

République Algérienne démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

UNIVERSITE ABOU BEKR BELKAID – TLEMCEM

Faculté des Sciences de la Nature de la Vie, des sciences de la Terre et de

l'Univers

Département des Sciences Agronomiques

**Laboratoire des Produits Naturels (LAPRONA)**

**THESE**

Présentée par : **NANI Abdelhafid**

En vue de l'obtention du diplôme de Doctorat en Agronomie,

**Option : Nutrition**

Thème

**Effets des polyphénols de mil sur le cancer de l'os et son mode d'action sur le système immunitaire**

Soutenue publiquement le 02/11/2017, devant le jury composé de :

<b>Président :</b>	Mr AMRANI Sidi Mohamed	Professeur	Université de Tlemcen
<b>Directrice de thèse :</b>	Mme BELARBI Meriem	Professeur	Université de Tlemcen
<b>Co-Directeur de thèse :</b>	Mr HICHAMI Aziz	Maitre de conférences	Université de Bourgogne
<b>Examineur :</b>	Mr KHAN Naim Akhtar	Professeur	Université de Bourgogne
<b>Examineur :</b>	Mme ATIK Fouzia	Professeur	Université de Tlemcen
<b>Examineur :</b>	Mr BEGHADAD Choukri	Maitre de conférences	Université de Tlemcen

Année universitaire : 2016/2017

## **Remerciements**

*Avec l'aide de Dieu tout puissant, j'ai pu achever ce travail, il me tient aussi à cœur de remercier tous ceux qui y ont contribué de près ou de loin.*

*Cette thèse s'inscrit dans un projet de collaboration bilatéral Franco-Algérien : Tassili N° 14MDU910 - Campus France N° 30850QG « **MODULATION DE L'INFLAMMATION ET DE L'INCIDENCE DES CANCERS PAR LES EXTRAITS LIPIDIQUES ET POLY-PHÉNOLIQUES DE PLANTES DU MAGHREB** ».*

*J'adresse une profonde reconnaissance à ma directrice de thèse, **Meriem Belarbi**, Professeur à l'UABT et vice doyenne chargée de la pédagogie à la faculté de S.N.V/ S.T.U, pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire, Laboratoire des Produits Naturels (LAPRONA) à l'UABT, et fait l'honneur de m'encadrer au cours de ma formation. Merci pour avoir toujours été disponible et pour avoir été à mon écoute, pour m'avoir guidé tout en me laissant libre dans mes choix.*

*Il m'est agréable de remercier mon co-directeur de thèse, **Aziz Hichami**, Maître de Conférences à l'Université de Bourgogne-Franche comté (France). J'adresse mes plus vifs remerciements pour son aide, sa gentillesse au quotidien, tous ses encouragements et son soutien dans les moments difficiles, merci pour votre amitié... « **Ya mâalim** ». Je tiens également à exprimer à l'ensemble de mes encadrants, mes sincères remerciements pour les nombreuses heures investies dans la correction du présent travail.*

*La réalisation de cette thèse a été rendue possible grâce à **Naim Akhtar Khan**, Professeur CE à l'Université de Bourgogne-Franche comté (France), qui m'a permis de réaliser, au sein de son laboratoire « Nutox, Inserm U1231 », une thèse sur un sujet qui me tenait particulièrement à cœur. Un grand merci pour ses précieux conseils et, également, pour l'incroyable rigueur scientifique qu'il a su me faire partager, et particulièrement de m'avoir appris l'art de la rédaction.*

*Je suis très reconnaissant à tous les membres de l'équipe « Immunothérapie et chimiothérapie des cancers, Inserm U1231 » sous la direction de **François Ghiringhelli**, Professeur à l'Université de Bourgogne-Franche comté et oncologue au centre Georges-François Leclerc, Dijon (France), mais tout particulièrement **Mickael Rialland** et **Cédric Rébé** qui ont collaboré aux différents travaux que j'ai mené, pour leurs discussions et leurs aides qui ont bien éclairé ma lanterne sur la signalisation cellulaire.*

*Je tiens également à remercier Mr **Sidi Mohamed Amrani** de me faire l'honneur de présider le jury de cette thèse. Que M<sup>me</sup> **Fouzia Atik**, Professeur à l'UABT et Mr **Choukri Beghdad**, Maître de Conférences de Classe A à l'UABT, trouvent ici l'expression de ma plus haute considération et de ma sincère reconnaissance pour avoir accepté de juger ce travail. Les remarques, les suggestions et les critiques que vous allez m'apporter vont, sans doute, me permettre d'enrichir le contenu de ce travail et d'aborder d'autres perspectives.*

*Je remercie sincèrement mon étudiant et mon collègue, mais surtout mon cher ami **Ishak Boukhetache** pour sa grande contribution dans la réalisation de la partie du pouvoir antioxydant. J'adresse ma sincère gratitude à ma chère collègue **Malika Bahiani** pour ses conseils, et particulièrement pour ses touches spéciales apportées sur ce travail.*

*Je n'oublie pas **Taha Merghoub**, Associate Professor à Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, NYC. Je suis très reconnaissant de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire, Laboratory of Tumor Immunology, et de m'avoir initié dans la culture des cellules cancéreuses et la cytométrie. Mes gratitude s'adressent aussi à **Billel** et **Sadna** pour leur précieuse collaboration pendant mon stage à MS-KCC.*

*À tout le personnel de la plateforme de cytométrie DIJON : **Arlette, Anabelle, Serge**. Merci pour votre gentillesse, disponibilité et orientation. Je n'oublie pas ma collègue **Adélie** pour son aide précieuse en cytométrie en flux.*

*J'adresse également mes remerciements aux personnes qui ont contribué à l'aboutissement de ce mémoire : **Joseph, Sandrine, Souleymane, Wided, Selva, Sylvia, Mohammed, Lisa, Madjid, Ikram, Fatima Zohra, Abdennour, Babar, Danish, Fatima Zahra, Adel, Julia, Léa, Sarra, Hela et Isma** pour leurs aides et leurs sympathies. Merci à tous les membres de l'unité INSERM U1231.*

*Je tiens à remercier de tout mon cœur mes parents qui n'ont jamais épargné un effort pour me soutenir, me reconforter et m'encourager. Sans vous, rien n'aurait été possible, « Merci pour votre soutien et votre amour » ! À tous mes frères et sœurs pour leur soutien sans faille et permanent. À tous les membres de ma famille, ma belle-famille ou considérés au même égard que ma famille « Merci, cette thèse est la vôtre » !*

*Sans me permettre d'oublier d'exprimer un grand merci du fond du cœur à ma femme « **Zohra** » qui est toujours à mes côtés, qui m'a aidé, m'a encouragé et m'a soutenu surtout dans les moments difficiles. Un grand merci également, plein d'amour et de tendresse, pour mon ange « **Inès** » que Dieu la protège.*

*Un simple merci ne serait pas suffisant pour exprimer ce que je dois à tous mes amis que à je dois une grande vénération.*

**Abdelhafid**

## الملخص

يهدف هذا العمل للتحقق من القوة المضادة للأكسدة، والآثار المناعية، والنشاط المضاد للأورام للمستخلصات الفينولية من حبوب نبات الدخن *Pennisetum glaucum* أظهرت النتائج أن القوى المضادة للأكسدة لبعض المستخلصات هي مماثلة لتلك التي أدت من طرف المراجع، BHA وفيتامين C، مع القيم EC50 من مقتطفات اختبار تتراوح بين 1268،0 إلى 3228،0 ملغ / مل. علاوة على ذلك، المركبات الفينولية تحول دون انتشار الخلايا التائية. وبالتالي، فإنها تقلص فسفرة ERK-1 / ERK2 والتعبير المورثي ل-IL-2. المركبات الفينولية تسببت بموت خلايا U2OS مع IC50 حوالي 80 ميكروغرام / مل. أظهر وسم AAD-7 و Annexin-V أن المركبات الفينولية أدت لموت الخلايا بشكل أساسي عن طريق الموت المبرمج للخلايا، والذي أكد في نقصان موت هاته الخلايا عند معالجتها بمانع بروتينات الموت المبرمج، z-VAD-fmk. في الواقع تسببت المركبات الفينولية في زيادة الكالسيوم الخلوي و تفعيل caspases و PARP. زيادة على ذلك لوحظت زيادة في نشاط P38 MAPK و JNK / SAPK، وكبح مسار c-SRC / AKT. وأخيراً، أظهر تحليل دورة الخلية أن المركبات الفينولية خفضت CDK2 وزادت التعبير للسيكلين E، مما أدى إلى تراكم خلايا U2OS في المرحلة S. نخلص إلى أن المركبات الفينولية من الدخن لديها أنشطة مضادة للأكسدة، ومغيرة للمناعة ومضاد للأورام.

الكلمات الرئيسية: الدخن ، البولي فينول، الدهون، الخلايا التائية، ساركومة العظام، موت الخلايا المبرمج، إشارات الكالسيوم

## Résumé

Le présent travail vise à évaluer le pouvoir antioxydant, les effets immunomodulateurs, et l'activité antitumorale des extraits polyphénoliques des grains du mil perlé (ou *Pennisetum glaucum*). Les résultats ont montré que les pouvoirs antioxydants de certains extraits sont semblables à celles exercés par les antioxydants de références, BHA et de la vitamine C, avec des valeurs de EC50 des extraits testés allant de 0,1268 à 0,3228 mg/mL. En outre, les composés phénoliques ont inhibé la prolifération des lymphocytes T induite par des mitogènes. Ainsi, ils ont diminué la phosphorylation de ERK1 / ERK2 et l'expression génique de l'IL-2. Les polyphénols du mil ont induit de façon dose-dépendante la mort des cellules U2OS avec une EC50 d'environ 80 µg/mL. Le marquage Annexin-V/7-AAD a montré que les polyphénols du millet induisent la mort cellulaire principalement par apoptose caspase-dépendante qui a été confirmée par une diminution de la mort cellulaire quand ces cellules étaient co-traitées avec un inhibiteur pan-caspase, z-VAD-fmk. En effet, l'extrait polyphénolique a provoqué des augmentations du calcium cytoplasmique associées à l'activation des caspases et le clivage des PARP. Les résultats de western blot ont révélé que les composés phénoliques ont induit l'activation des p38 MAPK, SAPK/JNK, et ils ont inhibé la voie c-SRC / AKT. Enfin, l'analyse du cycle cellulaire a montré que ces composés phénoliques ont diminué CDK2 associé d'une augmentation de l'expression de la cycline E, ce qui entraîne une accumulation U2OS cellules en phase S. Nous concluons que les composés phénoliques de millet perlé ont des activités antioxydantes, immuomodulateurs et antitumoraux.

**Mots clés :** *mil perlé, polyphénols, lipides, cellules T, ostéosarcome, apoptose, signalisation calcique*

## **Abstract**

The present work aims to check the antioxidant power, the immunomodulatory effects, and antitumor activity of polyphenolic extracts from pearl millets (or *Pennisetum glaucum*) grains. Results showed that the antioxidants powers of some extracts are similar to those exerted by references, BHA and Vitamin C, with IC<sub>50</sub> values of the tested extracts ranging from 0,1268 to 0,3228 mg / mL. Moreover, phenolic compounds inhibited mitogen-induced T-cell proliferation. Thus, they diminished ERK1/ERK2 phosphorylation and IL-2 expression. Polyphenolic extract dose-dependently induced U2OS cells death with an IC<sub>50</sub> around 80 µg/mL. 7-AAD and Annexin-V staining showed that PGPC induced cell death mainly through caspase-dependent apoptosis evidenced by cell death decrease when they were co-treated with pan-caspase inhibitor, z-VAD-fmk. In fact, polyphenolic extract caused increases in cytoplasmic calcium associated with caspases activation and PARP cleavage. Western blotting analysis revealed that phenolic compounds upregulated p38 MAPK and SAPK/JNK activity and inhibited c-SRC/AKT pathway. Finally, cell cycle analysis showed that PGPC decreased CDK2 and increased cyclin E expression, resulting in U2OS cells accumulation in S phase. We conclude that phenolic compounds from pearl millet have antioxidant, immunomodulatory, and antitumor activities.

***Key words: pearl millet, polyphenols, lipids, T cells, osteosarcoma, apoptosis, calcium signaling***

## Liste des abréviations

**[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>**: calcium libre intracellulaire

**3-MA**: 3-Methyladenine

**5-FU**: 5-Fluoro-Uracile

**7AAD**: 7-amino-actinomycin D

**AcOH**: acétone

**ADN**: Acide DésoxyriboNucléique

**Ag**: Antigène

**AIF**: Apoptosis Inducing Factor.

**AKT**: serine/threonine protein kinase  
isolated from the retrovirus AKT8

**ALP**: phosphatase alcaline

**AP-1**: protéine activatrice 1

**Apaf-1**: Apoptotic Proteases Activating  
Factor 1.

**APC**: Allophycocyanin

**APS**: Ammonium Persulphate

**ARN**: Acide RiboNucléique

**ATF**: Activating Transcription Factor

**ATP**: Adénosine TriPhosphate

**BAK**: BCL-2-Antagonist/Killer

**BAPTA**: 1,2-bis (2-aminophenoxy)-ethane-  
N, N, N', N'-tetraacetic acid

**BAX**: Bcl-2-Associated X Protein

**BCA**: acide bicinchoninique

**Bcl-2**: B-Cell Lymphoma Protein

**BF<sub>3</sub>**: trifluorure de bore

**BH3**: Bcl-2 homology domain 3

**BHA**: Butylated hydroxyanisole

**BID**: BH3-Interacting-domain Death agonist.

**BMU** : basal multicellular unit

**BSA** : Bovine serum albumin

**Caspase**: Cystéinyl Aspartate Specific  
Protease.

**CD-** : Cluster de Différenciation-

**Cdc2**: Cell division cycle protein 2,  
homologue de CDK1 humaine.

**CDK** : Cyclin-dependant kinase

**CHOP**: CEBP homologousprotein

**CKI**: Cyclin-dependent Kinase Inhibitor

## Liste des abréviations

**c-Kit:** a type III receptor tyrosine kinase (RTK)

**CMH :** complexe majeur d'histocompatibilité

**CPA :** cellules présentatrices de l'antigène

**CQ :** chloroquine

**CSM :** cellules souches mésenchymateuses

**c-Src:** proto-oncogene tyrosine-protein kinase

**DC:** cellules dendritiques

**DISC:** Death Inducing Signaling Complex

**DMSO:** Diméthylsulfoxyde

**DPPH:** 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl

**DPPH-H:** 2:2 diphenylepicrylhydrazine

**DTT:** Dithiothréitol

**EAG:** équivalent acide gallique

**EC:** équivalent catéchine

**EC50:** The half maximal effective concentration

**ECL:** Enhanced Chemiluminescence

**EDTA:** Ethylene diamine tetraacetic acid.

**EGTA:** Ethylene glycol bis (2-aminoethylether)-N,N'-tetraacetic acid

**eIF2:** Eukaryotic translation Initiation Factor 2

**EMAG:** Esters Méthyliques d'Acides Gras

**EndoG:** Endonuclease G

**ERK:** Extracellular signal-regulated kinase.

**ERO :** espèces réactives d'oxygènes

**FADD:** Fas associated death domain

**Fas:** (CD95, Apo-1, TNFRSF6), a prototypical apoptosis-inducing death receptor in the tumor necrosis factor receptor (TNFR) superfamily

**Fas-L:** Fas ligand

**G1 :** phase G1 du cycle cellulaire

**G2 :** phase G2 du cycle cellulaire

**GAG:** glycosaminoglycans

**Grb2:** Growth Receptors Binding Protein 2

**Grp78:** a 78-kDa glucose-regulated protein

**HEPES :** acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique

**HPLC :** chromatographie liquide de haute performance

**HtrA :** high-temperature requirement

## Liste des abréviations

<b>IFN-<math>\gamma</math></b> : Interféron $\gamma$	<b>NO</b> : monoxyde d'azote ou oxyde nitrique
<b>IgG</b> : Immunoglobulines de type G	<b>Omi/HtrA2</b> (humaine): homologue de HtrA (bactérienne)
<b>IL-</b> : InterLeukine-	<b>OMM</b> : membrane mitochondriale externe
<b>Iono</b> : Ionomycine	<b>OPG</b> : Ostéoprotégérine
<b>IP3</b> : inositol-1, 4, 5-triphosphate	<b>OS</b> : ostéosarcome
<b>IRE1</b> : Inositol Requiring Enzyme 1	<b>PARP</b> : Poly (ADP-ribose) polymérase
<b>IRM</b> : Imagerie par Résonance Magnétique	<b>PBS</b> : Phosphate buffered saline.
<b>ITAM</b> : Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif	<b>p-CA</b> : acide p-coumarique
<b>JNK</b> : Jun N-terminal kinase	<b>PCR</b> : réaction en chaîne par polymérisation
<b>LAT</b> : Linker for Activated T cells	<b>PERK</b> : Protein kinase RNA (PKR)-like Endoplasmic Reticulum Kinase
<b>LDL</b> : Low Density Lipoprotein	<b>PGL</b> : <i>Pennisetum glaucum</i> lipids
<b>LFA-3</b> : Lymphocytes Function-associated Antigen-3	<b>PGPC</b> : <i>Pennisetum glaucum</i> phenolic compounds
<b>MAPK</b> : Mitogen Activated Protein kinases	<b>PI3K</b> : Phosphatidyl-Inositol 3'-Kinase
<b>M-CSF</b> : Macrophage colony-stimulatingfactor	<b>PKC</b> : Protéines Kinases C
<b>MDM2</b> : Murine Double Minute 2	<b>PMA</b> : phorbol 12-myristate 13-acetate
<b>MeOH</b> : méthanol	<b>PMSF</b> : phénylméthylsulfonyle
<b>mTOR</b> : mammalian Target Of Rapamycin	<b>PNC</b> : protéines non-collagéniques
<b>MYC</b> : MYC proto-oncogene, basic helix-loop-helix	<b>PTH</b> : parathormone
	<b>PVDF</b> : polyvinylidène difluorure

