007/s13193-014-0290-y>
- Jobin, C., Bradham, C. A., Russo, M. P., Juma, B., Narula, A. S., Brenner, D. A., & Sartor, R. B. (1999). Curcumin Blocks Cytokine-Mediated NF-κB Activation and Proinflammatory Gene Expression by Inhibiting Inhibitory Factor I-κB Kinase Activity. *The Journal of Immunology*, 163(6), 3474–3483. Retrieved from <http://www.jimmunol.org/content/163/6/3474>
- Jones, L. W., Eves, N. D., Spasojevic, I., Wang, F., & Il'yasova, D. (2011). Effects of Aerobic Training on Oxidative Status in Postsurgical Non-Small Cell Lung Cancer Patients: A Pilot Study. *Lung Cancer (Amsterdam, Netherlands)*, 72(1), 45–51. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2010.08.002>
- Jones, L. W., Viglianti, B. L., Tashjian, J. A., Kothadia, S. M., Keir, S. T., Freedland, S. J., ... Dewhirst, M. W. (2010). Effect of aerobic exercise on tumor physiology in an animal model of human breast cancer. *Journal of Applied Physiology*, 108(2), 343–348. <https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00424.2009>
- Jorissen, R. N., Walker, F., Pouliot, N., Garrett, T. P. J., Ward, C. W., & Burgess, A. W. (2003). Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling. *Experimental Cell Research*, 284(1), 31–53. [https://doi.org/10.1016/S0014-4827\(02\)00098-8](https://doi.org/10.1016/S0014-4827(02)00098-8)
- Jung, Y. S., Kim, S. J., Kwon, D. Y., Ahn, C. W., Kim, Y. S., Choi, D. W., & Kim, Y. C. (2013). Alleviation of alcoholic liver injury by betaine involves an enhancement of antioxidant defense via regulation of sulfur amino acid metabolism. *Food and Chemical Toxicology*, 62, 292–298. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.08.049>
- Kahlos, K., Soini, Y., Pääkkö, P., Säily, M., Linnainmaa, K., & Kinnula, V. L. (2000). Proliferation, apoptosis, and manganese superoxide dismutase in malignant mesothelioma. *International Journal of Cancer*, 88(1), 37–43.
- Kanbak, G., Akyüz, F., & Inal, M. (2001). Preventive effect of betaine on ethanol-induced membrane lipid composition and membrane ATPases. *Archives of Toxicology*, 75(1), 59–61.

Références

- Kanematsu, T., Yano, S., Uehara, H., Bando, Y., & Sone, S. (2003). Phosphorylation, but not overexpression, of epidermal growth factor receptor is associated with poor prognosis of non-small cell lung cancer patients. *Oncology Research*, 13(5), 289–298.
- Kapadia, G. J., Tokuda, H., Konoshima, T., & Nishino, H. (1996). Chemoprevention of lung and skin cancer by Beta vulgaris (beet) root extract. *Cancer Letters*, 100(1–2), 211–214. [https://doi.org/10.1016/0304-3835\(95\)04087-0](https://doi.org/10.1016/0304-3835(95)04087-0)
- Karin, M., & Lin, A. (2002). NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nature Immunology*, 3(3), 221–227. <https://doi.org/10.1038/ni0302-221>
- Katz-Brull, R., Seger, D., Rivenson-Segal, D., Rushkin, E., & Degani, H. (2002). Metabolic Markers of Breast Cancer Enhanced Choline Metabolism and Reduced Choline-Ether-Phospholipid Synthesis. *Cancer Research*, 62(7), 1966–1970. Retrieved from <http://cancerres.aacrjournals.org/content/62/7/1966>
- Kawata, M., Koinuma, D., Ogami, T., Umezawa, K., Iwata, C., Watabe, T., & Miyazono, K. (2012). TGF- β -induced epithelial-mesenchymal transition of A549 lung adenocarcinoma cells is enhanced by pro-inflammatory cytokines derived from RAW 264.7 macrophage cells. *Journal of Biochemistry*, 151(2), 205–216. <https://doi.org/10.1093/jb/mvr136>
- Kim, D. H., Sung, B., Kang, Y. J., Jang, J. Y., Hwang, S. Y., Lee, Y., ... Kim, N. D. (2014). Anti-inflammatory effects of betaine on AOM/DSS-induced colon tumorigenesis in ICR male mice. *International Journal of Oncology*, 45(3), 1250–1256. <https://doi.org/10.3892/ijo.2014.2515>
- Kim, D. K., Cho, E. S., & Um, H.-D. (2000). Caspase-Dependent and -Independent Events in Apoptosis Induced by Hydrogen Peroxide. *Experimental Cell Research*, 257(1), 82–88. <https://doi.org/10.1006/excr.2000.4868>
- Kim, S. J., Jung, Y. S., Kwon, D. Y., & Kim, Y. C. (2008). Alleviation of acute ethanol-induced liver injury and impaired metabolomics of S-containing substances by betaine supplementation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 368(4), 893–898. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.02.003>
- Kim, Y.-G., Lim, H.-H., Lee, S.-H., Shin, M.-S., Kim, C.-J., & Yang, H. J. (2015). Betaine inhibits vascularization via suppression of Akt in the retinas of streptozotocin-induced hyperglycemic rats. *Molecular Medicine Reports*, 12(2), 1639–1644. <https://doi.org/10.3892/mmr.2015.3613>
- Kim, Y.-J. (2012). Betaine inhibits in vitro and in vivo angiogenesis through suppression of the NF- κ B and Akt signaling pathways. *International Journal of Oncology*. <https://doi.org/10.3892/ijo.2012.1616>
- Kinnula, V. L., & Crapo, J. D. (2004). Superoxide dismutases in malignant cells and human tumors. *Free Radical Biology & Medicine*, 36(6), 718–744. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2003.12.010>
- Kitange, G. J., Carlson, B. L., Mladek, A. C., Decker, P. A., Schroeder, M. A., Wu, W., ... Sarkaria, J. N. (2009). Evaluation of MGMT Promoter Methylation Status and Correlation with Temozolomide Response in Orthotopic Glioblastoma Xenograft Model. *Journal of Neuro-Oncology*, 92(1), 23–31. <https://doi.org/10.1007/s11060-008-9737-8>
- Klaunig, J. E., Xu, Y., Isenberg, J. S., Bachowski, S., Kolaja, K. L., Jiang, J., ... Walborg, E. F. (1998). The role of oxidative stress in chemical carcinogenesis. *Environmental Health Perspectives*, 106 Suppl 1, 289–295.
- Koelwyn, G. J., Wennerberg, E., Demaria, S., & Jones, L. W. (2015). Exercise in Regulation of Inflammation-Immune Axis Function in Cancer Initiation and Progression. *Oncology (Williston Park, N.Y.)*, 29(12), 908–920.

Références

- Konstantinova, S. V., Tell, G. S., Vollset, S. E., Nygård, O., Bleie, Ø., & Ueland, P. M. (2008). Divergent Associations of Plasma Choline and Betaine with Components of Metabolic Syndrome in Middle Age and Elderly Men and Women. *The Journal of Nutrition*, 138(5), 914–920. Retrieved from <http://jn.nutrition.org/content/138/5/914>
- Kontakiotis, T., Katsoulis, K., Hagizisi, O., Kougioulis, M., Gerou, S., & Papakosta, D. (2011). Bronchoalveolar lavage fluid alteration in antioxidant and inflammatory status in lung cancer patients. *European Journal of Internal Medicine*, 22(5), 522–526. <https://doi.org/10.1016/j.ejim.2011.02.024>
- Krause, K.-H. (2004). Tissue distribution and putative physiological function of NOX family NADPH oxidases. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 57(5), S28–29.
- Kurdiova, T., Balaz, M., Vician, M., Maderova, D., Vlcek, M., Valkovic, L., ... Ukropcova, B. (2014). Effects of obesity, diabetes and exercise on Fndc5 gene expression and irisin release in human skeletal muscle and adipose tissue: in vivo and in vitro studies. *The Journal of Physiology*, 592(5), 1091–1107. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2013.264655>
- Lacave, R., Larsen, C. J., & Robert, J. (2005). *Cancérologie fondamentale*. John Libbey Eurotext.
- Lan, Q., Zheng, T., Rothman, N., Zhang, Y., Wang, S. S., Shen, M., ... Chanock, S. (2006). Cytokine polymorphisms in the Th1/Th2 pathway and susceptibility to non-Hodgkin lymphoma. *Blood*, 107(10), 4101–4108. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-10-4160>
- Landi, M. T., Zhao, Y., Rotunno, M., Koshiol, J., Liu, H., Bergen, A. W., ... Wang, E. (2010). MicroRNA expression differentiates histology and predicts survival of lung cancer. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 16(2), 430–441. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-1736>
- Lapperre, T. S., Sont, J. K., van Schadewijk, A., Gosman, M. M., Postma, D. S., Bajema, I. M., ... Hiemstra, P. S. (2007). Smoking cessation and bronchial epithelial remodelling in COPD: a cross-sectional study. *Respiratory Research*, 8(1), 85. <https://doi.org/10.1186/1465-9921-8-85>
- Lee, E. J., An, D., Nguyen, C. T. T., Patil, B. S., Kim, J., & Yoo, K. S. (2014). Betalain and Betaine Composition of Greenhouse- or Field-Produced Beetroot (*Beta vulgaris* L.) and Inhibition of HepG2 Cell Proliferation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1021/jf404648u>
- Lee, I. (2015). Betaine is a positive regulator of mitochondrial respiration. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 456(2), 621–625. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.12.005>
- Lee, I. M., Sesso, H. D., & Paffenbarger, R. S. (1999). Physical activity and risk of lung cancer. *International Journal of Epidemiology*, 28(4), 620–625. <https://doi.org/10.1093/ije/28.4.620>
- Lee, K. W., & Lee, H. J. (2006). Biphasic effects of dietary antioxidants on oxidative stress-mediated carcinogenesis. *Mechanisms of Ageing and Development*, 127(5), 424–431. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2006.01.021>
- Lerner, C. A., Sundar, I. K., Watson, R. M., Elder, A., Jones, R., Done, D., ... Rahman, I. (2015). Environmental Health Hazards of e-Cigarettes and their Components: Oxidants and Copper in e-cigarette aerosols. *Environmental Pollution (Barking, Essex : 1987)*, 198, 100–107. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2014.12.033>
- Lerner, C. A., Sundar, I. K., Yao, H., Gerloff, J., Ossip, D. J., McIntosh, S., ... Rahman, I. (2015). Vapors Produced by Electronic Cigarettes and E-Juices with Flavorings Induce Toxicity, Oxidative Stress, and Inflammatory Response in Lung Epithelial Cells and in Mouse Lung. *PLoS ONE*, 10(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116732>
- Lever, M., Slow, S., George, P. M., & Chambers, S. T. (2012). Betaine excretion correlates

Références

- with plasma homocysteine when plasma lipids are elevated. *Clinical Biochemistry*, 45(1–2), 154–156. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2011.10.021>
- Li, B., Chu, X., Gao, M., & Li, W. (2010). Apoptotic mechanism of MCF-7 breast cells in vivo and in vitro induced by photodynamic therapy with C-phycocyanin. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 42(1), 80–89. <https://doi.org/10.1093/abbs/gmp104>
- Li, B., Gao, M.-H., Chu, X.-M., Teng, L., Lv, C.-Y., Yang, P., & Yin, Q.-F. (2015). The synergistic antitumor effects of all-trans retinoic acid and C-phycocyanin on the lung cancer A549 cells in vitro and in vivo. *European Journal of Pharmacology*, 749, 107–114. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.01.009>
- Li, B., Gao, M.-H., Zhang, X.-C., & Chu, X.-M. (2006). Molecular immune mechanism of C-phycocyanin from *Spirulina platensis* induces apoptosis in HeLa cells in vitro. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 43(3), 155–164. <https://doi.org/10.1042/BA20050142>
- Li, M., Tan, S.-Y., & Wang, X.-F. (2014). Paeonol exerts an anticancer effect on human colorectal cancer cells through inhibition of PGE2 synthesis and COX-2 expression. *Oncology Reports*. <https://doi.org/10.3892/or.2014.3543>
- Liao, G., Gao, B., Gao, Y., Yang, X., Cheng, X., & Ou, Y. (2016). Phycocyanin Inhibits Tumorigenic Potential of Pancreatic Cancer Cells: Role of Apoptosis and Autophagy. *Scientific Reports*, 6. <https://doi.org/10.1038/srep34564>
- Liao, K., Xia, B., Zhuang, Q.-Y., Hou, M.-J., Zhang, Y.-J., Luo, B., ... Lin, Z.-N. (2015). Parthenolide Inhibits Cancer Stem-Like Side Population of Nasopharyngeal Carcinoma Cells via Suppression of the NF- κ B/COX-2 Pathway. *Theranostics*, 5(3), 302–321. <https://doi.org/10.7150/thno.8387>
- Liebeke, M., & Bundy, J. G. (2013). Biochemical diversity of betaines in earthworms. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 430(4), 1306–1311. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.12.049>
- Lim, J., Lee, S. H., Cho, S., Lee, I.-S., Kang, B. Y., & Choi, H. J. (2013). 4-methoxychalcone enhances cisplatin-induced oxidative stress and cytotoxicity by inhibiting the Nrf2/ARE-mediated defense mechanism in A549 lung cancer cells. *Molecules and Cells*, 36(4), 340–346. <https://doi.org/10.1007/s10059-013-0123-9>
- Lin, W.-W., & Karin, M. (2007). A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. *The Journal of Clinical Investigation*, 117(5), 1175–1183. <https://doi.org/10.1172/JCI31537>
- Liu, B., Andrieu-Abadie, N., Levade, T., Zhang, P., Obeid, L. M., & Hannun, Y. A. (1998). Glutathione Regulation of Neutral Sphingomyelinase in Tumor Necrosis Factor- α -induced Cell Death. *Journal of Biological Chemistry*, 273(18), 11313–11320. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.18.11313>
- Liu, T.-Y., Shi, C.-X., Gao, R., Sun, H.-J., Xiong, X.-Q., Ding, L., ... Zhu, G.-Q. (2015). Irisin inhibits hepatic gluconeogenesis and increases glycogen synthesis via the PI3K/Akt pathway in type 2 diabetic mice and hepatocytes. *Clinical Science (London, England: 1979)*, 129(10), 839–850. <https://doi.org/10.1042/CS20150009>
- Liu, Y., Yin, T., Feng, Y., Cona, M. M., Huang, G., Liu, J., ... Ni, Y. (2015). Mammalian models of chemically induced primary malignancies exploitable for imaging-based preclinical theragnostic research. *Quantitative Imaging in Medicine and Surgery*, 5(5), 708–729. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2223-4292.2015.06.01>
- Loboda, A., Damulewicz, M., Pyza, E., Jozkowicz, A., & Dulak, J. (2016). Role of Nrf2/HO-1 system in development, oxidative stress response and diseases: an evolutionarily conserved mechanism. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 73(17), 3221–3247.

Références

<https://doi.org/10.1007/s00018-016-2223-0>

Lü, P. (2016). Inhibitory effects of hyperoside on lung cancer by inducing apoptosis and suppressing inflammatory response via caspase-3 and NF- κ B signaling pathway. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 82, 216–225. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.05.006>

Lyouni, S., Tamion, F., Leplingard, A., Beaumont, C., Puy, H., & Lebreton, J.-P. (2007). Rôles protecteurs de l'hème oxygénase et des catabolites de l'hème. *Hématologie*, 13(4), 251–264. <https://doi.org/10.1684/hma.2007.0163>

Ma, Z., Qi, J., Meng, S., Wen, B., & Zhang, J. (2013). Swimming exercise training-induced left ventricular hypertrophy involves microRNAs and synergistic regulation of the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway. *European Journal of Applied Physiology*, 113(10), 2473–2486. <https://doi.org/10.1007/s00421-013-2685-9>

MacNeil, B., & Hoffman-Goetz, L. (1993). Effect of exercise on natural cytotoxicity and pulmonary tumor metastases in mice. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 25(8), 922–928.

Mahabir, S., Forman, M. R., Dong, Y. Q., Park, Y., Hollenbeck, A., & Schatzkin, A. (2010). Mineral Intake and Lung Cancer Risk in the NIH-American Association of Retired Persons Diet and Health Study. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 19(8), 1976–1983. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-10-0067>

Mahabir, S., Spitz, M. R., Barrera, S. L., Beaver, S. H., Etzel, C., & Forman, M. R. (2007). Dietary zinc, copper and selenium, and risk of lung cancer. *International Journal of Cancer*, 120(5), 1108–1115. <https://doi.org/10.1002/ijc.22451>

Mahabir, S., Wei, Q., Barrera, S. L., Dong, Y. Q., Etzel, C. J., Spitz, M. R., & Forman, M. R. (2008). Dietary magnesium and DNA repair capacity as risk factors for lung cancer. *Carcinogenesis*, 29(5), 949–956. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgn043>

Malkinson, A. M. (2005). Role of inflammation in mouse lung tumorigenesis: a review. *Experimental Lung Research*, 31(1), 57–82.

Mallard, B. (2010). *Cancérologie*. De Boeck Supérieur.

Malli, F., Papaioannou, A. I., Gourgoulisanis, K. I., & Daniil, Z. (2010). The role of leptin in the respiratory system: an overview. *Respiratory Research*, 11, 152. <https://doi.org/10.1186/1465-9921-11-152>

Mantovani, A., Sozzani, S., Locati, M., Allavena, P., & Sica, A. (2002). Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends in Immunology*, 23(11), 549–555.

Mao, T. K., VAN DE Water, J., & Gershwin, M. E. (2000). Effect of spirulina on the secretion of cytokines from peripheral blood mononuclear cells. *Journal of Medicinal Food*, 3(3), 135–140. <https://doi.org/10.1089/jmf.2000.3.135>

Mao, Y., Pan, S., Wen, S. W., & Johnson, K. C. (2003). Physical Activity and the Risk of Lung Cancer in Canada. *American Journal of Epidemiology*, 158(6), 564–575. <https://doi.org/10.1093/aje/kwg186>

Marí, M., Morales, A., Colell, A., García-Ruiz, C., Kaplowitz, N., & Fernández-Checa, J. C. (2013). Mitochondrial glutathione: Features, regulation and role in disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1830(5), 3317–3328. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.10.018>

Marnett, L. J., & Kalgutkar, A. S. (1999). Cyclooxygenase 2 inhibitors: discovery, selectivity and the future. *Trends in Pharmacological Sciences*, 20(11), 465–469.

May, O. L. (2012). Nrf2 antioxidant stress response : managing its “dark side.” Retrieved from <https://www.caymanchem.com/Article/2168>

Références

- Mazzocchi, G., Vendemiale, G., De Cata, A., Carughi, S., & Tarquini, R. (2010). Altered time structure of neuro-endocrine-immune system function in lung cancer patients. *BMC Cancer*, 10, 314. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-10-314>
- McCubrey, J. A., Steelman, L. S., Chappell, W. H., Abrams, S. L., Montalto, G., Cervello, M., ... Martelli, A. M. (2012). Mutations and deregulation of Ras/Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR cascades which alter therapy response. *Oncotarget*, 3(9), 954–987. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.652>
- McLean, K. J., Luciakova, D., Belcher, J., Tee, K. L., & Munro, A. W. (2015). Biological diversity of cytochrome P450 redox partner systems. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 851, 299–317. https://doi.org/10.1007/978-3-319-16009-2_11
- Mei, J., & Liu, L. (2016). [Role of Interleukin 17 in Lung Carcinogenesis and Lung Cancer Progression]. *Zhongguo Fei Ai Za Zhi = Chinese Journal of Lung Cancer*, 19(1), 46–51. <https://doi.org/10.3779/j.issn.1009-3419.2016.01.06>
- Meier, B., Radeke, H. H., Selle, S., Younes, M., Sies, H., Resch, K., & Habermehl, G. G. (1989). Human fibroblasts release reactive oxygen species in response to interleukin-1 or tumour necrosis factor-alpha. *The Biochemical Journal*, 263(2), 539–545.
- Melloni, B., Lefebvre, M. A., Bonnaud, F., Vergnenègre, A., Grossin, L., Rigaud, M., & Cantin, A. (1996). Antioxidant activity in bronchoalveolar lavage fluid from patients with lung cancer., 154. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.154.6.8970359>
- Merksamer, P. I., Liu, Y., He, W., Hirschey, M. D., Chen, D., & Verdin, E. (2013). The sirtuins, oxidative stress and aging: an emerging link. *Aging*, 5(3), 144–150. <https://doi.org/10.18632/aging.100544>
- Millot, L., Dumollard, J. M., Niveleau, A., Prades, J. M., Peoc'h, M., & Estour, B. (2008). L'évaluation de la méthylation globale d'ADN — un outil potentiel de diagnostic différentiel des nodules thyroïdiens. [/data/revues/00034266/00660005/488/](http://www.em-consulte.com/en/article/76698). Retrieved from <http://www.em-consulte.com/en/article/76698>
- Milner, J. A. (2008). Nutrition and cancer: essential elements for a roadmap. *Cancer Letters*, 269(2), 189–198. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2008.05.030>
- Mogi, A., & Kuwano, H. (2011). TP53 mutations in nonsmall cell lung cancer. *Journal of Biomedicine & Biotechnology*, 2011, 583929. <https://doi.org/10.1155/2011/583929>
- Mohammadi, M., Ghaznavi, R., Keyhanmanesh, R., Sadeghipour, H. R., Naderi, R., & Mohammadi, H. (2013). Voluntary exercise prevents lead-induced elevation of oxidative stress and inflammation markers in male rat blood. *TheScientificWorldJournal*, 2013, 320704. <https://doi.org/10.1155/2013/320704>
- Moldovan, L., & Moldovan, N. I. (2004). Oxygen free radicals and redox biology of organelles. *Histochemistry and Cell Biology*, 122(4), 395–412. <https://doi.org/10.1007/s00418-004-0676-y>
- Morgan, M. J., & Liu, Z. (2011). Crosstalk of reactive oxygen species and NF-κB signaling. *Cell Research*, 21(1), 103–115. <https://doi.org/10.1038/cr.2010.178>
- Morrow, J. D., & Roberts, L. J. (1997). The isoprostanes: unique bioactive products of lipid peroxidation. *Progress in Lipid Research*, 36(1), 1–21.
- Movassagh, M., & Foo, R. S.-Y. (2008). Simplified apoptotic cascades. *Heart Failure Reviews*, 13(2), 111–119. <https://doi.org/10.1007/s10741-007-9070-x>
- Müller, M., Strand, S., Hug, H., Heinemann, E. M., Walczak, H., Hofmann, W. J., ... Galle, P. R. (1997). Drug-induced apoptosis in hepatoma cells is mediated by the CD95 (APO-1/Fas) receptor/ligand system and involves activation of wild-type p53. *Journal of Clinical Investigation*, 99(3), 403–413. Retrieved from

Références

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC507813/>

Na, H.-K., & Oliynyk, S. (2011). Effects of physical activity on cancer prevention. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1229(1), 176–183. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2011.06105.x>

Nadda, N., Setia, S., Vaish, V., & Sanyal, S. N. (2013). Role of cytokines in experimentally induced lung cancer and chemoprevention by COX-2 selective inhibitor, etoricoxib. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 372(1–2), 101–112. <https://doi.org/10.1007/s11010-012-1451-3>

Naik, E., & Dixit, V. M. (2011). Mitochondrial reactive oxygen species drive proinflammatory cytokine production. *The Journal of Experimental Medicine*, 208(3), 417–420. <https://doi.org/10.1084/jem.20110367>

Nakagami, K., Uchida, T., Ohwada, S., Koibuchi, Y., Suda, Y., Sekine, T., & Morishita, Y. (1999). Increased choline kinase activity and elevated phosphocholine levels in human colon cancer. *Japanese Journal of Cancer Research: Gann*, 90(4), 419–424.

Nieman, D. C. (2001). Exercise immunology: nutritional countermeasures. *Canadian Journal of Applied Physiology = Revue Canadienne De Physiologie Appliquée*, 26 Suppl, S45-55.

Niu, Z.-Y., Pan, L., Liu, Y.-J., Zhang, X.-J., & Suo, X.-H. (2006). [Effects of integrin beta1 on phycocyanin inhibiting proliferation of K562 cells]. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*, 14(4), 658–661.

Noguchi, S., Torii, R., Shimabukuro, I., Yamasaki, K., Kido, T., Yoshii, C., ... Yatera, K. (2016). Adrenal Insufficiency Associated with Small Cell Lung Cancer: A Case Report and Literature Review. *Journal of UOEH*, 38(2), 155–162. <https://doi.org/10.7888/juoeh.38.155>

Ocarra, P. (1965). PURIFICATION AND N-TERMINAL ANALYSES OF ALGAL BILIPROTEINS. *The Biochemical Journal*, 94, 171–174.