## Liste des abréviations

**RANKL:** Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand

**Rb:** gène de la protéine du RétinoBlastome

**RE:** Réticulum endoplasmique

**RIPA:** Radio Immunoprecipitation Assay

**RNase:** Endoribonucléase

**RPMI-1640:** Medium for cell culture (Roswell Park Memorial Institute Medium)

**RT-qPCR :** Reverse Transcription-quantitative Polymerase Chain Reaction

**RuR:** Ruthenium Red

**S:** phase S du cycle cellulaire

**SAPK/JNK:** Stress-activated protein kinases /Jun amino-terminal kinases

**SDS:** Sodium-Dodécyl-Sulfate

**SERCA:** Sarco/endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase

**SLP-76:** SH2 domain-containing Leukocyte Protein, 76 kDa

**SMAC:** Supramolecular Activation Cluster

**STAT:** Signal Transducer and Activator of Transcription

**SVF:** Sérum de veau foetal.

**TBS-T:** Tris Buffered Saline-Tween-20

**TCR :** T Cell Receptor

**TG:** Thapsigargin

**Th:** T Helper cells

**TMED:** Tetramethylethylenediamine

**TNF:** Tumor Necrosis Factor

**TNFR:** Tumor Necrosis Factor Receptor

**TOP:** Tumeurs osseuses primitives

**TRAF2:** TNF-ReceptorAssociated Factor

**TRAIL:** Tumor necrosis factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand

**UPR:** unfolded protein response

**XPB1:** X box-bindingprotein 1

**XPB1s:** XPB1 épissé

**XIAP :** Xchromosome-linkedinhibitor of apoptosisprotein

**ZAP-70 :** Zeta-chain-Associated Protein

**z-VAD-fmk:** a pan-caspase inhibitor

**Remerciements**

**Résumé**

**Liste des abréviations**

**Liste des tableaux**

**Liste des figures**

## **Table des matières**

Introduction ..... 1

### **Revue bibliographique**

**I. Polyphénols..... 4**

I.1. Généralités ..... 4

I.2. Classification des composés phénoliques ..... 4

I.2.1. Les flavonoïdes ..... 6

I.2.2. Les non-flavonoïdes ..... 8

I.3. La diversité des polyphénols dans les grains des mils ..... 10

I.4. Effets immunomodulateurs et anticancéreux des polyphénols ..... 12

**II. La réponse immunitaire ..... 14**

II.1.Introduction..... 14

II.2. Les cellules immunocompétentes ..... 14

II.2.1. Origine ..... 15

II.2.3. Les lymphocytes T : rôle central dans la réponse immunitaire..... 16

II.3 L'activation des lymphocytes T ..... 19

II.3.1. Les récepteurs des cellules T ..... 19

II.3.2. L'activation des lymphocytes T par le TCR ..... 22

II.3.3. La transduction du signal via le TCR ..... 22

**III. Ostéosarcome ..... 24**

III.1.Physiologie du tissu osseux ..... 24

III.1.1. Généralités..... 24

III.1.2. Les fonctions physiologiques du tissu osseux ..... 24

III.1.3. Composition du tissu osseux ..... 25

III.1.4. Le remodelage osseux ..... 30

III.2. Les tumeurs osseuses primitives .....	31
III.3. Epidémiologie des ostéosarcomes .....	32
III.4. Localisations des ostéosarcomes .....	33
III.5. Anomalies cytogénétiques et épigénétiques dans les ostéosarcomes .....	34
<b>IV. L'apoptose .....</b>	<b>36</b>
IV.1. Les morts cellulaires : définitions et caractéristiques.....	36
IV.2. Caractéristiques de l'apoptose.....	37
IV.2.1. Critères morphologiques .....	37
IV.2.2. Critères biochimiques.....	38
IV.3. Les différentes voies de l'apoptose.....	38
IV.4. Rôle du calcium dans la régulation de l'apoptose .....	39
<b>V. Objectifs généraux de la thèse.....</b>	<b>42</b>
<b><u>Etude expérimentale</u></b>	
<b>I. Pouvoir antioxydant des polyphénols de mil.....</b>	<b>43</b>
I.1. Préparation du matériel biologique végétal.....	43
I.2. Détermination du taux d'humidité .....	44
I.3. Préparation des extraits polyphénoliques .....	44
I.4. Dosage des polyphénols.....	44
I.5. Dosage des flavonoïdes.....	45
I.6. La quantification des polyphénols par HPLC dans les grains de mil, cultivar Bechna.....	46
I.7. Pouvoir antioxydant <i>in vitro</i> de mil : test de DPPH.....	46
<b>II. Effet immunomodulateur des polyphénols et des lipides de mil .....</b>	<b>49</b>
II.1. Détermination de la composition en acides gras par chromatographie en phase gazeuse (CPG) .....	49
II.2. Isolement des lymphocytes T .....	50
II.3. Test de transformation lymphoblastique (TTL).....	51
II.4. Préparation des échantillons pour Western blot.....	51
II.5. Détection des MAP kinases par Western blot.....	52
II.6. Détermination de l'expression des ARNm par RTqPCR .....	52
II.7. Mesure de la signalisation calcique .....	53
<b>III. Effet anticancéreux des polyphénols du mil.....</b>	<b>54</b>
III.1. Culture cellulaire et traitements.....	54
III.1.1 Lignées cellulaires et entretien .....	54

III.1.2. Traitements PGPC, p-CA et 5-FU .....	55
III.1.3. Traitements avec les inhibiteurs .....	55
III.2. Mesure de la prolifération cellulaire.....	55
III.3. Marquage Annexin V et 7AAD.....	56
III.4. Détermination de l'expression des ARNm par RTqPCR .....	56
III.5. Western blot .....	57
III.5.1. Extraction et dosage des protéines.....	57
III.5.2. Migration et transfert.....	58
III.5.5. Immunoblotting et révélation .....	59
III.5.6. Arrachage d'anticorps et réutilisation de la membrane .....	61
III.6. Etude du cycle cellulaire sur cellules fixées par Cytométrie de flux.....	61
<b>IV. Analyse statistique .....</b>	<b>62</b>
<b><u>Résultats &amp; discussions</u></b>	
<b>I. Pouvoir antioxydant des extrais polyphénoliques de grains de mil.....</b>	<b>63</b>
I.1. Détermination du taux d'humidité.....	63
I.2. Rendements des extractions .....	63
I.3. Détermination de la teneur en polyphénols totaux.....	64
I.4. Détermination de la teneur en flavonoïdes.....	65
I.5. Le profil phénolique des grains du mil, cultivar Bechna .....	67
I.6. Pouvoir antioxydant: test DPPH antiradicalaire .....	68
I.7. Discussion.....	75
<b>II. Les effets immuno-modulateurs de l'extrait polyphénolique et lipidique des grains de mil, <i>Pennisetum glaucum</i>, cultivar Bechna.....</b>	<b>80</b>
II.1. La composition en acides gras des grains du mil, cultivar Bechna .....	80
II.2. PGPC et PGL diminuent la prolifération des lymphocytes T.....	80
II.3. PGL et PGPC diminuent l'activation de ERK1 / ERK2 induite par PMA.....	81
II.4. PGL et PGPC diminuent l'expression d'IL-2 dans l'ARNm .....	82
II.5. PGL et PGPC induisent des augmentations de [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> dans les cellules T spléniques .....	83
II.5. Discussion.....	86
<b>III. Effet anticancéreux de l'extrait polyphénolique des grains de mil, <i>Pennisetum glaucum</i>, cultivar Bechna.....</b>	<b>90</b>
III.1. Viabilité cellulaire .....	90
III.2. Induction de l'apoptose par PGPC et p-CA.....	91
III.3. Détection des protéines apoptotiques .....	93

III.4. Effet du PGPC sur l'augmentation du Ca <sup>2+</sup> intracellulaire dans les cellules U2OS .....	94
III.5. Effet de PGPC sur les voies de signalisation impliquées dans la prolifération des cellules U2OS .....	95
III.6. Analyse de la distribution du cycle cellulaire.....	96
III.7. Cyclines et CDK analyse d'expression .....	97
III.8. Discussion .....	97
<b>Conclusion .....</b>	<b>105</b>
<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>106</b>

# Introduction

### Introduction

Environ 20.000 espèces de plantes sont utilisées dans le monde à des fins alimentaires, thérapeutiques, pharmaceutiques et cosmétiques (Hmamouchi 1997). L'étude de la chimie des plantes (ou phytochimie) est en plein essor malgré son ancienneté. Actuellement, grâce au développement des méthodes d'extraction et des techniques d'analyses physico-chimiques, une meilleure connaissance de la composition des plantes d'importance alimentaire et thérapeutique est devenue possible. Ces techniques de recherche ont révélé que le règne végétal représente une source importante d'une immense variété de molécules bioactives. Ces molécules ne participent pas forcément à leur métabolisme de base, mais représentent plutôt des produits du métabolisme secondaire.

Les principaux métabolites secondaires sont les alcaloïdes, les terpénoïdes, et les composés phénoliques (ou polyphénols). Les polyphénols constituent une famille importante de métabolites secondaires du règne végétal qui correspondent à une large gamme de structures chimiques allant de molécules phénoliques simples à poids moléculaire faible tels les acides phénoliques à des composés hautement polymérisés comme les tannins (Martin & Andriantsitohaina 2002). Ces structures confèrent la couleur caractéristique de chaque plante. De plus, elles interviennent dans la protection des plantes contre les différentes attaques microbiennes et fongiques (Bruneton 1999).

Ces dernières années, de nombreuses études sont menées sur l'évaluation du profil phénolique de plusieurs plantes réputées pour leurs vertus thérapeutiques. D'ailleurs, les polyphénols sont connus pour leur capacité à piéger les espèces réactives d'oxygène, et par conséquent, maintiennent l'homéostasie oxydatif au niveau cellulaire. De plus, les polyphénols jouent un rôle très important dans la lutte contre diverses pathologies associées au stress oxydatif, telles que le cancer, les maladies neurodégénératives ou encore les maladies cardiovasculaires (Robards & Antolovich 1997; Yao et al. 2004; Manach et al. 2006). Les polyphénols sont les antioxydants les plus abondants dans notre alimentation d'origine végétale: céréales, fruits et légumes. Les céréales jouent un rôle important dans l'alimentation humaine. Les grains de céréales contiennent des acides phénoliques et des phyto-œstrogènes, et ils constituent également la principale source des lignanes. Ces grains peuvent aussi contenir des flavonoïdes (Liyana-Pathirana & Shahidi 2006).

Les recommandations actuelles des organisations internationales de santé et de nutrition, comme Food and Drug Administration (FDA), incitent la consommation de céréales complètes en raison de leurs effets bénéfiques sur la santé humaine (FDA, 1998). Cependant, le changement le plus radical survenu dans notre alimentation lors de la transition nutritionnelle d'un régime traditionnel vers une alimentation occidentale contemporaine correspond à une quasi-inversion des sources énergétiques. Basées initialement sur une écrasante prépondérance de glucides complexes (les céréales notamment), leur évolution s'est tournée vers des apports lipidiques de plus en plus élevés. Ce profond changement que l'on retrouve sous toutes les latitudes, s'explique par les progrès technologiques, les avantages économiques, mais l'appétence de l'homme pour les corps gras est déterminante (Benjelloun 2002). Cette malnutrition prédispose à plusieurs maladies telles que les maladies auto-immunes (ex. diabète) et l'obésité. Cette dernière est caractérisée par une inflammation chronique à bas bruit (Zhang et al. 2009). Il a été aussi suggéré que la diminution des antioxydants (contenus dans les fruits et légumes), l'augmentation de l'acide gras polyinsaturé n-6 (margarine, huile végétale) et la diminution des apports de n-3 (poissons huileux) contribuent au développement des réactions d'hypersensibilité telles que l'asthme et les maladies atopiques (Devereux & Seaton 2005). Dans la plupart de ces maladies, nous notons une dérégulation du système immunitaire, dont les lymphocytes T qui jouent un rôle primordial, accompagné d'une réponse inflammatoire plus ou moins sévère. Il a été rapporté que l'inflammation est à l'origine de la plupart des maladies chroniques tel le cancer (Heidland et al. 2006; Eiró & Vizoso 2012).

Le cancer de l'os (ou ostéosarcome) est la tumeur osseuse la plus fréquente avec une prévalence élevée chez les enfants et les adolescents (Mirabello et al. 2009). La chirurgie et la chimiothérapie sont les traitements standards de l'ostéosarcome (Luetke et al. 2014). Toutefois, outre la résistance ou la faible réponse aux agents chimiothérapeutiques, la chimiothérapie est connue pour sa toxicité (Brade et al. 1991; Bakhshi & Radhakrishnan 2010; Allison et al. 2012; Hospital 2008). En conséquence, les agents bioactifs d'origine alimentaire suscitent un intérêt croissant pour leurs potentiels chimiopréventifs. Des études épidémiologiques et précliniques suggèrent que les polyphénols alimentaires possèdent des propriétés chimiopréventives contre les cancers avec moins de toxicité et d'effets secondaires (Thomasset et al. 2007).

## Introduction

Les millets sont des céréales cultivées depuis plus de 3500 ans dans toute l'Afrique sahélienne et les pays tropicaux d'Afrique occidentale. Le terme millet (ou mil) se réfère à un certain nombre d'espèces différentes qui sont toutes des céréales à petits grains (Bender 2013). De nombreux travaux ont démontré que les grains de mil exercent des effets bénéfiques (Lee et al. 2010; Shobana et al. 2010; Shukla & Srivastava 2014). En Algérie la culture de mil perlé (ou *Pennisetum glaucum*) est surtout répandue au Sud-Ouest du pays. Dans la région d'Adrar, il est cultivé partout dans les oasis de différentes régions (Touat, Gourara et Tidikelt) où il est utilisé traditionnellement comme remède pour accélérer l'ossification en cas de fracture.

Il a été démontré que les polyphénols de sorgho, une céréale largement cultivée à côté du mil, ont des effets anti-tumorales et anti-métastatiques (Darvin et al. 2015). De ce fait, dans une perspective de valoriser une plante cultivée dans la région d'Adrar, notre étude se porte en premier abord sur l'extraction, le dosage, l'évaluation du pouvoir antioxydant des composés phénoliques de deux cultivars du mil perlé appelés localement Bechna et Mekrout. Deuxièmement, nous avons évalué les effets des extraits polyphénoliques et lipidiques du mil sur l'activation des lymphocytes T. Enfin, nous avons évalué l'effet de l'extrait polyphénolique sur l'induction de la mort programmée des cellules humaines de l'ostéosarcome, U2OS.

**Revue  
Bibliographique**

***PARTIE I***

---

***CONTEXTE SCIENTIFIQUE  
ET PROBLEMATIQUES***

## I. Polyphénols

### I.1. Généralités

Les composés phénoliques (ou polyphénols) sont des composés phytochimiques très répandus dans le règne végétal. Ces métabolites secondaires avec plus de 8000 structures phénoliques connues sont répartis dans les différentes parties de la plante ; racines, tiges, fleurs, et feuilles (Martin & Andriantsitohaina 2002; Mehinagic et al. 2011). Les principales sources alimentaires sont les fruits et les légumes, les boissons comme le vin rouge, le thé, le café, les jus de fruits, les graines oléagineuses, les légumes secs et les céréales (Middleton et al. 2000). Les principales classes de polyphénols présents dans les céréales sont les acides phénoliques, les flavonoïdes et les lignanes (Fardet et al. 2013).