Oda, K., Ikeda, Y., Kawana, K., Osuga, Y., & Fujii, T. (2015). mTOR Signaling in Endometrial Cancer: From a Molecular and Therapeutic Point of View. *Current Obstetrics and Gynecology Reports*, 4(1), 1–10. <https://doi.org/10.1007/s13669-014-0103-x>

O'Donnell, R., Richter, A., Ward, J., Angco, G., Mehta, A., Rousseau, K., ... Wilson, S. (2004). Expression of ErbB receptors and mucins in the airways of long term current smokers. *Thorax*, 59(12), 1032–1040. <https://doi.org/10.1136/thx.2004.028043>

Ogrunc, M., Di Micco, R., Lontos, M., Bombardelli, L., Mione, M., Fumagalli, M., ... d'Adda di Fagagna, F. (2014). Oncogene-induced reactive oxygen species fuel hyperproliferation and DNA damage response activation. *Cell Death and Differentiation*, 21(6), 998–1012. <https://doi.org/10.1038/cdd.2014.16>

Ohashi, K., Sequist, L. V., Arcila, M. E., Lovly, C. M., Chen, X., Rudin, C. M., ... Pao, W. (2013). Characteristics of Lung Cancers Harboring NRAS Mutations. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 19(9), 2584–2591. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-3173>

Ohta, T., Iijima, K., Miyamoto, M., Nakahara, I., Tanaka, H., Ohtsuji, M., ... Hirohashi, S. (2008). Loss of Keap1 function activates Nrf2 and provides advantages for lung cancer cell growth. *Cancer Research*, 68(5), 1303–1309. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-5003>

Oliva, J., Bardag-Gorce, F., Tillman, B., & French, S. W. (2011). Protective effect of quercetin, EGCG, catechin and betaine against oxidative stress induced by ethanol in vitro. *Experimental and Molecular Pathology*, 90(3), 295–299. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2011.02.006>

Oliva, J., Zhong, J., Buslon, V. S., & French, S. W. (2012). The effect of SAME and betaine on Hepa 1–6, C34 and E47 liver cell survival in vitro. *Experimental and Molecular Pathology*, 92(1), 126–130. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2011.10.001>

Références

- Olsen, R. H., Krogh-Madsen, R., Thomsen, C., Booth, F. W., & Pedersen, B. K. (2008). Metabolic responses to reduced daily steps in healthy nonexercising men. *JAMA*, 299(11), 1261–1263. <https://doi.org/10.1001/jama.299.11.1259>
- Olsen, R. K. J., Cornelius, N., & Gregersen, N. (2015). Redox signalling and mitochondrial stress responses; lessons from inborn errors of metabolism. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 38(4), 703–719. <https://doi.org/10.1007/s10545-015-9861-5>
- OMS | Cancer. (n.d.). Retrieved February 7, 2017, from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/fr/>
- Osaki, M., Oshimura, M., & Ito, H. (2004). PI3K-Akt pathway: its functions and alterations in human cancer. *Apoptosis: An International Journal on Programmed Cell Death*, 9(6), 667–676. <https://doi.org/10.1023/B:APPT.0000045801.15585.dd>
- Ost, M., Coleman, V., Kasch, J., & Klaus, S. (n.d.). Regulation of myokine expression: Role of exercise and cellular stress. *Free Radical Biology and Medicine*. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.02.018>
- Padmanabhan, B., Tong, K. I., Ohta, T., Nakamura, Y., Scharlock, M., Ohtsuji, M., ... Yamamoto, M. (2006). Structural basis for defects of Keap1 activity provoked by its point mutations in lung cancer. *Molecular Cell*, 21(5), 689–700. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.01.013>
- Pahl, H. L. (1999). Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene*, 18(49), 6853–6866. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203239>
- Palace, V. P., Khaper, N., Qin, Q., & Singal, P. K. (1999). Antioxidant potentials of vitamin A and carotenoids and their relevance to heart disease. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(5–6), 746–761. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00266-4](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00266-4)
- Pan, R., Lu, R., Zhang, Y., Zhu, M., Zhu, W., Yang, R., ... Bao, Q. (2015). Spirulina phycocyanin induces differential protein expression and apoptosis in SKOV-3 cells. *International Journal of Biological Macromolecules*, 81, 951–959. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.09.039>
- Pani, G., Bedogni, B., Anzevino, R., Colavitti, R., Palazzotti, B., Borrello, S., & Galeotti, T. (2000). Deregulated manganese superoxide dismutase expression and resistance to oxidative injury in p53-deficient cells. *Cancer Research*, 60(16), 4654–4660.
- Papagiannakopoulos, T., Bauer, M. R., Davidson, S. M., Heimann, M., Subbaraj, L., Bhutkar, A., ... Jacks, T. (2016). Circadian Rhythm Disruption Promotes Lung Tumorigenesis. *Cell Metabolism*, 24(2), 324–331. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.07.001>
- Pardhasaradhi, B. V. V., Ali, A. M., Kumari, A. L., Reddanna, P., & Khar, A. (2003). Phycocyanin-mediated apoptosis in AK-5 tumor cells involves down-regulation of Bcl-2 and generation of ROS. *Molecular Cancer Therapeutics*, 2(11), 1165–1170.
- Park, S.-H., Seong, M.-A., & Lee, H.-Y. (2016). p38 MAPK-induced MDM2 degradation confers paclitaxel resistance through p53-mediated regulation of EGFR in human lung cancer cells. *Oncotarget*, 7(7), 8184–8199. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6945>
- Parker, L., McGuckin, T. A., & Leicht, A. S. (2014). Influence of exercise intensity on systemic oxidative stress and antioxidant capacity. *Clinical Physiology and Functional Imaging*, 34(5), 377–383. <https://doi.org/10.1111/cpf.12108>
- Parrish, A. B., Freel, C. D., & Kornbluth, S. (2013). Cellular Mechanisms Controlling Caspase Activation and Function. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(6). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008672>
- Pedersen, B. K., & Febbraio, M. A. (2008). Muscle as an endocrine organ: focus on muscle-derived interleukin-6. *Physiological Reviews*, 88(4), 1379–1406.

Références

<https://doi.org/10.1152/physrev.90100.2007>

Pedersen, B. K., Steensberg, A., Keller, P., Keller, C., Fischer, C., Hiscock, N., ... Febbraio, M. A. (2003). Muscle-derived interleukin-6: lipolytic, anti-inflammatory and immune regulatory effects. *Pflügers Archiv*, 446(1), 9–16. <https://doi.org/10.1007/s00424-002-0981-z>

Pedersen, L., Idorn, M., Olofsson, G. H., Lauenborg, B., Nookaew, I., Hansen, R. H., ... Hojman, P. (2016). Voluntary Running Suppresses Tumor Growth through Epinephrine- and IL-6-Dependent NK Cell Mobilization and Redistribution. *Cell Metabolism*, 23(3), 554–562. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.01.011>

Peluso, G., Barbarisi, A., Savica, V., Reda, E., Nicolai, R., Benatti, P., & Calvani, M. (2000). Carnitine: an osmolyte that plays a metabolic role. *Journal of Cellular Biochemistry*, 80(1), 1–10.

Pentón-Rol, G., Marín-Prida, J., Pardo-Andreu, G., Martínez-Sánchez, G., Acosta-Medina, E. F., Valdivia-Acosta, A., ... Pentón-Arias, E. (2011). C-Phycocyanin is neuroprotective against global cerebral ischemia/reperfusion injury in gerbils. *Brain Research Bulletin*, 86(1–2), 42–52. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2011.05.016>

Perkins, N. D. (2007). Integrating cell-signalling pathways with NF-κB and IKK function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(1), 49–62. <https://doi.org/10.1038/nrm2083>

Petersen, C. M., Nelson, R., & Steffen, T. M. (2013). The Effect of Parkinson Drug Timing on Cardiovascular Response during Treadmill Exercise in a Person with Parkinson Disease and Freezing of Gait. *Physiotherapy Canada. Physiotherapie Canada*, 65(3), 217–222. <https://doi.org/10.3138/ptc.2011-57>

Peters-Regehr, T., Bode, J. G., Kubitz, R., & Häussinger, D. (1999). Organic osmolyte transport in quiescent and activated rat hepatic stellate cells (Ito cells). *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 29(1), 173–180. <https://doi.org/10.1002/hep.510290111>

Pisoschi, A. M., & Pop, A. (2015). The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 97, 55–74. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.04.040>

Piyathilake, C. J., Johanning, G. L., Macaluso, M., Whiteside, M., Oelschlager, D. K., Heimbarger, D. C., & Grizzle, W. E. (2000). Localized Folate and Vitamin B-12 Deficiency in Squamous Cell Lung Cancer Is Associated With Global DNA Hypomethylation. *Nutrition and Cancer*, 37(1), 99–107. https://doi.org/10.1207/S15327914NC3701_13

Poulain, S., Evenou, F., Carré, M.-C., Corbel, S., Vignaud, J.-M., & Martinet, N. (2009). Vitamin A/retinoids signalling in the human lung. *Lung Cancer (Amsterdam, Netherlands)*, 66(1), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2009.03.008>

Prieto-Hontoria, P. L., Pérez-Matute, P., Fernández-Galilea, M., Bustos, M., Martínez, J. A., & Moreno-Aliaga, M. J. (2011). Role of obesity-associated dysfunctional adipose tissue in cancer: a molecular nutrition approach. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1807(6), 664–678. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.11.004>

Provatopoulou, X., Georgiou, G. P., Kalogera, E., Kalles, V., Matiatou, M. A., Papapanagiotou, I., ... Gounaris, A. (2015). Serum irisin levels are lower in patients with breast cancer: association with disease diagnosis and tumor characteristics. *BMC Cancer*, 15. <https://doi.org/10.1186/s12885-015-1898-1>

Pryor, W. A., Prier, D. G., & Church, D. F. (1983). Electron-spin resonance study of mainstream and sidestream cigarette smoke: nature of the free radicals in gas-phase smoke and in cigarette tar. *Environmental Health Perspectives*, 47, 345–355. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1569403/>

Pulling, L. C., Divine, K. K., Klinge, D. M., Gilliland, F. D., Kang, T., Schwartz, A. G., ...

Références

- Belinsky, S. A. (2003). Promoter Hypermethylation of the O6-Methylguanine-DNA Methyltransferase Gene More Common in Lung Adenocarcinomas from Never-Smokers than Smokers and Associated with Tumor Progression. *Cancer Research*, 63(16), 4842–4848. Retrieved from <http://cancerres.aacrjournals.org/content/63/16/4842>
- Qiu, M., Chen, L., Tan, G., Ke, L., Zhang, S., Chen, H., & Liu, J. (2015). A reactive oxygen species activation mechanism contributes to JS-K-induced apoptosis in human bladder cancer cells. *Scientific Reports*, 5, 15104. <https://doi.org/10.1038/srep15104>
- Radak, Z., Chung, H. Y., Koltai, E., Taylor, A. W., & Goto, S. (2008). Exercise, oxidative stress and hormesis. *Ageing Research Reviews*, 7(1), 34–42. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2007.04.004>
- Radák, Z., Kaneko, T., Tahara, S., Nakamoto, H., Ohno, H., Sasvári, M., ... Goto, S. (1999). The effect of exercise training on oxidative damage of lipids, proteins, and DNA in rat skeletal muscle: evidence for beneficial outcomes. *Free Radical Biology and Medicine*, 27(1–2), 69–74. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(99\)00038-6](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(99)00038-6)
- Rana, A., Rana, B., Mishra, R., Sondarva, G., Rangasamy, V., Das, S., ... Kanthasamy, A. (2013). Mixed Lineage Kinase–c-Jun N-Terminal Kinase Axis. *Genes & Cancer*, 4(9–10), 334–341. <https://doi.org/10.1177/1947601913485415>
- Rao, R. R., Long, J. Z., White, J. P., Svensson, K. J., Lou, J., Lokurkar, I., ... Spiegelman, B. M. (2014). Meteorin-like is a hormone that regulates immune-adipose interactions to increase beige fat thermogenesis. *Cell*, 157(6), 1279–1291. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.03.065>
- Rapport Nutrition et cancer - NUT2007sa0095Ra.pdf. (n.d.). Retrieved from <http://www.anses.fr/Documents/NUT2007sa0095Ra.pdf>
- Rayavarapu, S., Coley, W., & Nagaraju, K. (2012). Endoplasmic reticulum stress in skeletal muscle homeostasis and disease. *Current Rheumatology Reports*, 14(3), 238–243. <https://doi.org/10.1007/s11926-012-0247-5>
- Rebillard, A., Lefeuve-Orfila, L., Gueritat, J., & Cillard, J. (2013). Prostate cancer and physical activity: Adaptive response to oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*, 60, 115–124. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.02.009>
- Reddy, C. M., Bhat, V. B., Kiranmai, G., Reddy, M. N., Reddanna, P., & Madyastha, K. M. (2000). Selective inhibition of cyclooxygenase-2 by C-phycocyanin, a biliprotein from *Spirulina platensis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 277(3), 599–603. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.3725>
- Reddy, M. C., Subhashini, J., Mahipal, S. V. K., Bhat, V. B., Srinivas Reddy, P., Kiranmai, G., ... Reddanna, P. (2003). C-Phycocyanin, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, induces apoptosis in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 304(2), 385–392. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(03\)00586-2](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(03)00586-2)
- Reuland, D. J., Khademi, S., Castle, C. J., Irwin, D. C., McCord, J. M., Miller, B. F., & Hamilton, K. L. (2013). Upregulation of phase II enzymes through phytochemical activation of Nrf2 protects cardiomyocytes against oxidant stress. *Free Radical Biology & Medicine*, 56, 102–111. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.11.016>
- Reuter, S., Gupta, S. C., Chaturvedi, M. M., & Aggarwal, B. B. (2010). Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? *Free Radical Biology & Medicine*, 49(11), 1603–1616. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.09.006>
- Robertis, E. D. P. D., & Robertis, E. M. F. D. (1983). *Biologie cellulaire et moléculaire*. Presses Université Laval.
- Roberts, L. J., & Milne, G. L. (2009). Isoprostanes. *Journal of Lipid Research*, 50(Suppl), S219–S223. <https://doi.org/10.1194/jlr.R800037-JLR200>

Références

- Rodrigues, S., Bruyneel, E., Rodrigue, C. M., Shahin, E., & Gespach, C. (2004). [Cyclooxygenase 2 and carcinogenesis]. *Bulletin Du Cancer*, 91 Spec No, S61-76.
- Roebuck, B. D., McCaffrey, J., & Baumgartner, K. J. (1990). Protective Effects of Voluntary Exercise during the Postinitiation Phase of Pancreatic Carcinogenesis in the Rat. *Cancer Research*, 50(21), 6811–6816. Retrieved from <http://cancerres.aacrjournals.org/content/50/21/6811>
- Roswall, N., Olsen, A., Christensen, J., Dragsted, L. O., Overvad, K., & Tjønneland, A. (2010). Source-specific effects of micronutrients in lung cancer prevention. *Lung Cancer*, 67(3), 275–281. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2009.11.010>
- Rotblat, B., Melino, G., & Knight, R. A. (2012). NRF2 and p53: Januses in cancer? *Oncotarget*, 3(11), 1272–1283. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3717791/>
- Rotunno, M., Yu, K., Lubin, J. H., Consonni, D., Pesatori, A. C., Goldstein, A. M., ... Landi, M. T. (2009). Phase I Metabolic Genes and Risk of Lung Cancer: Multiple Polymorphisms and mRNA Expression. *PLoS ONE*, 4(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005652>
- Roy, S., Sen, C. K., & Packer, L. (1999). Determination of cell-cell adhesion in response to oxidants and antioxidants. *Methods in Enzymology*, 300, 395–401.
- Russell, A. P., Hesselink, M. K. C., Lo, S. K., & Schrauwen, P. (2005). Regulation of metabolic transcriptional co-activators and transcription factors with acute exercise. *The FASEB Journal*. <https://doi.org/10.1096/fj.04-3168fje>
- Sabarathan, K. G., & Ganesan, G. (2008). Antibacterial and toxicity evaluation of C-phycocyanin and cell extract of filamentous freshwater cyanobacterium-Westiellopsis sps. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 12(2), 79–82.
- Sabiston, C. M., & Brunet, J. (2012). Reviewing the Benefits of Physical Activity During Cancer Survivorship. *American Journal of Lifestyle Medicine*, 6(2), 167–177. <https://doi.org/10.1177/1559827611407023>
- Sahoo, A., & Im, S.-H. (2010). Interleukin and Interleukin Receptor Diversity: Role of Alternative Splicing. *International Reviews of Immunology*, 29(1), 77–109. <https://doi.org/10.3109/08830180903349651>
- Samy, D. M., Ismail, C. A., & Nassra, R. A. (2015). Circulating Irisin Concentrations in Rat Models of Thyroid Dysfunction — Effect of Exercise. *Metabolism*, 64(7), 804–813. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2015.01.001>
- Sancar, A., Lindsey-Boltz, L. A., Unsal-Kaçmaz, K., & Linn, S. (2004). Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annual Review of Biochemistry*, 73, 39–85. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.73.011303.073723>
- Sánchez-Martínez, R., Castillo, A. I., Steinmeyer, A., & Aranda, A. (2006). The retinoid X receptor ligand restores defective signalling by the vitamin D receptor. *EMBO Reports*, 7(10), 1030–1034. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400776>
- Sathish, V., Ebenezar, K. K., & Devaki, T. (2003). Synergistic effect of Nicorandil and Amlodipine on tissue defense system during experimental myocardial infarction in rats. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 243(1–2), 133–138.
- Sato, M., Shames, D. S., Gazdar, A. F., & Minna, J. D. (2007). A Translational View of the Molecular Pathogenesis of Lung Cancer. *Journal of Thoracic Oncology April 2007*, 2(4), 327–343. <https://doi.org/10.1097/01.JTO.0000263718.69320.4c>
- Sawant, A., Schafer, C. C., Jin, T. H., Zmijewski, J., Tse, H. M., Roth, J., ... Deshane, J. S. (2013). Enhancement of antitumor immunity in lung cancer by targeting myeloid-derived suppressor cell pathways. *Cancer Research*, 73(22). <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-0987>

Références

- Scarpulla, R. C., Vega, R. B., & Kelly, D. P. (2012). Transcriptional integration of mitochondrial biogenesis. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 23(9), 459–466. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2012.06.006>
- Scheele, C., Nielsen, S., & Pedersen, B. K. (2009). ROS and myokines promote muscle adaptation to exercise. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 20(3), 95–99. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2008.12.002>
- Schlueter, A. K., & Johnston, C. S. (2011). Vitamin C: Overview and Update. *Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine*, 16(1), 49–57. <https://doi.org/10.1177/1533210110392951>
- Schmid, D., & Leitzmann, M. F. (2014). Television viewing and time spent sedentary in relation to cancer risk: a meta-analysis. *Journal of the National Cancer Institute*, 106(7). <https://doi.org/10.1093/jnci/dju098>
- Schwahn, B. C., Hafner, D., Hohlfeld, T., Balkenhol, N., Laryea, M. D., & Wendel, U. (2003). Pharmacokinetics of oral betaine in healthy subjects and patients with homocystinuria. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 55(1), 6–13. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2125.2003.01717.x>
- Segal, R. A., Martonen, T. B., Kim, C. S., & Shearer, M. (2002). COMPUTER SIMULATIONS OF PARTICLE DEPOSITION IN THE LUNGS OF CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE PATIENTS. *Inhalation Toxicology*, 14(7), 705–720. <https://doi.org/10.1080/08958370290084593>
- Seibold, M. A., & Schwartz, D. A. (2011). The lung: the natural boundary between nature and nurture. *Annual Review of Physiology*, 73, 457–478. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-012110-142212>
- Sen, N., Satija, Y. K., & Das, S. (2011). PGC-1 α , a key modulator of p53, promotes cell survival upon metabolic stress. *Molecular Cell*, 44(4), 621–634. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.08.044>
- Servais, S., Couturier, K., Koubi, H., Rouanet, J. L., Desplanches, D., Sornay-Mayet, M. H., ... Favier, R. (2003). Effect of voluntary exercise on H₂O₂ release by subsarcolemmal and intermyofibrillar mitochondria. *Free Radical Biology and Medicine*, 35(1), 24–32. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(03\)00177-1](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(03)00177-1)
- Shao, L., Li, H., Chen, J., Song, H., Zhang, Y., Wu, F., ... Tang, D. (n.d.). Irisin suppresses the migration, proliferation, and invasion of lung cancer cells via inhibition of epithelial-to-mesenchymal transition. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.12.084>
- Shaw, A. T., & Solomon, B. (2011). Targeting Anaplastic Lymphoma Kinase in Lung Cancer. *Clinical Cancer Research*, 17(8), 2081–2086. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-1591>
- Shen, D., Mao, W., Liu, T., Lin, Q., Lu, X., Wang, Q., ... Wijndaele, K. (2014). Sedentary Behavior and Incident Cancer: A Meta-Analysis of Prospective Studies. *PLoS ONE*, 9(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105709>
- Shen, H.-M., & Pervaiz, S. (2006). TNF receptor superfamily-induced cell death: redox-dependent execution. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 20(10), 1589–1598. <https://doi.org/10.1096/fj.05-5603rev>
- Shibata, T., Ohta, T., Tong, K. I., Kokubu, A., Odogawa, R., Tsuta, K., ... Hirohashi, S. (2008). Cancer related mutations in NRF2 impair its recognition by Keap1-Cul3 E3 ligase and promote malignancy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(36), 13568–13573. <https://doi.org/10.1073/pnas.0806268105>

Références

- Shimada, T., & Fujii-Kuriyama, Y. (2004). Metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons to carcinogens by cytochromes P450 1A1 and 1B1. *Cancer Science*, 95(1), 1–6.
- Shokri, H., Khosravi, A. R., & Taghavi, M. (2014). Efficacy of *Spirulina platensis* on immune functions in cancer mice with systemic candidiasis. *Journal of Mycology Research*, 1(1), 7–13. Retrieved from http://jmr.ut.ac.ir/article_51627.html
- Siegel, R., Naishadham, D., & Jemal, A. (2013). Cancer statistics, 2013. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 63(1), 11–30. <https://doi.org/10.3322/caac.21166>
- Siegfried, J. M. (2014). Smoking Out Reproductive Hormone Actions in Lung Cancer. *Molecular Cancer Research : MCR*, 12(1), 24–31. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-13-0580>
- Siegfried, J. M., Gubish, C. T., Rothstein, M. E., Henry, C., & Stabile, L. P. (2012). Combining the Multitargeted Tyrosine Kinase Inhibitor Vandetanib with the Antiestrogen Fulvestrant Enhances Its Antitumor Effect in Non-small Cell Lung Cancer. *Journal of Thoracic Oncology*, 7(3), 485–495. <https://doi.org/10.1097/JTO.0b013e31824177ea>
- Singh, A., Misra, V., Thimmulappa, R. K., Lee, H., Ames, S., Hoque, M. O., ... Biswal, S. (2006). Dysfunctional KEAP1-NRF2 Interaction in Non-Small-Cell Lung Cancer. *PLoS Medicine*, 3(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0030420>
- Sinner, P., Folsom, A. R., Harnack, L., Eberly, L. E., & Schmitz, K. H. (2006). The Association of Physical Activity with Lung Cancer Incidence in a Cohort of Older Women: The Iowa Women's Health Study. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 15(12), 2359–2363. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-06-0251>
- Smith, W. L., DeWitt, D. L., & Garavito, R. M. (2000). Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annual Review of Biochemistry*, 69, 145–182. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.69.1.145>
- Sommer, A., & Vyas, K. S. (2012). A global clinical view on vitamin A and carotenoids. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 96(5), 1204S–1206S. <https://doi.org/10.3945/ajcn.112.034868>
- Sprague, B. L., Trentham-Dietz, A., Klein, B. E. K., Klein, R., Cruickshanks, K. J., Lee, K. E., & Hampton, J. M. (2008). Physical activity, white blood cell count, and lung cancer risk in a prospective cohort study. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention : A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 17(10), 2714–2722. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-08-0042>
- Standard, J., Jiang, Y., Yu, M., Su, X., Zhao, Z., Xu, J., ... Wang, W. (2014). Reduced signaling of PI3K-Akt and RAS-MAPK pathways are the key targets for weight loss-induced cancer prevention by dietary calorie restriction and/or physical activity. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 25(12), 1317–1323. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2014.07.010>
- Steensberg, A., Keller, C., Hillig, T., Frøsig, C., Wojtaszewski, J. F. P., Pedersen, B. K., ... Sander, M. (2007). Nitric oxide production is a proximal signaling event controlling exercise-induced mRNA expression in human skeletal muscle. *The FASEB Journal*, 21(11), 2683–2694. <https://doi.org/10.1096/fj.06-7477com>
- Steghens, J. P., van Kappel, A. L., Denis, I., & Collombel, C. (2001). Diaminonaphtalene, a new highly specific reagent for HPLC-UV measurement of total and free malondialdehyde in human plasma or serum. *Free Radical Biology & Medicine*, 31(2), 242–249.
- Steindorf, K., Friedenreich, C., Linseisen, J., Rohrmann, S., Rundle, A., Veglia, F., ... Riboli, E. (2006). Physical activity and lung cancer risk in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition Cohort. *International Journal of Cancer*, 119(10), 2389–2397. <https://doi.org/10.1002/ijc.22125>

Références

- Storz, P. (2005). Reactive oxygen species in tumor progression. *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library*, 10, 1881–1896.
- St-Pierre, J., Drori, S., Uldry, M., Silvaggi, J. M., Rhee, J., Jäger, S., ... Spiegelman, B. M. (2006). Suppression of reactive oxygen species and neurodegeneration by the PGC-1 transcriptional coactivators. *Cell*, 127(2), 397–408. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.09.024>
- Sullivan, D. M., Wehr, N. B., Fergusson, M. M., Levine, R. L., & Finkel, T. (2000). Identification of oxidant-sensitive proteins: TNF-alpha induces protein glutathiolation. *Biochemistry*, 39(36), 11121–11128.
- Sun, Z., Wang, Z., Liu, X., & Wang, D. (2015). New development of inhibitors targeting the PI3K/AKT/mTOR pathway in personalized treatment of non-small-cell lung cancer. *Anti-Cancer Drugs*, 26(1), 1–14. <https://doi.org/10.1097/CAD.0000000000000172>
- Svensk, A.-M., Soini, Y., Pääkkö, P., Hirvikoski, P., & Kinnula, V. L. (2004). Differential Expression of Superoxide Dismutases in Lung Cancer. *American Journal of Clinical Pathology*, 122(3), 395–404. <https://doi.org/10.1309/A45QHB0QRRX6CT9A>
- Tabac : la liste des 93 produits toxiques de la fumée de cigarette. (n.d.). Retrieved April 4, 2017, from https://www.sciencesetavenir.fr/sante/tabac-la-liste-des-93-produits-toxiques-de-la-fumee-de-cigarette_18912
- Taillé, C., El-Benna, J., Lanone, S., Dang, M.-C., Ogier-Denis, E., Aubier, M., & Boczkowski, J. (2004). Induction of heme oxygenase-1 inhibits NAD(P)H oxidase activity by down-regulating cytochrome b558 expression via the reduction of heme availability. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(27), 28681–28688. <https://doi.org/10.1074/jbc.M310661200>
- Takahashi, H., Ogata, H., Nishigaki, R., Broide, D. H., & Karin, M. (2010). Tobacco smoke promotes lung tumorigenesis by triggering IKKbeta- and JNK1-dependent inflammation. *Cancer Cell*, 17(1), 89–97. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.12.008>
- Takata, Y., Cai, Q., Beeghly-Fadiel, A., Li, H., Shrubsole, M. J., Ji, B.-T., ... Shu, X.-O. (2012). Dietary B vitamin and methionine intakes and lung cancer risk among female never smokers in China. *Cancer Causes & Control : CCC*, 23(12), 1965–1975. <https://doi.org/10.1007/s10552-012-0074-z>
- Talvas, J., Obled, A., Fafournoux, P., & Mordier, S. (2006). Regulation of protein synthesis by leucine starvation involves distinct mechanisms in mouse C2C12 myoblasts and myotubes. *The Journal of Nutrition*, 136(6), 1466–1471.
- Tang, N., Wu, Y., Zhou, B., Wang, B., & Yu, R. (2009). Green tea, black tea consumption and risk of lung cancer: A meta-analysis. *Lung Cancer*, 65(3), 274–283. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2008.12.002>
- Tardon, A., Lee, W. J., Delgado-Rodriguez, M., Dosemeci, M., Albanes, D., Hoover, R., & Blair, A. (2005). Leisure-time physical activity and lung cancer: a meta-analysis. *Cancer Causes & Control : CCC*, 16(4), 389–397. <https://doi.org/10.1007/s10552-004-5026-9>
- Tarrazo-Antelo, A. M., Ruano-Ravina, A., Abal Arca, J., & Barros-Dios, J. M. (2014). Fruit and vegetable consumption and lung cancer risk: a case-control study in galicia, Spain. *Nutrition and Cancer*, 66(6), 1030–1037. <https://doi.org/10.1080/01635581.2014.936951>
- Tas, F., Ciftci, R., Kilic, L., & Karabulut, S. (2013). Age is a prognostic factor affecting survival in lung cancer patients. *Oncology Letters*, 6(5), 1507–1513. Retrieved from <http://www.spandidos-publications.com/ol/6/5/1507/abstract>
- Teixeira, A., Müller, L., dos Santos, A. A., Reckziegel, P., Emanuelli, T., Rocha, J. B. T., & Bürger, M. E. (2009). Beneficial effects of gradual intense exercise in tissues of rats fed with a diet deficient in vitamins and minerals: A pilot study. *Nutrition*, 25(5), 590–596. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2008.11.003>

Références

- Teixidó, N., Cañamás, T. p., Usall, J., Torres, R., Magan, N., & Viñas, I. (2005). Accumulation of the compatible solutes, glycine–betaine and ectoine, in osmotic stress adaptation and heat shock cross-protection in the biocontrol agent *Pantoea agglomerans* CPA-2. *Letters in Applied Microbiology*, 41(3), 248–252. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2005.01757.x>
- Terry, M. J., Maines, M. D., & Lagarias, J. C. (1993). Inactivation of phytochrome- and phycobiliprotein-chromophore precursors by rat liver biliverdin reductase. *The Journal of Biological Chemistry*, 268(35), 26099–26106.
- Thangam, R., Suresh, V., Asenath Princy, W., Rajkumar, M., Senthilkumar, N., Gunasekaran, P., ... Kannan, S. (2013). C-Phycocyanin from *Oscillatoria tenuis* exhibited an antioxidant and in vitro antiproliferative activity through induction of apoptosis and G0/G1 cell cycle arrest. *Food Chemistry*, 140(1–2), 262–272. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.02.060>
- Thorburn, A. (2008). Apoptosis and autophagy: regulatory connections between two supposedly different processes. *Apoptosis: An International Journal on Programmed Cell Death*, 13(1), 1–9. <https://doi.org/10.1007/s10495-007-0154-9>
- Torres, R. L., Torres, I. L. S., Gamaro, G. D., Fontella, F. U., Silveira, P. P., Moreira, J. S. R., ... Belló, A. A. (2004). Lipid peroxidation and total radical-trapping potential of the lungs of rats submitted to chronic and sub-chronic stress. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research = Revista Brasileira De Pesquisas Médicas E Biológicas / Sociedade Brasileira De Biofísica ... [et Al.]*, 37(2), 185–192.
- Tran, H., Brunet, A., Grenier, J. M., Datta, S. R., Fornace, A. J., DiStefano, P. S., ... Greenberg, M. E. (2002). DNA Repair Pathway Stimulated by the Forkhead Transcription Factor FOXO3a Through the Gadd45 Protein. *Science*, 296(5567), 530–534. <https://doi.org/10.1126/science.1068712>
- Tsai, M.-S., Weng, S.-H., Chen, H.-J., Chiu, Y.-F., Huang, Y.-C., Tseng, S.-C., ... Lin, Y.-W. (2012). Inhibition of p38 MAPK-dependent excision repair cross-complementing 1 expression decreases the DNA repair capacity to sensitize lung cancer cells to etoposide. *Molecular Cancer Therapeutics*, 11(3), 561–571. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-11-0684>
- Tudek, B., Winczura, A., Janik, J., Siomek, A., Foksinski, M., & Oliński, R. (2010). Involvement of oxidatively damaged DNA and repair in cancer development and aging. *American Journal of Translational Research*, 2(3), 254–284. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2892402/>
- Tyczynski, J. E., Bray, F., & Maxwell Parkin, D. (2003). Lung cancer in Europe in 2000: epidemiology, prevention, and early detection. *The Lancet Oncology*, 4(1), 45–55. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(03\)00960-4](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(03)00960-4)
- Ueland, P. M. (2010). Choline and betaine in health and disease. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 34(1), 3–15. <https://doi.org/10.1007/s10545-010-9088-4>
- Valko, M., Izakovic, M., Mazur, M., Rhodes, C. J., & Telser, J. (2004). Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 266(1–2), 37–56.
- van Horssen, R., Ten Hagen, T. L. M., & Eggermont, A. M. M. (2006). TNF-alpha in cancer treatment: molecular insights, antitumor effects, and clinical utility. *The Oncologist*, 11(4), 397–408. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.11-4-397>
- Visconti, R., & Grieco, D. (2009). New insights on oxidative stress in cancer. *Current Opinion in Drug Discovery & Development*, 12(2), 240–245.
- Vivier, E., Tomasello, E., Baratin, M., Walzer, T., & Ugolini, S. (2008). Functions of natural killer cells. *Nature Immunology*, 9(5), 503–510. <https://doi.org/10.1038/ni1582>
- Vlamiš-Gardikas, A., & Holmgren, A. (2002). Thioredoxin and glutaredoxin isoforms. *Methods in Enzymology*, 347, 286–296.

Références

- Volm, M., Mattern, J., & Koomägi, R. (1999). Inverse correlation between apoptotic (Fas ligand, caspase-3) and angiogenic factors (VEGF, microvessel density) in squamous cell lung carcinomas. *Anticancer Research*, 19(3A), 1669–1671.
- Wang, A., Qin, F., Hedlin, H., Desai, M., Chlebowski, R., Gomez, S., ... Stefanick, M. L. (2016). Physical activity and sedentary behavior in relation to lung cancer incidence and mortality in older women: The Women's Health Initiative. *International Journal of Cancer*, 139(10), 2178–2192. <https://doi.org/10.1002/ijc.30281>
- Wang, H., Liu, Y., Gao, X., Carter, C. L., & Liu, Z.-R. (2007). The recombinant beta subunit of C-phycoerythrin inhibits cell proliferation and induces apoptosis. *Cancer Letters*, 247(1), 150–158. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2006.04.002>
- Warren, G. W., & Cummings, K. M. (2013). Tobacco and lung cancer: risks, trends, and outcomes in patients with cancer. *American Society of Clinical Oncology Educational Book. American Society of Clinical Oncology. Meeting*, 359–364. https://doi.org/10.1200/EdBook_AM.2013.33.359
- Warskulat, U., Zhang, F., & Häussinger, D. (1996). Modulation of phagocytosis by anisoosmolarity and betaine in rat liver macrophages (Kupffer cells) and RAW 264.7 mouse macrophages. *FEBS Letters*, 391(3), 287–292. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(96\)00753-3](https://doi.org/10.1016/0014-5793(96)00753-3)
- Wettstein, M., Weik, C., Holneicher, C., & Häussinger, D. (1998). Betaine as an osmolyte in rat liver: metabolism and cell-to-cell interactions. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 27(3), 787–793. <https://doi.org/10.1002/hep.510270321>
- White, E., & DiPaola, R. S. (2009). The double-edged sword of autophagy modulation in cancer. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 15(17), 5308–5316. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-5023>
- Wilson, R., Lyall, K., Smyth, L., Fernie, C. E., & Riemersma, R. A. (2002). Dietary hydroxy fatty acids are absorbed in humans: implications for the measurement of “oxidative stress” in vivo. *Free Radical Biology & Medicine*, 32(2), 162–168.
- Wistuba, I. I. (2007). Genetics of preneoplasia: lessons from lung cancer. *Current Molecular Medicine*, 7(1), 3–14. Retrieved from <http://www.ingentaconnect.com/content/ben/cmm/2007/00000007/00000001/art00002>
- Wistuba, I. I., Virmani, A. K., Gazdar, A. F., Lam, S., LeRiche, J., Behrens, C., ... Minna, J. D. (1997). Molecular Damage in the Bronchial Epithelium of Current and Former Smokers. *Journal of the National Cancer Institute*, 89(18), 1366–1373. <https://doi.org/10.1093/jnci/89.18.1366>
- Wolf, P., Hu, Y. C., Doffek, K., Sidransky, D., & Ahrendt, S. A. (2001). O6-Methylguanine-DNA Methyltransferase Promoter Hypermethylation Shifts the p53 Mutational Spectrum in Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancer Research*, 61(22), 8113–8117. Retrieved from <http://cancerres.aacrjournals.org/content/61/22/8113>
- Wolin, K. Y., Yan, Y., Colditz, G. A., & Lee, I.-M. (2009). Physical activity and colon cancer prevention: a meta-analysis. *British Journal of Cancer*, 100(4), 611–616. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6604917>
- Wongpaiboonwattana, W., Tosukhowong, P., Dissayabuttra, T., Mutirangura, A., & Boonla, C. (2013). Oxidative stress induces hypomethylation of LINE-1 and hypermethylation of the RUNX3 promoter in a bladder cancer cell line. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP*, 14(6), 3773–3778.
- Woodson, K., Tangrea, J. A., Barrett, M. J., Virtamo, J., Taylor, P. R., & Albanes, D. (1999). Serum α -Tocopherol and Subsequent Risk of Lung Cancer Among Male Smokers. *Journal of the National Cancer Institute*, 91(20), 1738–1743. <https://doi.org/10.1093/jnci/91.20.1738>

Références

- Wright, M. E., Park, Y., Subar, A. F., Freedman, N. D., Albanes, D., Hollenbeck, A., ... Schatzkin, A. (2008). Intakes of Fruit, Vegetables, and Specific Botanical Groups in Relation to Lung Cancer Risk in the NIH-AARP Diet and Health Study. *American Journal of Epidemiology*, 168(9), 1024–1034. <https://doi.org/10.1093/aje/kwn212>
- Wu, J.-Y., Wang, J., Lai, J.-C., Cheng, Y.-W., Yeh, K.-T., Wu, T.-C., ... Lee, H. (2008). Association of O6-Methylguanine-DNA Methyltransferase (MGMT) Promoter Methylation with p53 Mutation Occurrence in Non-Small Cell Lung Cancer with Different Histology, Gender, and Smoking Status. *Annals of Surgical Oncology*, 15(11), 3272–3277. <https://doi.org/10.1245/s10434-008-0078-9>
- Wu, L.-C., Lin, Y.-Y., Yang, S.-Y., Weng, Y.-T., & Tsai, Y.-T. (2011). Antimelanogenic effect of c-phycocyanin through modulation of tyrosinase expression by upregulation of ERK and downregulation of p38 MAPK signaling pathways. *Journal of Biomedical Science*, 18, 74. <https://doi.org/10.1186/1423-0127-18-74>
- Wu, Q.-J., Xiang, Y.-B., Yang, G., Li, H.-L., Lan, Q., Gao, Y.-T., ... Fowke, J. H. (2014). Vitamin E intake and the lung cancer risk among female nonsmokers: A report from the Shanghai Women's Health Study. *International Journal of Cancer*, n/a-n/a. <https://doi.org/10.1002/ijc.29016>
- Xia, Z. X., Li, Z. X., Zhang, M., Sun, L. M., Zhang, Q. F., & Qiu, X. S. (2016). CARMA3 regulates the invasion, migration, and apoptosis of non-small cell lung cancer cells by activating NF- κ B and suppressing the P38 MAPK signaling pathway. *Experimental and Molecular Pathology*, 100(2), 353–360. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2015.10.004>
- Xie, C., Zhang, Y., Tran, T. D. N., Wang, H., Li, S., George, E. V., ... Yang, L.-J. (2015). Irisin Controls Growth, Intracellular Ca²⁺ Signals, and Mitochondrial Thermogenesis in Cardiomyoblasts. *PloS One*, 10(8), e0136816. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136816>
- Xin, C., Liu, J., Zhang, J., Zhu, D., Wang, H., Xiong, L., ... Tao, L. (2016). Irisin improves fatty acid oxidation and glucose utilization in type 2 diabetes by regulating the AMPK signaling pathway. *International Journal of Obesity (2005)*, 40(3), 443–451. <https://doi.org/10.1038/ijo.2015.199>
- Xinhan, C., Shu, Z., Liming, H., & others. (1995). THE EXPERIMENTAL STUDY OF APPLICATION OF PHYCOCYANIN IN CANCER ALSEER THERAPY [J]. *Chinese Journal of Marine Drugs*, 1, 4. Retrieved from http://en.cnki.com.cn/Article_en/CJFDTOTAL-HYYW199501004.htm
- Xiong, F., Xiao, D., & Zhang, L. (2012). Norepinephrine causes epigenetic repression of PKC ϵ gene in rodent hearts by activating Nox1-dependent reactive oxygen species production. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 26(7), 2753–2763. <https://doi.org/10.1096/fj.11-199422>
- Yamadori, T., Ishii, Y., Homma, S., Morishima, Y., Kurishima, K., Itoh, K., ... Hizawa, N. (2012). Molecular mechanisms for the regulation of Nrf2-mediated cell proliferation in non-small-cell lung cancers. *Oncogene*, 31(45), 4768–4777. <https://doi.org/10.1038/onc.2011.628>
- Yang, Y., Dong, J., Sun, K., Zhao, L., Zhao, F., Wang, L., & Jiao, Y. (2013). Obesity and incidence of lung cancer: a meta-analysis. *International Journal of Cancer*, 132(5), 1162–1169. <https://doi.org/10.1002/ijc.27719>
- Ying, J., Rahbar, M. H., Hallman, D. M., Hernandez, L. M., Spitz, M. R., Forman, M. R., & Gorlova, O. Y. (2013). Associations between Dietary Intake of Choline and Betaine and Lung Cancer Risk. *PLoS ONE*, 8(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054561>
- Ying, J., Wang, J., Ji, H., Lin, C., Pan, R., Zhou, L., ... Li, P. (2016). Transcriptome analysis of phycocyanin inhibitory effects on SKOV-3 cell proliferation. *Gene*, 585(1), 58–64. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2016.03.023>

Références

- You, J., & Chan, Z. (2015). ROS Regulation During Abiotic Stress Responses in Crop Plants. *Frontiers in Plant Science*, 6, 1092. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01092>
- Yu, H., & Rohan, T. (2000). Role of the Insulin-Like Growth Factor Family in Cancer Development and Progression. *Journal of the National Cancer Institute*, 92(18), 1472–1489. <https://doi.org/10.1093/jnci/92.18.1472>
- Yu, M., King, B., Ewert, E., Su, X., Mardiyati, N., Zhao, Z., & Wang, W. (2016). Exercise Activates p53 and Negatively Regulates IGF-1 Pathway in Epidermis within a Skin Cancer Model. *PLOS ONE*, 11(8), e0160939. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160939>
- Yun, Y. H., Lim, M. K., Won, Y.-J., Park, S. M., Chang, Y. J., Oh, S. W., & Shin, S. A. (2008). Dietary preference, physical activity, and cancer risk in men: national health insurance corporation study. *BMC Cancer*, 8, 366. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-8-366>
- Zaynagetdinov, R., Sherrill, T. P., Gleaves, L. A., Hunt, P., Han, W., McLoed, A. G., ... Blackwell, T. S. (2015). Chronic NF-κB activation links COPD and lung cancer through generation of an immunosuppressive microenvironment in the lungs. *Oncotarget*, 7(5), 5470–5482. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6562>
- Zbinden-Foncea, H., Raymackers, J.-M., Deldicque, L., Renard, P., & Francaux, M. (2012). TLR2 and TLR4 activate p38 MAPK and JNK during endurance exercise in skeletal muscle. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 44(8), 1463–1472. <https://doi.org/10.1249/MSS.0b013e31824e0d5d>
- Zeisel, S. H., & Blusztajn, J. K. (1994). Choline and Human Nutrition. *Annual Review of Nutrition*, 14(1), 269–296. <https://doi.org/10.1146/annurev.nu.14.070194.001413>
- Zeisel, S. H., Mar, M.-H., Howe, J. C., & Holden, J. M. (2003). Concentrations of Choline-Containing Compounds and Betaine in Common Foods. *The Journal of Nutrition*, 133(5), 1302–1307. Retrieved from <http://jn.nutrition.org/content/133/5/1302>
- Zhang, C.-X., Pan, M.-X., Li, B., Wang, L., Mo, X.-F., Chen, Y.-M., ... Ho, S. C. (2013). Choline and betaine intake is inversely associated with breast cancer risk: a two-stage case-control study in China. *Cancer Science*, 104(2), 250–258. <https://doi.org/10.1111/cas.12064>
- Zhang, F., Warskulat, U., & Häussinger, D. (1996). Modulation of tumor necrosis factor-α release by anisoosmolarity and betaine in rat liver macrophages (Kupffer cells). *FEBS Letters*, 391(3), 293–296.
- Zhang, F., Warskulat, U., Wettstein, M., & Häussinger, D. (1996). Identification of betaine as an osmolyte in rat liver macrophages (Kupffer cells). *Gastroenterology*, 110(5), 1543–1552.
- Zhang, X., Zhang, L., Xu, W., Qian, H., Ye, S., Zhu, W., ... Zhang, R. (2013). Experimental therapy for lung cancer: umbilical cord-derived mesenchymal stem cell-mediated interleukin-24 delivery. *Current Cancer Drug Targets*, 13(1), 92–102.
- Zhang, Y., Mu, Q., Zhou, Z., Song, H., Zhang, Y., Wu, F., ... Tang, D. (2016). Protective Effect of Irisin on Atherosclerosis via Suppressing Oxidized Low Density Lipoprotein Induced Vascular Inflammation and Endothelial Dysfunction. *PLOS ONE*, 11(6), e0158038. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158038>
- Zhao, J., Jitkaew, S., Cai, Z., Choksi, S., Li, Q., Luo, J., & Liu, Z.-G. (2012). Mixed lineage kinase domain-like is a key receptor interacting protein 3 downstream component of TNF-induced necrosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(14), 5322–5327. <https://doi.org/10.1073/pnas.1200012109>
- Zhao, J.-H., Jiang, Y.-G., Wu, C.-T., Luo, Y., Hou, Z., & He, D.-L. (2010). [Expression of COX-2 in different human prostate cancer cell lines and its significance]. *Zhonghua Nan Ke Xue = National Journal of Andrology*, 16(8), 689–692.
- Zheng, J., Inoguchi, T., Sasaki, S., Maeda, Y., McCarty, M. F., Fujii, M., ... Takayanagi, R.

Références

- (2013). Phycocyanin and phycocyanobilin from *Spirulina platensis* protect against diabetic nephropathy by inhibiting oxidative stress. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 304(2), R110–R120. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00648.2011>
- Zhu, D., Wang, H., Zhang, J., Zhang, X., Xin, C., Zhang, F., ... Tao, L. (2015). Irisin improves endothelial function in type 2 diabetes through reducing oxidative/nitrative stresses. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 87, 138–147. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2015.07.015>
- Zitka, O., Skalickova, S., Gumulec, J., Masarik, M., Adam, V., Hubalek, J., ... Kizek, R. (2012). Redox status expressed as GSH:GSSG ratio as a marker for oxidative stress in paediatric tumour patients. *Oncology Letters*, 4(6), 1247–1253. <https://doi.org/10.3892/ol.2012.931>
- Zoeller, R. F. (2009). Lifestyle in the Prevention and Management of Cancer: Physical Activity. *American Journal of Lifestyle Medicine*, 3(5), 353–361. <https://doi.org/10.1177/1559827609338680>

□ i i □ a □ A □



Review

Lung cancer: What are the links with oxidative stress, physical activity and nutrition



Edith Filaire^a, Carmen Dupuis^a, Géraud Galvaing^{b,c}, Sylvie Aubreton^d,
Hélène Laurent^d, Ruddy Richard^{c,d,e}, Marc Filaire^{b,c,*}

^a Laboratoire CIAMS, EA4532, Université Paris-Sud, Université Orléans, UFRSTAPS, 2 allée du Château, 45067 Orléans, France

^b Centre Jean Perrin, Service de Chirurgie Thoracique, BP 392, F-63011 Clermont-Ferrand, France

^c INRA, CRNH Auvergne, UMR 1019, 63000 Clermont-Ferrand, France

^d CHRU Clermont-Ferrand, Service de Médecine Physique et Réadaptation, Hôpital G. Montpied, F-63003 Clermont-Ferrand, France

^e CHRU Clermont-Ferrand, Service de Médecine du sport et d'exploration fonctionnelle respiratoire, Hôpital G. Montpied, F-63003 Clermont-Ferrand, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 10 May 2013

Received in revised form

14 September 2013

Accepted 16 September 2013

Keywords:

Lung cancer

Oxidative stress

Physical activity

Nutrition

Respiratory function

Quality of life

ABSTRACT

Oxidative stress appears to play an essential role as a secondary messenger in the normal regulation of a variety of physiological processes, such as apoptosis, survival, and proliferative signaling pathways. Oxidative stress also plays important roles in the pathogenesis of many diseases, including aging, degenerative disease, and cancer. Among cancers, lung cancer is the leading cause of cancer in the Western world. Lung cancer is the commonest fatal cancer whose risk is dependent on the number of cigarettes smoked per day as well as the number of years smoking, some components of cigarette smoke inducing oxidative stress by transmitting or generating oxidative stress. It can be subdivided into two broad categories, small cell lung cancer and non-small-cell lung cancer, the latter is the most common type. Distinct measures of primary and secondary prevention have been investigated to reduce the risk of morbidity and mortality caused by lung cancer. Among them, it seems that physical activity and nutrition have some beneficial effects. However, physical activity can have different influences on carcinogenesis, depending on energy supply, strength and frequency of exercise loads as well as the degree of exercise-mediated oxidative stress. Micronutrient supplementation seems to have a positive impact in lung surgery, particularly as an antioxidant, even if the role of micronutrients in lung cancer remains controversial. The purpose of this review is to examine lung cancer in relation to oxidative stress, physical activity, and nutrition.

© 2013 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Oxidative stress plays important roles in the pathogenesis of many diseases, including aging, degenerative disease, and cancer [1], and it has been shown that oxidative mechanisms have a role in the initiation, promotion and progression of carcinogenesis [2]. Lung cancer is the commonest fatal cancer whose risk is dependent on the number of cigarettes smoked per day as well as the number of years smoking, some components of cigarette smoke inducing oxidative stress by transmitting or generating Reactive Oxygen Species (ROS) [3]. Human lung cancer can be subdivided into two broad categories, small cell lung cancer (SCLC) and non-small-cell lung cancer (NSCLC), the latter is the most common type. Efficacy of exercise-training as an adjunct therapy for patients diagnosed with NSCLC both before and following pulmonary resection

has been reported [4,5]. However, physical activity can have different influences on carcinogenesis, depending on energy supply, strength and frequency of exercise loads as well as the degree of exercise-mediated oxidative stress [6].

Nutrition has also been thought to account for about 30% of cancers in Western countries, making diet second to tobacco as a preventable cause of cancer [7]. In fact, impaired nutrition and weight loss are important predictors of perioperative complications in lung cancer patients. On the other hand, micronutrient supplementation seems to have a positive impact in lung surgery [8], particularly as an antioxidant, even if the role of micronutrients in lung cancer remains controversial [9]. The purpose of this review is to examine lung cancer in relation to oxidative stress, physical activity, and diet.

2. Reactive oxygen species and NO: what are their roles?

Free radicals are reactive compounds that have one or more unpaired electrons in their valence shell [10]. Their lifetime is very

* Corresponding author at: Centre Jean Perrin, Service de Chirurgie Thoracique, BP 392, F-63011 Clermont-Ferrand, France. Tel.: +33 4 73 27 81 21; fax: +33 4 27 80 64. E-mail address: marc.filaire@cjp.fr (M. Filaire).

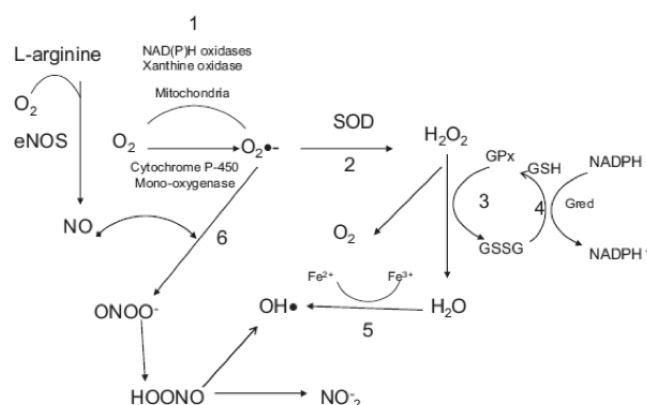


Fig. 1. Pathways of ROS formation. *Reaction 1:* the superoxide anion radical ($O_2^{\bullet-}$) is formed by the process of reduction of molecular oxygen mediated by NAD(P)H oxidases, xanthine oxidase, etc.). *Reaction 2:* superoxide radical is dismuted by the superoxide dismutase (SOD) to hydrogen peroxide (H_2O_2). *Reaction 3:* hydrogen peroxide is most efficiently scavenged by the enzyme glutathione peroxidase (GPx) which requires glutathione (GSH) as the electron donor. *Reaction 4:* the oxidized glutathione (GSSG) is reduced back to GSH by the enzyme glutathione peroxidase (Gred) which uses NADPH as the electron donor. *Reaction 5:* some transition metals (e.g. Fe^{2+}) can breakdown hydrogen peroxide to reactive hydroxyl radical (Fenton reaction). *Reaction 6:* the superoxide anion radical can combine with nitric oxide (NO) to produce peroxynitrite ($ONOO^-$).

short ranging from milliseconds to nanoseconds. They can mediate cell damage by extracting electrons from a stable molecule in an attempt to pair up their own electrons, thus leaving the original molecule in an unstable state. They are produced at low levels during normal physiological conditions and are scavenged by endogenous antioxidant systems. ROS represent the most important class of radical species generated in living systems [11]. Molecular oxygen (dioxygen) has a unique electronic configuration and is itself a radical. The addition of one electron to dioxygen forms the superoxide anion radical ($O_2^{\bullet-}$) considered as the "primary" ROS. It can further interact with other molecules to generate "secondary" ROS, which are more aggressive, either directly or prevalently through enzyme- or meta-catalyzed processes. Various ROS formation pathways are outlined in Fig. 1. Their "steady state" concentrations are determined by the balance between their rates of production and their rates of removal by various antioxidants. Mitochondria have traditionally been considered as the main source of intracellular ROS, but other enzymatic systems, such as NADPH oxidases (Noxs), cytochrome P-450, cyclooxygenase, aldehyde oxidase, dihydroorotate dehydrogenase, tryptophan dioxygenase, nitric oxide synthase, xanthine oxidase, also contribute to ROS production [11]. Alternatively, ROS and reactive nitrogen species are produced in response to external stimuli, such as inflammatory cytokines, growth factors, environmental toxins, chemotherapeutics, ultraviolet light, or ionizing radiation and surgical operation. Oxidative stress has been proved to play a significant role in carcinogenesis. ROS can act both as anticarcinogenic, e.g. by promoting cell-cycle stasis, apoptosis and necrosis, and inhibiting angiogenesis, or conversely as procarcinogenic, due to their ability to promote proliferation, invasiveness, angiogenesis and metastasis, and suppress apoptosis [10].