### I.2. Classification des composés phénoliques

Les composés phénoliques sont l'une des trois grandes classes de métabolites secondaires des plantes. Leur biosynthèse comprend la voie des phénylpropanoïdes pour la construction squelette carboné C6-C3 (acides hydroxycinnamiques), voire C6-C1 (acides hydroxybenzoïques), et celle des flavonoïdes pour la construction du squelette tricyclique de type C6-C3-C6 (tableau 1). Les flavonoïdes composent la principale classe de composés phénoliques. Leurs groupements OH phénoliques, ainsi que le groupement OH occupant la position C3 de certaines sous-classes (flavanols, flavonols, anthocyanidines), sont fréquemment méthylés, glycosylés par une variété de sucres neutres (ex. : D-glucose, L-rhamnose), voire acylés par un résidu d'acide gallique des oligomères et des polymères par la formation des liaisons C4-C6 et C4-C8. Les proanthocyanidines ainsi formées constituent la famille des tanins dits « condensés » pour les distinguer des tanins dits « hydrolysables » (gallotannins et ellagitannins) dérivés de l'acide gallique. Le terme « polyphénols » est souvent pris dans son acception la plus large des « composés phénoliques », bien que certains (acides hydroxycinnamiques et hydroxybenzoïques) ne présentent en fait qu'un seul cycle phénolique (Fardet et al. 2013).

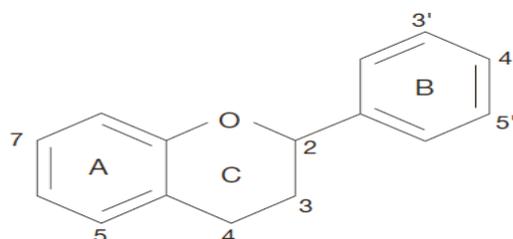
**Tableau 1: différentes classes des composés phénoliques selon le nombre de carbone**

Nombre de carbone	Squelette de base	Classe	Exemples
6	C6	Phénols simples	Hydroquinone
7	C6-C1	Acides benzoïques	Acide p-hydroxybenzoïque
8	C6-C2	Acétophénonnes	3-acétyl 6-méthoxybenzaldehyde
9	C6-C3	Acides cinnamiques Coumarines	Acide coumarique, acide caféique
10	C6-C4	Naphtoquinones	Shikonine
13	C6-C1-C6	Xanthonnes	Bellidifoline, mangocétine
14	C6-C2-C6	Stilbènes	Hydrangénol, Pinosylvine
15	C6-C3-C6	Flavonoïdes, Isoflavonoïdes	Quercétine Roténoïde
18	(C6-C3) <sub>2</sub>	Lignanes	Matairésinol
30	(C6-C3-C6) <sub>2</sub>	Bi flavonoïdes	Amentoflavone Hinokiflavone
N	(C6-C3-C6) <sub>n</sub>	Tanins condensés (proanthocyanidols)	Aesculitanins

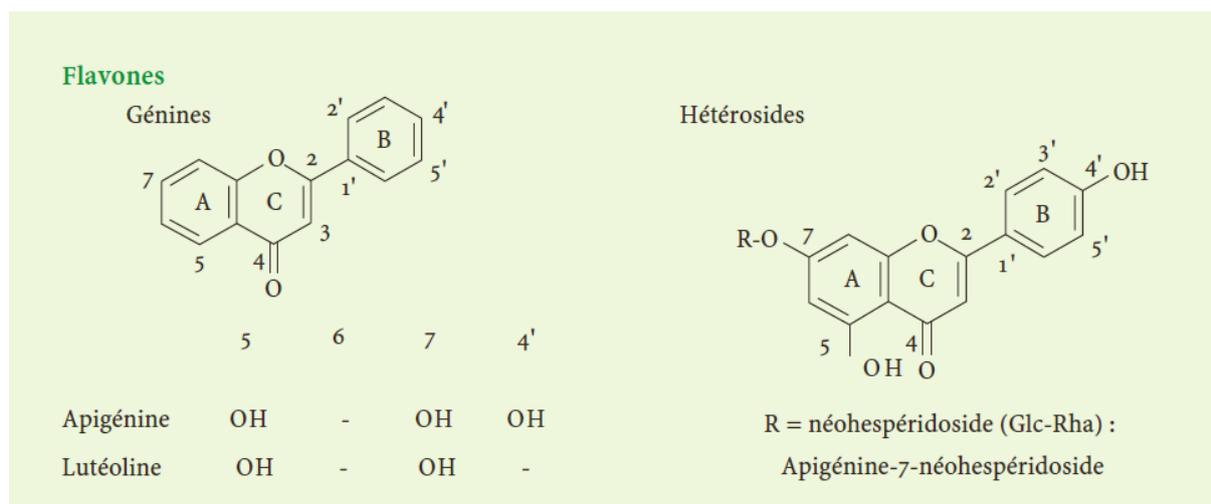
Selon Chira et al. (2008), les composés phénoliques peuvent être répartis en deux grands groupes : les flavonoïdes et les non-flavonoïdes.

### I.2.1. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes constituent un groupe de plus de 6000 composés naturels qui sont quasiment universels chez les plantes vasculaires (Erlund 2004). Tous les flavonoïdes dérivent de la même structure de base : l'enchaînement 2-phényl chromane (figure 1) (Ghedira 2005). Il existe plusieurs groupes de flavonoïdes, dont les principaux sont les flavones, les flavonols, les flavan-3-ols, les isoflavones, les flavanones et les anthocyanidines (figure 2) (Chira et al. 2008).

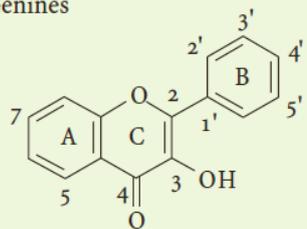


**Figure 1 : Structure de l'enchaînement 2-phényl chromane (flavane)** (Derbel & Ghedira 2005)



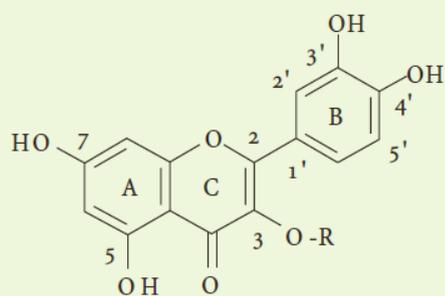
Flavonols

Génines



	5	7	3'	4'	5'
Quercétine	OH	OH	OH	OH	-
Kaempférol	OH	OH	-	OH	-
Myricétine	OH	OH	OH	OH	OH

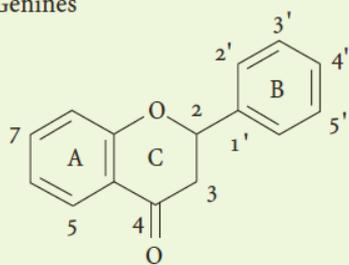
Hétérosides



R = rhamnose : Quercitroside

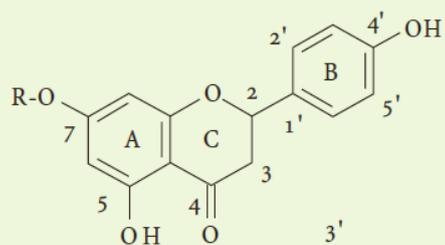
Flavanones

Génines



	5	7	4'
Naringénine	OH	OH	OH

Hétérosides



R = néohespéridoside : Naringine

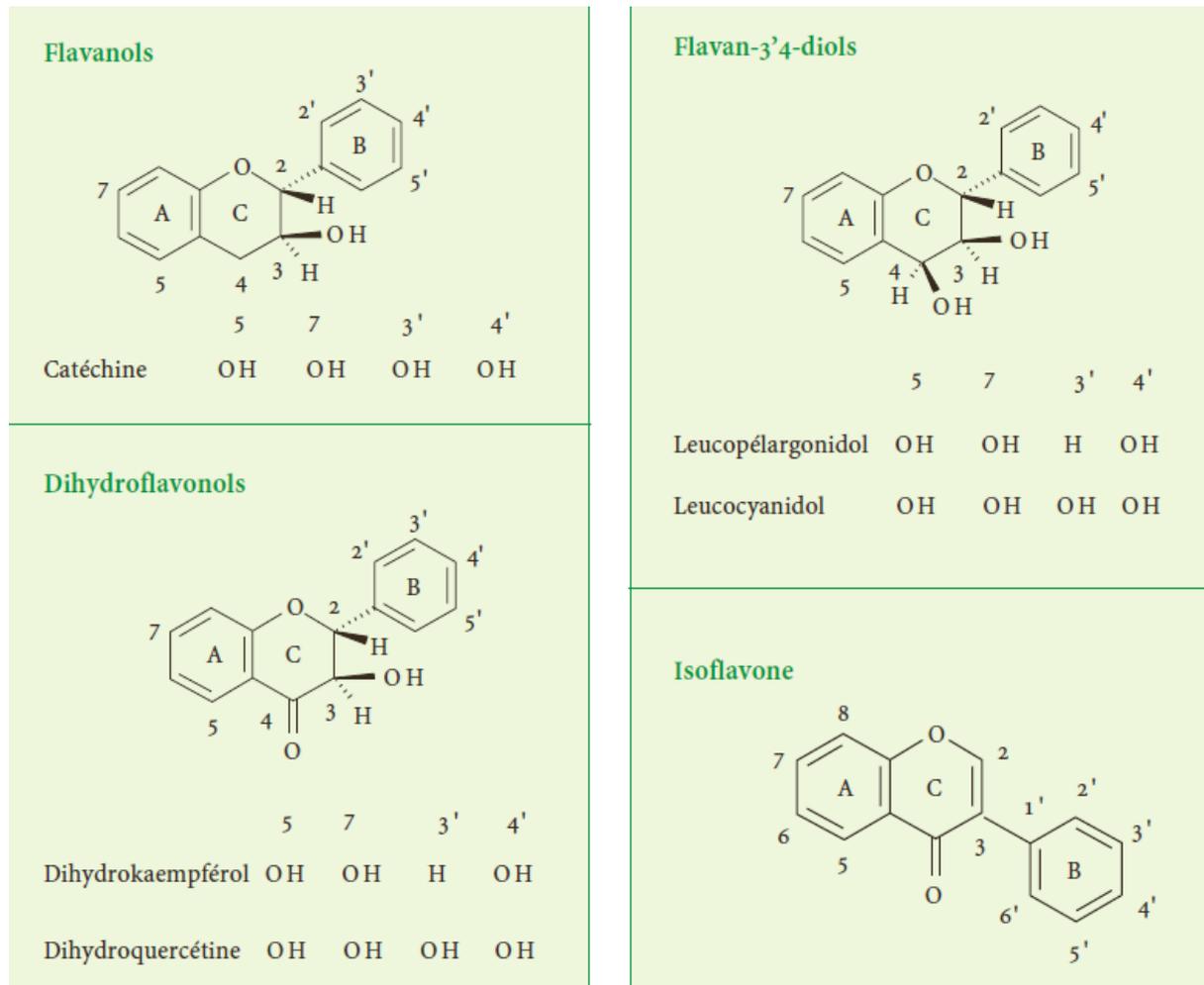


Figure 2: différentes classes des flavonoïdes (Ghedira 2005)

## I.2.2. Les non-flavonoïdes

Les acides phénoliques, les acides hydroxycinnamiques, et les stilbènes sont les principaux non-flavonoïdes d'importance alimentaire.

### I.2.2.1. Les phénols simples

Ils sont rares à l'état naturel qui sont des dérivés en C6 du noyau benzénique, et qui sont issus de la décarboxylation de l'acide shikimique. Parmi les phénols simples, on trouve l'hydroquinol, le pyrocatechol et le phloroglucinol (Chira et al. 2008)

### *1.2.2.2. Les acides phénoliques*

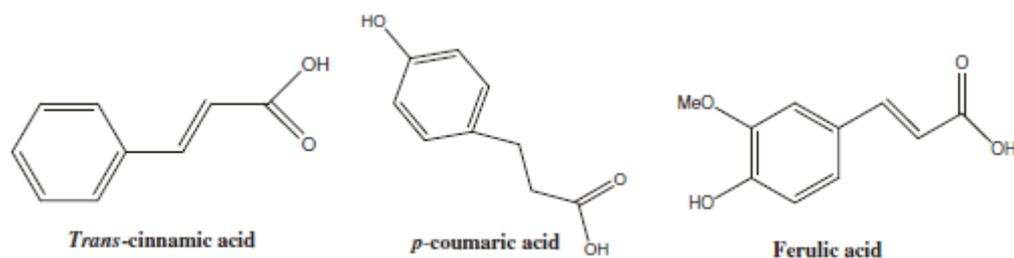
#### *Les acides hydroxybenzoïques*

Les acides hydroxybenzoïques présentent une structure en C6-C1, composée d'un noyau benzénique sur lequel vient s'attacher une chaîne aliphatique à un carbone. On trouve l'acide vanillique, l'acide syringique, l'acide gentisique et l'acide gallique (Chira et al. 2008).

#### *Les acides hydroxycinnamiques*

L'acide cinnamique est un composé C6-C3 produit par une désamination de la phénylalanine catalysée par la phénylalanine ammonia-lyase, l'acide paracoumarique (p-coumarique) est alors produit par l'hydroxylation de l'acide cinnamique. L'acide cinnamique et les acides hydroxycinnamiques sont aussi désignés sous le terme de phénylpropanoïdes. Leur squelette de base est un noyau benzénique avec une chaîne aliphatique à 3 carbones, avec un ou plusieurs groupements hydroxyles souvent estérifiés en ester d'alcool aliphatique. Les lignanes désignent des molécules qui résultent le plus souvent d'une liaison entre deux carbones de la chaîne latérale de deux acides hydroxycinnamiques. Ils sont constitués de deux unités de phénylpropane (Rezaire 2012).

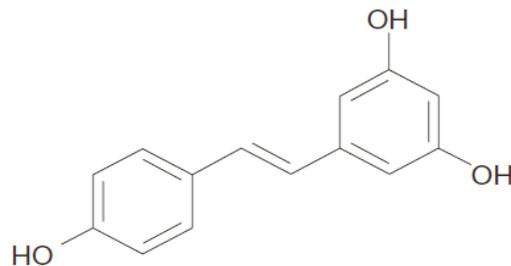
Les acides hydroxycinnamiques communs sont les acides caféïque, p-coumarique, férulique et sinapique. Ils sont produits par des séries d'hydroxylation et de méthylation et ils s'accumulent souvent sous forme d'esters d'acide tartrique : acides coutarique, caftarique et fertarique, esters respectifs des acides p-coumarique, férulique et sinapique (Chira et al. 2008).



**Figure 3: structures de quelques acides hydroxycinnamiques (Devi et al. 2014)**

### *1.2.2.3. Les stilbènes*

Les stilbènes sont des composés phénoliques contenant deux noyaux benzéniques reliés par un pont éthène (Bruneton 1999). Le resvératrol (3-4'-5trihydroxystilbène) est le seul stilbène identifié dans notre alimentation (figure 04) (Derbel & Ghedira 2005).



**Figure 4 :Structure du trans-resvératrol** (Derbel & Ghedira 2005)

A ces groupes de polyphénols s'ajoute le groupe des tanins qui sont divisés en deux groupes : les tanins condensés (non hydrolysables) qui sont des polymères de flavonols (catéchols) et de proanthocyanidols qui donnent par ébullition avec les acides minéraux dilués des composés insolubles amorphes, et de couleurs rouges appelés phlobaphènes ou rouge de tanins; et les tanins hydrolysables. Ces derniers sont des esters du glucose et d'acides phénoliques qui sont l'acide gallique (tanins galliques) et l'acide éllagique (tanins éllagiques). Leurs polymères sont appelés des tannoïdes.

### **1.3. La diversité des polyphénols dans les grains des mils**

Les céréales sont des plantes cultivées principalement pour leurs graines utilisées dans l'alimentation de l'homme et des animaux domestiques, souvent moulues sous forme de farine, mais aussi en grains et parfois sous forme de plante entière (fourrages).

En alimentation humaine ce sont surtout le blé, le riz et secondairement le maïs qui sont utilisés aujourd'hui. L'orge sert surtout en brasserie pour la fabrication du malt. Certaines céréales secondaires sont remises au goût du jour avec le retour à une agriculture biologique, comme l'épeautre, le seigle ou l'avoine (Alais & Linden 1997). Le mil est une céréale cultivée depuis plus de 3500 ans dans tout le Sahel (Gambie, Mali, Niger, Nigeria, Sénégal et le Tchad) et les pays tropicaux d'Afrique de l'Ouest. Originnaire du Niger et du Mali, sa culture

s'est diffusée en Afrique équatoriale puis vers l'Inde, notamment grâce à une adaptation génétique à différents climats, un des facteurs clés de la domestication et de la diffusion des plantes cultivées (Saïdou et al. 2009). En Algérie sa culture est surtout répandue au Sud-Ouest du pays. Dans la région d'Adrar, il était anciennement cultivé partout dans les oasis de différentes régions (Touat, Gourara et Tidikelt) (Rahal Bouziane, 2006).