NO is a water- and lipid-soluble gas containing one unpaired electron, making NO a highly reactive molecule that acts as an important oxidative biological signaling molecule in a large variety of diverse physiological processes, including blood pressure regulation, neurotransmission, defense mechanisms [12]. NO has a short half-life (a few seconds) in an aqueous environment. It is formed in various cell types by nitric oxide synthases (NOS) is soluble in both aqueous and lipid media. Endogenous NO acts as an

important signaling molecule mediating various cellular functions. On the other hand, overproduction of reactive nitrogen species, called nitrosative stress, induces cytotoxic and mutagenic effects. Nitrosative stress may lead to nitrosylation reactions that can alter the structure of proteins and so inhibit their normal functions. The role of NO from initiation to promotion in a tumor is still subject to debate. In fact, excessive amounts of NO increase apoptosis in some tumor cells, whereas lower amounts can increase vascularity and protect the cells from apoptosis. Nitric oxide can react with the superoxide anion, which produces the peroxynitrite anion, which can decompose to hydroxyl radical or nitrogen dioxide (Fig. 1).

Exposure to free radicals has led organisms to develop a series of defense mechanisms involving prevention mechanisms, repair mechanisms, physical defenses and antioxidant defenses. Enzymatic antioxidant defenses include superoxide dismutase (SOD), which is characterized by 3 isoforms [12], catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx). These defenses can be modified by exercise, training, nutrition and aging [13]. Non-enzymatic antioxidants include a variety of FR quenchers such as ascorbic acid, α -tocopherol, carotenoids, flavonoids, thiols which include glutathione (GSH), ubiquinone Q 10, uric acid, bilirubin, ferritin, albumin, transferrin, lactoferrin, and micronutrients which act as enzymatic cofactors. Essential micronutrients include cobalt, copper, chromium, fluorine, iron, iodine, manganese, selenium and zinc. Also copper, due to its ability to gain and lose electrons, can act as a free radical [14]. Under normal conditions, there is a balance between both the activities and the intracellular levels of antioxidants, this balance being essential for the survival of organisms and their health. Thus each cell is characterized by a concentration of electrons (redox state) stored in many cellular constituents and the redox state of a cell and its oscillation determines cellular functioning, the term "redox state" also describing the redox environment of a cell.

At the molecular level, cellular stress response pathways are controlled by four categories of molecules and transcriptional regulators: insulin/IGF-1 signaling, sirtuins, target of rapamycin, and AMP-activated protein kinase-dependent pathways. All these pathways have one molecular target in common, named FoxO1 [15]. FoxOs are redox-sensitive Forkhead-containing ubiquitous

transcription factors, and represent a major cell defense mechanism against oxidative insults [15]. In mammals, there are 4 FoxO molecules, which are encoded by different genes and they all affect differentiation, proliferation and survival of a variety of cells including adipocytes, hepatocytes, β -cells, and myoblasts. FoxO activity is regulated by a variety of external stimuli including insulin, growth factors, hormones, cytokines, and oxidative stress, through a plethora of post-translational modification of FoxOs including phosphorylation, ubiquitination, acetylation, and methylation. The antioxidant defense provided by FoxOs is ultimately overwhelmed by high levels of oxidative stress or oxidative stress-activated pathways that interfere with the activity of FoxOs, or both.

ROS are widely recognized for their dual roles as both deleterious and beneficial, since they can be either harmful or beneficial to living systems, particularly by playing a physiological role in intracellular signaling and regulation as secondary messengers. In fact, depending on the type of antioxidants, intensity, and time of redox imbalance as well on the type of cells, oxidative stress can play a role in the regulation of important processes through the modulation of signal pathways, influencing synthesis of antioxidant enzymes, repair processes, inflammation, apoptosis, and cell proliferation [15]. The magnitude and duration of the stress as well as the cell type involved are important factors in determining which pathways are activated and the particular outcome reflects the balance between these pathways. The initiation and/proper functioning of several signal transduction pathways rely on the action of ROS as signaling molecules, which may act on different levels in the signal transduction cascade by causing reversible oxidations of proteins at cysteine residues [15]. Such reversible amino acid oxidations regulate ERKs, jun N-Terminal kinases, p38 MAPK, the Wnt/ β -catenin signaling pathway, as well as the activity of transcription factors including nuclear factor κ B (NF- κ B), and AP-1. ROS can thus play a very important physiological role as secondary messengers [15]. However, signaling via ROS is harmful as overproduction of reactive signal molecules may be destructive. Numerous diseases are known to involve oxidative stress, including cancer. The following paragraph evaluates the role of ROS in lung cancer.

3. ROS and lung cancer

A primary consequence of oxidative stress is lipid peroxidation, the end products of lipid peroxidation can lead to subsequent pathological consequences, particularly in lung, through the rearrangement of the lipoperoxyl radical (ROO) [16]. Oxidative DNA damage by reactive oxygen species is also thought to contribute to carcinogenesis. In fact, it has been shown that ROS-induced DNA damage involves single- or double-stranded DNA breaks, purine, pyrimidine, or deoxyribose modifications, and DNA cross-links, DNA damage inducing either arrest or induction of transcription, induction of signal transduction pathways, replication errors, and genomic instability, all of which being linked to carcinogenesis. Various redox metals, due to their ability to generate free radicals, or non-redox metals, due to their ability to bind to critical thiols, also induce modifications to DNA bases, and enhanced lipid peroxidation, and changes in calcium and sulphhydryl homeostasis.

In addition to ROS, reactive nitrogen species (RNS), such as peroxynitrites and nitrogen oxides, have also been implicated in DNA damage. As previously described [17], oxidative damage and the induction of mutation in mitochondrial DNA may participate at multiple stages of the process of carcinogenesis, involving mitochondria-derived ROS, induction of mutations in mitochondrial genes, and possibly the insertion of mitochondrial genes into nuclear DNA. It also appears that alterations in the normal regulatory processes of cells may lead to cancer. It has also been reported

that excessive amounts of NO increase apoptosis in some tumor cells, whereas lower amounts increase the vascularity and protect the cell from apoptosis [2], particularly in lung cancer. Because of its interface with the environment, the lung is a major target organ for injury by exogenous oxidants such as environmental pollutants and endogenous ROSs generated by inflammatory cells. However, the mechanisms whereby oxidants exert their pathological effects on the lungs have been the focus of numerous studies and are still the subject of debate [18]. Cigarette smoke appears to be the main cause of lung cancer, even if genetically determined variations in the metabolism of tobacco-derived carcinogens influence the individual risk. It should also be noted that environmental tobacco smoke increases the risk of lung cancer in non-smokers. Cigarette smoke has been shown to induce chronic airway inflammation with accumulation and activation of leucocytes, producing high concentrations of ROS and NO. The damaging effects of NO derive from its reaction with ROS, modify protein function through nitridation or induce alteration in DNA. Long-term cigarette exposure also decreases plasma concentrations of numerous antioxidants [19].

A wide variety of other toxic substances such as asbestos, polycyclic aromatic carbohydrates, arsenic, and diesel emissions have also been identified as potential causes of lung cancer [20], even if their role appears to be less significant than exposure to cigarette smoke. Some of these carcinogens react covalently with DNA to cause oxidative damage, which can induce DNA breaks [20]. Activation of signaling pathways is another way in which oxidant pollutants may cause pathological responses in the lung. In fact, air pollutants and ROS can activate MAPK signaling, which may ultimately promote inflammation. It has also been shown that the chemically nearly inert gas radon, a ubiquitous natural air pollutant arising from radioactive decay of uranium-238, which is present throughout the Earth's crust, is recognized as a lung carcinogen [21].

Molecular genetic studies of lung cancer have also revealed multiple genetic and epigenetic changes such as DNA sequence alterations, copy number changes and aberrant promoter methylation. Gene mutations, such as molecular alterations in EGFR, Ras, p53, and molecular mechanisms, such as cytochrome-P, glutathione S-transferase, histone deacetylases and N-acetyltransferase, are thus involved in the pathogenesis and the increased risk of lung cancer in smokers as well as in non-smokers [22].

4. ROS and physical activity

To date, approximately 80 studies have been conducted investigating the effects of structured exercise training in patients following a diagnosis of cancer. Results showed that structured exercise training is a safe and well-tolerated therapeutic strategy associated with significant improvements in a broad range of cancer-related toxicities including fatigue, exercise capacity, and physical quality of life [23]. Physical activity (PA) is also associated with numerous health benefits, especially playing a role on the prevention of cancer, and may reduce the risk of lung cancer, even if the data are in debate [24]. Physical activity can be defined as bodily movement produced by skeletal muscles, resulting in a quantifiable level of energy expenditure. It is associated with daily living, work, and leisure-time activities. Leisure-time physical activity (LPA) is often characterized by short-term, intensive energy expenditure, whereas occupational physical activity (OPA) is more likely to occur over longer periods (e.g. hours) at lower rates of energy expenditure. Chronic OPA represents a form of oxidative stress to the organism and therefore can alter the balance between pro-oxidants and antioxidants [11]. Several pathways have been suggested by which physical activity can increase ROS production. The primary pathway involves electron leakage

from mitochondria during aerobic exercise, whereby there is an increase in oxygen flux, resulting in an increase in free radical production. Physical activity-associated physiological pathways such as those involved during muscle injury incorporating subsequent increased phagocytic activity, disruption to iron-containing proteins, and the production of xanthine oxidase can also result in increased oxidative stress [11]. Furthermore, auto-oxidation of catecholamines, which are released from the adrenal glands in greater quantities during physical activity, induces an increase in radical production. Similarly, heme proteins such as oxymyoglobin can undergo auto-oxidation as a result of exercise, thus leading to radical formation, especially that of superoxide. Aerobic physical activity is accompanied by an increased oxygen consumption, which may increase ROS activity. However, this phenomenon cannot occur with low PA intensity (under 60% VO_2max). In such case, antioxidant capacity is not overreached and ROS-induced damage does not appear [11]. Regular OPA increases antioxidant defenses in the skeletal muscle up-regulating SOD and glutathione peroxidase gene expression, thereby adapting stronger oxidative stresses. This adaptation may occur very quickly (about 5 min) after ROS production and seems to be specific to oxidative muscular fibers which are the main ROS production location during physical activity. Regular OPA also increases the activity of proteasome complex in the myocardium, and decreases the level of carbonylated proteins and other damaged proteins. Anaerobic physical activity can increase oxidative stress, such as xanthine and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase production, prostanoid metabolism, ischemia/reperfusion, and phagocytic respiratory burst activity, through a number of pathways through. Another source of ROS production during anaerobic physical activity arises from inflammation and cellular damage that often happen after traumatizing exercise such as impact sports and eccentric exercise. Iron liberation, from hemoglobin or ferritin, may amplify the inflammatory response and the oxidative stress. Antioxidant enzymes may be activated selectively during an acute bout of strenuous physical activity depending on the oxidative stress imposed on the specific tissues as well as the intrinsic antioxidant defense capacity [25].

While exhausting exercise is reported to increase DNA damage, moderate aerobic exercise does not increase, but rather alleviates oxidative damage [11]. Besides damaging DNA, ROS are able to stimulate inflammatory signal transduction pathways via activation of redox-sensitive transcription factors such as NF- κ B, which has been known to be involved in inflammation-associated carcinogenesis [6], a single bout of exercise accelerating NF- κ B activation. On the contrary, moderate PA induces antioxidant gene expression through activation of nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2, named Nrf2, which plays an important role in the expression of several antioxidants. Few studies have investigated the link between physical activity, oxidative stress and lung cancer. Examining the effects of supervised, moderate-intensity aerobic training on urinary markers of oxidative status in patients with post-surgical NSCLC, Jones et al. [5] noted a significant increase in F2-isoprostanes, which reflect the pro-oxidant-antioxidant balance or the constitutive level of ROS within tissues, in patients with stage I–III NSCLC. However, Allgayer et al. [26] reported that short-term moderate intensity exercise significantly reduced urinary excretion of 8-oxo-dG, a marker of oxidative damage to DNA, in colorectal cancer patients after the completion of primary adjuvant therapy. As suggested by Jones et al. [6], the explanations for these contrasting findings are not known but are likely to reflect differences in exercise prescription (i.e. duration, frequency, intensity, and program length) and study population. Further studies are required to elucidate the complex relationship between physical activity, oxidative stress, and tumor biology, in animal and human models of cancer.

5. Lung cancer and physical activity

5.1. Primary prevention

Distinct measures of primary prevention have been investigated to reduce the risk reductions of morbidity and mortality caused by lung cancer. In fact, physical activity might influence the risks for cancers at several sites, and the evidence is most consistent for colon cancer, pancreatic cancer, endometrial cancer and prostate cancer [27]. However, little is known about whether physical activity is associated with similar risk reductions in lung cancer [4,6]. Moreover, the efficacy of physical training on lung cancer risk is debatable, and is principally studied in males [28]. For example, Colbert et al. [28] reported no relationship between OPA or LPA and lung cancer risk in male smokers. On the contrary, Thune et al. [29] noted that LPA, using 4 intensity categories, consisting of low (sedentary, low, or inactive), moderate (moderate, medium, or moderately vigorous), high (frequent exercise, high, vigorous, or heavy), and very high category, had a protective effect on lung cancer risk in men only. In the same study, no association between physical activity and lung cancer risk was observed among women. An energy expenditure of 12,600 kJ wk^{-1} (achievable by 6–8 h of at least moderate-intensity physical activity), significantly reduces the risk of lung cancer in males, whether they were non-smokers (83%), current smokers of less than 20 cigarettes d^{-1} (8%), or current smokers of more than 20 cigarettes d^{-1} (8%) compared to less active males [30]. Using a longitudinal study for almost 20 years, Sinner et al. [31] showed that PA at a moderate or vigorous intensity is related to a decreased risk of lung cancer in older women, independently of smoking status, pack-years of smoking, and other confounders. Performing a meta-analysis, Sun et al. [32] suggest that high and medium levels of physical activity have a beneficial effect on lung cancer by reducing the overall risk of tumor development among both men and women. In general, there might be different effects on cancer risk between occupational physical activity and leisure time physical activity, and it would be interesting to investigate in more details the possible various effects on lung cancer risk between occupational physical activity and leisure time physical activity on risk of lung cancer. Nevertheless, as previously described in the last chapter, PA can have different influences on carcinogenesis, depending on energy supply as well as strength and frequency of exercise loads. Moderate regular exercise induces cancer-preventive potential as well as other health-beneficial effects, whereas single exhaustive exercise may increase the risk of some cancer development [6]. One of the reasons for such controversy may be attributed to the degree of exercise-mediated oxidative stress, which differentially affects health.

Several mechanisms have been proposed to explain how OPA may reduce, especially, the risk of lung cancer [24]. It seems, in fact, that OPA increases cardiopulmonary function and perfusion, reducing the interaction time with the carcinogenic agents in the airways, although exposure to air pollutants might also increase with increased respiration. Another mechanism is the effect of exercise on the immune system. Immune function is enhanced with long-term moderate-intensity exercise through increases in the number and activity of macrophages, natural killer cells, as well as increased mitogen-induced lymphocyte proliferation rates. OPA also induced lower concentrations of insulin, glucose, and triglycerides and increased high-density lipoprotein cholesterol levels, these changes being in relation to decreased cancer risk. Another possibility is that higher levels of physical activity are associated with decreased insulin-like growth factor levels, increased IGF binding proteins (IGFBPs) and thus inhibit cellular mitosis. High levels of circulating IGF-1 were associated with an increased risk of lung cancer and high levels of IGFBP-3 with a decreased risk [33].

These mechanisms could operate separately or in combination and modify the risk for lung cancer among physically active individuals. In addition, there are protective effects resulting from body weight control and its effect on high blood pressure caused by physical activity.

There is also evidence that physical activity has positive effects on physiology, body composition, physical functions, psychological outcomes, and quality of life in patients during and after treatment for various cancers. Nevertheless, it should be noted that PA assessment in the majority of studies is obtained using questionnaires and interviews, and measured only once. Thus, it seems important in the future to use studies assessing physical activity at several time points throughout the follow-up period using a more comprehensive, objectively verifiable measure of daily physical activity, such as monitors (i.e. SenseWear Pro activity Monitor) as some studies do [34].

5.2. Secondary prevention

Lung cancer treatments, such as surgery, chemotherapy, radiation therapy cause local chronic inflammation, oxidative stress, and have deleterious effects on cardiopulmonary function, depending largely on the cardiopulmonary reserve of the patient, and the presence of co-morbid disease. More than in other cancers, this particular aspect can impair prognosis and survival related to eligibility for optimal therapy in a curative intent and adherence for treatment. In the field of pulmonary resection for cancer, surgery is the treatment of choice for low stage NSCLC (Stage I and II) and selected cases of metastatic disease [35]. Immediately after surgery, there is a dramatic fall in pulmonary function with a decrease of 40–50% of Forced Vital Capacity (FVC), Forced Expiratory Volume in 1 second (FEV1), and gas exchange capacity (DCO) [36]. Moreover, maximal oxygen consumption (VO_2max) has been shown to decrease to 73% of the preoperative values within 14 days after the surgery, this fall being the consequences of both ventilatory and circulatory limitations. After recovery, there is an average loss in spirometric values, DCO and VO_2 peak of respectively 15%, 15% and 13% after lobectomy and 32%, 27% and 28% after pneumonectomy [37].

Chemotherapy (CT), mainly based on cisplatinum regimen, is used for the large majority of patients with advanced lung cancer (Stage IV). It could be also associated before (neoadjuvant CT) and/or after surgery (adjuvant CT) in order to improve long-term survival. Studies have reported a 20% significant decrease of DCO after neoadjuvant CT, a low DCO being considered as a useful indicator of postoperative complications [38,39]. Nevertheless, relief in tumor obstruction after CT could improve spirometric performance [38].

Radiotherapy (RT) for lung cancer can also induce lung damage such as acute pneumonitis, a rare but life threatening complication, and fibrosis inducing a slight and progressive impairment of pulmonary function [40]. At a few months after RT, spirometric values do not significantly change. At the same time, a 14% decrease of DCO is observed [40]. At 2 years or more, a progressive decrease of 8% and 3.5% per year is observed in spirometric values and DCO respectively, fibrosis and increased stiffening of the lung being the explanation for these decreases [41]. The combination of CT and RT, the standard of treatment in locally advanced lung cancer (Stage III), exacerbates the total lung capacity and DCO decrease in the large majority of patients. It has been shown a 0.8% and 1% decline of total lung capacity and DCO respectively for each 1% lung volume receiving $>20\text{ Gy}$ [42].

In recent years, some studies have demonstrated the importance of PA before treating lung cancer, reporting significant improvements in exercise capacity immediately following an exercise program [4]. In conjunction with aerobic training, some studies also

included a component of resistance training and stretching exercise [43]. In general, as reported by Bobbio et al. [43], short-term preoperative pulmonary rehabilitation could improve the exercise capacity of patients who are candidates for lung resection for NSCLC cancer.

Exercise intervention after treatment for patients with NSCLC has also been investigated. The magnitude of improvement in exercise capacity following intervention was inconsistent among studies [11]. The controversial data can be explained by the varied duration of intervention proposed (ranging from 4 to 14 weeks), the time from treatment to beginning of PA intervention, and the varied type of treatment participants had undertaken (surgery, chemotherapy and or radiotherapy) [8]. Generally speaking, exercise intervention focused on aerobic cardiovascular training performed at a moderate to high intensity during 4–14 weeks, each session lasting 10–45 min. Programs also included resistance training of moderate intensity (i.e. 60–80% one repetition maximum) using free active exercises or machines for 30–60 min/session [44,45]. However, as far as we know, the comparison of the beneficial effects of aerobic training to those of resistance training has only been investigated by Jones et al. [44], using an RCT in patients with stage I to III NSCLC following surgical intervention, the results not yet published. The optimal intensity, duration, frequency or type of exercise has also not been investigated yet and requires further investigations.

6. Nutrition and lung cancer

Besides the specific role of PA in primary and secondary prevention of lung cancer, many studies have focused on the effect of nutrition in modifying the risk of this pathology. It appears that a high consumption of fruits and vegetables can be an important element of primary prevention [46]. In fact, through the several potentially beneficial antioxidants, fibers, minerals, and phytochemicals fruits and vegetables contain, they may help prevent cancer and contribute to maintenance of a healthy weight. Many of these compounds inhibit phase I carcinogen-metabolizing enzymes, induce phase II detoxification enzymes, enhance the immune system, and modulate circulating hormone concentrations. On the contrary, β -carotene was associated with an increased lung cancer incidence in large randomized studies, most likely because of negative interaction with cigarette smoke [47].

Taking into account research on the effect of substances with antioxidant power that may reduce oxidative DNA damage and thereby protect against cancer, many studies have focused on flavonoids [48]. However, the results are debatable, a small protective effect of flavonoid consumption (especially at high doses) against the development of lung cancer being reported, although not all studies confirmed this [48]. Moreover, the collective evidence available so far from observational epidemiological studies on tea, flavonoids, and lung cancer risk tends toward a small beneficial association for green and black tea, particularly among never-smokers, and for flavonols/flavones but not for catechins. Nevertheless, some studies as those of Smith-Warner et al. [49] reported a protective effect of fruit and vegetables on lung cancer risk among current smokers only, antioxidants from vegetables and fruits reducing the oxidative stress caused by smoking.

Several studies have also analyzed the potential benefits of fruits and vegetables on different subtypes of lung tumors, lung tumors being divided into 2 groups; Kreyberg I (comprising small-cell carcinomas, squamous cell carcinomas, and large-cell carcinomas) and Kreyberg II (adenocarcinomas) [50]. However, the data are subject to debate. Indeed, Skuladottir et al. [51] noted a protective effect for fruits on squamous cell carcinomas, and an inverse association for vegetables on small-cell carcinomas. On the contrary, Liu et al.

[50] reported no relationship between the intake of fruits and vegetables and any histological subtype of lung cancer. It also appears that a combination of vegetables and fruit consumption and LPA has a more beneficial protective effect on lung cancer among current smokers than among former or never-smokers in males [52]. Therefore, smoking, due its high effect on lung cancer, is a strong confounder in associations between fruit and vegetable consumption and lung cancer risk.

Beside the specific effect of vegetables and fruits on lung cancer, red meat intake seems to be implicated in the pathway of carcinogenesis, through the carcinogenic product resulting during high-temperature cooking, and the endogenous formation of mutagens from heme present in meat. However, the data are subject to debate, and seem to be related to gender. In fact, in a recent study, Taveska et al. [53] reported that a high intake of red and processed meat increased the risk of lung carcinoma in men. On the contrary, no risk was observed in women with processed meat intake.

In summary, the literature suggested that, ingestion of vitamin E, vitamin C, vitamin A, polyunsaturated fatty acids, calcium, magnesium, and green tea seem to have protective effects on lung cancer risk. On the contrary, dietary folate and red meat may increase this risk [7]. Nevertheless, as suggested by Koutsokera et al. [34], smoking remains the predominant risk factor for lung cancer, and public health efforts should continue to focus on smoking prevention as a means of reducing the incidence and mortality of lung cancer.

The role of nutrition in the outcome of surgery for lung cancer has been addressed in only a few studies, malnutrition impairment being reported to increase the risk of developing postoperative complications [54]. Moreover, impaired nutrition is an important predictor of perioperative complications in lung cancer patients, and preoperative chemoradiotherapy (CRT) increases the risk of such complications [55]. However, induction CRT before surgical resection is sometimes proposed for locally advanced NSCLC [54]. Malnutrition is also reported as the common cause of immunodeficiency, and it appears that preoperative immunonutrition may improve the perioperative nutritional status after induction chemoradiotherapy in patients undergoing lung cancer surgery, and reduce the severity of postoperative complications [54]. However further studies are needed to confirm these results. Recently, Kawai et al. [56] have also reported that some biomarkers, such as low serum prealbumin level in the perioperative period, are associated with a poorer prognosis in NSCLC patients and could serve as a marker for identifying patients at high risk, even at an early clinical stage.

7. Perspectives

Oxidative mechanisms play a role in the initiation, promotion and progression of carcinogenesis. The past decade has witnessed an increase in clinical and research interest in the role of exercise on the incidence of lung cancer and following a cancer diagnosis. It appears that physical activity is a safe and feasible supportive intervention to improve symptom control and cardio-respiratory fitness in cancer patients with early-stage disease either during or following the completion of adjuvant therapy [5]. However, the optimal intensity, duration, frequency or type of exercise have also not been yet investigated and require more investigations, especially as physical activity can have different influences on carcinogenesis, depending on energy supply, strength and frequency of exercise loads as well as the degree of exercise-mediated oxidative stress. In fact, physical activity is associated with high increased ROS generation, this phenomenon not occurring with low exercise intensity. Moreover, there is growing evidence that ROS are signaling molecules. In this way, ROS may serve as messenger molecules

to activate adaptive responses, such as redox-sensitive NF- κ B signaling, which enhance gene expression of antioxidant enzymes in oxidatively stressed skeletal muscle. Therefore, further studies are required to elucidate the complex relationship between physical activity, oxidative stress and lung cancer in animal and human models of cancer. Since the antioxidant defense system is of vital importance in the protection against oxidative stress and depends in part upon dietary intake, the development of controlled clinical assays could be justified for evaluating the usefulness of diets and/or antioxidant supplements as a complement to the recommendation to practice physical activity at a primary and secondary prevention.

Conflict of interest statement

The authors have no conflicts of interest to declare.

Acknowledgement

The authors thank Mrs Martine Collomb for her writing assistance.