« Mil » est un terme générique qui désigne plusieurs espèces dont les grains servent dans l'alimentation humaine et animale. Le plus souvent, le terme réfère toutefois à une variété particulière ; le mil perlé, une céréale qui appartient à la famille des Poaceae (*ex gramineae*), tribu des *Panicaceae* or c'est la variété la plus répandue à travers le monde. Elle est également appelée : *Pennisetum americanum*, *Pennisetum typhoides*, mil à chandelle ou mil pénicillaire (Maire 1952). En Amérique du Nord, on la retrouve surtout sous sa forme décortiquée ou alors moulue en farine (Caballero et al. 2003). Le mil à chandelle reste la principale source d'énergie de millions de personnes du fait qu'il représente le pilier de la sécurité alimentaire au Sahel. C'est une des cultures vivrières les plus importantes de la région, avec deux autres céréales le sorgho et le riz (Saïdou et al. 2009). Il constitue la source quotidienne d'environ 495 kcal pour chaque citoyen (FAOSTAT 2004). Au Niger, deuxième pays producteur d'Afrique après le Nigeria, le mil couvre par exemple plus de 65 % de la surface cultivée et constitue près des trois quarts de la production céréalière du pays (Saïdou et al. 2009). En Inde, le mil occupe la quatrième place après le riz, le blé et le sorgho (Wybrecht et al. 2002).

De nombreux efforts ont été consentis pour déterminer la répartition des composés phénoliques dans les différentes parties de la graine de mil, en utilisant des analyses chimiques et histochimiques. Les polyphénols ne sont pas répartis également d'une façon homogène dans le grain, mais plutôt sont principalement concentrés dans les couches extérieures, à savoir la couche d'aleurone, la testa et le péricarpe, qui forment les principaux composants de la fraction de son. Les examens histochimiques du grain de mil indique que près de 60% des polyphénols du mil sont concentrés dans le tégument qui représente environ 12% de la masse de grain. Les composés phénoliques se trouvent sous forme libre, soluble conjuguée et liée insoluble. Selon Hilu et al. (1978), la majorité des composés phénoliques présents dans le mil existent sous la forme de glycosides, alors que Subba Rao & Muralikrishna (2002) ont signalé l'acide férulique est l'acide phénolique lié majeur (18,60 mg / 100 g) et l'acide protocatéchique est l'acide phénolique libre majeur (45,0 mg / 100 g) du mil. Les composés phénoliques de mil sont stables à la chaleur, mais sensibles au pH et sont largement instables dans des conditions alcalines (Chethan & Malleshi 2007). La séparation des polyphénols par chromatographie liquide de haute performance (HPLC) a montré que les

analytes étaient des dérivés de l'acide benzoïque (acide gallique, acide protocatéchique et l'acide p-hydroxybenzoïque) et l'acide cinnamique (acide p-coumarique, acide syringique, acide férulique et acide trans-cinnamique) et un flavonoïde (quercétine). Les dérivés de l'acide benzoïque représentaient environ 85% des composés phénoliques totaux (Chethan et al. 2008). En plus de ces composés phénoliques, la spectrométrie de masse a montré la présence de naringénine, kaempferol, lutéolineglucoside, phloroglucinol, Apigenin, (+) - catéchine / (-) - épicatechine, trans-feruloylmique Acide, dimère de la prodéolinidine (epi / gallocatechins, 2GC), daidzeine, gallates de catéchine, trimères et tétragrammes de catéchine (Shobana et al. 2009).

### I.4. Effets immunomodulateurs et anticancéreux des polyphénols

Les éventuels bénéfices que pourraient apporter les polyphénols à la santé humaine intéressent particulièrement deux domaines : la phytothérapie – puisque l'explication de l'efficacité supposée de nombreuses plantes médicinales repose en tout ou partie sur la présence de composés phénoliques dans ces plantes – et l'hygiène alimentaire, du fait que de nombreuses études indiquent que les polyphénols pourraient diminuer le risque de survenue d'un certain nombre de pathologies, en particulier celles liées au vieillissement et aux lésions oxydatives (cancers, maladies cardiovasculaires ou neurodégénératives) (Leong & Shui 2002).

Les maladies auto-immunes comprennent une série de maladies systémiques telles que la polyarthrite rhumatoïde et le lupus systémique érythémateux qui sont souvent associés à des morbidité et mortalité (Wernick & Campbell 2000). L'inflammation et les dommages infligés aux propres tissus orchestrés par une réponse cellulaire et / ou humorale de l'hôte est la caractéristique de tous les syndromes auto-immunes. Les auto-anticorps, les réponses immunitaires spécifiques à médiation cellulaire, et le réseau de cytokines indépendant de cellules T sont les principaux acteurs de la pathogenèse de telles maladies auto-immunes telle l'arthrite rhumatoïde (Firestein 2003). Cette hyperaction du système immunitaire peut être régulée par un mécanisme dit immunomodulation. Cette dernière correspond au processus de modification d'une réponse immunitaire de manière positive ou négative par l'administration d'un médicament ou d'un composé (Tzianabos 2000). Récemment, plusieurs composés dérivés de plantes, tels que les triperines et les triptolides, ont été jugés immunosuppresseurs et sont maintenant largement utilisés dans le traitement de l'inflammation et maladies auto-immunes (Lu et al. 2011). L'acide p-coumarique est un polyphénol omniprésent dans les céréales

comme les mils, le maïs, l'avoine, le blé et les fruits et légumes comme les pommes, raisins, oranges, tomates, pommes de terre et épinards (Konishi et al. 2003). Il a été démontré que l'acide p-coumarique a un effet protecteur contre plusieurs pathologies comme l'athérosclérose (Zang et al. 2000), la carcinogenèse (Hudson et al. 2000) et contre les dommages causés par les UV aux tissus oculaires (Lodovici et al. 2009), et contre la lésion neuronale dans la maladie de Parkinson (Vauzour et al. 2010). Par ailleurs de nombreux travaux ont démontré que l'acide p-coumarique a un effet anti-ulcère (De Barros et al. 2008), antimicrobien (Jeong-Yong et al. 1998), anti-plaquettaire (Luceri et al. 2007), anti-mutagène (Ferguson et al. 2003), et des activités anti-inflammatoires (Luceri et al. 2004).

L'inflammation et le stress oxydatif sont à l'origine de plusieurs pathologies tel le cancer (Todoric et al. 2016; Prasad et al. 2016). Les cellules cancéreuses sont connues par leur capacité à s'échapper à l'apoptose. Les études impliquant le contrôle de l'apoptose dans le traitement du cancer, ont utilisé différentes stratégies concernant l'initiation, la progression et/ou l'invasion ; les trois étapes principales de la carcinogenèse. Cependant, le développement de la résistance tumorale et des effets secondaires indésirables des thérapies ciblées impliquent la nécessité de s'orienter vers de nouvelles stratégies de traitement avec une moindre toxicité. Les polyphénols naturels ont de nombreux avantages potentiels pour la santé humaine (Obrenovich et al. 2010). La relation entre les polyphénols naturels, l'apoptose et le cancer a été identifiée par des études qui ont démontré la capacité de ces composés à agir comme agents chimiopréventifs et / ou chimiothérapeutiques contre le cancer (Kelloff et al. 1994; Stoner & Mukhtar 1995; Jang et al. 1997). Les polyphénols, en plus de leur activité antioxydante et parmi de nombreux mécanismes potentiels, tel la régulation de l'expression des gènes impliqués dans la survie et la prolifération cellulaire (Kang et al. 2011), induisent des différents programmes de mort cellulaire (Giovannini & Masella 2012), ou inhibent la matrice des métalloprotéinases (Katiyar 2006) et le facteur de croissance endothélial vasculaire (Oak et al. 2005), contrecarrant ainsi l'angiogenèse et affectant le développement des métastases.

## II. La réponse immunitaire

### II.1.Introduction

L'immunité fait référence aux mécanismes de défense d'un organisme vivant contre des agents étrangers, notamment infectieux, susceptibles de menacer son bon fonctionnement ou sa survie. Parmi les acteurs de la réponse immunitaire, une distinction est classiquement faite entre les cellules responsables de la réponse spontanée, ou naturelle, assurant la défense de première ligne (monocytes, macrophages, neutrophiles, etc.), et celles impliquées dans l'immunité adaptative, que ce soit les médiateurs de l'immunité cellulaire (lymphocytes T) ou de la réponse humorale (lymphocytes B). Ces cellules reconnaissent les microorganismes de façon spécifique, que ceux-ci soient à l'intérieur des cellules de l'hôte ou à l'extérieur dans les liquides biologiques.

Les cellules B s'attaquent aux microorganismes extracellulaires et à leurs produits en sécrétant des anticorps, qui reconnaissent spécifiquement l'antigène et se lient à lui. L'antigène peut être une molécule à la surface d'un microorganisme ou bien une toxine produite par un agent infectieux. Les lymphocytes T ont une gamme d'activités plus large. Certains sont impliqués dans le contrôle du développement des lymphocytes B et de la production d'anticorps. D'autres cellules T interagissent avec les cellules phagocytaires pour les aider à détruire les microorganismes intracellulaires. Enfin, un troisième groupe de lymphocytes T reconnaît les cellules infectées par un virus et les détruit. En pratique, il y a beaucoup d'interactions entre les lymphocytes et les cellules phagocytaires (Attakpa 2010).

### II.2. Les cellules immunocompétentes

*Dans cette partie, nous aborderons brièvement le rôle des monocytes/macrophages et des lymphocytes B dans la réponse immunitaire et de façon détaillé l'activation des lymphocytes T. En effet, dans cette étude nous nous sommes intéressés principalement à la modulation de l'activité des lymphocytes T.*

### II.2.1. Origine

Toutes les cellules du système immunitaire sont issues d'une même cellule hématopoïétique qui au niveau de la moelle osseuse va se différencier en progéniteur myéloïde commun et en progéniteur lymphoïde commun. Les progéniteurs lymphoïdes communs vont pénétrer dans le thymus et y poursuivre leur différenciation. Les cellules en différenciation dans le thymus, aussi appelées thymocytes, subiront une sélection positive et une sélection négative qui permettront de s'assurer que les lymphocytes T qui sortiront du thymus: 1/ seront capables de reconnaître les cellules présentatrices de l'antigène et 2/ ne réagiront pas contre le soi. À la sortie du thymus, les lymphocytes T qui sont alors naïfs (ils n'ont jamais rencontré l'antigène pour lequel ils sont spécifiques), vont gagner, en empruntant la circulation sanguine, les organes lymphoïdes secondaires (figure 5) (Lafouresse 2012).

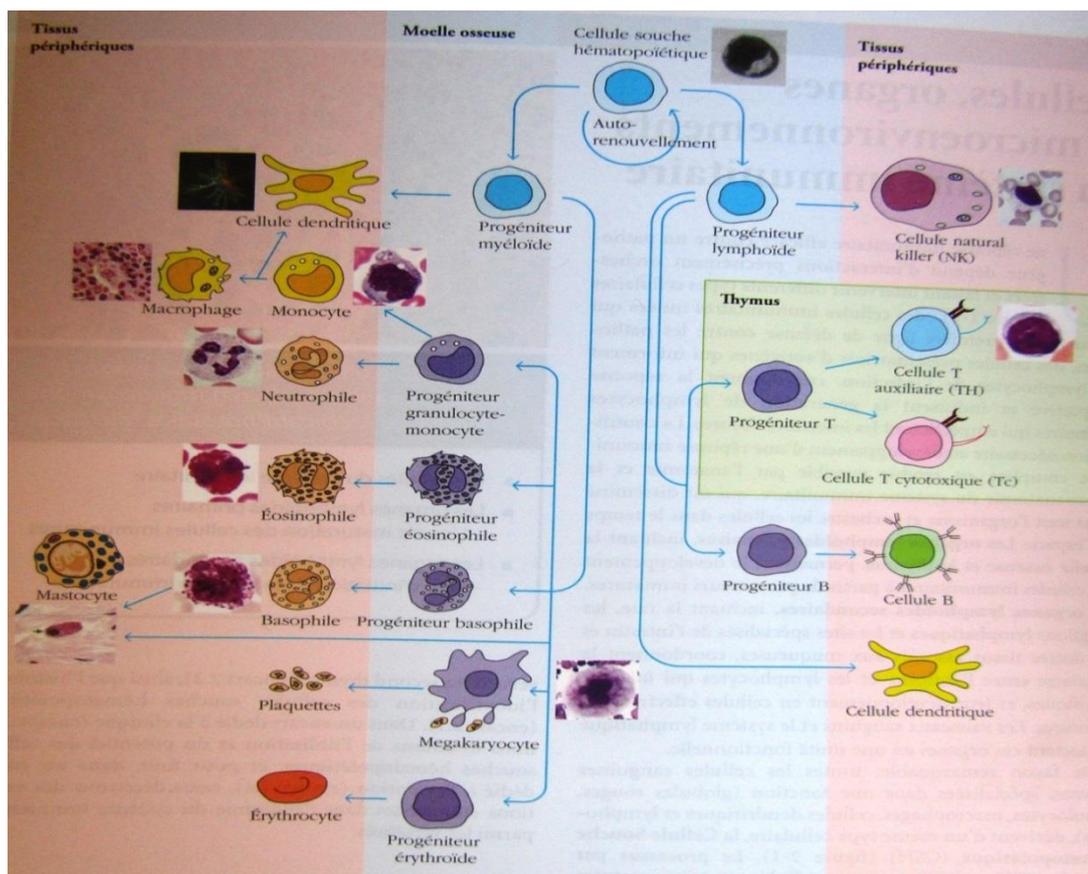


Figure 5 : schéma de l'hématopoïèse (Owen et al., 2014)

### II.2.3. Les lymphocytes T : rôle central dans la réponse immunitaire

Les lymphocytes T sont des cellules de l'immunité adaptative. Contrairement aux cellules de l'immunité innée, elles vont reconnaître les agents pathogènes de manière spécifique grâce à leur récepteur pour l'antigène : le TCR (T Cell Receptor). Les lymphocytes T sont divisés en 2 catégories en fonction des chaînes qui constituent leur TCR : les lymphocytes  $T_{\alpha\beta}$  qui sont majoritairement représentés et les lymphocytes  $T_{\gamma\delta}$  qui représentent 1 à 10 % des lymphocytes T totaux chez l'homme. Nous nous intéresserons uniquement aux lymphocytes  $T_{\alpha\beta}$  que nous appellerons pour des raisons de simplicité, lymphocytes T (Lafouresse 2012).

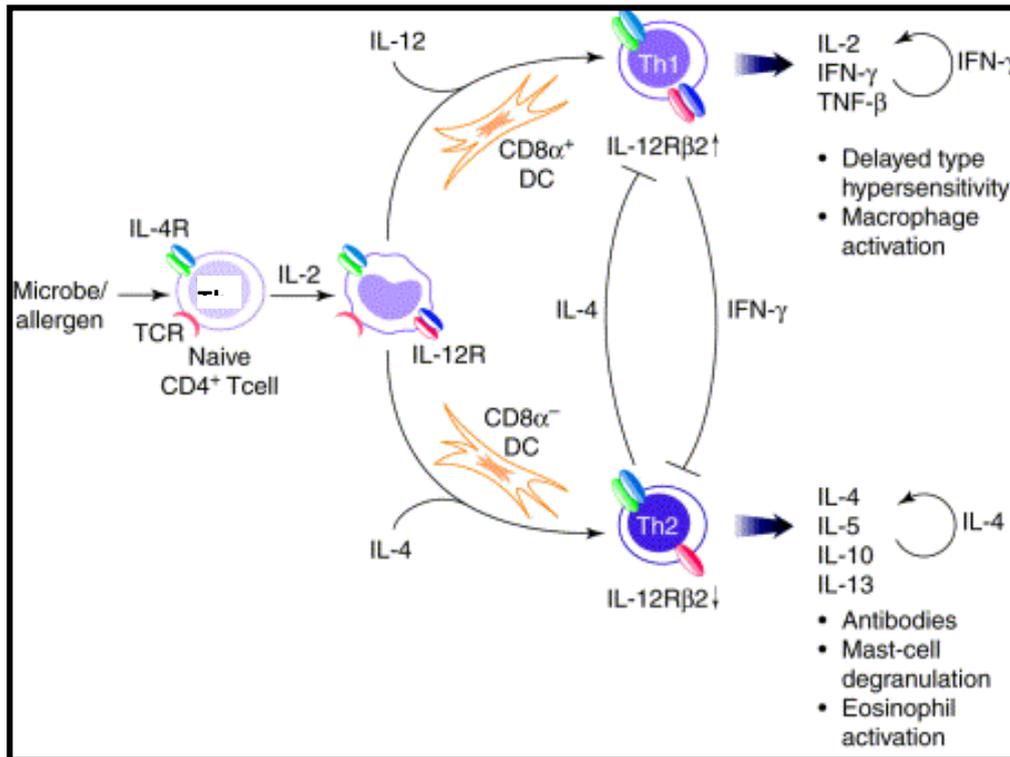
Contrairement aux lymphocytes B, les lymphocytes T ne sont capables de reconnaître l'antigène que si celui-ci est présenté à la surface de cellules spécialisées dites présentatrices de l'antigène (CPA) sous forme de petits fragments peptidiques. Les fragments d'antigènes sont représentés en association avec des molécules spécialisées dans cette fonction et codées par un ensemble de gènes, appelées complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Les cellules T utilisent leurs récepteurs spécifiques d'antigènes TCR pour reconnaître les peptides antigéniques associés à ces molécules du CMH. Le complexe majeur d'histocompatibilité joue un rôle primordial dans de nombreux aspects du fonctionnement du système immunitaire. Trois types différents de gènes ont été identifiés :

- les gènes de classe I, extrêmement polymorphes, ont un rôle important dans le rejet des greffes. Les glycoprotéines de classe I sont exprimées à la surface de toutes les cellules nucléées de l'organisme et servent de marqueurs spécifiques de soi pour les lymphocytes T cytotoxiques
- les gènes de classe II produisent également des glycoprotéines qui jouent un rôle important dans le contrôle des réponses cellulaires T et B, des interactions macrophages/cellules T auxiliaires (présentation de l'antigène)
- les gènes de classe III déterminent la structure et le niveau des composants du complément.

Les molécules du CMH de classe I sont présentes sur toutes les cellules de l'organisme et la présentation antigénique via les classes I permet d'activer les lymphocytes T  $CD8^+$ . Les molécules du CMH de classe II sont présentes sur les CPA (macrophages, cellules

dendritiques, lymphocytes B) et certaines cellules non immunes, activées. La reconnaissance d'un antigène présenté par une molécule du CMH de classe II active les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>. ***Les lymphocytes CD4<sup>+</sup> jouent un rôle central dans la régulation de la réponse immunitaire. Leur activation induit la prolifération cellulaire, la sécrétion de cytokines dont la nature oriente vers une réponse humorale et une maturation plasmocytaire ou vers une réponse cellulaire.***

Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs, n'ayant pas rencontré d'Antigène (Ag) produisent majoritairement de l'IL-2 lorsque les cellules rencontrent pour la première fois l'Ag. Ces cellules, dites aussi Th0, sont capables, sous l'influence de cytokines, de se différencier soit vers le phénotype Th1, soit vers le phénotype Th2 (figure 6). Les cellules T helper 1 (Th1) produisent de l'IL-2, de l'interféron  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), et le TNF- $\beta$ . Les cellules Th2 quant à elles, produisent de l'IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 et IL-13. Les cellules Th0 sécrètent les cytokines de type Th1 et Th2. Les cellules Th1 favorisent la réponse immunitaire à médiation cellulaire et, par conséquent, favorisent l'inflammation et la cytotoxicité cellulaire et modulent négativement la réaction d'hypersensibilité, tandis que les cellules Th2 sécrètent des cytokines permettant aux lymphocytes B de produire des IgG1 et IgE (Mosmann & Sad 1996). Les lymphocytes Th2 sécrètent également l'IL-4, l'IL-5, l'IL-10 et l'IL-13 (Liblau et al. 1995). La sous-population Th1 agit comme un activateur des monocytes/macrophages qui augmentent alors leurs capacités phagocytaires. Sous l'action de l'IL-12, sécrétée par les macrophages ou les cellules dendritiques, les cellules Th1 produisent l'IL-2, l'IFN- $\gamma$  et le TNF- $\alpha$  ce qui permet l'activation des macrophages (Mosmann & Coffman 1989). Les macrophages activés sécrètent l'IL-12, du NO, des métabolites de l'oxygène et des molécules de CMHII, ce qui permettra, en retour, l'activation des lymphocytes Th1 (figure 6).



**Figure 6 : Différenciation cellulaire des lymphocytes *T helper* (Th).** Un lymphocyte T CD4<sup>+</sup> naïf (Th0) est activé via le TCR lorsqu'il rencontre l'Ag présenté par une cellule présentatrice de l'Ag (CPA). Une fois activée, la cellule Th commence à proliférer et sécrète de l'IL-2 et exprime le récepteur de l'IL-12 (IL-12R). En présence d'IL-12, sécrétée par les macrophages ou par contact avec les cellules dendritiques (DC) CD8α<sup>+</sup>, un programme de différenciation vers le phénotype Th1 est initié. En présence d'IL-4, produite par le Th0 ou par contact avec les cellules dendritiques CD8α<sup>-</sup>, il y a une différenciation vers le phénotype Th2 et une diminution de l'expression du récepteur à l'IL-12 (IL-12Rβ2). Abréviations : TCR, *T-cell receptor* ; Th1, *T helper 1* ; Th2, *T helper 2* (Rengarajan et al. 2000).

Les couples de molécules d'adhésion CD28/B7.1 et 2 et CD2/LFA-3 participent aussi à cette activation, ainsi que le TNF- $\alpha$  de membrane des Th1. La production d'IL-12, par les macrophages, dépend d'un signal induit par l'IFN- $\gamma$  et d'un signal provenant des Th1 activés par l'intermédiaire du couple CD40 (macrophage)/CD40L (Th1). En revanche, les Th2, par l'intermédiaire de l'IL-10, inhibent les fonctions effectrices des macrophages. Le TGF- $\beta$  d'origine variée est également une cytokine inhibitrice des Th1. L'IL-4 des Th2 entraîne la diminution d'expression des IL-12R ( $\beta$ 2) des T, et l'IL-10 des Th2 diminue la sécrétion d'IL-12 par les macrophages. Donc, l'IL-4 et l'IL-10 freinent le passage vers le phénotype Th1.

Puisque les cytokines produites par les lymphocytes Th1 activent les monocytes et les macrophages, ces cytokines sont considérées comme des molécules pro-inflammatoires. Les cytokines produites par les lymphocytes Th2 suppriment les réponses déclenchées par les cellules Th1 et sont donc considérées comme anti-inflammatoires. Il est admis qu'une mauvaise régulation de la balance Th1/Th2, est impliquée dans un certain nombre de pathologies humaines (Lucey et al. 1996).

### II.3 L'activation des lymphocytes T

Dans cette partie, nous verrons les mécanismes impliqués dans l'activation des lymphocytes T et les voies de signalisation déclenchées à partir du TCR, en portant une attention particulière au signal calcique et au pH intracellulaire, voies étudiées dans la présente thèse. De nombreuses études réalisées sur les lymphocytes T mais également dans d'autres cellules du système immunitaire, démontrent que les polyphénols modulent l'ensemble de ces étapes selon des mécanismes variés.

#### II.3.1. Les récepteurs des cellules T

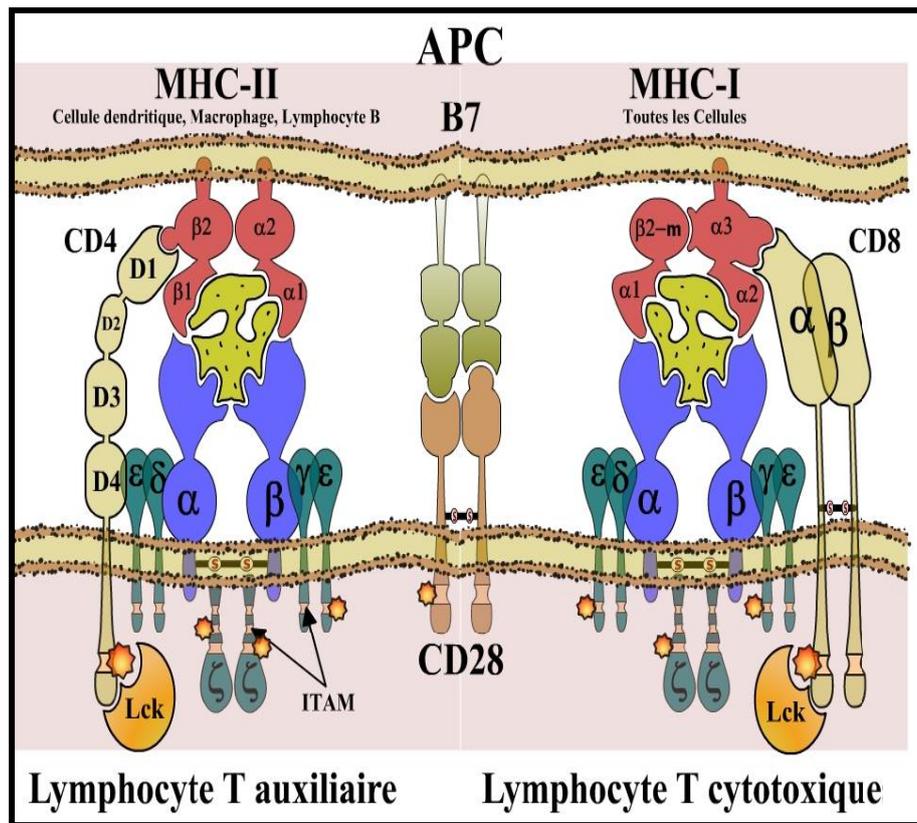
Le TCR est composé de deux chaînes polypeptidiques hétérodimères (chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  ou, plus rarement, chaînes  $\gamma$  et  $\delta$ ), liées de manière covalente par des ponts disulfures. Ces chaînes sont composées de domaines constants et variables. Les parties variables se situent vers l'extrémité N-terminale et sont responsables de la reconnaissance d'un antigène présenté par une molécule de CMH. Les parties variables sont générées par un réarrangement génique complexe, produisant ainsi de grandes possibilités d'affinité à différents peptides.

Contrairement aux CMH, un seul type de TCR est exprimé sur un lymphocyte. La sous-population T $\alpha\beta$  représente environ 85% des lymphocytes T sanguins. Seuls les lymphocytes

T, réagissant contre un antigène reconnu spécifiquement par leur TCR, vont générer une réponse immunitaire. Le TCR est accompagné de plusieurs autres molécules de surface essentielles à l'activation d'un lymphocyte T. Parmi celles-ci, on distingue le CD3. Le CD3 est un complexe protéique formé de 5 chaînes différentes (les chaînes  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$  et  $\eta$ ) qui s'associent pour former 3 dimères : un hétérodimère gamma et epsilon ( $\gamma\epsilon$ ), un hétérodimère delta et epsilon ( $\delta\epsilon$ ) et, soit un homodimère formé de deux chaînes zêta ( $\zeta\zeta$ ), soit un hétérodimère zêta et éta ( $\zeta\eta$ ). L'hétérodimère  $\zeta\eta$  ne se retrouve que dans 10% des CD3. Les chaînes du CD3 sont responsables de la signalisation moléculaire du TCR, menant à l'activation du lymphocyte. Chacune des chaînes du CD3 possède des sites de phosphorylation de tyrosine au niveau intracellulaire (ITAM, « immunoreceptor tyrosine-based activation motif »). Ces ITAM servent de substrat pour des kinases de la famille Src (Lck et Fyn) (Huang & Wange 2004; Razzaq et al. 2004). Il se déclenche alors une cascade complexe d'activation de différentes enzymes (figure 7).

La particularité de la reconnaissance, par le lymphocyte T, du peptide antigénique en association avec une des deux classes de CMH, impose l'existence de co-récepteurs. Associés au complexe TCR-CD3, ces co-récepteurs sont les molécules CD4 et CD8 capables de distinguer, respectivement, les molécules de CMH de classe II et I. Comme nous l'avons mentionné dans le chapitre précédent, on distingue donc, grâce à elles, deux populations de lymphocytes T :

- les lymphocytes T auxiliaires ou *Helper* exposant la molécule CD4 qui est une glycoprotéine monocaténaire transmembranaire de 54 kDa dont la portion extracellulaire comporte 4 domaines. La molécule de CD4 est capable de se lier à la partie invariante du CMH de classe II. Les Ag présentés sont des Ag exogènes qui ont été endocytés par les CPA.
- les lymphocytes T cytotoxiques exposant la molécule CD8 qui est un hétérodimère constitué de deux chaînes ( $\alpha$  et  $\beta$ ) liées de manière covalente. Ce sont des glycoprotéines transmembranaires distinctes mais de poids moléculaire identique (32 kDa) possédant un seul domaine extracellulaire. Ce domaine reconnaît la partie invariante des molécules de CMH de classe I. Les Ag présentés sont des Ag endogènes, produits par toutes les cellules nucléées de l'organisme.



**Figure 7 : Le complexe TCR et ses co-récepteurs.** Le TCR est une glycoprotéine de la membrane plasmique, composé de deux unités ( $\alpha$  et  $\beta$ ). Le complexe CD3 est associé à ce récepteur et ses sous-unités sont organisées en deux hétérodimères ( $\delta\epsilon$  et  $\gamma\epsilon$ ) et un homodimère ( $\zeta\zeta$ ). Elles portent toutes le motif ITAM (*Immune Receptor Tyrosine-based Activation Motif*) nécessaire à la transmission du signal du TCR. La molécule CD4 est un monomère contenant quatre domaines de type immunoglobuline (D1-4). La molécule CD8 est un hétérodimère formé d'une chaîne  $\alpha$  et d'une chaîne  $\beta$ , chacune a un seul domaine variable, associées de manière covalente par un pont disulfure. Les molécules de CD4 et CD8 sont impliquées dans la reconnaissance de la classe de CMH portée par la CPA. Ces deux récepteurs sont associés entre autre à une protéine tyrosine kinase de la famille Src, la protéine LcK, nécessaire à la sinalisation du TCR. Les lymphocytes nécessitent un second signal, le signal co-stimulateur qui est délivré par la liaison de la molécule CD28, présente sur les lymphocytes, à la molécule B7 présente, quant à elle, à la surface des CPA.

### II.3.2. L'activation des lymphocytes T par le TCR

Au cours de l'activation lymphocytaire, il existe des réponses précoces se produisant de quelques minutes à quelques heures après l'initiation de la transduction du signal, alors que d'autres réponses, dites tardives, peuvent se produire des jours après stimulation. Durant la phase précoce de l'activation, les lymphocytes T subissent d'énormes modifications biochimiques, telles que des phosphorylations-déphosphorylations de protéines, des variations de la membrane lipidique, des flux d'ions, des altérations du taux des nucléotides cycliques, des variations de synthèse d'ARN ainsi que des variations de synthèse protéique.

La réponse cellulaire plus tardive, telle que la prolifération, résulte généralement d'une cascade complexe d'événements impliquant l'activation de gènes. Le déclenchement des événements tardifs requiert un signal de co-stimulation, médié par le récepteur CD28 (Stephen 1996). La molécule CD28 (présente de manière constitutive à la surface des cellules T CD4<sup>+</sup> et à la surface de 50% des cellules CD8<sup>+</sup>) est un hétérodimère glycoprotéique capable d'interagir avec les ligands B7.1 et B7.2 présents sur les CPA. Cette interaction permet l'expression de l'IL-2 et de son récepteur (IL-2R ou CD25) et la progression des cellules au travers de la phase G2/M du cycle cellulaire. Sans les signaux issus de ce récepteur, la stimulation du TCR provoque l'anergie et la mort cellulaire par apoptose (Appleman & Boussiotis 2003).

*Dans cette partie du mémoire, nous aborderons les événements précoces de l'activation des cellules T, événements auxquels nous nous sommes intéressés.*

### II.3.3. La transduction du signal via le TCR

La réponse immunitaire est initiée par l'interaction d'un lymphocyte T avec une cellule présentatrice de l'Ag, qui peut être, comme nous l'avons vu précédemment, un macrophage, une cellule dendritique ou un lymphocyte B. L'interaction entre un lymphocyte T et une CPA conduit à la formation d'une structure particulière appelée synapse immunologique (SI), au niveau de laquelle un certain nombre de protéines à la surface de ces cellules contribuent à l'interaction intercellulaire (Nel 2002). Ces sites de contact servent à l'assemblage des molécules impliquées dans la signalisation et forment une structure appelée cluster d'activation supramoléculaire (SMAC, *Supramolecular Activation Cluster*).

La phosphorylation des motifs ITAM des sous-unités de CD3 agrégés par les tyrosines kinases de la famille Src, comme Lck et Fyn, constitue l'une des premières étapes consécutives à l'activation du TCR. Les cellules T expriment principalement la Lck qui se lie à l'extrémité cytoplasmique du récepteur CD4 ou CD8, selon le type de lymphocyte (Favero & Lafont 1998). Suite à la stimulation du TCR, cette kinase est redirigée, par son récepteur porteur, vers des structures particulières de la membrane plasmique riches en cholestérol et en glycosphingolipides appelés radeaux lipidiques ou lipid rafts (He et al. 2005). La tyrosine kinase Lck est activée par déphosphorylation d'un phosphate inhibiteur présent sur un résidu tyrosine en C-terminal de la protéine, par la phosphatase transmembranaire CD45. Par la suite, les tyrosines phosphorylées des ITAM offrent des sites de recrutement pour d'autres kinases comme celles de la famille Syk, qui comprend Syk et ZAP-70 (*Zeta-chain-Associated Protein of 70 kDa*). La ZAP-70, une fois recrutée au niveau du TCR, se fixe au niveau de la chaîne  $\zeta$  puis est phosphorylée et activée par Lck. Une fois activée, la ZAP-70 peut alors phosphoryler, à son tour, des molécules dépourvues d'activité catalytique qu'on appelle les molécules adaptatrices comme LAT (*Linker for Activated T cells*), Grb2 (*Growth Receptors Binding Protein 2*) et SLP-76 (*SH2 domain-containing Leukocyte Protein 76 kDa*). Ces molécules adaptatrices ont pour fonction d'assembler les complexes moléculaires responsables de la signalisation (Huang & Wange 2004).