References

- [1] Behrend L, Henderson G, Zwacka RM. Reactive oxygen species in oncogenic transformation. *Biochem Soc Trans* 2003;31:144–244.
- [2] Masri F. Role of nitric oxide and its metabolites as potential markers in lung cancer. *Ann Thorac Med* 2010;5:123–7.
- [3] Okumura N, Yoshida H, Kitagishi Y, Nishimura Y, Iseki S, Matsuda S. Against lung cancer cells: to be or not to be: that is the problem. *Lung Cancer Int* 2012. <http://dx.doi.org/10.1155/2012/659365>.
- [4] Granger CL, McDonald CF, Berney S, Chao C, Denehy L. Exercise intervention to improve exercise capacity and health related quality of life for patients with non-small cell lung cancer: a systematic review. *Lung Cancer* 2011;72:139–53.
- [5] Jones LW, Eves ND, Spasojevic I, Wang F, Liyasova D. Effects of aerobic training on oxidative status in postsurgical non-small cell lung cancer patients: a pilot study. *Lung Cancer* 2011;72:45–51.
- [6] Na HK, Olinyk S. Effects of physical activity on cancer prevention. *Ann N Y Acad Sci* 2011;1229:176–83.
- [7] Key TJ, Schatzkin A, Willett WC, Allen NE, Spencer EA, Travis RC. Diet, nutrition and the prevention of cancer. *Public Health Nutr* 2004;7:187–200.
- [8] Matzi V, Lindenmann J, Muench A, Greiberger J, Juan H, Wintersteiger R, et al. The impact of preoperative micronutrient supplementation in lung surgery. A prospective randomized trial of oral supplementation of combined α -ketoglutaric acid and 5-hydroxymethylfurfural. *Eur J Cardiothorac Surg* 2007;32:776–82.
- [9] Yang HT, Chao PC, Yin MC. Riboflavin at high doses enhances lung cancer cell proliferation, invasion, and migration. *J Food Sci* 2013;78:343–9.
- [10] Halliwell B, Gutteridge J. Free radicals in biology and medicine. 4th ed. Oxford: Oxford University; 2007.
- [11] Finaud J, Lac G, Filaire E. Oxidative stress: relationship with exercise and training. *Sports Med* 2006;36:327–58.
- [12] Alfonso V, Champy R, Mitrovic D, Collin P, Lomri A. Reactive oxygen species and superoxide dismutases: role in joint diseases. *J Bone Spine* 2007;74:324–9.
- [13] Dekkers JC, van Doornen LJ, Kemper HC. The role of antioxidant vitamins and enzymes in the prevention of exercise-induced muscle damage. *Sports Med* 1996;21:213–38.
- [14] Crohns M. Antioxidants, cytokines and markers of oxidative stress in lung cancer: associations with adverse events, response and survival. 1st ed. Saarbrücken: Lambert Academic Publishing; 2010.
- [15] Kousteni S. FoXOs: unifying links between oxidative stress and skeletal homeostasis. *Curr Osteoporos Rep* 2011;9:60–6.
- [16] Kryston TB, Georgiev AB, Pissis P, Georgakilas AG. Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis. *Mutat Res* 2011;711:193–201.
- [17] Penta JS, Johnson FM, Wachsmann JT, Copeland WC. Mitochondrial DNA in human malignancy. *Mutat Res* 2001;488:119–33.
- [18] Cienciewicz J, Trivedi S, Kleeberger SR. Oxidants and the pathogenesis of lung diseases. *J Allergy Clin Immunol* 2008;122:456–70.
- [19] Yanbaeva DG, Dentener MA, Creutzberg EC, Wesseling G, Wouters EF. Systemic effects of smoking. *Chest* 2007;131:1557–66.
- [20] Wise SS, Holmes AL, Wise Sr JP. Hexavalent chromium-induced DNA damage and repair mechanisms. *Rev Environ Health* 2008;23:39–57.
- [21] Subramanian J, Govindan R. Lung cancer in never smokers: a review. *J Clin Oncol* 2007;25:561–70.
- [22] Planchard D, Domont J, Taranchon E, Monnet I, Tredaniel J, Caliendo R, et al. The NER proteins are differentially expressed in ever smokers and in never smokers with lung adenocarcinoma. *Ann Oncol* 2009;20:1257–63.

- [23] Jones LW, Liang Y, Pituskin EN, Battaglini CL, Scott JM, Hornsby WE, et al. Effect of exercise training on peak oxygen consumption in patients with cancer: a meta-analysis. *Oncologist* 2011;16:112–20.
- [24] Lee IM, Sesso HD, Paffenbarger Jr RS. Physical activity and risk of lung cancer. *Int J Epidemiol* 1999;28:620–5.
- [25] Thirumalai T, Theresa SV, Elumalai EK. Intense and exhaustive exercise induce oxidative stress in skeletal muscle. *Asian Pac J Trop Dis* 2011;1:63–6.
- [26] Allgayer H, Owen RW, Nair J, Spiegelhalter B, Streit J, Reichel C, et al. Short-term moderate exercise programs reduce oxidative DNA damage as determined by high-performance liquid chromatography–electrospray ionization–mass spectrometry in patients with colorectal carcinoma following primary treatment. *Scand J Gastroenterol* 2008;43:971–8.
- [27] Wolin KY, Yan Y, Colditz GA, Lee IM. Physical activity and colon cancer prevention: a meta-analysis. *Br J Cancer* 2009;100:611–6.
- [28] Colbert LH, Hartman TJ, Tangrea JA, Pietinen P, Virtamo J, Taylor PR, et al. Physical activity and lung cancer risk in male smokers. *Int J Cancer* 2002;98:770–3.
- [29] Thune I, Lund E. The influence of physical activity of lung-cancer risk: a prospective study of 81,516 men and women. *Int J Cancer* 1997;70:57–62.
- [30] Lee IM, Paffenbarger Jr RS. Physical activity and its relation to cancer risk: a prospective study of college alumni. *Med Sci Sports Exerc* 1994;26:831–7.
- [31] Sinner P, Folsom AR, Harnack L, Eberly LE, Schmitz KH. The association of physical activity with lung cancer incidence in a cohort of older women: the Iowa Women's Health Study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006;15:2359–63.
- [32] Sun JY, Shi L, Gao XD, Xu SF. Physical activity and risk of lung cancer: a meta-analysis of prospective cohort studies. *Asian Pac J Cancer Prev* 2012;13:3143–7.
- [33] Mao Y, Pan S, Wen SW, Johnson KC. Physical activity and the risk of lung cancer in Canada. *Am J Epidemiol* 2003;158:564–75.
- [34] Koutsokera A, Kiaga M, Saif MW, Souliotis K, Syrigos KN. Nutrition habits, physical activity, and lung cancer: an authoritative review. *Clin Lung Cancer* 2013;14:342–50.
- [35] Kaifi JT, Gusani NJ, Deshaies I, Kimchi ET, Reed MF, Mahraj RP, et al. Indications and approach to surgical resection of lung metastases. *J Surg Oncol* 2010;102:187–95.
- [36] Filaire M, Bailly P, Chadeyeras JB, Galvaing G, Naamee A, Aubreton S, et al. Evolution of the early respiratory function after lung resection for cancer. *Rev Pneumol Clin* 2009;65:85–92.
- [37] Nezu K, Kushibe K, Tojo T, Takahama M, Kitamura S. Recovery and limitation of exercise capacity after lung resection for lung cancer. *Chest* 1998;113:1511–6.
- [38] Leo F, Solli P, Spaggiari L, Veronesi G, De Braud F, Leon ME, et al. Respiratory function changes after chemotherapy: an additional risk for postoperative respiratory complications? *Ann Thorac Surg* 2004;77:260–5.
- [39] Margaritora S, Cesario A, Cusumano G, Cafarotti S, Corbo GM, Ferri L, et al. Is pulmonary function damaged by neoadjuvant lung cancer therapy? A comprehensive serial time-trend analysis of pulmonary function after induction radiochemotherapy plus surgery. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2010;139:1457–63.
- [40] Allen AM, Henning GT, Ten Haken RK, Hayman JA, Martel MK. Do dose-volume metrics predict pulmonary function changes in lung irradiation? *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2003;55:921–9.
- [41] Abratt RP. Long term changes in pulmonary function tests after definitive irradiation for lung cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2004;58:1008–9.
- [42] Gopal R, Starkschall G, Tucker SL, Cox JD, Liao Z, Hanus M, et al. Effects of radiotherapy and chemotherapy on lung function in patients with non-small-cell lung cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2003;56:114–20.
- [43] Bobbio A, Chetta A, Ampollini L, Primomo GL, Internullo E, Carbognani P, et al. Preoperative pulmonary rehabilitation in patients undergoing lung resection for non-small cell lung cancer. *Eur J Cardiothorac Surg* 2008;33:95–8.
- [44] Jones LW, Eves ND, Kraus W, Potti A, Crawford J, Blumenthal JA, et al. The lung cancer exercise training study: a randomized trial of aerobic training, resistance training, or both in postsurgical lung cancer patients: rationale and design. *BMC Cancer* 2010. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2407-10-155>.
- [45] Peddle-McIntyre CJ, Bell G, Fenton D, McCargar L, Courneya KS. Feasibility and preliminary efficacy of progressive resistance exercise training in lung cancer survivors. *Lung Cancer* 2012;75:126–32.
- [46] Khan MM, Goto R, Kobayashi K, Suzumura S, Nagata Y, Sonoda T, et al. Dietary habits and cancer mortality among middle aged and older Japanese living in Hokkaido, Japan by cancer site and sex. *Asian Pac J Cancer Prev* 2004;5:58–65.
- [47] Holick CN, Michaud DS, Stolzenberg-Solomon R, Mayne ST, Pietinen P, Taylor PR, et al. Dietary carotenoids, serum beta-carotene, and retinol and risk of lung cancer in the alpha-tocopherol, beta-carotene cohort study. *Am J Epidemiol* 2002;156:536–47.
- [48] García-Tirado J, Rieger-Reyes C, Saz-Peiro P. Effects of flavonoids in the prevention of lung cancer: systematic review. *Med Clin* 2012;139:358–63.
- [49] Smith-Warner SA, Spiegelman D, Yaun SS, Albanes D, Beeson WL, van den Brandt PA, et al. Fruits, vegetables and lung cancer: a pooled analysis of cohort studies. *Int J Cancer* 2003;107:1001–11.
- [50] Liu Y, Sobue T, Otani T, Tsugane S. Vegetables, fruit consumption and risk of lung cancer among middle-aged Japanese men and women: JPHC study. *Cancer Causes Control* 2004;15:349–57.
- [51] Skuladottir H, Tjoenneland A, Overvad K, Stripp C, Christensen J, Raaschou-Nielsen O, Olsen JH. Does insufficient adjustment for smoking explain the preventive effects of fruit and vegetables on lung cancer? *Lung Cancer* 2004;45:1–10.
- [52] Yun YH, Lim MK, Won YJ, Park SM, Chang YJ, Oh SW, et al. Dietary preference, physical activity, and cancer risk in men: national health insurance corporation study. *BMC Cancer* 2008. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2407-8-366>.
- [53] Tasevska N, Sinha R, Kipnis V, Subar AF, Leitzmann MF, Hollenbeck AR, et al. A prospective study of meat, cooking methods, meat mutagens, heme iron, and lung cancer risks. *Am J Clin Nutr* 2009;89:1884–94.
- [54] Uy KL, Darling G, Xu W, Yi QL, De Perrot M, Pierre AF, et al. Improved results of induction chemoradiation before surgical intervention for selected patients with stage IIIA–N2 non-small cell lung cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2007;134:188–93.
- [55] Shintani Y, Ikeda N, Matsumoto T, Kadota Y, Okumura M, Ohno Y, et al. Nutritional status of patients undergoing chemoradiotherapy for lung cancer. *Asian Cardiovasc Thorac Ann* 2012;20:172–6.
- [56] Kawai H, Ota H. Low perioperative serum prealbumin predicts early recurrence after curative pulmonary resection for non-small-cell lung cancer. *World J Surg* 2012;36:2853–7.



Disponible en ligne sur
ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France
EM|consulte
www.em-consulte.com



NOTE BRÈVE

Activité physique spontanée et qualité de vie des patients atteints d'un cancer du poumon, en attente d'une résection pulmonaire



Spontaneous physical activity and quality of life among patients with lung cancer awaiting for lung resection

C. Dupuis^a, M. Filaire^{a,b}, E. Filaire^{c,*}

^a Unité de nutrition humaine, université d'Auvergne, UMR 1019, BP 10448, 63000 Clermont-Ferrand, France

^b Service de chirurgie thoracique, centre Jean-Perrin, BP 392, 63011 Clermont-Ferrand, France

^c Laboratoire CIAM5, EA4532, université Paris-Sud, université Orléans, 2, allée du Château, 45067 Orléans cedex, France

Reçu le 28 avril 2014 ; accepté le 29 septembre 2014

Disponible sur Internet le 4 novembre 2014

MOTS CLÉS

Cancer du poumon ;
Activité physique ;
Qualité de vie

Résumé

Introduction. — Cette étude avait pour objectif d'évaluer l'activité physique spontanée, la qualité de vie (incluant la fatigue et la qualité de sommeil) et l'état de dépression des patients atteints du cancer du poumon non à petites cellules en attente de résection pulmonaire afin d'évaluer leur éligibilité à un programme d'entraînement adapté.

Sujets et méthodes. — Trente-sept patients (âge = 63,8 ± 2,1 ans) atteints d'un cancer du poumon non à petites cellules ont été évalués sept jours avant résection pulmonaire, sur leur niveau d'activité physique spontanée durant 3 jours à l'aide d'un Armband (SenseWear®), sur leur qualité de vie (EORTC-C30 et EORTC-LC13) et leur état de dépression (Beck Depression Inventory).

Conclusions. — Le résultat majeur de notre étude montre que les patients atteints d'un cancer du poumon non à petites cellules à un stade précoce présentent une qualité de vie satisfaisante et l'absence de symptôme dépressif prégnant. Ces patients sont éligibles à des programmes d'entraînement physiques adaptés pour une prise en charge chirurgicale optimale de leur pathologie.

© 2014 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : edith.filaire@univ-orleans.fr (E. Filaire).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.scispo.2014.09.003>

0765-1597 / © 2014 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

KEYWORDS

Lung cancer;
Physical activity;
Quality of life

Summary

Introduction. – The aim of this study was to evaluate spontaneous physical activity, quality of life, including fatigue and sleep quality, and depression state, among patients with lung cancer waiting for a lung resection and to evaluate their eligibility to a physical training program.

Subjects and methods. – The level of spontaneous physical activity was evaluated 7 days before lung resection by wearing a SenseWear Armband® during 3 days among 37 patients (mean age = 63.8 ± 2.1 years) suffering for a non-small cell lung cancer. Quality of life and depression were respectively evaluated with EORTC-C30, EORTC-LC13, and Beck Depression Inventory questionnaires.

Conclusions. – The main result shows that patients with early stage of non-small cells lung cancer have a good quality of life and an absence of depressive symptoms. These patients are eligible for physical training programs suitable for making optimal surgical management of their disease.

© 2014 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Introduction

Le cancer du poumon est la première cause de décès par cancer dans le monde [1]. Le tabagisme est son facteur de risque principal. Par ailleurs, des facteurs génétiques, hormonaux mais aussi environnementaux comme le niveau d'activité physique (AP) et la nutrition semblent jouer un rôle prépondérant [2]. Concernant l'AP, des études utilisant des programmes en endurance ou en résistance ont déjà mis en évidence son impact positif sur la qualité de vie, sur des paramètres cardiovasculaires, respiratoires et sur l'humeur du patient atteint de cancer, en particulier du poumon non à petites cellules (CNPC) [1–3]. Néanmoins, à notre connaissance, aucune étude n'a mesuré l'activité physique spontanée des patients en attente de résection pulmonaire ainsi que leur état de dépression, afin d'évaluer leur éligibilité à un programme d'entraînement physique préopératoire. L'objectif de notre étude était donc d'évaluer l'AP spontanée, la qualité de vie et l'état de dépression de patients atteints d'un cancer du poumon en attente d'une résection pulmonaire.

2. Protocole expérimental

2.1. Sujets

Trente-sept patients (9 femmes et 28 hommes) éligibles à une résection pulmonaire de type lobectomie ou pneumonectomie pour une lésion pulmonaire suspecte ou un cancer du poumon prouvé ont participé à cette étude. Le recrutement des sujets a été réalisé lors de consultations chirurgicales préopératoires. Durant cette consultation, le protocole leur était expliqué et un consentement était recueilli. Le protocole a été réalisé en suivant les recommandations de la déclaration d'Helsinki.

2.1.1. Caractéristiques de la population

Le poids (kg), la taille (cm) et l'indice de masse corporelle (IMC) (kg/m^2) des patients ont été évalués. Le statut

socioprofessionnel, les antécédents médico-chirurgicaux, la consommation tabagique, la réalisation d'un traitement anticancéreux préalable (radiothérapie et/ou chimiothérapie) et la prise de médicaments psychotropes ont été notés lors de l'interrogatoire médical.

Des tests d'évaluation globale de la fonction respiratoire ont été réalisés : volume expiratoire maximal par seconde en pourcentage de la théorique (VEMS%), capacité de diffusion du monoxyde de carbone en pourcentage de la théorique (DLCO%), et le rapport VEMS/capacité vitale forcée (CVF).

2.2. Mesure de l'activité physique spontanée

L'activité physique spontanée des patients a été évaluée au moyen de l'appareil SenseWear® Armband (SMT Medical, Würzburg, Allemagne) sur trois jours, l'enregistrement de l'AP s'effectuant 23 h/24 h. Les données étaient traitées à l'aide du logiciel SenseWear Professional de BodyMedia® permettant d'évaluer la dépense énergétique totale (DET) (kcal), le nombre d'heures passées à réaliser une activité physique inférieure ou supérieure à 3 MET, et la durée du sommeil (heures). Cet appareil permet de collecter les signaux physiologiques en continu à un taux de 32 enregistrements à la seconde.

2.3. Qualité de vie

La qualité de vie a été évaluée par le questionnaire spécifique au cancer : l'EORTC-QLQ-C30 validé en français [4] et son module spécifique au cancer du poumon, l'EORTC-LC13 [5] composé de 13 items permettant de mesurer les symptômes spécifiques au cancer du poumon. Pour le QLQ-C30, un score élevé à l'échelle de santé générale représente un haut niveau de qualité de vie. Pour le module LC13, un score élevé signifie une prévalence importante des symptômes. Ces deux tests font références à la pathologie du cancer du poumon [6].

Tableau 1 Caractéristiques de la population d'étude (moyenne $\pm$ erreur standard).

	Patients (n=37)
Hommes et femmes (nombre)	28/9
Âge (ans)	63,76 $\pm$ 1,5
Taille (cm)	1,69 $\pm$ 0,01
Poids (cm)	74,50 $\pm$ 2,40
IMC (kg/m ²)	26,00 $\pm$ 0,75
VEMS (% théorique)	83,49 $\pm$ 3,10
VEMS/CVF	70,78 $\pm$ 2,16
DCO (% théorique)	73,69 $\pm$ 3,20
Albuminémie	42,60 $\pm$ 0,79
Stade BPCO (GOLD)	
Non classé	n=2
Pas de BPCO	n=27
Stade I	n=2
Stade II	n=4
Stade III	n=2
Statut fumeur	
Jamais	n=5
Ancien fumeur	n=29
Fumeur	n=3
Traitement néo-adjuvant	
Chimiothérapie (C)	n=7
Radiothérapie (R)	n=2
C+R	n=2
Sans traitement néo-adjuvant	n=26

VEMS : volume expiratoire maximale par seconde ; CVF : capacité vitale forcée ; IMC : indice de masse corporelle ; DCO : capacité de diffusion de l'oxyde de carbone ; BPCO : broncho-pneumopathie chronique obstructive ; GOLD : Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease [9].

2.4. Dépression

La dépression a été mesurée par l'intermédiaire du Beck Depression Inventory (BDI) [7], dans sa version validée en français par Pichot et al. [8]. Ce questionnaire permet de déterminer quatre stades de dépression : pas de dépression, dépression légère, dépression modérée et dépression sévère en fonction du score obtenu.

2.5. Analyses statistiques

Les données ont été exprimées en moyennes et erreurs standard (ES) et traitées au moyen du logiciel SPSS version 17.1. Les corrélations entre le niveau d'AP et les différents items de qualité de vie et la dépression ont été effectuées par l'intermédiaire du test de Pearson. Le seuil de significativité a été fixé à $p < 0,05$.

3. Résultats

3.1. Caractéristiques de la population

Le Tableau 1 présente les caractéristiques de la population.

Les valeurs sub-normales de VEMS, DCO et du ratio VEMS/CVF témoignent de l'absence de broncho-pneumopathie obstructive (BPCO) chez plus de 70% des

Tableau 2 Scores obtenus à certains items de l'EORTC (moyenne $\pm$ ES).

	Patients (n=37)
Qualité de vie (/100)	71,86 $\pm$ 3,09
Fatigue (/100)	20,71 $\pm$ 4,52
Douleur (/100)	19,37 $\pm$ 3,57
Dyspnée (/100)	18,00 $\pm$ 4,20
Insomnie (/100)	49,55 $\pm$ 6,79
Douleur au bras ou à l'épaule (/100)	17,12 $\pm$ 4,59
Autres douleurs (/100)	21,62 $\pm$ 5,20

patients. D'après la classification de GOLD (Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease), 22% des les patients évalués avaient une BPCO et légère pour la majorité d'entre eux selon GOLD [9].

3.2. Activité physique

La dépense énergétique totale journalière exprimée en kcal était de 2486,6 $\pm$ 63,4. Le temps à pratiquer une activité physique modérée (> 3 MET) était de 96,0 $\pm$ 15,0 minutes en moyenne par jour, celle correspondant à la pratique d'une activité sédentaire (< 3 MET) étant de 13,75 $\pm$ 0,54 heures en moyenne. Le temps de sommeil exprimé en heures était de 7,27 $\pm$ 0,28.

3.3. Qualité de vie

Le score de qualité de vie des patients est satisfaisant (Tableau 2).

3.4. Dépression

On note un score de 3,9 $\pm$ 0,5 à l'échelle de Beck correspondant à une légère dépression.

3.5. Corrélations entre le l'activité physique modérée et les paramètres de qualité de vie

Aucune corrélation n'est apparue entre le temps de pratique d'une activité physique modérée (> 3 MET) et l'échelle de Beck ou les items de qualité de vie hormis pour l'item « autres douleurs » ($r = 0,37$; $p = 0,02$).

4. Discussion

Le résultat majeur de notre étude montre que les patients atteints d'un CNPC à un stade précoce présentent une qualité de vie satisfaisante et l'absence de symptôme dépressif prégnant. Aucune corrélation n'apparaît entre le niveau d'AP spontanée et la qualité de vie. Nos résultats sont conformes aux dernières publications sur le sujet [10] et suggèrent que la majorité de ces patients sont éligibles à des programmes d'entraînement physiques adaptés pour une prise en charge chirurgicale optimale de leur pathologie.

Déclaration d'intérêts

Les auteurs déclarent ne pas avoir de conflits d'intérêts en relation avec cet article.

Remerciements

Les auteurs remercient la Ligue contre le Cancer pour leur soutien financier.

Références

- [1] Dhillon HM, van der Ploeg HP, Bell ML, Boyer M, Clarke S, Vardy J. The impact of physical activity on fatigue and quality of life in lung cancer patients: a randomised controlled trial protocol. *BMC Cancer* 2012;12:572.
- [2] Filaine E, Dupuis C, Galvaing G, Auberton S, Laurent H, Richard R, et al. What are the links with oxidative stress, physical activity and nutrition. *Lung Cancer* 2013;82(3):383–9.
- [3] Granger C, McDonald C, Bernier S, Chao C, Denolly L. Exercise intervention to improve exercise capacity and health related quality of life for patients with non-small cell lung cancer: a systematic review. *Lung Cancer* 2011;72:139–53.
- [4] Aaronson NK, Ahmedzai S, Bergman B, Bullinger M, Cull A, Duez NJ, et al. The European Organization for Research and Treatment of Cancer QLQ-C30: a quality-of-life instrument for use in international clinical trials in oncology. *J Natl Cancer Inst* 1993;85(5):365–76.
- [5] Bergman B, Aaronson NK, Ahmedzai S, Kaasa S, Sullivan M. The EORTC QLQ-LC13: a modular supplement to the EORTC core quality of life questionnaire (QLQ-C30) for use in lung cancer clinical trials. *Eur J Cancer* 1994;30(5):635–42.
- [6] Damm K, Roeske N, Jacob C. Health-related quality of life questionnaires in lung cancer trials: a systematic literature review. *Health Eco Rev* 2013;3:15.
- [7] Beck A. Depression, clinical experimental and theoretical aspects. New York: Harper & Row Publishers; 1967.
- [8] Pichot P, Boyer P, Pull C, Rein W, Simon M, Thibault A. Un questionnaire d'auto-évaluation de la symptomatologie dépressive : le QD 2. Construction, structure factorielle, propriétés métrologiques. *Rev Psychol Appl* 1984;3:229–50.
- [9] Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD 2014). Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. Updated; 2014. Available at: http://www.goldcopd.org/uploads/users/files/GOLD_Report_2014.pdf
- [10] Yılmaz E, Özalevli S, Ersöz H, Yağın A, Önen A, Akkoçlu A. Comparison of health-related quality of life and exercise capacity according to stages in patients with non-small cell lung cancer. *Türk Toraks* 2013;61(2):131–9.

Hindawi Publishing Corporation
Journal of Oncology
Volume 2016, Article ID 8162952, 11 pages
<http://dx.doi.org/10.1155/2016/8162952>



Research Article

Study of the Effects of Betaine and/or C-Phycocyanin on the Growth of Lung Cancer A549 Cells *In Vitro* and *In Vivo*

Rea Bingula,¹ Carmen Dupuis,¹ Chantal Pichon,² Jean-Yves Berthon,³
Marc Filaire,^{1,4} Lucie Pigeon,² and Edith Filaire^{1,5,6}

¹Unité Mède de Recherche 1019, Centre de Recherche en Nutrition Humaine Auvergne, Université d'Auvergne, 63000 Clermont-Ferrand, France

²CNRS UPR4301, Université Orléans, 45100 Orléans, France

³Greentech SA, Biopôle Clermont-Limagne, 63360 Saint-Beauzire, France

⁴Centre Jean Perrin, Service de Chirurgie Thoracique, 58 rue Montalembert, 63011 Clermont-Ferrand, France

⁵CIAMS, Université Paris-Sud, Université Paris-Saclay, 91405 Orsay Cedex, France

⁶CIAMS, Université d'Orléans, 45067 Orléans, France

Correspondence should be addressed to Edith Filaire; edith.filaire@univ-orleans.fr

Received 22 April 2016; Revised 27 June 2016; Accepted 31 July 2016

Academic Editor: James L. Mulshine

Copyright © 2016 Rea Bingula et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

We investigated the effects of betaine, C-phycocyanin (C-PC), and their combined use on the growth of A549 lung cancer both *in vitro* and *in vivo*. When cells were cotincubated with betaine and C-PC, an up to 60% decrease in viability was observed which is significant compared to betaine (50%) or C-PC treatment alone (no decrease). Combined treatment reduced the stimulation of NF- κ B expression by TNF- α and increased the amount of the proapoptotic p38 MAPK. Interestingly, combined treatment induced a cell cycle arrest in G₂/M phase for ~60% of cells. *In vivo* studies were performed in pathogen-free male nude rats injected with A549 cells in their right flank. Their daily food was supplemented with either betaine, C-PC, both, or neither. Compared to the control group, tumour weights and volumes were significantly reduced in either betaine- or C-PC-treated groups and no additional decrease was obtained with the combined treatment. This data indicates that C-PC and betaine alone may efficiently inhibit tumour growth in rats. The synergistic activity of betaine and C-PC on A549 cells growth observed *in vitro* remains to be further confirmed *in vivo*. The reason behind the nature of their interaction is yet to be sought.

1. Introduction

Lung cancer causes 28% of global cancer-related deaths and 15% of all diagnosed cancers [1]. It can be subdivided into two broad categories, small-cell lung cancer (SCLC) and non-small-cell lung cancer (NSCLC), the latter being the most common type [2]. The treatment of NSCLC includes surgery, radiotherapy, tyrosine kinase inhibitors, immunotherapy, and platinum-based chemotherapy [3]. With respect to chemotherapy, it appears that natural plant products play an important role, making a considerable contribution to approximately 60% of available chemotherapeutic cancer drugs [4].

The development and progression of cancer involve abnormal changes in DNA methylation which lead to the activation of certain protooncogenes, such as c-Myc, as well

as to the inactivation of certain tumour suppressors, such as p16 [5]. It seems that certain dietary components affect the process of carcinogenesis, through DNA methylation. In fact, it has been shown that folate, as methyl group donors, and riboflavin, vitamin B₆, and vitamin B₁₂, as cofactors in one-carbon metabolism, are associated with DNA synthesis and methylation and, hence, may play a role in carcinogenesis and cancer risk; DNA global hypomethylation is associated with lung cancer [6, 7]. Betaine (B) is another major methyl donor [8], which maintains normal DNA methylation patterns [9]. It is naturally found in a variety of food sources including sugar beet, wheat bran, spinach, shrimps, and many others [10]. Humans also obtain betaine from dietary choline, as the liver and kidney are able to oxidize choline into betaine in a two-step enzyme-dependent reaction [10, 11]. Betaine

is involved in the synthesis of methionine, which serves as a major supplier of cellular cysteine via a transsulfuration pathway for the synthesis of reduced glutathione that protects the cell from reactive oxygen species [12]. It plays a central role in choline-mediated one-carbon metabolism, cell membrane structural integrity and signalling functions, and neurotransmitter synthesis. Betaine appears to be safe at a daily intake of 9–15 g [12]. Subacute and subchronic rat studies determined that betaine is nontoxic at all doses studied (0–5% of the diet) [13]. Betaine has been inversely associated with the risk of breast cancer [14], nasopharyngeal carcinoma [15], and colorectal cancer [16] and was also shown to decrease lung cancer risk [8]. Moreover, betaine supplementation seems to attenuate oxidative stress [17] and to have an anti-inflammatory effect through NF- κ B modulation and antiangiogenic effects [18]. Some articles have shown that betaine is able to inhibit the growth of cancer cells *in vitro* [19, 20] by regulating the expression of protooncogenes and tumour suppressors by stabilizing their methylation patterns [5]. Kim et al. [21] also recently reported that the effects of betaine are linked to the suppression of NF- κ B and Akt signal pathways *in vitro* and *in vivo*.

In vivo, a decrease in markers of oxidative stress (thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), malondialdehyde (MDA)), conjugated dienes, carbonyl proteins, and nitrotyrosine was also noted by Basaran-Küçükgöçer et al. [22] following 6 weeks of betaine supplementation (2.5% of chow) in rats. In liver cancer, betaine has a protective effect against the deleterious effects of chemotherapy using cisplatin by limiting the decline of antioxidant enzymes (glutathione disulfide reductase, glutathione peroxidase, catalase, and superoxide dismutase), by eliminating the increase in TBARS concentrations and by attenuating the proinflammatory and apoptotic mediators [23].

Besides betaine, phycocyanin (C-PC) is a protein from the phycobiliprotein family characterized by its intense blue colour and a structure consisting of a protein and nonprotein component known as phycocyanobilin. It is regarded as an ideal food and drug resource, due to its rich protein, lipid, vitamin, mineral, chlorophyll, β -carotene, and polysaccharide content. C-PC can be safely added to food, cosmetics, and medicine, with more and more studies confirming that C-PC has many biological activities such as antioxidation, antimitation, antitumour, and antiviral activities, immunity stimulation, hepatoprotective, antiplatelet, and neuroprotective properties and the scavenging of free radicals [24, 25]. Depending on the source, C-PC is classified into three groups: C-PC (from cyanobacteria), R-PC (from red algae), and R-PCII (from *Synechococcus* species) [26].

It appears that C-PC inhibits HeLa cell growth *in vitro*, in a dose-dependent manner by preventing DNA replication [27]. C-PC may induce the apoptosis of colon cancer cell SW480 and laryngeal cancer cell HEP-2 though the mechanism remains unknown [28, 29]. Li et al. [30] have reported that C-PC is an ideal cancer prevention drug as it may inhibit the growth of cancer cells *in vivo* and *in vitro*. Thus, C-PC may become a good substitute for highly toxic conventional chemotherapeutic anticancer drugs in the future [31].

To our knowledge, no studies have investigated the effect of betaine and C-PC on the growth, cell cycle distribution, or apoptosis of A549 cells, human pulmonary epithelial cell line derived from a lung adenocarcinoma, using both an *in vitro* and *in vivo* approach. Therefore, we investigated whether separate or combined treatment with betaine and C-PC would produce an inhibitory effect on the growth of A549 cell line, through a decrease of cell viability and whether this treatment would have an effect on the inflammatory NF- κ B pathway. Secondly, we wanted to evaluate whether the combination of C-PC and betaine would influence the p38 MAPK pathway or the cell cycle, as reported in previous studies separately for each compound [18, 32, 33]. Finally, we evaluated the effect of betaine and C-PC on the A549 tumour growth *in vivo* after oral supplementation of nude rats over a 4-week period (following the injection of A549 cells and tumour establishment).

2. Materials and Methods

2.1. In Vitro Study

2.1.1. Treatment Substances. C-PC from *S. platensis* (a gift from Greentech SA, Clermont-Ferrand) in powder form was stored at 4°C protected from light. Both betaine (B2754, Sigma-Aldrich) and C-PC stock solutions were prepared in a phosphate buffer saline (PBS) (Sigma-Aldrich), filtered through a 0.2 μ m pore filter and manipulated in a sterile environment. A 10% betaine stock solution (840 mM) was kept at 4°C, while a C-PC stock solution was stored at –20°C and protected from light.

2.1.2. Cell Culture. A549 (ECACC Cell Lines) and A549/NF- κ B-Luc (Panomics (ref RC0002)) cell line (A549 cell line with NF- κ B inducible promoter for luciferase) of human non-small-cell lung adenocarcinoma were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (Sigma-Aldrich), supplemented with 10% Foetal Calf Serum (FCS) (PAA Laboratories), 1% GlutaMAX (Gibco), and 1% Penicillin/Streptomycin (Sigma) at +37°C in 5% CO₂ atmosphere.

2.1.3. Sample Preparation. The cells (10⁴ cell/well in 96-well plate for cell viability assay, 6·10⁴ cell/well in 24-well plate for all other analysis, 2·10⁵ cell/T25 flask, or 6-well plate for cell cycle analysis and western blot, resp.) were seeded in 100, 400, 5000, and 3000 μ L medium, respectively, and cultured overnight. The medium was then removed and different concentrations and combinations of C-PC and betaine solutions were added to the cells and incubated for 24 h and 48 h at +37°C in 5% CO₂ atmosphere.

2.1.4. Cell Viability Assay. Following betaine and/or C-PC treatment, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT; 20 μ L of 5 mg·mL^{–1} solution in PBS) was added to each well containing 100 μ L of medium. The cells were then incubated for 4 h at +37°C [34]. MTT converted to formazan was solubilized with acidic isopropanol. The absorbance was measured at 562 nm with a Victor

spectrophotometer (Victor 3V Multilabel Plate Reader, Perkin-Elmer).

2.1.5. Western Blot. Cells were washed three times for 5 min with cold PBS; 50 μ L of RIPA buffer (Sigma-Aldrich) with phosphatase and protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich) was added to each well. Plates were incubated for 30 min at +4°C with orbital shaking. The cells were scrubbed, and two well contents were pooled and centrifuged (10 min, 3000 $\times$ g, 4°C). Supernatants were stored at -20°C. On the day of analysis the samples were thawed; approximately 20 μ g of each sample (protein quantification kit—BC assays, Interchim, Montluçon Cedex, France) was denatured with Laemmli 5x (10 min, 85°C), loaded on the 12% polyacrylamide gel, and migrated at 130 V (SDS-PAGE) (Mini-PROTEAN® Tetra Cell Systems, Bio-Rad). The transfer to nitrocellulose membrane was done for 80 min under 90 V (Bio-Rad PowerPac HC Power). Following transfer, the membranes were washed once in TBST (tris-buffered saline with Tween 20) and blocked for 1 h in 5% solution of bovine serum albumin (BSA) (Sigma) in TBST. The membranes were washed in TBST three times for 5 min and incubated with agitation overnight at 4°C with primary antibody diluted in 5% BSA solution. After incubation, membranes were washed 3 times for 5 min in TBST and incubated with horseradish peroxidase (HRP)-coupled secondary antibody in 1% solution of dehydrated milk in TBST for 1 h at room temperature. The membranes were then washed three times for 5 min in TBST and two times in TBS. 3 mL of ECL™ Prime Western Blotting System (Sigma-Aldrich) was added to the membranes and incubated for 5 min. The blots were visualised by ChemiDoc™ XRS+ System with Image Lab™ Software (Bio-Rad). After visualisation of p38 MAPK, the membranes were incubated twice for 10 min with in-house dehybridization buffer, twice for 10 min with PBS, and twice for 5 min with TBST, and, after, the protocol was restarted from the blocking of the membrane for the final detection of the β -actin (incubation with the primary antibody was during 6 h on +4°C).

The actin band was detected on the same membrane as the p38 MAPK. The signal quantification was done using Image J software. The primary antibodies used were p38 MAPK rabbit anti-human polyclonal antibody (ADI-KAS-MA009-E, Enzo Life Sciences) 1:500 and beta-actin rabbit anti-human polyclonal antibody (PA1-183, Thermo Scientific) 1/1000. The secondary antibody used was goat anti-rabbit IgG (H+L), HRP conjugate (#32460, Thermo Scientific) 1/1000.

2.1.6. RLU (Relative Light Unit) Measurement. A549/NF- κ B-Luc cells treated for 24 h with betaine and/or C-PC were washed three times with PBS (Sigma-Aldrich), and DMEM without FBS was added along with human TNF α (Miltenyi Biotec) at final concentration of 25 ng·mL⁻¹ as an inducer of the NF- κ B pathway. Following 9 h incubation, cells were washed once in PBS, trypsinised, mixed with complete medium, and centrifuged for 7 min at 1500 $\times$ g and the dried pellet was stored at -80°C until the day of analysis. The samples were thawed and washed with 500 μ L PBS (5 min, 1500 $\times$ g). The pellet was resuspended in 300 μ L of Cell Culture Lysis buffer (Promega) with TritonX-100, vortexed

for 30 s, and incubated for 10 min at room temperature. Samples were centrifuged for 10 min at 3000 $\times$ g, 60 μ L of supernatant was put in the luminometer tubes on ice, and 100 μ L mixture of lysis buffer with 10 mM ATP was added to each tube. Luciferase activity was measured using a luminometer (LUMAT LB 9507), normalized to total cell protein using a BCA protein assay kit (protein quantification kit—BC assays, Interchim, Montluçon Cedex, France) and expressed as relative light units (RLU) per mg protein.

2.1.7. Cell Cycle Analysis. A549 were synchronized in G₁ phase following FBS deprivation followed by thymidine inhibition of DNA synthesis. Cells were first incubated 24 h in DMEM without FBS, followed by 24 h in complete medium with 5 mM thymidine. At that point cells were synchronized in G₁ phase and were then incubated with C-PC and/or betaine. Following 24 h, cells were collected by trypsinisation, an equal amount of cells from each condition was centrifuged (5 min 3000 $\times$ g), the pellet was gently resuspended in 300 μ L of PBS, mixed with 700 μ L of precooled 100% ethanol by gently inverting the tube, and stored at -20°C. On the day of analysis, the cells were pelleted (10 min, 5000 $\times$ g), ethanol was removed, and 500 μ L of PBS with 20 μ L of propidium iodide (50 mg·mL⁻¹, Becton Dickinson), 1 μ L of RNase (100 mg·mL⁻¹), and 0.01% of TritonX-100 were added. The suspension was transferred into FACS tubes (Falcon) and incubated for 30 min at room temperature protected from light. The samples were analysed by flow cytometry (Becton Dickinson FACSsort).

2.2. In Vivo Study: Tumour Rat Model

2.2.1. Cell Culture. A549 cells (ATOC® CCL185®, human lung cancer) were maintained in culture by Cellvax Pharma, in DMEM environment, 10% Foetal Bovine Serum (FBS), 5 mM L-Glutamine, and 1% Penicillin/Streptomycin. A549 cells were grown to a confluence of 80%. For injection, A549 cells were suspended in Matrigel (50:50).

2.2.2. Study Design. A total of thirty-four pathogen-free male nude rats (Charles River, France), weighing 239.8 $\pm$ 6 g, aged 6-7 weeks, were used for this study. All animal work procedures were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of Maisons-Alfort (France).

Animals were acclimated for one week before initiation of the study. The daily light cycle extended from 7 a.m. to 7 p.m. and room temperature was maintained at 21.6 $\pm$ 0.5°C. Throughout the study, rats were allowed to consume food and water ad libitum. Food contained 4% proteins and 3.9% fats, with the remainder being carbohydrates (A03, Society Safe diet, Augy, France). Rats were housed in individual cages.

Following acclimatization, 10⁷ A549 cells were subcutaneously injected into the right flank of the rats.

Ten days following tumour implantation and once mean tumour volumes (MTV) reached 500 mm³, all animals were randomly assigned to nonintervention control group (n = 8; MTV: 568.8 $\pm$ 98.9 mm³), betaine treatment group (n = 9; MTV: 568.5 $\pm$ 133.8 mm³), C-PC treatment group (n = 8;

$597.0 \pm 136.4 \text{ mm}^3$), and betaine + C-PC treatment group ($n = 8$; MTV: $703.4 \pm 111.3 \text{ mm}^3$).

2.2.3. Betaine Treatment. Betaine treatment was administered in drinking water and corresponded to 4% of the daily food intake ($2.93 \pm 0.3 \text{ g}$ by kg of body weight). Betaine supplementation was adjusted every two days, according to the food and water intake of each rat. The daily food, water, and betaine intakes were evaluated for each rat.

2.2.4. C-PC Treatment. C-PC treatment was administered in drinking water and corresponded to $370.0 \pm 0.03 \text{ mg}$ by kg of body weight. C-PC supplementation was adjusted every two days, according to the food and water intake of each rat. The daily food, water, and C-PC intakes were evaluated for each rat.

2.2.5. C-PC and Betaine Treatment. Betaine and C-PC supplementation was administered in drinking water and corresponded to 4% of the daily food intake for betaine and to $370.0 \pm 0.03 \text{ mg}$ by kg of body weight for phycocyanin. The daily food, water, Betaine, and C-PC intakes were evaluated for each rat.

2.2.6. Evaluation of Tumour Growth. Tumour growth was measured (tumour length, width, and volume) twice a week by using an external calliper. Tumour volume was calculated by using the following formula: $V = \text{Length} \times \text{Width}^2/2$. The mean tumour volume (MTV) per group was estimated and given in the graph. The tumour growth data was recorded for each individually identified rat.

The observation period lasted 28 days. All experimental animals were euthanized if during that period the tumour volume reached 4000 mm^3 , as required by institutional guidelines.

At the 29th day, rats were removed from their cages, taken to an adjacent room, and within 30 seconds of removal from the cage were euthanized using anaesthetic (Ketamine: $75 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ + Xylazine: $8 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) and an aortic puncture. Immediately after euthanization, tumours were excised, weighed, and snap-frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C .

3. Statistical Analysis

All statistical tests for the *in vivo* experiments were performed using the statistical package programme SPSS 19 (SPSS Inc., Chicago, IL). All values were expressed as the mean $\pm$ SE.

Nonparametric analyses (Kruskal-Wallis test and Mann-Whitney *U* test) were used in the statistical computations for tumour weight, tumour growth, food intakes, and body weight.

Statistical significance between groups for *in vitro* studies was assessed by the paired Student's *t*-test ($n = 3$) or repeated measures one-way ANOVA followed by Tukey's posttest (GraphPad Prism, San Diego, California, USA). Differences were considered statistically significant when $p < 0.05$.

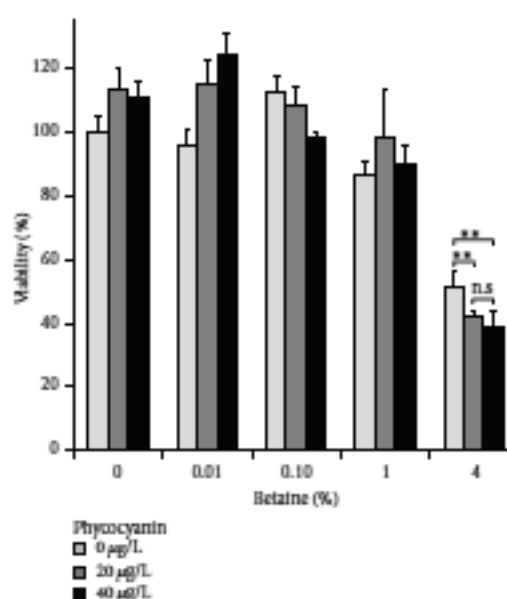


FIGURE 1: Decrease of cell viability following treatment with betaine and C-PC. Viability of A549 cells following treatment with 0%, 0.01%, 0.1%, 1%, and 4% betaine and $0 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, $20 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, or $40 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ of C-PC. Cell viability was measured using MTT assay after 48 h treatment. Mean $\pm$ standard deviation. ** $p < 0.005$; n.s. stands for not statistically significant. Statistical significance between groups was assessed by the paired Student's *t*-test ($n = 3$).

4. Results

4.1. In Vitro Study

4.1.1. Viability of the A549 Cells. A549 cells were treated with betaine, C-PC, and a combination of both substances for 48 hours, followed by the viability evaluation through the MTT assay. After 48 h observing the sole betaine treatment, 4% betaine proved to be the most efficient, decreasing the viability of cells by 50%, so this was the one we chose for further application. Treatment with C-PC alone in tested concentrations did not yield a significant viability decrease in any dose or time dependency. On the contrary, combining 4% betaine with different C-PC concentrations decreased the viability by an additional 10–20% (Figure 1). The same effect was also observed for the C-PC concentrations not presented in the figure (data not shown).

4.1.2. Effect of C-PC and Betaine on the Inflammatory NF- κ B Pathway. To study the effect of betaine and C-PC and their combination on the NF- κ B pathway in the context of lung cancer, we used A549/NF- κ B-LUC cells (Figure 2). In those cells, luciferase expression is driven by the inducible NF- κ B promoter through activation of the NF- κ B pathway. As a positive control and as an inducer of the NF- κ B promoter activation, A549/NF- κ B-LUC cells were treated with $25 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ TNF α for 9 h.

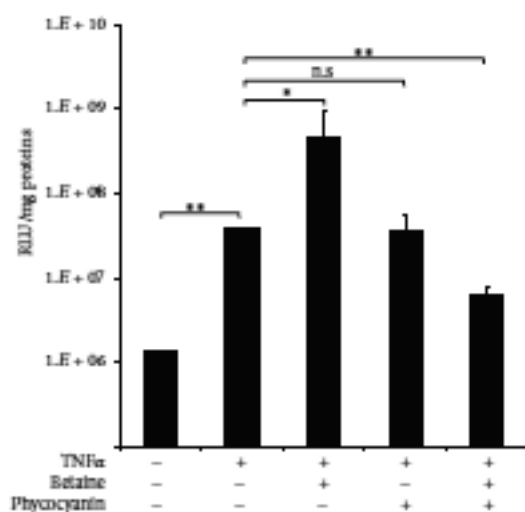


FIGURE 2: NF- κ B expression decrease with combined betaine/C-PC treatment. Measurement of luciferase activity in A549/NF- κ B-Luc cells after 24 h treatment with betaine and/or C-PC followed by 9 h treatment with TNF α . Mean $\pm$ standard deviation. * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$; n.s. stands for not statistically significant. Statistical significance between groups was assessed by the paired Student's t -test ($n = 3$).

When cells were first treated for 24 h with C-PC and/or betaine and then further incubated for 9 h with TNF α , treatment with 4% betaine alone seemed to elevate the activation of NF- κ B. C-PC treatment alone did not have any significant effect while a significant decrease ($p < 0.05$) in activation was only observed when cells were treated with both $20 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ C-PC and 4% betaine (Figure 2).

4.1.3. Effect of C-PC and Betaine on the p38 MAPK. Western blot was performed to evaluate the expression of p38 MAPK in A549 cells incubated with 4% betaine and/or $20 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ C-PC. The expression of the p38 MAPK was evaluated by measuring the total p38 MAPK content after 24 h and 48 h and normalization to the β -actin. Values of the treatments are expressed as relative densities according to their respective controls.

Following 24 h incubation, there was no significant difference in any of the treatment groups (Figure 3(b)—condition B, grey bars). On the other hand, after 48 h, the increase in the expression can be seen in all conditions. While betaine alone and C-PC alone treatments show 1.5-fold increase, which is slight but insignificant, the combination of both gave an approximately 2.5-fold increase in the total p38 MAPK expression (Figure 3(b)—condition B + C-PC black bars). This increase was significant in relation to both 24 h B + C-PC treatment and the 48 h control MAPK expression.

4.1.4. Cell Cycle Analysis. To study the effect of C-PC and betaine and their combination on the cell cycle, A549 cells

were synchronized in G₀/G₁ cycle by serum deprivation followed by thymidine excess (Figure 4). Cell cycle distribution was evaluated following measurement of DNA content by propidium iodide and monitored by flow cytometry.

Asynchronous A549 showed standard distribution of cells in the different cell cycle phases, with G₀/G₁ as the most abundant (56.42%) and approximately equal distribution in S and G₂/M phase (21.77% and 20.92%, resp.) (Figure 4(a)—asynchronous). The synchronization protocol resulted in 91% of cells in G₀/G₁ phase, with almost complete blockage of mitosis (1.20%) and 7% of cells in S phase (Figure 4(a)—synchronized). G₀/G₁ synchronized cells were then either untreated or treated with betaine, C-PC, or a combination of both treatments for 18 h (Figure 4(b)).

After 18 h, untreated cells regained a cell cycle distribution similar to asynchronous cells (Figure 4(b)—untreated). 4% betaine treatment (Figure 4(b)—betaine) after 18 h induced an accumulation of cells in G₂/M phase (59.50% versus 17.54%) and in sub-G₀ (10.97% versus 0.72%) compared to untreated condition. The treatment with $80 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ of C-PC lowered the percentage of cells in S phase (14.90% versus 21.64%) in favour of G₁ phase by 4% (Figure 4(b)—C-PC). The effect of combined treatment was close to that of betaine treatment alone even though C-PC seemed to enhance the accumulation in G₂/M by 5% as well as the decrease in S phase likely caused by betaine (Figure 4(b)—Betaine + C-PC). Furthermore, while the amount of cells in the sub-G₀ phase in nontreated cells and in C-PC treated cells remains negligible (<1%), betaine treatment counted 10.97% of sub-G₀ cells, either apoptotic or necrotic. When betaine was combined with C-PC, this number decreased to 6.71%. In conclusion, it would appear that 4% betaine induced cell cycle arrest in G₂/M phase and prevented further proliferation of cancer cells, as similarly observed in HeLa cells [35]. $80 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ of C-PC only slightly influenced the cell cycle by increasing G₁ [36] and decreasing S phase cells. Interestingly, in combination with betaine, it improved the effect of betaine.

4.2. In Vivo Study. The body weights of rats were between 372.1 ± 40.2 g and 350.8 ± 42.8 g and were not significantly modified by treatments. Food intake was the same for all groups, suggesting that treatments have no toxic effects.

4.2.1. Effects of Betaine on Tumour Weight and Volume. Table 1 presents tumour volume and weight per group on the day of euthanization. Compared with the control group, tumour weight was significantly lower in betaine, C-PC, and betaine + C-PC treatment group. C-PC treatment induced a higher decrease in tumour weight as compared to betaine treatment. No further higher decrease was noted in the combination treatment group (betaine + C-PC).

Compared to the control group, a significant difference in tumour volume was noted (Figure 5) after the second week and continued to the end of the experiment.

Following 4 weeks of betaine treatment, tumour volume in the betaine group was 50% lower when compared to the control group, 88.2% lower for the C-PC group, and 86.8% lower for the betaine + C-PC group, respectively.

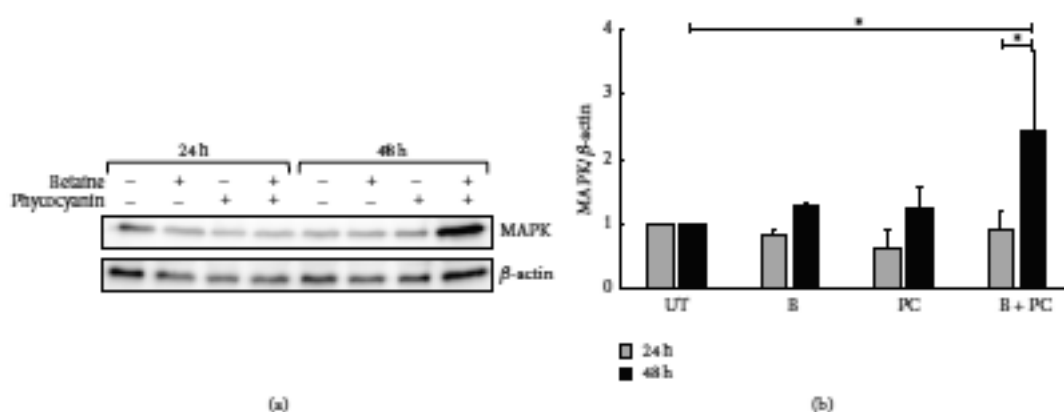


FIGURE 3: Activation of p38 MAPK pathway on A549 after betaine and/or phycocyanin treatment. Cells were treated with either 4% betaine, $20 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ of C-PC, or a combination of both molecules for 24 and 48 h. (a) Expression of p38 MAPK in different treatments was monitored by western blot. β -actin was used as a loading-control protein. (b) p38 MAPK along with β -actin band signals were quantified with the ImageJ software. After normalization with β -actin, p38 MAPK values were plotted on the graph as relative values compared to their respective controls. Bars are presented as the mean $\pm$ standard deviation. * $p < 0.05$. Statistical significance between groups was assessed using repeated measures one-way ANOVA followed by Tukey's posttest. UT stands for untreated condition, B stands for betaine, and PC stands for C-PC.