*Les voies de signalisation déclenchées incluent l'augmentation de la concentration en calcium intracellulaire ( $[Ca^{2+}]_i$ ), la variation du pH<sub>i</sub>, l'activation des protéines kinases C (PKC) et la voie des MAP (Mitogen Activated Protein) kinases. Ces voies de signalisation sont complexes et interconnectées.*

### III. Ostéosarcome

#### III.1. Physiologie du tissu osseux

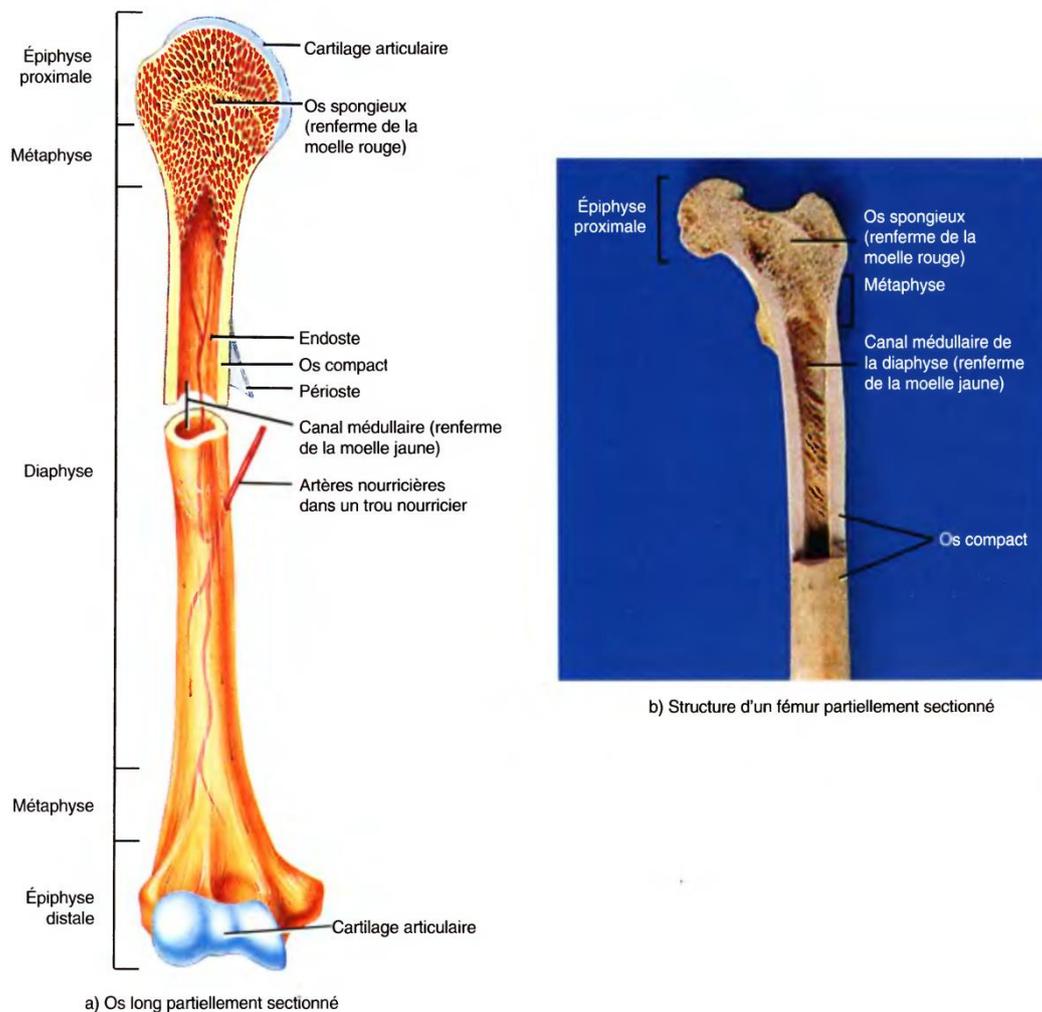
##### III.1.1. Généralités

Le tissu osseux constitue en grande partie le squelette, c'est-à-dire la charpente qui soutient et protège les organes du corps, et qui permet le mouvement. A la fois résistant et léger, l'os est un tissu dynamique qui se renouvelle constamment (Tortora & Grabowski 2002). Le tissu osseux est un tissu conjonctif hautement spécialisé, qui associe des cellules et une matrice extracellulaire construite autour d'une trame de fibres de collagène de type I (Chenu & Delmas 1994). Ce tissu est caractérisé par sa dureté et son apparente rigidité mais il n'est pas pour autant figé. Au contraire, c'est une structure dynamique en perpétuel remaniement car continuellement produite par les ostéoblastes, modifiée par les ostéocytes et détruite par les ostéoclastes (Toppets et al. 2004). La plupart des os (à l'exception de ceux du crâne) apparaissent d'abord sous la forme d'une ébauche cartilagineuse qui s'ossifie ensuite au fur et à mesure de la croissance du nouveau-né. Le tissu osseux ainsi constitué peut être spongieux ou compact. Les os sont classés selon leur forme en - os longs : le tibia, le fémur, le péroné, l'humérus, le radius et le cubitus ; - os courts : les os du carpe (poignet) du tarse (pieds) ; - os plats : les os du crâne et des côtes, les omoplates, le sternum ; - os irréguliers tels que les vertèbres, les os iliaques, certains os du crâne (Martin 2009; Follet 2003). Les os longs servent classiquement de modèle pour décrire la structure des os. Un os long typique chez l'adulte est constitué d'une partie centrale cylindrique appelée diaphyse, et de deux extrémités élargies et arrondies appelées épiphyses, couvertes de cartilage articulaire. Des régions coniques, appelées métaphyses, connectent la diaphyse à chaque épiphyse (figure 8) (Toppets et al. 2004).

##### III.1.2. Les fonctions physiologiques du tissu osseux

Les os jouent un rôle de soutien (pour les tissus mous), de protection (encéphale, moelle épinière, le cœur et les poumons, les organes reproducteurs internes), et ont un rôle primordial dans la réalisation des mouvements corporels (grâce à leur agencement avec les muscles squelettiques). Les os sont également des acteurs majeurs de l'homéostasie des

minéraux (principalement le calcium et le phosphore) et le site privilégié de l'hématopoïèse chez l'adulte (Martin 2009). Aussi, les lipides qui se trouvent dans les cellules de la moelle jaune constituent une réserve importante d'énergie chimique (Tortora & Grabowski 2002).



**Figure 8 : Structure d'un os long (Tortora & Grabowski, 2002)**

### III.1.3. Composition du tissu osseux

Le tissu osseux est composé de deux fractions, une fraction cellulaire et une fraction extracellulaire (Miller 2001). Le tissu osseux est constitué d'une trame protéique sur laquelle se fixe la phase minérale qui représente 70 % du poids de l'os sec (Chavassieux & Meunier 2003). La minéralisation de la matrice confère alors à l'os ses propriétés mécaniques (Vergne 2007).

### *III.1.3.1. La matrice extracellulaire*

La matrice extracellulaire occupe entre 92 et 95 % du volume tissulaire et peut être subdivisée en matrice organique (22 %) et inorganique (69 %). La teneur en eau, environ 9%, est très variable en fonction de l'âge et du degré de minéralisation (Toppets et al. 2004).

#### *La matrice organique*

La matrice organique représente 22% de la masse osseuse et forme ce que l'on appelle l'ostéoïde ou substance préosseuse. Elle est constituée de 90 % de collagène et de 10 % de protéines non-collagéniques (Vergne 2007). Les principales classes de macromolécules qui la composent forment la substance fibrillaire (90 %) contenant des protéines fibreuses structurales (collagène et élastine) ou adhérentes (fibronectine) ainsi que la substance interfibrillaire (10 %) englobant les glycosaminoglycans (GAG) et protéoglycans, des petites protéines non collagéniques comme l'ostéopontine, l'ostéonectine, l'ostéocalcine et les sialoprotéines osseuses ainsi que des lipides en petites quantités. Dans le tissu osseux, ces molécules peuvent induire ou inhiber la minéralisation (Toppets et al. 2004).

- Le collagène de type I

Le collagène de type I osseux est synthétisé par les ostéoblastes. Les molécules de collagène, après clivage des propeptides N et C terminaux, s'assemblent en fibrilles, elles-mêmes associées en fibres de collagène puis stabilisées par des pontages covalents non-réductibles, dont les plus connus sont la pyridinoline et la désoxypyridinoline, utilisées aujourd'hui comme marqueurs de la dégradation de la matrice osseuse.

- Les protéines non-collagéniques

Les protéines non-collagéniques (PNC) sont distribuées entre la phase minérale et la trame collagénique. Les PNC incluent des protéines contenant des résidus d'acide- $\gamma$ -carboxyglutamique ou gla-protéines comme l'ostéocalcine. Les PNC comprennent également des protéoglycans et des protéines d'origine plasmatique. Les PNC incluent enfin des glycoprotéines, comme la phosphatase alcaline (ALP) osseuse. Cette enzyme est impliquée dans les processus de minéralisation (Torii et al. 1996). L'inactivation du gène ALP chez la souris induit ainsi une anomalie de la minéralisation, ce qui souligne le rôle prépondérant de cette enzyme dans ce processus (Wennberg et al. 2000). Au niveau cellulaire, cette enzyme est liée de façon covalente aux complexes phosphatidyl-inositols de la membrane plasmique.

### *La matrice inorganique*

L'os est caractérisé par sa dureté, résultant de la calcification de la matrice organique extracellulaire. L'os constitue aussi un réservoir métabolique de sels minéraux (Vergne 2007). Lors de la combustion du tissu osseux, 45% d'eau, 20% de protéines, et 10% de graisse disparaissent au profit de la matière minérale résiduelle (25%) (Miller 2001).

La composition des sels minéraux issus de la combustion osseuse est la suivante:

- Phosphates de calcium ou cristal d'hydroxyapatite : 85%
- Carbonates : 9%
- Phosphates de magnésium : 2%
- Fluorures de calcium : 4% et plus chez les personnes âgées

#### *III.1.3.2. Les cellules osseuses*

Il existe quatre types de cellules dans le tissu osseux : les ostéoclastes, les ostéoblastes, les ostéocytes et les cellules bordantes (figure 9). Ces cellules assurent les différentes phases au cours du remodelage osseux.

Par rapport à leur origine, on distingue deux lignées de cellules osseuses:

- **La lignée ostéoblastique** : comprenant les ostéoblastes, les ostéocytes et les cellules bordantes, d'origine mésenchymateuse.
- **La lignée ostéoclastique** : provenant de cellules souches communes à la lignée monocyte-macrophage.

#### *Les ostéoblastes*

L'ostéoblaste mature est une cellule cuboïdale alignée le long de la matrice osseuse qu'elle a synthétisée. Son cytoplasme, basophile, est riche en réticulum endoplasmique et en mitochondries et présente un appareil de Golgi développé qui témoigne de son activité de synthèse active (Marie 1992). Les ostéoblastes sont par définition les cellules responsables de la production de la matrice osseuse. D'autre part, elles synthétisent un grand nombre de facteurs paracrines et autocrines qui affectent la résorption osseuse aussi bien que la formation (Chenu & Delmas 1994). Les ostéoblastes sont des cellules mononuclées dérivant de cellules souches mésenchymateuses pluripotentes, qui sont également à l'origine d'autres types cellulaires différenciés comme les adipocytes, les myocytes ou les chondrocytes (Vergne, 2007). L'engagement dans l'une ou l'autre voie cellulaire est conditionné par l'expression de facteurs de transcription. Le facteur de transcription Cbfa1 est le marqueur spécifique le plus

précoce de la différenciation ostéoblastique (Ducy et al. 1997). Les ostéoblastes matures ne se divisent pas, étant des cellules différenciées. La majorité des ostéoblastes se laissent emmurer dans la matrice qu'ils ont synthétisée et deviennent alors des ostéocytes. D'autres cellules deviennent aplaties et forment une couche de cellules bordantes alignées le long de la matrice nouvellement formée (Marie 1992). La durée de vie moyenne d'un ostéoblaste est de 3 mois, et une grande partie (65 %) meurt par apoptose (Vergne 2007).

### *Les ostéocytes*

Durant la synthèse de la matrice, un grand nombre d'ostéoblastes meurt, d'autres retournent à un état de repos, principalement sur les surfaces osseuses, d'autres (10 à 20%) encore sont emprisonnés dans la matrice qu'ils ont synthétisée. Dans ce dernier cas, ils portent le nom d'ostéocytes et sont logés dans une lacune ménagée dans la matrice: l'ostéoplaste (Toppets et al. 2004). Les ostéoblastes et les ostéocytes sont connectés les uns avec les autres ainsi qu'avec la surface osseuse et les cellules bordantes par des petits canaux, servant aux échanges de nutriments. Bien que les ostéocytes soient métaboliquement moins actifs que les ostéoblastes, ils sont capables de synthétiser une nouvelle matrice osseuse à la surface des lacunes ostéocytaires (Chenu & Delmas 1994) et peuvent également jouer un rôle dans la régulation phosphocalcique entre l'os et le sang et de ce fait contrôler la maturation de la matrice extracellulaire (Gao et al. 1996). Une hypothèse avancée est que comme l'ostéocyte est une cellule mécano-sensible, elle pourrait synthétiser des facteurs de régulations localement qui permettraient un remaniement osseux sous l'effet de contraintes mécaniques auxquelles l'os est exposé (Lanyon 1993).

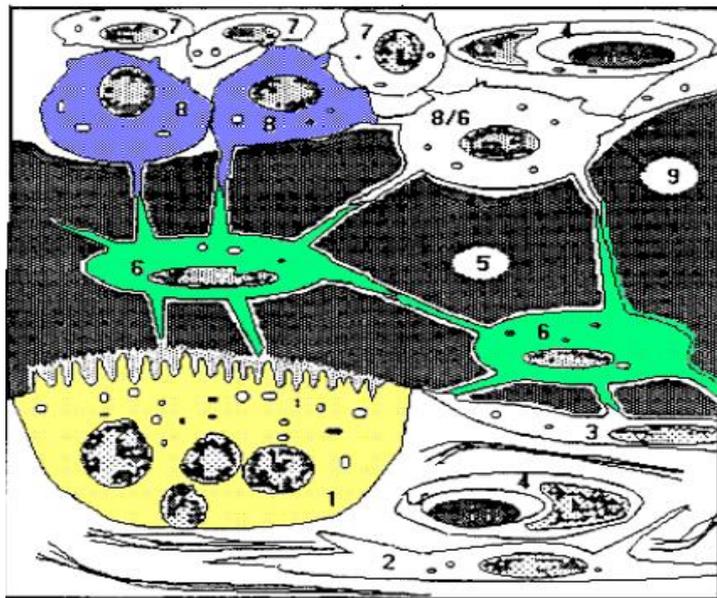
### *Les cellules bordantes*

Les cellules bordantes dérivent du même précurseur que l'ostéoblaste, elles expriment les mêmes récepteurs hormonaux, produisent aussi des facteurs de croissance ou des cytokines, mais elles ont perdu une grande partie de leurs fonctions de synthèse. C'est le type cellulaire et les ostéocytes emmurés dans la matrice osseuse (Chavassieux & Meunier 2003). Elles pourraient également constituer une barrière fonctionnelle entre la moelle osseuse et l'os calcifié. Les cellules bordantes seraient également une source de cellules ostéoblastiques de réserve capable de se transformer en cellules ostéogéniques sous l'action de certains stimuli comme la parathormone (PTH). Enfin, elles pourraient jouer un rôle déterminant dans la modulation de l'activité ostéoclastique en libérant lors de l'activation d'un cycle de

remodelage des substances chimiotactiques reconnues par les précurseurs ostéoclastiques (Thomas et al. 2011).

### *Les ostéoclastes*

Ce sont les cellules responsables de la résorption osseuse. Les ostéoclastes sont des cellules géantes, polynucléées pouvant renfermer de 2 à 30 noyaux et riche en enzymes lysosomales telles la phosphatase acide tartrate résistante ou la cathepsine k et des collagénases. D'origine hématopoïétique, ils appartiennent à la famille des monocytes/macrophages (Chavassieux & Meunier 2003). Ces cellules sont polarisées : les noyaux se trouvent à l'opposé de la surface osseuse tandis que la zone en contact avec la matrice osseuse développe des dendrites, ce qui d'une part augmente la surface de contact entre l'ostéoclaste et le tissu osseux et d'autre part confine les changements de pH à une zone bien précise: les lacunes de Howship. Ils réalisent l'ostéoclasie, c'est à dire la résorption du tissu osseux. Ils sécrètent en effet des acides organiques tels des citrates et des lactates qui assurent la dissolution des minéraux osseux ainsi que des hydrolases acides qui digèrent la matrice organique (Toppets et al. 2004).