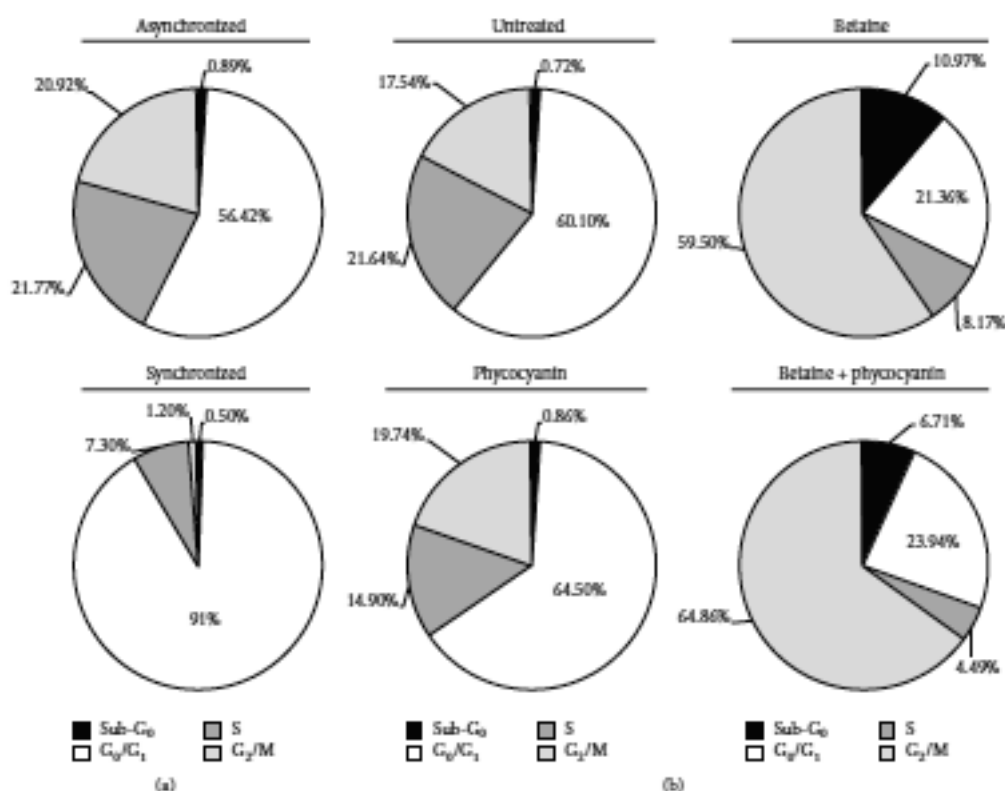


FIGURE 4: Betaine induced cell cycle arrest in G₂ phase. Cell cycle study of A549 cells treated with betaine and/or C-PC. (a) First, cells were synchronized in G₁ phase by serum deprivation followed by thymidine excess (synchronized). (b) Synchronized cells were then treated for 18 h with only medium (untreated), 4% betaine, $80 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ of C-PC, or a combination of the two treatments (betaine + C-PC). Cell cycles analysed by flow cytometry following propidium iodide staining are shown.

TABLE 1: Tumour volume in cubic millimetre (mm³) and tumour weight in absolute values (g) and relative values (percentage of the body weight (% BW)) on the day of euthanatization per group. Mean $\pm$ standard deviation.

	Tumour volume (mm ³)	Tumour weight (g)	Tumour weight (% BW)
Control	4015 $\pm$ 713	2.92 $\pm$ 0.47	0.79 $\pm$ 0.12
Betaine	1874 $\pm$ 1154 ^{**}	1.63 $\pm$ 0.94 [*]	0.48 $\pm$ 0.28 ^{**}
C-PC	473 $\pm$ 162 ^{***}	0.21 $\pm$ 0.06 ^{***}	0.06 $\pm$ 0.02 ^{***}
C-PC + betaine	528 $\pm$ 236 ^{***}	0.20 $\pm$ 0.06 ^{***}	0.06 $\pm$ 0.02 ^{***}

Compared to control group: ^{*} $p < 0.05$; ^{**} $p < 0.01$; ^{***} $p < 0.001$; compared to betaine group: ^{***} $p < 0.001$.

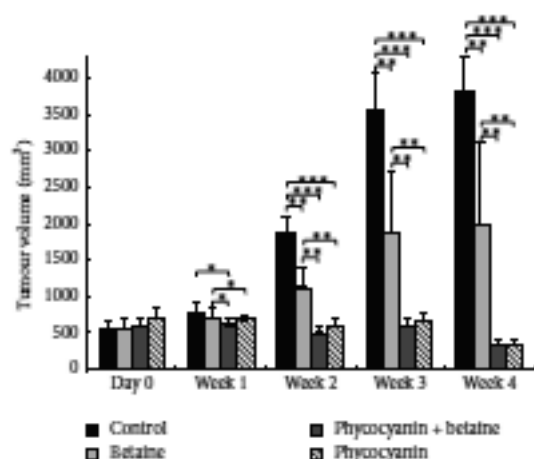


FIGURE 5: Evolution of mean of tumour volume per week per group, expressed in cubic millimetres (mm³). Mean $\pm$ standard deviation. ^{*} $p < 0.05$; ^{**} $p < 0.01$; ^{***} $p < 0.001$.

5. Discussion

Cancer, also known as malignant tumour, is a disease that seriously damages health and lives. Recently, scientists have become interested in the potential antitumour effects of nutrients due to their safety and general acceptance. Some data have demonstrated that a large class of natural compounds, including pharmaconutrients, exhibit antitumour activities against selected cancer types [37, 38]. Among them is C-PC, a natural component of edible *S. Platensis* with no toxic side effects that is widely used as an excellent supplement to the human diet [39]. It could inhibit the growth of cancer cells both *in vivo* and *in vitro*. On the other hand, previous studies reported that betaine supplementation has an anti-inflammatory and antiangiogenic effect [18], as well as an anticancer action which may be explained through the regulation of the expression of protooncogenes and tumour suppressors by stabilizing their methylation patterns [40].

We showed that *in vitro* 4% betaine could effectively decrease the viability of A549 lung cancer cells, showing an even better effect if combined with C-PC. The effect observed with betaine correlated to a previous study reporting the decrease in viability following 2% and 4% betaine treatment of Hepal-6 cells (hepatocellular carcinoma) and HepG2 cells (human hepatoblastoma) [41]. Although there are previous

indications that C-PC alone can inhibit cancer cell growth in various concentrations and in a dose-dependent manner by inducing apoptosis [36, 42, 43], we did not observe this. One possible explanation could be the effectiveness of the product, which is highly dependent on the organism of origin, extraction and purification methods, and storage [44, 45].

Apoptosis can be induced through two distinct intracellular pathways mediated either by the death receptor or by the mitochondrial activation, the latter triggered as a response to environmental stress as well as to anticancer drugs [46]. Although weakly activated by growth factors, JNK and p38 MAPK respond strongly to stress signals [47, 48] and chemotherapeutic drugs, and their activation proved necessary for drug-induced apoptosis [49]. p38 MAPK is involved in the mitochondria-mediated apoptotic process and acts one step prior to mitochondrial dysfunction and caspase activation by influencing Bax translocation [50]. Its activation already proved important in the induction of apoptosis in nonsmall lung cancer cells [51]. Our western blot results support the MTT findings of the enhanced effect in combined B + C-PC treatment, showing that there is a greater impact on the expression of p38 MAPK when the two substances are used together, possibly activating apoptosis and reducing cell viability. Conversely, although betaine alone induces a significant viability decrease, there was no significant elevation of MAPK expression, leaving open the possibility of influencing other cellular pathways. Molecular mechanisms of C-PC-induced apoptosis have not been completely elucidated and possible mechanisms such as inhibiting COX-2 activity, reducing the expression of Bcl-2, enhancing the expression of CD59, and activating proteins from the cysteine protease family have been suggested [52]. Recently, Pan et al. [53] reported that C-PC may regulate the expressions of many kinds of proteins in SKOV-3 ovarian carcinoma cells to affect the process of apoptosis, oxidative stress, lipid, and ion transportation and finally inhibit the growth of tumour cells. Although the concentrations used may have been too low to show an effect after administration alone, it is not excluded that this was still enough to add to the effect of betaine by influencing one of the above mentioned pathways.

Disturbance of the cancer cell cycle is one of the therapeutic targets for development of new anticancer drugs [4]. Indeed, cell cycle regulation plays an important role in cell proliferation, differentiation, and apoptosis. In recent years, it has been reported that the dysfunction of cell cycle regulation appears to be closely connected to tumour onset and development. The G₂/M checkpoint allows the cell to repair DNA

damage before entering mitosis and is the most conspicuous target for many anticancer drugs that would cause cell death through the induction of apoptosis [54]. In this study, 4% betaine treatment induced cell cycle arrest in G₂/M phase, preventing a further proliferation of cancer cells, as similarly observed in HeLa cells [35], in correlation with the observed decrease of cell viability seen in the MTT assay. 11% of the cell distribution found in the sub-G₁ phase represents the population of cells in apoptosis or necrosis with fragmented nuclear DNA [55]. A successful anticancer compound should kill or incapacitate cancer cells without causing excessive damage to the normal surrounding cells. By inducing cell cycle arrest, the cells are more likely to enter apoptosis, a "clean" death without causing excessive inflammatory cell recruitment into the surrounding tissue through necrotic death, avoiding further damage to the tissue [56]. Incubation of cells with C-PC increased the cells in G₁ phase, as reported earlier [36, 57]. Wang et al. [58] have also demonstrated that C-PC could inhibit tumour cell proliferation and induce G₂/M phase arrest in HepG-2 cells. Ying et al. [54] reported that C-PC displayed a significant inhibition effect on the proliferation of human ovarian cancer cell SKOV-3 *in vitro*, which was a result of interactions among multiple pathways and signalling molecules. For these authors, interfering with a series of signalling pathways including proteoglycans in cancer, neurotrophin signalling pathway, VEGF signalling pathway, central carbon metabolism in cancer, and p53 pathway and many ending executive factors such as cyclin B1, cyclin-dependent kinase 2 (Cdc2) and Cdc25C, and C-PC influenced the proliferation and apoptosis of cancer cells. A combination with betaine increased the amount of both G₂/M phase cells and G₁ phase cells. In this case the sub-G₁ population was decreased by 4% compared to the betaine treatment alone. Since the sub-G₁ population contains both necrotic and apoptotic cells, increasing the amount of cells in the cycle arrest that can be guided more easily to apoptosis could bring greater benefit than having a higher amount of the sub-G₁ phase cells, where necrotic cells are potential triggers for inflammation, especially in an *in vivo* context. The molecular events controlling the G₁ phase of the cell cycle are determined by a series of phosphorylation events regulated by the expression of specific cyclins, cyclin-dependent kinases (CDK), and CDK inhibitors [59]. The activation of p38 MAPK was reported to lead to the G₂/M cell cycle arrest by suppressing CDC2 via the phosphatase CDC25 [60], which may be a connection between observed posttreatment increased expression of the p38 MAPK and the cell cycle arrest.

NF- κ B, although generally acknowledged as an antiapoptotic and proinflammatory mediator, along with TNF α has a complex role in cell signalling which is rather ambiguous [61]. It is already known that, after binding its receptor, TNF α induces several responses [62]. Apart from promoting the degradation of I κ B and releasing NF- κ B transcription factor, it activates two stress-activated MAPK pathways mediated by JNK and p38. Both can have a proapoptotic role [63] by activating caspase-3 of the intrinsic apoptotic pathway, which directly cleaves some of the proteins from the NF- κ B pathway, including NF- κ B [64]. In contrast to the expected

results, luciferase reporting system in A549/NF- κ B-Luc cells showed that 4% betaine enhanced TNF α activation of NF- κ B. However, it is important to keep in mind that this system reports only one side of the TNF α signalling pathway (only measuring the promoter activity of the NF- κ B gene and not the real content of the protein or mRNA in the cell) and that these same conditions in MTT assay showed a decrease in cell viability. This may lead to the assumption that, in this case, the "death" pathway of TNF α is more often activated or that NF- κ B here plays a proapoptotic role. In contrast to previous findings [65], C-PC applied alone did not show any inhibitory effect. The reasons may be the different, for example, C-PC purification methods, which influence the protein's properties as already mentioned, or may be due to different concentrations applied. Conversely, when C-PC was combined with 4% betaine it decreased activation of NF- κ B promoter (compared to the positive control). The future goal would be to further investigate at which instance and in what manner these two molecules, betaine and C-PC, interfere with the pathways of complex TNF α signalling.

To summarize, *in vitro*, betaine alone could inhibit the growth of tumour cells, while the combination of betaine and C-PC showed synergy. However, the effects of C-PC and betaine on lung cancer tumour *in vivo* need further study. In this research we used the NU/NU rat as an animal model to explore the effects of the two substances *in vivo*. Following tumour establishment, its weight and volume were monitored during the supplementation period in each group of rats. Compared with the control group, the tumour weight and volume were significantly reduced in the C-PC and betaine treatment group, respectively (Table 1 and Figure 5), and showed no further decrease in the combination group. In this case we observed no synergistic effect of the combined treatment but rather a strong inhibitory effect of C-PC alone. The beneficial effect of betaine could be due to several reasons. Its antioxidant properties are reported in many diseases and conditions, including oxidative stress induced by ethanol [17], restraint stress [12], and treatment of Parkinson's disease [66]. In mice with colon tumour, betaine specifically inhibited ROS generation and decreased GSSG concentration [21]. The other crucial role of betaine is as a methyl donor, modulating gene expression by targeting different elements of epigenetic mechanisms [67]. Esteller et al. [6] noticed that abnormal promoter DNA methylation was found in all stages of non-small-cell lung cancer, thus bringing betaine and its function into the spotlight. Furthermore, Lee [32] studied mouse hepatocyte H2.35 cells incubated with betaine and showed that betaine treatment leads to an upregulation of mitochondrial respiration and cytochrome c oxidase activity. He suggested that the antiproliferative effects of betaine on cancer cells might be due to enhanced mitochondrial function contributing to a reversal of the Warburg effect. The Akt signalling pathway is known to be associated with promotion of mitochondrial oxidative phosphorylation (OXPHOS) [32] and thus of mitochondrial respiration. Conversely, another study showed that inhibition of heme synthesis and mitochondrial respiration function can arrest the progression of lung cancer cells [68]. Even if the role of mitochondrial respiration is controversial, it seems, in any

case, to be one of the key factors in lung cancer progression. Considering the obtained *in vivo* effect of C-PC, we can find the support in earlier publications reporting its beneficial antitumour effects such as the scavenging of free radicals [26] or a concrete growth inhibition in different tumour cell lines, suggesting influence of various mechanisms and cellular pathways [27–30]. One possible explanation for why we did not observe the same inhibitory effect of C-PC *in vitro* could be the fact that the exact metabolism of phycocyanin is yet unknown. Bearing this in mind, it is possible that our *in vitro* concentration of C-PC was simply too low to produce an effect when administered alone.

Observing the obtained results *in vitro*, it is evident that there is some kind of interaction between C-PC and betaine that is still unknown. Since betaine transporters belong to the SLC36 group of proton coupled amino acid symporters that are pH sensitive [69], it is possible that C-PC as a cysteine/methionine rich protein [70] influences the uptake of betaine into the cells by adjusting the pH through the acid-base properties of its amino acid side-chains. Decrease of C-PC fluorescence inside the cells when combined with betaine (seen in the flow cytometry analysis—data not shown) may be explained by C-PC slightly changing the conformation after changing its amino acid charge by donating/accepting H⁺ ions. Also, it might be possible that C-PC interacts with betaine itself, since betaine is an amino acid-like compound, and that changing its charge influences its transport over the cell membrane or interactions inside the cell. However, further investigations are needed to confirm this hypothesis.

6. Conclusion

In summary, betaine and C-PC proved to be easily applicable and effective inhibitors of the A549 cell line growth. While in *in vitro* experiments the effect of C-PC was very slight or none, combining it with betaine seemed to enhance an already strong betaine effect. Thus, this combined treatment proved to be an effective inhibitor of the growth of A549 cells by inhibiting the progress of the cell cycle, reducing the cell viability, or enhancing the proapoptotic pathways. However, *in vivo*, both C-PC and betaine alone could successfully inhibit the growth of tumour in rats, and the tumour-suppressing effect was not more evident in the group receiving the combined treatment. Analysis of the methylation pattern following treatments, the oxidative status of cells and the organism, other cellular pathways involved, elucidation of the substance metabolism, and the nature of the interaction between betaine and C-PC, all these things, must still be answered to help us understand the underlying narrative.

Competing Interests

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as potential competing interests.

Acknowledgments

This study was supported by the Ligue contre le Cancer.

References

- [1] M. D. Swartz, C. B. Peterson, P. J. Lupo et al., "Investigating multiple candidate genes and nutrients in the folate metabolism pathway to detect genetic and nutritional risk factors for lung cancer," *PLoS ONE*, vol. 8, no. 1, Article ID e53475, 2013.
- [2] E. Pilaire, C. Dupuis, G. Galvaing et al., "Lung cancer: what are the links with oxidative stress, physical activity and nutrition," *Lung Cancer*, vol. 82, no. 3, pp. 383–389, 2013.
- [3] X. Zhang, J. Zang, J. Xu et al., "Maintenance therapy with continuous or switch strategy in advanced non-small cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis," *Chest*, vol. 140, no. 1, pp. 117–126, 2011.
- [4] S. Rupachandra and D. V. L. Sarada, "Induction of apoptotic effects of antiproliferative protein from the seeds of *Borreria hispida* on lung cancer (A549) and cervical cancer (HeLa) cell lines," *BioMed Research International*, vol. 2014, Article ID 179836, 8 pages, 2014.
- [5] Y.-P. Du, J.-S. Peng, A. Sun, Z.-H. Tang, W.-H. Ling, and H.-L. Zhu, "Assessment of the effect of betaine on p16 and c-myc DNA methylation and mRNA expression in a chemical induced rat liver cancer model," *BMC Cancer*, vol. 9, article 261, 2009.
- [6] M. Esteller, M. Sanchez-Cespedes, R. Resell, D. Sidransky, S. B. Baylin, and J. G. Herman, "Detection of aberrant promoter hypermethylation of tumor suppressor genes in serum DNA from non-small cell lung cancer patients," *Cancer Research*, vol. 59, no. 1, pp. 67–70, 1999.
- [7] Y. Takata, Q. Cai, A. Beeghly-Fadiel et al., "Dietary B vitamin and methionine intakes and lung cancer risk among female never smokers in China," *Cancer Causes & Control*, vol. 23, no. 12, pp. 1965–1975, 2012.
- [8] J. Ying, M. H. Rahbar, D. M. Hallman et al., "Associations between dietary intake of choline and betaine and lung cancer risk," *PLoS ONE*, vol. 8, no. 2, article e54561, 2013.
- [9] P. M. Ueland, P. I. Holm, and S. Hustad, "Betaine: a key modulator of one-carbon metabolism and homocysteine status," *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, vol. 43, no. 10, pp. 1069–1075, 2005.
- [10] S. A. S. Craig, "Betaine in human nutrition," *The American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 80, no. 3, pp. 539–549, 2004.
- [11] P. M. Ueland, "Choline and betaine in health and disease," *Journal of Inherited Metabolic Disease*, vol. 34, no. 1, pp. 3–15, 2011.
- [12] B. Ganesan, R. Anandan, and P. T. Lakshmanan, "Studies on the protective effects of betaine against oxidative damage during experimentally induced restraint stress in Wistar albino rats," *Cell Stress and Chaperones*, vol. 16, no. 6, pp. 641–652, 2011.
- [13] K. C. Hayes, A. Pronczuk, M. W. Cook, and M. C. Robbitts, "Betaine in sub-acute and sub-chronic rat studies," *Food and Chemical Toxicology*, vol. 41, no. 12, pp. 1685–1700, 2003.
- [14] C.-X. Zhang, M.-X. Pan, B. Li et al., "Choline and betaine intake is inversely associated with breast cancer risk: a two-stage case-control study in China," *Cancer Science*, vol. 104, no. 2, pp. 250–258, 2013.
- [15] F.-F. Zeng, C.-H. Xu, Y.-T. Liu et al., "Choline and betaine intakes are associated with reduced risk of nasopharyngeal carcinoma in adults: a case-control study," *British Journal of Cancer*, vol. 110, no. 3, pp. 808–816, 2014.
- [16] J. E. Lee, E. Giovannucci, C. S. Fuchs, W. C. Willett, S. H. Zeisel, and E. Cho, "Choline and betaine intake and the risk of colorectal cancer in men," *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, vol. 19, no. 3, pp. 884–887, 2010.

- [17] J. Oliva, F. Bardag-Gorce, B. Tillman, and S. W. French, "Protective effect of quercetin, EGCG, catechin and betaine against oxidative stress induced by ethanol in vitro," *Experimental and Molecular Pathology*, vol. 90, no. 3, pp. 295–299, 2011.
- [18] E.-Y. Yi and Y.-J. Kim, "Betaine inhibits in vitro and in vivo angiogenesis through suppression of the NF- κ B and Akt signaling pathways," *International Journal of Oncology*, vol. 41, no. 5, pp. 1879–1885, 2012.
- [19] F. H. T. Duong, V. Christen, M. Filipowicz, and M. H. Heim, "S-adenosylmethionine and betaine correct hepatitis C virus induced inhibition of interferon signaling in vitro," *Hepatology*, vol. 43, no. 4, pp. 796–806, 2006.
- [20] Gentile, C. Sogawa, K. Ohyaia et al., "Inhibitory action of antidepressants on mouse Betaine/GABA transporter (BGTT) heterologously expressed in cell cultures," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 13, no. 3, pp. 2578–2589, 2012.
- [21] D. H. Kim, B. Sung, Y. J. Kang et al., "Anti-inflammatory effects of betaine on AOM/DSS-induced colon tumorigenesis in ICR male mice," *International Journal of Oncology*, vol. 45, no. 3, pp. 1250–1256, 2014.
- [22] C. Basaran-Küçükgergin, I. Bingöl, M. S. Tekkesin et al., "Effects of carnosine, taurine, and betaine pretreatments on diethylnitrosamine-induced oxidative stress and tissue injury in rat liver," *Toxicology and Industrial Health*, vol. 32, no. 8, pp. 1405–1413, 2016.
- [23] H. Hagar, A. El Medany, R. Salam, G. El Medany, and O. A. Nayal, "Betaine supplementation mitigates cisplatin-induced nephrotoxicity by abrogation of oxidative/nitrosative stress and suppression of inflammation and apoptosis in rats," *Experimental and Toxicologic Pathology*, vol. 67, no. 2, pp. 133–141, 2015.
- [24] A. Ramos, F. G. Acien, J. M. Fernández-Sevilla, C. V. González, and R. Bermejo, "Development of a process for large-scale purification of C-phycoerythrin from *Synechocystis aquatilis* using expanded bed adsorption chromatography," *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, vol. 879, no. 7–8, pp. 511–519, 2011.
- [25] B. Fernández-Rojas, O. N. Medina-Campos, R. Hernández-Pando, M. Negrette-Guzmán, S. Huerta-Yepex, and J. Pedraza-Chaverri, "C-phycoerythrin prevents cisplatin-induced nephrotoxicity through inhibition of oxidative stress," *Food & Function*, vol. 5, no. 3, pp. 480–490, 2014.
- [26] M. Kuddus, P. Singh, G. Thomas, and A. Al-Hazmi, "Recent developments in production and biotechnological applications of C-phycoerythrin," *BioMed Research International*, vol. 2013, Article ID 742859, 9 pages, 2013.
- [27] W. Yong, Q. Feng, Q. Kalxian, and D. Qiang, "Anticancer activity of phycoerythrin," *Journal of Zhejiang University (Engineering Science)*, vol. 35, pp. 672–675, 2000.
- [28] J. Ying, R. Pan, M. Wang et al., "Effects of phycoerythrin on apoptosis of human laryngeal cancer HEP-2 cells," *Chinese Journal of Pathophysiology*, vol. 31, no. 7, pp. 1189–1196, 2015.
- [29] C. Zhang, R. W. Pan, K. P. Li et al., "Inhibitory effect of phycoerythrin on the proliferation of human colon cancer SW480 cells: a preliminary study," *Chinese Journal of Microbiology*, vol. 27, pp. 146–150, 2015.
- [30] B. Li, X. Chu, M. Gao, and W. Li, "Apoptotic mechanism of MCF-7 breast cells in vivo and in vitro induced by photodynamic therapy with C-phycoerythrin," *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, vol. 42, no. 1, pp. 80–89, 2010.
- [31] B. Li, M. Gao, C. Li, P. Yang, and Q. Yin, "Study of the synergistic effects of all-transretinoic acid and C-phycoerythrin on the growth and apoptosis of A549 cells," *European Journal of Cancer Prevention*, vol. 25, no. 2, pp. 97–101, 2016.
- [32] I. Lee, "Betaine is a positive regulator of mitochondrial respiration," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 456, no. 2, pp. 621–625, 2015.
- [33] L.-C. Wu, Y.-Y. Lin, S.-Y. Yang, Y.-T. Weng, and Y.-T. Tsai, "Antimelanogenic effect of c-phycoerythrin through modulation of tyrosinase expression by upregulation of ERK and downregulation of p38 MAPK signaling pathways," *Journal of Biomedical Science*, vol. 18, no. 1, article 74, 2011.
- [34] T. Mosmann, "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays," *Journal of Immunological Methods*, vol. 65, no. 1–2, pp. 55–63, 1983.
- [35] Y. Guo, L.-S. Xu, D. Zhang et al., "Betaine effects on morphology, proliferation, and p53-induced apoptosis of hela cervical carcinoma cells in vitro," *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, vol. 16, no. 8, pp. 3195–3201, 2015.
- [36] R. Thangam, V. Suresh, W. Asenath Princy et al., "C-Phycocyanin from *Oscillatoria tenuis* exhibited an antioxidant and in vitro antiproliferative activity through induction of apoptosis and G0/G1 cell cycle arrest," *Food Chemistry*, vol. 140, no. 1–2, pp. 262–272, 2013.
- [37] A. B. da Rocha, R. M. Lopes, and G. Schwartzmann, "Natural products in anticancer therapy," *Current Opinion in Pharmacology*, vol. 1, no. 4, pp. 364–369, 2001.
- [38] V. Granci, Y. M. Dupertuis, and C. Pichard, "Angiogenesis as a potential target of pharmacogenetics in cancer therapy," *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, vol. 13, no. 4, pp. 417–422, 2010.
- [39] B. Fernández-Rojas, J. Hernández-Juárez, and J. Pedraza-Chaverri, "Nutraceutical properties of phycoerythrin," *Journal of Functional Foods*, vol. 11, pp. 375–392, 2014.
- [40] M. Alirezaei, Z. Khoshdel, O. Derfoulhan, M. Rashidipour, and V. Taghadost, "Beneficial antioxidant properties of betaine against oxidative stress mediated by levodopa/benserazide in the brain of rats," *The Journal of Physiological Sciences*, vol. 65, no. 3, pp. 243–252, 2015.
- [41] J. Oliva, J. Zhong, V. S. Buslon, and S. W. French, "The effect of SAMe and betaine on Hepa 1-6, C34 and E47 liver cell survival in vitro," *Experimental and Molecular Pathology*, vol. 92, no. 1, pp. 126–130, 2012.
- [42] B. Li, M.-H. Gao, X.-M. Chu et al., "The synergistic antitumor effects of all-trans retinoic acid and C-phycoerythrin on the lung cancer A549 cells in vitro and in vivo," *European Journal of Pharmacology*, vol. 749, pp. 107–114, 2015.
- [43] M. C. Reddy, J. Subhashini, S. V. K. Mahipal et al., "C-Phycocyanin, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, induces apoptosis in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 304, no. 2, pp. 385–392, 2003.
- [44] R. Chaiklahan, N. Chirasuan, V. Loha, S. Tia, and B. Bunnag, "Separation and purification of phycoerythrin from *Spirulina* sp. using a membrane process," *Bioresource Technology*, vol. 102, no. 14, pp. 7159–7164, 2011.
- [45] M. Gantar, D. Stmović, S. Džilas, W. W. Gonzalez, and J. Mikšević, "Isolation, characterization and antioxidant activity of C-phycoerythrin from *Limnolobus* sp. strain 37-2-1," *Journal of Biotechnology*, vol. 159, no. 1–2, pp. 21–26, 2012.
- [46] D. R. Green, "Death decoder," *Nature*, vol. 396, no. 6712, pp. 629–630, 1998.