**Figure 9 : Les différentes cellules du tissu osseux**

Ce dessin représentant une travée (5) montre les quatre types de cellules osseuses. On peut voir les ostéoblastes (8) et leurs précurseurs (7) sur la plus haute surface, au-dessus d'un liseré de matrice ostéoïde non calcifiée (9). Les ostéocytes (6) sont situés dans leur lacune. On peut aussi voir un ostéoclaste (1) et une cellule bordante (3) sur la surface la plus basse. Un capillaire (4) et un fibroblaste (2) sont situés près de la travée.

### III.1.4. Le remodelage osseux

Le remodelage osseux accomplit trois principales fonctions. Il permet tout d'abord à l'organisme de réguler l'équilibre minéral (homéostasie du calcium et du phosphate). Il constitue ensuite un mécanisme d'adaptation du squelette à son environnement mécanique, réduisant ainsi le risque de fracture. C'est enfin un mécanisme de renouvellement tissulaire et de réparation des dommages osseux créés notamment lors des contraintes cycliques (Thomas et al. 2011).

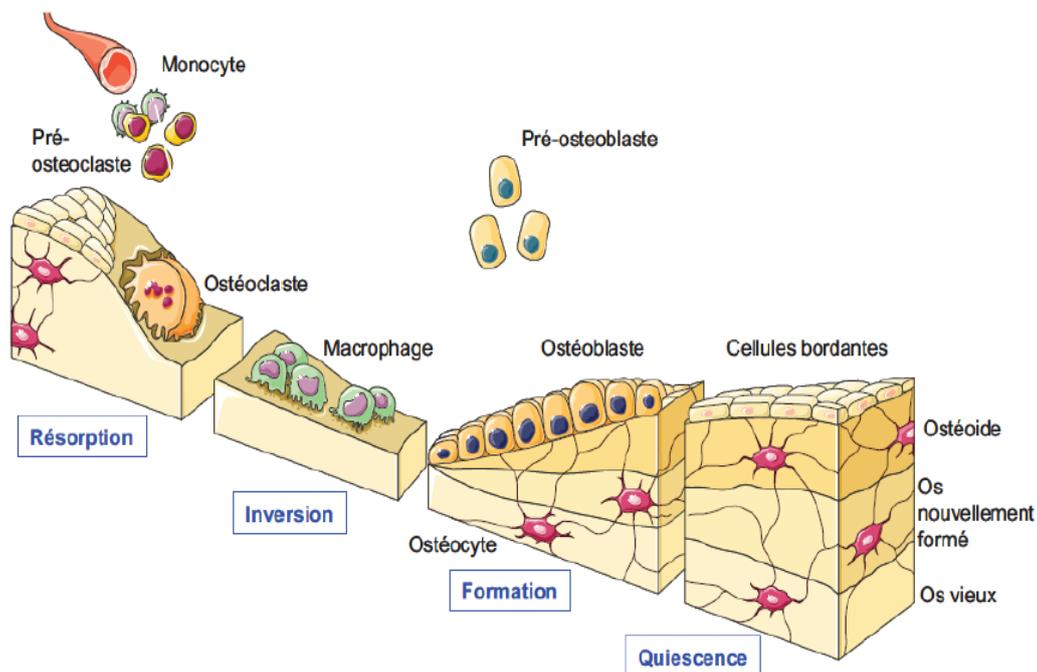
Le remodelage osseux est le résultat de l'activité de multiples unités cellulaires appelées *basal multicellular unit* (BMU), au sein desquelles agissent de manière séquentielle et couplée dans le temps et l'espace les ostéoclastes qui résorbent l'os ancien, puis les ostéoblastes qui apposent une matrice ostéoïde qui se minéralisera.

A l'inverse, tout dérèglement de l'équilibre entre apposition et résorption osseuse, provoque l'apparition de pathologies ostéocondensantes (ostéopétrose) ou ostéolytiques, pouvant être métaboliques (ostéoporose) ou tumorales (ostéosarcome) (Georges 2012).

Dans un premier temps les cellules bordantes perçoivent un signal d'initiation, dont la nature exacte reste encore inconnue. Ce signal pourrait être hormonal (diminution de la quantité d'oestrogène), cytokinique ou encore mécanique (fracture). Ce signal conduirait à la dégradation de la fine couche de matrice non minéralisée située sous les cellules bordantes, exposant ainsi la matrice minéralisée à l'action des ostéoclastes. En effet, les cellules bordantes ont une activité métabolique très réduite, mais peuvent se multiplier ou se différencier à nouveau en ostéoblastes fonctionnels sous l'influence de stimuli mécaniques ou moléculaires: c'est la phase « d'activation ». Ces préostéoclastes fusionnent pour devenir des ostéoclastes actifs et adhérents à la surface osseuse : c'est la phase de « résorption » du minéral osseux et de la matrice organique. La phase « d'inversion » correspond à la dégradation de la matrice osseuse entraînant une augmentation du taux de calcium intracellulaire des ostéoclastes ce qui provoque une désorganisation des podosomes et par conséquent le détachement de l'ostéoclaste qui mourra par apoptose. Ces ostéoclastes sont alors remplacés par des cellules mononucléées de type macrophagique qui vont éliminer les derniers résidus de matrice présents dans le fond de la lacune.

Puis survient le recrutement des ostéoblastes dans cette lacune qu'ils comblent en apposant une nouvelle matrice organique, le tissu ostéoïde, qui sera ensuite minéralisé : c'est la phase de « formation ». L'activité de formation au sein d'une BMU dépend davantage du nombre

initial d'ostéoblastes que de l'activité propre de chaque cellule. La vitesse d'apposition de la matrice osseuse est initialement élevée, puis fléchit lorsque la lacune de résorption se comble. Une séquence de remodelage dure en moyenne de 4 à 6 mois. Vient enfin une phase de « quiescence » pendant laquelle la minéralisation secondaire de la matrice est parachevée. Cette étape correspond à une accumulation de minéral dans la matrice indépendamment des cellules osseuses, avec un rôle fondamental dans la résistance mécanique des os (MUNDY et al. 1976). L'homéostasie du tissu osseux repose principalement sur deux types cellulaires aux actions antagonistes : l'ostéoblaste et l'ostéoclaste. Ces deux types cellulaires ne sont toutefois pas totalement indépendants puisque les ostéoblastes secrètent des médiateurs solubles régulateurs de l'ostéoclastogénèse: l'OPG (Ostéoprotégérine), RANKL (Receptoractivator of nuclear factor kappa-B ligand), le M-CSF (Macrophage colony-stimulatingfactor), le TNF (tumornecrosis factor) ou des interleukines (IL-1, IL-6, IL-11) (Lacey et al. 1998; Yasuda et al. 1998). Les ostéoblastes sont ainsi impliqués à la fois dans la formation et la résorption osseuse.



**Figure 10 : Les différentes étapes du remodelage osseux (Lerner 2006)**

### III.2. Les tumeurs osseuses primitives

Comme tout tissu, le tissu osseux est susceptible de développer des pathologies pouvant avoir des origines traumatiques, immunitaires, métaboliques, infectieuses, ou encore

tumorales. Les signes cliniques des tumeurs osseuses (la douleur, la tuméfaction et la fracture sur os pathologique) n'ont aucune spécificité. Il est par conséquent indispensable de connaître la nature histologique de la lésion, grâce à une biopsie osseuse, de façon à entreprendre un traitement adapté. Le diagnostic peut être précisé par des examens complémentaires comme la radiographie ou l'IRM.

Ces tumeurs peuvent être bénignes (les plus fréquentes) ou malignes.

Les tumeurs osseuses primitives (TOP) malignes représentent environ 10% de l'ensemble des tumeurs de l'enfant et de l'adolescent. On peut notamment citer :

- Les tumeurs produisant du tissu osseux : l'ostéosarcome
- Les tumeurs produisant du cartilage : le chondrosarcome
- Les tumeurs produisant du tissu conjonctif : le fibrosarcome
- Les tumeurs d'origine mésenchymateuse peu différenciées : le sarcome d'Ewing
- Les tumeurs d'origine hématologique : le myélome multiple, certaines formes de lymphomes (Monderer, 2013).

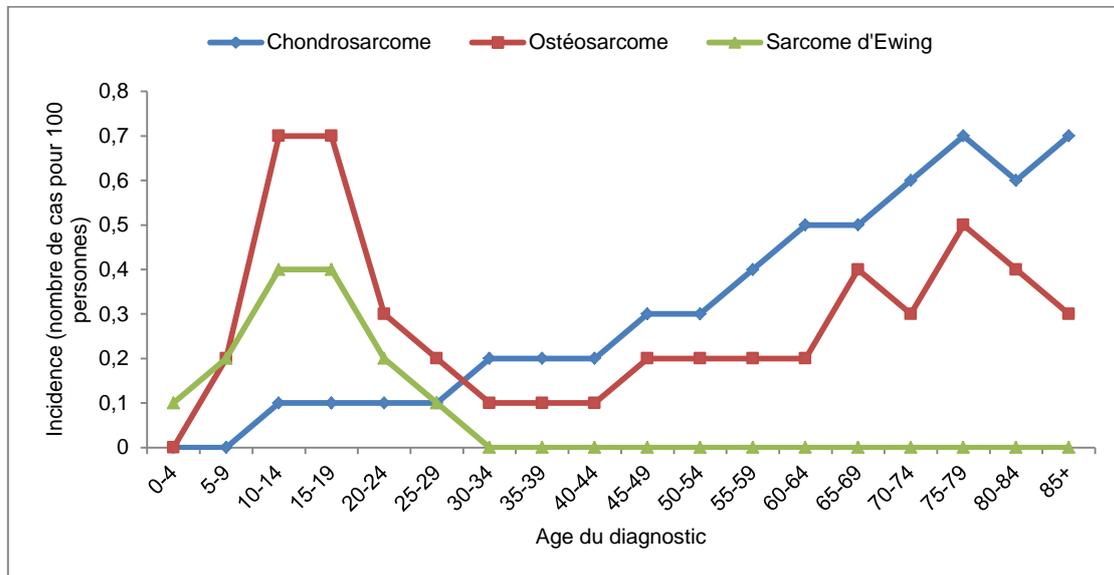
L'ostéosarcome est défini par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) comme une tumeur maligne caractérisée par l'élaboration d'os ou de substance ostéoïde par les cellules tumorales. Il dérive du mésoderme et est issu des cellules souches mésenchymateuses (CSM) (Mohseny & Hogendoorn 2011). L'ostéosarcome résulterait d'une dérégulation du programme de différenciation de ces CSM. Les cellules ostéosarcomateuses peuvent donc être plus ou moins différenciées selon le stade de différenciation de la cellule affectée par la transformation tumorale. De manière générale, il semble apparaître qu'il existe une corrélation inverse entre différenciation et agressivité des tumeurs (Wagner et al. 2011).

### III.3. Epidémiologie des ostéosarcomes

L'OS constitue la TOP maligne la plus fréquente, avec 4,8 nouveaux cas par an et par million d'enfants de moins de 20 ans aux Etats-Unis (Gorlick et al. 2013) et 3,6 nouveaux cas par an et par million d'enfants de moins de 15 ans en France (Lacour et al. 2010). Elle représente la moitié des cas de TOP diagnostiquées mais reste une pathologie rare (5% des cancers de l'enfant soit 0,2% de toutes les néoplasies malignes).

L'OS survient généralement dans une population jeune. 75% des OS sont en effet diagnostiqués entre 8 et 25 ans (avec une médiane d'âge de 18 ans), à une fréquence légèrement plus élevée chez les garçons que chez les filles (Ries et al. 1999). Les OS sont

souvent diagnostiqués au décours d'une fracture pathologique. Un second pic d'incidence est observé autour de 50 ans, correspondant aux OS se développant au cours de la maladie de Paget ou aux ostéosarcomes secondaires à une radiothérapie (Monderer 2013)(figure 11).



**Figure 11 : Incidence des tumeurs osseuses primitives malignes en fonction de l'âge adapté de Fletcher et al. (2002)**

### III.4. Localisations des ostéosarcomes

L'ostéosarcome touche dans 90% des cas la métaphyse des os longs. Il est principalement localisé au niveau du genou à savoir : l'extrémité inférieure du fémur (40 %), l'extrémité supérieure du tibia (15 %), mais également à l'extrémité supérieure du fémur et de l'humérus (14 %). Ces sites correspondent aux segments osseux dont la croissance est la plus importante de l'organisme. Moins de 10% surviennent à la diaphyse et les localisations épiphysaires sont encore plus rares tout comme celles des os plats ou des os courts. Cependant, des cas d'ostéosarcomes ont été rapportés pour tous les os du squelette, même pour les sésamoïdes (petits os situés près des articulations).

Trois groupes sont identifiés selon leur localisation au sein de l'os :

-les *ostéosarcomes de surface* : ils sont généralement de bon pronostic.

-les *ostéosarcomes intracorticaux*: ils sont extrêmement rares et seules des observations isolées sont rapportées.

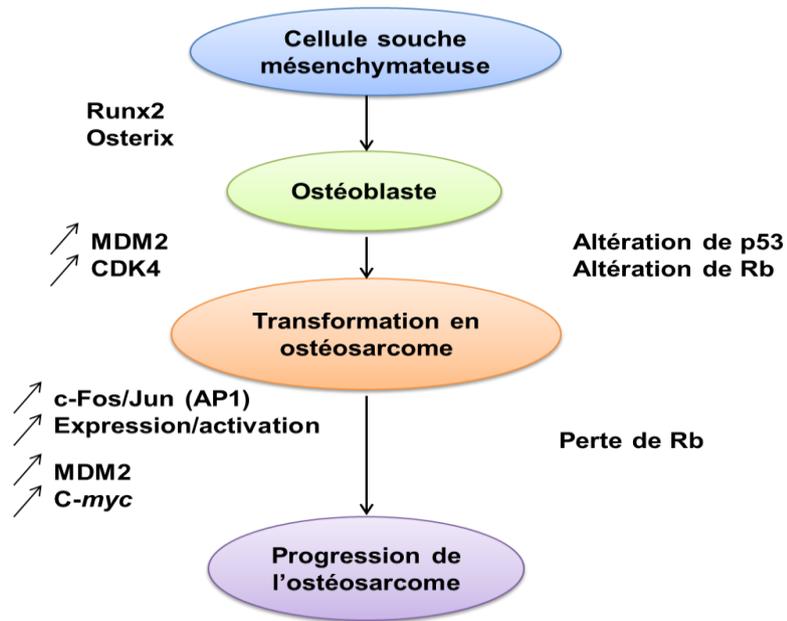
*-les ostéosarcomes intramédullaires ou centraux* : ils sont les plus fréquents et regroupent différentes variantes histologiques qui, à l'exception de la forme dite «bien différenciée intramédullaire», sont toutes de haute malignité (Georges 2012).

Le site métastatique préférentiel des ostéosarcomes est le poumon. Le développement de nodules pulmonaires entraîne une insuffisance respiratoire causant le décès du patient et la présence de ces nodules au moment du diagnostic diminue fortement les chances de survie des patients. Plus rarement, des métastases osseuses peuvent être retrouvées (Jaffe et al. 2002).

### III.5. Anomalies cytogénétiques et épigénétiques dans les ostéosarcomes

L'analyse des caryotypes des ostéosarcomes a révélé une grande complexité, avec de nombreux réarrangements chromosomiques ainsi que des variations dans le nombre de chromosomes, mais n'a pas permis d'identifier des spécificités. Cependant, des altérations génétiques récurrentes touchant des gènes impliqués dans le contrôle de la transition G1-S du cycle cellulaire ont été observées (López-Guerrero et al. 2004) (figure 12). Les mutations les plus courantes touchent les gènes Rb (dans environ 70% des cas) (Fuchs & Pritchard 2002; Wadayama et al. 1994), et p53 (dans 50% des cas) (Sandberg & Bridge 2003). Certains gènes sont amplifiés comme MDM2 [Murine Double Minute 2] (un inhibiteur de p53) et CDK4 (Cycline Dependant Kinase 4) qui permettent la transition G1-S. Un certain nombre de proto-oncogènes peuvent être également surexprimés : C-MYC 43, AP-1 44 et C- KIT. La présence de ces différentes altérations génétiques est corrélée avec l'agressivité des tumeurs et la survie des patients. Ces gènes représentent donc des cibles thérapeutiques intéressantes.

En plus des altérations chromosomiques et génétiques, de nombreuses modifications épigénétiques ont également été observées dans l'ostéosarcome. En effet, des études ont montré que l'hyperméthylation de l'ADN (Acide DésoxyriboNucléique) au niveau des promoteurs entraîne une baisse importante de l'expression du gène associé (Tableau 2) (Cui et al. 2011). Ces gènes sont impliqués dans différents processus cellulaires tels que le cycle cellulaire, l'apoptose, la transduction de signal, la différenciation et la prolifération. Cette hyperméthylation de l'ADN joue un rôle dans la progression de l'ostéosarcome et dans son pouvoir métastatique (Georges 2012).