- [47] I. Dolado, A. Swat, N. Ajenjo, G. De Vita, A. Cuadrado, and A. R. Nebreda, "p38 α MAP kinase as a sensor of reactive oxygen species in tumorigenesis," *Cancer Cell*, vol. 11, no. 2, pp. 191–205, 2007.
- [48] A. Cuenda and S. Rousseau, "p38 MAP-Kinases pathway regulation, function and role in human diseases," *Biochimica et Biophysica Acta—Molecular Cell Research*, vol. 1773, no. 8, pp. 1358–1375, 2007.
- [49] M. Benhar, I. Dalyot, D. Engelberg, and A. Levitzki, "Enhanced ROS production in oncogenically transformed cells potentiates c-Jun N-terminal kinase and p38 mitogen-activated protein kinase activation and sensitization to genotoxic stress," *Molecular and Cellular Biology*, vol. 21, no. 20, pp. 6913–6926, 2001.
- [50] M.-T. Park, J.-A. Choi, M.-J. Kim et al., "Suppression of extracellular signal-related kinase and activation of p38 MAPK are two critical events leading to caspase-8- and mitochondria-mediated cell death in phytosphingosine-treated human cancer cells," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 278, no. 50, pp. 50624–50634, 2003.
- [51] C. Tan, X. Qian, R. Jia, M. Wu, and Z. Liang, "Maitrine induction of reactive oxygen species activates p38 leading to caspase-dependent cell apoptosis in non-small cell lung cancer cells," *Oncology Reports*, vol. 30, no. 5, pp. 2529–2535, 2013.
- [52] J. Subhashini, S. V. K. Mahipal, M. C. Reddy, M. M. Reddy, A. Rachamalla, and P. Reddanna, "Molecular mechanisms in C-Phycocyanin induced apoptosis in human chronic myeloid leukemia cell line-K562," *Biochemical Pharmacology*, vol. 68, no. 3, pp. 453–462, 2004.
- [53] R. Pan, R. Lu, Y. Zhang et al., "Spirulina phycocyanin induces differential protein expression and apoptosis in SKOV-3 cells," *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 81, pp. 951–959, 2015.
- [54] J. Ying, J. Wang, H. Ji et al., "Transcriptome analysis of phycocyanin inhibitory effects on SKOV-3 cell proliferation," *Gene*, vol. 585, no. 1, pp. 58–64, 2016.
- [55] C. Riccardi and I. Nicoletti, "Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry," *Nature Protocols*, vol. 1, no. 3, pp. 1458–1461, 2006.
- [56] A. M. VanHook, "Immunology: avoiding inflammation during apoptosis," *Science Signaling*, vol. 7, no. 319, p. ec89, 2014.
- [57] M. Ravi, S. Tenta, G. Baskar et al., "Molecular mechanism of anti-cancer activity of phycocyanin in triple-negative breast cancer cells," *BMC Cancer*, vol. 15, no. 1, article 768, 2015.
- [58] C.-Y. Wang, X. Wang, Y. Wang et al., "Photosensitization of phycocyanin extracted from *Microcystis* in human hepatocellular carcinoma cells: implication of mitochondria-dependent apoptosis," *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, vol. 117, pp. 70–79, 2012.
- [59] B. Yu, M. E. Lane, R. G. Pestell, C. Albanese, and S. Wadler, "Downregulation of cyclin D1 alters cdk 4- and cdk 2-specific phosphorylation of retinoblastoma protein," *Molecular Cell Biology Research Communications*, vol. 3, no. 6, pp. 352–359, 2000.
- [60] D. V. Bulavin, Y. Higashimoto, I. J. Popoff et al., "Initiation of a G2/M checkpoint after ultraviolet radiation requires p38 kinase," *Nature*, vol. 411, no. 6833, pp. 102–107, 2001.
- [61] B. Lin, C. Williams-Skipp, Y. Tao et al., "NF- κ B functions as both a proapoptotic and antiapoptotic regulatory factor within a single cell type," *Cell Death and Differentiation*, vol. 6, no. 6, pp. 570–582, 1999.
- [62] G. Chen and D. V. Goeddel, "TNF-RI signaling: a beautiful pathway," *Science*, vol. 296, no. 5573, pp. 1634–1635, 2002.
- [63] A. Porras, S. Zuluaga, E. Black et al., "p38 α mitogen-activated protein kinase sensitizes cells to apoptosis induced by different stimuli," *Molecular Biology of the Cell*, vol. 15, no. 2, pp. 922–933, 2004.
- [64] M. Karin and A. Lin, "NF- κ B at the crossroads of life and death," *Nature Immunology*, vol. 3, no. 3, pp. 221–227, 2002.
- [65] S.-C. Cherng, S.-N. Cheng, A. Tarn, and T.-C. Chou, "Anti-inflammatory activity of c-phycocyanin in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages," *Life Sciences*, vol. 81, no. 19–20, pp. 1431–1435, 2007.
- [66] M. Alirezaei, "Betaine protects cerebellum from oxidative stress following levodopa and benserazide administration in rats," *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, vol. 18, no. 10, pp. 950–957, 2015.
- [67] B. Stefanska, H. Karlic, E. Varga, K. Fabianowska-Majewska, and A. G. Haslberger, "Epigenetic mechanisms in anti-cancer actions of bioactive food components—the implications in cancer prevention," *British Journal of Pharmacology*, vol. 167, no. 2, pp. 279–297, 2012.
- [68] J. Hooda, D. Cadinu, M. M. Alam et al., "Enhanced heme function and mitochondrial respiration promote the progression of lung cancer cells," *PLoS ONE*, vol. 8, no. 5, article e63402, 2013.
- [69] E. S. Schweikhard and C. M. Ziegler, "Amino acid secondary transporters: toward a common transport mechanism," *Current Topics in Membranes*, vol. 70, pp. 1–28, 2012.
- [70] Z. Huang, B. J. Guo, R. N. S. Wong, and Y. Jiang, "Characterization and antioxidant activity of selenium-containing phycocyanin isolated from *Spirulina platensis*," *Food Chemistry*, vol. 100, no. 3, pp. 1137–1143, 2007.



Annexes

Annexe 4 : Poster présenté aux « Journées de l'Ecole Doctorale SVSAE ».



Statut nutritionnel et activité physique chez des patients atteints d'un cancer du poumon non à petites cellules, en attente d'une résection pulmonaire

Carmen Dupuis¹, Marc Filsaire^{1,2}, Fabrice Kwiatkowski³, Edith Filsaire⁴

(1) Université d'Auvergne, Unité de Nutrition Humaine, CRNH-Auvergne, UMR 1019, Clermont-Ferrand ;

(2) Centre Jean Perrin, Service de chirurgie thoracique, Clermont-Ferrand ;

(3) Centre Jean Perrin, Service de Statistiques, Clermont-Ferrand ;

(4) Université d'Orléans, Université Paris-Sud, Laboratoire CIAMS, EA532, Orléans.



Introduction

10 à 15% des cancers du poumon (CP) surviennent chez des non-fumeurs, ce qui suggère que des facteurs autres que le tabac sont impliqués dans la carcinogénèse, tels que les altérations génétiques, l'activité physique (AP) et le statut nutritionnel (SN). L'altération de la méthylation de l'ADN via des mécanismes épigénétiques semble pouvoir influencer la carcinogénèse (Supic et al. 2013). D'autre part, l'AP jouerait également un rôle tant en prévention primaire, secondaire que tertiaire (Tewari et al. 2007), notamment par la modulation de certaines voies de signalisation telles que la voie PI3K/AKT/mTOR.

Objectifs

- Evaluer le niveau d'AP et le SN de patients atteints d'un cancer du poumon non à petites cellules (CPNPC) en attente d'une résection pulmonaire, puis comparer les résultats à une population contrôlée de sujets sains.
- Evaluer lien entre le développement d'un CPNPC et les apports nutritionnels et/ou le niveau d'AP.

Protocole expérimental

Simultanément, sur 4 jours (dont un jour pendant le week-end)

Activité physique

Ambiand SenseWear®



Statut Nutritionnel

Camel Alimentaire + Interview



Statistiques

- Utilisation de SPSS Version 20.0
- Résultats quantitatifs exprimés en moyenne $\pm$ SD
- Données nominales exprimées en énumérations et fréquences
- Test χ^2 et Test T de Student (ou Mann-Whitney selon la distribution)
- Régression logistique

Résultats

1. Caractéristiques de la population étudiée.

	Patients (n=37)	Contrôle (n=37)
Hommes/Femmes	28/9	28/9
Age (ans)	64.4 $\pm$ 8.5	63.7 $\pm$ 9.4
Taille (m)	1.71 $\pm$ 0.07	1.69 $\pm$ 0.09
Poids (kg)	75.0 $\pm$ 10.5	74.5 $\pm$ 14.6
Indice de Masse Corporelle	26.0 $\pm$ 3.2	26.0 $\pm$ 4.5
Statut Fumeur		
Non-Fumeur/Ancien Fumeur/Fumeur	5/29/3	7/25/5
Nombre de paquets/année	35.3 $\pm$ 30.1	21.7 $\pm$ 35.3*

Moyenne $\pm$ SD. *p<0.05

2. Comparaison du temps d'AP et des dépenses énergétiques (DE) journaliers.

	Patients (n=37)	Contrôle (n=37)
DE Totale Kcal/jour ¹ (DET) Kcal/Kg.jour ¹	2487.0 $\pm$ 380.0 34.1 $\pm$ 5.7	2725.0 $\pm$ 633.5 35.9 $\pm$ 9.5
DE Active Kcal/jour ¹	417.5 $\pm$ 381.9	795.1 $\pm$ 638.1***
Sédentarité h	15.1 $\pm$ 2.4	13.7 $\pm$ 1.9*
AP totale min	79.2 $\pm$ 16.5	138.8 $\pm$ 25.6**
AP modérée min	76.8 $\pm$ 20.5	115.8 $\pm$ 12.8**
AP vigoureuse min	2.2 $\pm$ 0.6	16.8 $\pm$ 3.5***
Nombre de pas	3652.5 $\pm$ 878.5	7341.4 $\pm$ 1834.8***
Sommeil min	421.6 $\pm$ 104.4	444.0 $\pm$ 60.6*

Moyenne $\pm$ SD. *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001

3. Comparaison des apports énergétiques (AE) journaliers, en macro- et micro-nutriments.

	Patients (n=37)	Contrôle (n=37)	ANC
AE Totaux Kcal/jour ¹ (AET) Kcal/Kg.jour ¹	2159 $\pm$ 479.2 29.6 $\pm$ 8.9	2704 $\pm$ 878.9*** 35.3 $\pm$ 9.8**	2100 36
Glucides g/Kg ¹ jour ¹ %AET	3.3 $\pm$ 1.2 44.4 $\pm$ 8.8	3.5 $\pm$ 0.8 41.2 $\pm$ 4.6*	50-55
Protéines g/Kg ¹ jour ¹ %AET	1.2 $\pm$ 0.2 17.1 $\pm$ 3.8	1.3 $\pm$ 0.2 15.5 $\pm$ 2.3*	1.2 12
Lipides g/Kg ¹ jour ¹ %AET	1.1 $\pm$ 0.3 34.4 $\pm$ 5.8	1.4 $\pm$ 0.3*** 38.4 $\pm$ 4.8***	30-35
AGPI %AET	8.3 $\pm$ 3.4	10.0 $\pm$ 3.4***	
Eau mL/Kg ¹ jour ¹	40.5 $\pm$ 5.4	42.8 $\pm$ 3.6	35-45
Vit B ₁ mg	1.2 $\pm$ 0.4	1.2 $\pm$ 0.3	1.2
Vit B ₂ mg	1.0 $\pm$ 0.2	1.5 $\pm$ 0.4***	1.8
Vit B ₆ mg	1.2 $\pm$ 0.4	1.4 $\pm$ 0.6	2.2
Vit B ₉ µg	233.0 $\pm$ 87.0	291.2 $\pm$ 117.9	400
Vit B ₁₂ µg	2.3 $\pm$ 0.5	2.5 $\pm$ 0.3	2.4
Choline mg	358.3 $\pm$ 90.6	420.4 $\pm$ 104.7***	/
Bétaïne mg	148.1 $\pm$ 55.7	198.1 $\pm$ 80.9***	/
Alcool %AET	4.5 $\pm$ 3.9	2.4 $\pm$ 3.4***	

Apports Nutritionnels conseillés (ANC), Acides gras polyinsaturés (AGPI)

Moyenne $\pm$ SD. *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001

4. Régression logistique

3 Variables prédisent l'appartenance au groupe Patients :

Choline (p=0.028), PUFA (p=0.0014), et Activité Physique (p=0.017)

Conclusion

Le niveau d'AP, les AET et les apports en choline, bétaïne et AGPI étaient significativement plus faibles pour les patients. Trois de ces variables pouvaient prédire l'appartenance au groupe cancer: Choline, AGPI, et le niveau d'AP.

Annexe 5 : Poster présenté aux « Oncoriales ».



9. énsu4é ĩ Cé(u%đ4năA%%énu4u%nu4u%
é. .ăni u4in vitro et in vivo

**Carmen Dupuis¹, Rea Bingula², Lucie Pigeon², Marc Filaire^{1,3}, Jean-Yves Berthon⁴,
Chantal Pichon², Edith Filaire⁵**

:Fuə/ACsNFuə: u: ACsuNāN: N9 éAu: a | NFuə: u: a 4ə h: v: uée: s
 a c pa :Fuə/ACmaCé: % maCé: %
 u: v: uée: puā c uFau su ni ANə v: hāN AN 4ə h: v: uée: s
 chnOCāu: t uni A. =4 4ə h: v: éo: u: c éAv uéNā
 Université d'Orléans, Université Paris cNs éi hāvA c c éAv uéNā maCé: %

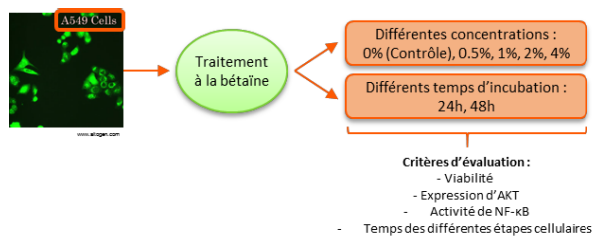
Introduction

[illegible]

Hypothèses

- *In vitro*: Nu 4 i Oé: u Ai A éA 4 ã h C ä v h : s u / n u 4 N 9 h ä 4 % C . é v A N u % u .
I h N C 9 u w h : % s h : n 4 % I B h i ô % % N F é : u %
• *In vivo*: N u N . C 9 u : v é A : 5 N á é A ü : i O é : u u : s é : v % 9 é A u : ä 4 : v é A 4 ã h A 8 é : n u N 9 h ä 4

Protocole expérimental

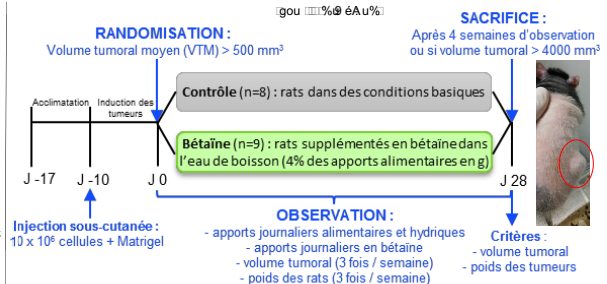


16 rats Nude Mâles

gou 100% éAu%

SACRIFICE:

Après 4 semaines d'observation
ou si volume tumoral $> 4000 \text{ mm}^3$



Statistiques : **véné** : su c pcc du **né** : **é** : e **ai** : u **la** **C** **né** % **Né** : **véné** % **u** - **à** **C** **u** : 9 h **bu** : u ± c

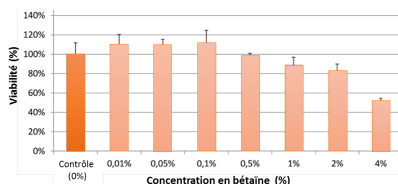


Figure 1. Viabilité des cellules A549, à 48h, après traitement avec des concentrations croissantes de bétaine. Moyenne $\pm$ SD.

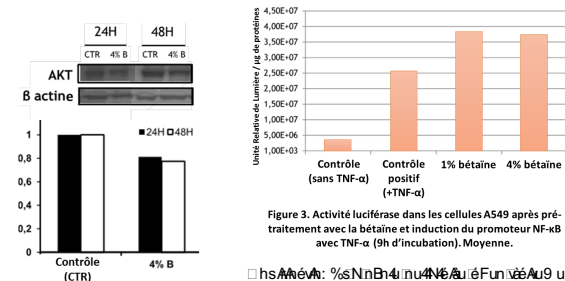


Figure 2. Expression d'AKT. Moyenne.

Résultats

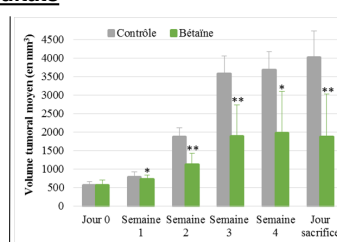
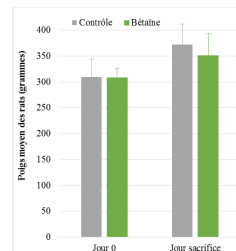


Figure 4. Volume tumoral moyen par groupe.
Moyenne $\pm$ SD. *p<0.05 **p<0.001



**Figure 5. Poids moyen par groupe.
Moyenne $\pm$ SD.**

Tableau 1. Taille tumorale moyenne par groupe en valeur brute et en valeur relative. Moyenne $\pm$ SD.

	Contrôle (n=8)	Bétaïne (n=9)	p
En grammes	2.92 ± 0.47	1.63 ± 0.94	0.007
En % du poids corporel	0.79 ± 0.12	0.48 ± 0.28	0.012

□. .hà%9 hB:u: %: ũ Oé: u □ èà5 hNā

- □□□□ □□□□ %N □□□□ □□□□ su.4 Nāé. .hàé%9 u: véAu

pé%su.sA: nu%9: AñéFu: vù.4%oñ hN □□□: vé.4 uv□ Oé: u □ hNā

- □. .hà%69 u: véAu: %Nv.sA: %9 hB: □
- □. .hà%9 B.sA: Nv.sA: %9 hB: □

Conclusion

In vitro □ 4 □ Oé : u x □ s A ANé 4 Fäi ANC su%nu 4Nu % l'expression d'AKT uv 9 hs N6A l'activité su l □ k□□□ in vivo □ éN 5Na sN % énnu □ 4 □ áv%N . 4C9 u : vC : u : i Oé : u éFéA : vN Fh 49 u V9 hée4 suN rhA 9 hA % A . hàè : v . éà èë . h àv éN oñN u □ h : v 4 □ □ □ □ □ nu , Na Nboôâu , Nu 4 i Oé : u àé4 : v 4 nhA 8é : nu V9 hée4 □
 □ é i Oé : u %9 i 4i 5NuÀ n rôle clé dans l'inhibition de la croissance des cellules tumorales pulmonaires □ □ u % é : éB % u
 nh9 . 4C9 u : véAu % h : v : Quu % éAu . hNanh9 . àu : sà 4u 9 Oné : A9 u % A . 4NC □

Annexe 6 : Poster présenté aux « 19^e colloque de la Ligue Nationale contre le Cancer ».

Bétaïne et/ou en C-Phycocyanine : effet sur la croissance tumorale des cellules A549 chez le rat Nude.

Carmen Dupuis¹, Marc Filaire^{1,2}, Adrien Rossary¹, Jean-Yves Berthon³, Jeremie Talvas¹, Edith Filaire⁴

(1) Université Clermont Auvergne, UNH, UMR 1019 INRA-UcA, équipe ECREIN, Clermont-Ferrand ;

(2) Centre Jean Perrin, Service de chirurgie thoracique, Clermont-Ferrand ;

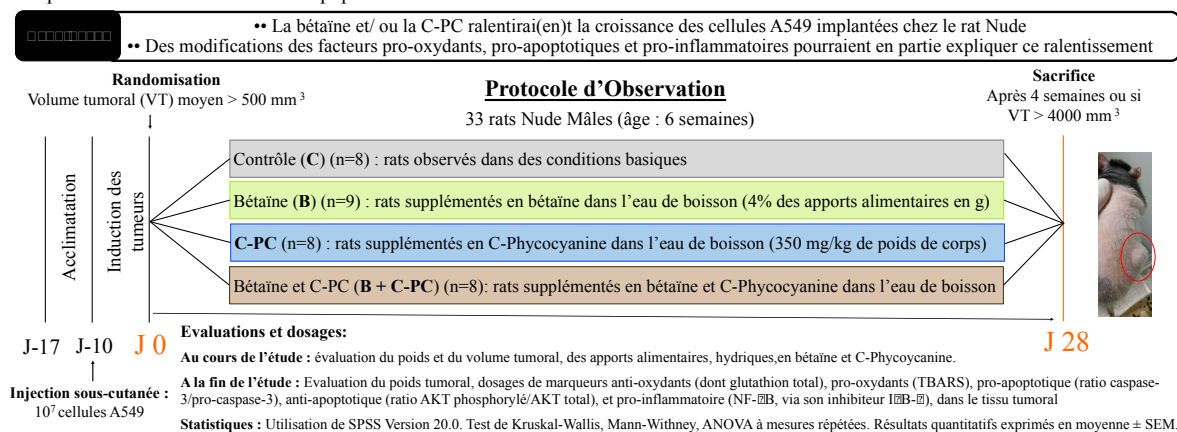
(3) GreenTech SA, Biopôle Clermont-Limagne, Saint-Beauzire ;

(4) Université d'Orléans, Université Paris-Sud, Laboratoire CIAMS, EA4532, Orléans.



Introduction

Le **stress oxydatif** (SO) est impliqué dans la carcinogénèse. Les facteurs nutritionnels peuvent limiter la progression tumorale. Parmi eux, la **bétaïne** a une fonction de **donneur de méthyle** et semble avoir des **propriétés anti-oxydantes** (Dou et al. 2014). Des apports en bêtaïne et en choline (précurseur de la bêtaïne) pourrait **réduire le risque d'avoir un cancer du poumon** (Ying et al. 2013). Par ailleurs, une supplémentation en bêtaïne permettrait de diminuer le SO et l'inflammation induits par la cisplatine, utilisée dans le cadre d'une chimiothérapie (Hagar et al. 2015). La **C-Phycocyanine (C-PC)** est une phycobiliprotéine extraite à partir d'algues ayant des propriétés **anti-oxydantes** et pouvant induire l'**apoptose des cellules cancéreuses** (Basha et al. 2008). Notre équipe a étudié *in vitro* l'association de ces deux micronutriments et a montré que la **bétaïne et la C-PC engendraient une diminution de la viabilité des cellules cancéreuses pulmonaires A549** (Bingula et al. 2016). Dans ce présent travail, l'effet de la bêtaïne et/ou de la C-PC sur la croissance des cellules A549 implantées chez le rat a été évalué. Des explications mécanistiques au travers de l'évaluation du SO, des marqueurs de l'inflammation et de l'apoptose sont avancées.



1. Ralentissement de la croissance tumorale

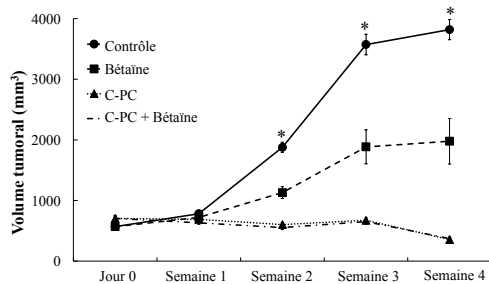


Figure 1. Evolution du volume tumoral par groupe. Moyenne $\pm$ SEM
 *p<0.05

Résultats

2. Activité pro-oxydante dans la tumeur

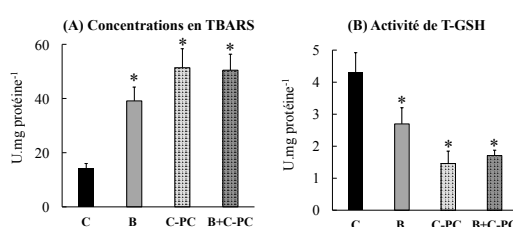


Figure 2. Modifications de l'équilibre redox tumoral. Concentrations (kits enzymatiques) en (A) TBARS, marqueur de la peroxydation lipidique et (B) Glutathion total (T-GSH), marqueur anti-oxydant. Moyenne $\pm$ SEM. *p<0.05

3. Activités pro-apoptotique et pro-inflammatoire dans la tumeur

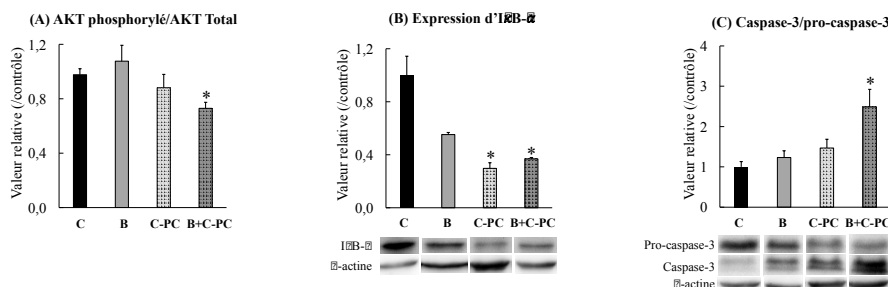


Figure 3. (A) Diminution de la phosphorylation d'AKT (ELISA) et de (B) l'expression d'I κ B- α , l'inhibiteur de NF- κ B (WB), (C) augmentation du clivage de la caspase-3 (WB) induites par une supplémentation en Bétaïne et C-PC. Moyenne $\pm$ SEM. *p<0.05

Conclusion

La bêtaïne et la C-PC ralentissent la croissance des cellules tumorales pulmonaires implantées chez le rat. Ce ralentissement de la croissance tumorale pourrait être en partie dû aux activités pro-oxydante, pro-apoptotique et pro-inflammatoire au sein de la tumeur induites par ces deux traitements. Des analyses complémentaires sont nécessaires pour comprendre les mécanismes impliqués.