**Figure 12: Mécanismes moléculaires et génétiques impliqués dans le développement et la progression des ostéosarcomes** (Georges 2012)

**Tableau 2: Les gènes hyperméthylés dans l'ostéosarcome** (Singhatanadgit et al. 2006)

Genes	Common names	Genes ID	Functions
CDK4	Cyclin-dependent kinase 4	1019	Amplification and cell cycle apoptosis
ChM-I	Chondromodulin-I	162840	Growth arrest
EGFR	Epidermal growth factor receptor	1956	Amplifications
GADD45A	Growth arrest and DNA-damage-inducible 45 alpha	13197	Apoptosis
IGF2	Insulin-like growth factor 2	3481	Signal transduction
INK4A	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A	1029	Cell cycle regulation
p53	p53 tumor suppressor homologue	1E+08	Cell cycle regulation and apoptosis
RASSF1A	RAS association domain family protein 1A	11186	Signal transduction
RECQL4	RecQ protein-like 4	9401	Mutations
RUNX2	Runt-related transcription factor 2	367218	Signal transduction
WIF-1	WNT inhibitory factor 1	11197	Proliferation and differentiation

## IV. L'apoptose

### IV.1. Les morts cellulaires : définitions et caractéristiques

Il a été longtemps opposé deux types de morts cellulaires : l'apoptose, mécanisme actif dans lequel la cellule participe à l'organisation de son démantèlement et la nécrose, définie comme une mort accidentelle au cours de laquelle la cellule subit une agression physique et se lyse, libérant son contenu intra-cytoplasmique. L'apoptose était caractérisée comme une mort « propre » puisque la cellule appelle les macrophages environnants à l'éliminer sans inflammation. La nécrose, à l'opposé, déclenche une réaction inflammatoire. L'apoptose a été nommée ainsi par comparaison avec la chute des feuilles en automne, terme qui sous-entend que l'organisme se débarrasse des éléments devenus inutiles, sans dommage pour son intégrité (Bénéteau 2006).

Aujourd'hui, cette dichotomie doit être nuancée ; en effet, de nombreux types de morts cellulaires différentes ont été définis (Fink & Cookson 2005) et l'on voit même la nécrose comme étant plutôt la résultante de certains types de morts, c'est-à-dire le phénotype terminal de la cellule morte où l'état d'équilibre est atteint entre la cellule et son environnement. Il est décrit dans l'apoptose un mécanisme de nécrose secondaire ou nécrose apoptotique dans le cas où les cellules apoptotiques ne sont pas phagocytées. Ces nouvelles morts cellulaires sont:

- **L'autophagie**, dans laquelle la cellule « emballe » son contenu cytoplasmique dans des vésicules appelées autophagosomes, devenant des autophagolysosomes après fusion avec les lysosomes. Ces cellules peuvent par la suite être phagocytées (Yorimitsu & Klionsky 2005). D'ailleurs, Yoshinori Ohsumi, a reçu le prix Nobel médecine 2016 pour ses travaux sur l'autophagie.

- **La pyroptose**, survenant par exemple au cours des infections à *Shigella* ou *Salmonella* : la cellule enclenche alors un programme de mort pro-inflammatoire dépendant de l'interleukine 1 (IL-1) (Cookson & Brennan 2001).

- **La nécrose programmée**, serait le mécanisme amenant au phénotype terminal nécrotique. Elle se caractérise par une déplétion en énergie de la cellule (Majno & Joris 1995).

L'apoptose : Le terme de mort cellulaire programmé est souvent employé comme synonyme d'apoptose : il décrit le fait que les cellules mettent en place un programme séquentiel d'événements pour organiser leur élimination.

## IV.2. Caractéristiques de l'apoptose

### IV.2.1. Critères morphologiques

Les modifications morphologiques observées lors de la nécrose sont très différentes de celles observées lors de l'apoptose (Wyllie et al. 1980).

La nécrose, résultat de la mort instantanée des cellules soumises à des altérations trop importantes, se caractérise par un gonflement de la cellule et des organites intracellulaires suivi d'une lyse membranaire et d'une inflammation des tissus sains adjacents suite à la libération du contenu intracellulaire.

Le phénomène d'apoptose n'a été découvert que très tard ; en effet, il est souvent ponctuel" de courte durée et ne produit aucune inflammation des tissus susceptibles de le mettre en évidence (Alexandre, 2000). La séquence des modifications morphologiques de la mort cellulaire programmé débute par des changements au niveau nucléaire. La chromatine se condense et la membrane nucléaire perd sa forme régulière; ensuite, le noyau commence à se fragmenter. Parallèlement, le cytoplasme se rétracte et la membrane plasmique, sans perdre son imperméabilité, bouillonne et forme des protubérances. Le contenu de la cellule est divisé et vacuolisé dans de petites capsules membranaires appelées "corps apoptotiques". Dans les tissus, ces vacuoles seront phagocytées par les cellules adjacentes. L'absence d'inflammation, ainsi que le maintien de l'intégrité des organites intracellulaires, permettent l'élimination des cellules apoptotiques sans endommager le tissu (Wyllie et al., 1980).

L'observation des modifications morphologiques est la méthode la plus ancienne pour détecter un phénomène apoptotique dans les cellules en culture. En microscopie simple, sans même de marquage, on peut aisément distinguer le bouillonnement de la membrane plasmique et les corps apoptotiques. En microscopie à fluorescence, l'ADN cellulaire est préalablement marqué par des colorants fluorescents comme l'acridine orange, le réactif d'Hoechst ou le DAPI, ce qui permet de révéler la condensation de la chromatine et la fragmentation nucléaire. Un marquage simultané au bromure d'éthidium ou à l'iodure de propidium permet de distinguer les cellules en nécrose ou en fin d'apoptose qui intègrent ces colorants, des cellules en apoptose imperméables. Les cellules en fin d'apoptose subissent une nécrose secondaire qui les rend plus perméables ; ces cellules se différencient cependant des cellules nécrotiques par la présence de chromatine condensée prête à être vacuolisée.

### IV.2.2. Critères biochimiques

Une fois initiée, l'apoptose conduit au clivage spécifique de diverses molécules cellulaires. La mort cellulaire programmée n'est pas accompagnée d'une digestion sauvage et inconsidérée des protéines. Ce sont des éléments bien précis qui sont clivés d'une manière coordonnée, habituellement sur un site unique, ce qui provoque la perte ou le changement de fonction de l'élément (Thornberry & Lazebnik 1998). Cette phase de dégradation est caractérisée par l'activation d'enzymes cataboliques et en particulier une classe de protéases associées à l'apoptose, les caspases. Celles-ci s'activent en cascade, entraînent la destruction de certains composants cellulaires et activent les endonucléases responsables du découpage de la chromatine. Cette dégradation est à l'origine du désassemblage de la cellule ; mais, elle facilite également le processus apoptotique en éliminant l'activité de diverses protéines impliquées dans la sauvegarde de la cellule (Cohen 1997).

### IV.3. Les différentes voies de l'apoptose

Il existe deux voies principales de signalisation aboutissant à l'apoptose. La première est la voie des récepteurs de mort (voie extrinsèque). La deuxième voie est la voie mitochondriale (voie intrinsèque) mettant en jeu la mitochondrie. Ces deux voies aboutissent à l'activation des caspases. Toutefois, il existe également une voie indépendante des caspases qui met en jeu la protéine mitochondriale AIF (Apoptosis inducing factor), ainsi qu'une voie passant par le réticulum endoplasmique (Joubert 2006).

Selon Mourali (2008), l'apoptose peut être initiée par deux voies alternatives: soit par les récepteurs de mort à la surface cellulaire (voie extrinsèque), soit par voie mitochondriale (voie intrinsèque). Par les deux voies, l'induction de l'apoptose conduit à l'activation des caspases initiateuses qui activeront à leur tour les caspases effectrices.

La voie extrinsèque est initiée par la fixation d'un ligand de mort extracellulaire, tel que Fas-L, TNF $\alpha$  ou TRAIL, à son récepteur de mort à la surface de la cellule (tel que Fas, TNFR ou TRAIL-R). Un complexe homotrimérique se forme alors. Il recrutera et activera des facteurs cytosoliques tels que la caspase 8 via une molécule adaptatrice, FADD, formant ainsi un complexe oligomérique de mort appelé DISC (Peter & Krammer 2003). Les cellules réagissant aux ligands extracellulaires de mort se subdivisent en deux types : type 1 et type 2. Dans la voie intrinsèque, l'activation des caspases se produit comme conséquence de la perméabilisation mitochondriale (Green 2000). Celle-ci est régulée par les protéines de la

famille Bcl-2 qui contrôlent la formation de pores au niveau de la membrane mitochondriale externe (OMM) en libérant des facteurs pro-apoptotiques. Parmi ces facteurs, on peut citer le cytochrome c, SMAC/DIABLO, AIF, EndoG et Omi/HtrA2 (Wang 2001). Il semble que le facteur le plus important soit le cytochrome c, qui se fixe sur APAF-1 pour l'activer et former un grand complexe appelé apoptosome, activant ainsi la procaspase 9, lequel clivera les caspases effectrices 3 et 7 (Rodriguez & Lazebnik 1999). Même recrutée par l'apoptosome, la caspase 9 peut être encore inhibée par la présence constitutive de XIAP (X-chromosome-linked inhibitor of apoptosis protein, un des membres de la famille des IAPs), mais la co-sécrétion de SMAC/DIABLO et de la sérine protéase Omi/HtrA2 induit la séquestration et/ou la dégradation de celui-ci, assurant une activation complète de l'apoptosome (figure 13) (Srinivasula et al. 2001).

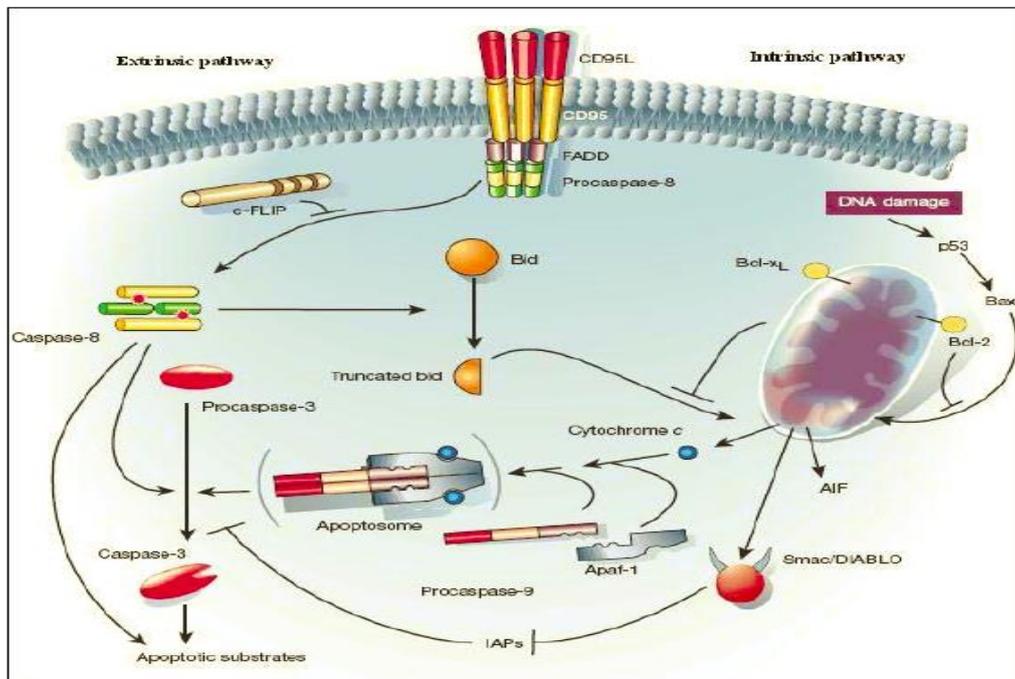


Figure 13 : Représentation des deux voies majeures de l'apoptose

#### IV.4. Rôle du calcium dans la régulation de l'apoptose

Le calcium est le cation le plus abondant chez les vertébrés (20 à 30 g/kg chez l'homme). La plus grande partie du calcium est fixée par les os où il joue un rôle structural et fonctionnel important. Le calcium est un deuxième messager intracellulaire impliqué dans une grande variété de fonctions cellulaires comme la contraction musculaire, la sécrétion, la transcription des gènes, la croissance cellulaire et l'apoptose (Pozzan et al. 1994; Verkhratsky 2007). Plusieurs organites subcellulaires sont impliqués dans le stockage du calcium,

notamment le réticulum sarcoendoplasmique, l'appareil de Golgi, la mitochondrie et le noyau (Pozzan et al. 1994).

Le RE constitue une réserve importante de calcium. L'accumulation du calcium dans le RE se fait contre un gradient électrochimique à l'aide de la pompe calcique nommée SERCA. Le rôle de cette dernière consiste à assurer le transfert des ions  $\text{Ca}^{2+}$  du cytosol vers le RE suite à l'hydrolyse d'ATP. Dans le RE, le calcium se trouve soit libre, soit lié à des protéines tampon (calcium-bindingproteins).

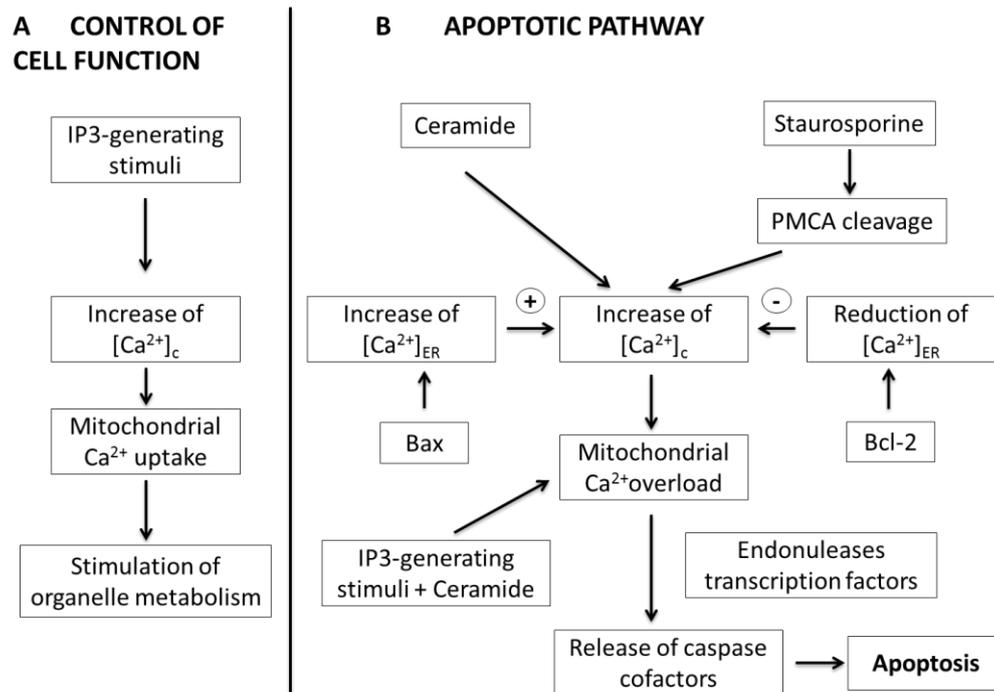
La mitochondrie est également impliquée dans la régulation de l'homéostasie calcique et module notamment les signaux calciques issus du RE (Carafoli, 2002). L'accumulation du calcium dans la mitochondrie est favorisée par l'élévation transitoire de la concentration calcique cytosolique à proximité des canaux calciques de la membrane cytoplasmique et de la membrane du RE (figure 14). La diffusion rapide de calcium dans le réseau mitochondrial permet donc d'induire rapidement les métabolismes mitochondriaux, entre autres la synthèse d'énergie sous forme d'ATP (Pinton & Rizzuto 2006; Rizzuto & Pozzan 2006).

Par ailleurs, l'implication de l'appareil de Golgi dans l'accumulation du calcium, et l'homéostasie calcique en général, est maintenant clairement définie. Les propriétés des protéines permettant l'accumulation du calcium dans l'appareil de Golgi sont similaires à celles des pompes du RE (Missiaen et al. 2004), suggérant qu'il s'agit d'une pompe calcique de type P, similaire sinon identique à SERCA (Rojas & Moretti-Rojas 2000).

Finalement, le noyau se caractérise lui aussi par un gradient de concentration de calcium, ce qui laisse suggérer que le calcium ne peut pas diffuser librement entre le noyau et le cytoplasme et qu'un système régule l'entrée et la sortie du calcium (Lee et al. 1998). De nombreuses études montrent que le calcium est responsable de la régulation de plusieurs événements nucléaires, et que, par conséquent, la régulation de sa concentration est d'une importance considérable (Bootman et al. 2000). Pour ne citer qu'elles, dans le cytosol, on retrouve des centaines de protéines de type "EF-Hand" comme la calmoduline, la parvalbumine, la calbindine et la troponine C qui jouent un rôle "tampon", et dans le RE on retrouve la calséquestrine, la calréticuline et l'endoplasmine qui présentent à la fois une forte capacité de stockage et une faible affinité pour le calcium.

L'implication du calcium dans le processus apoptotique induit par différents stress est souvent associée à son rôle dans l'activation de plusieurs protéases et endonucléases. En plus de son rôle dans le clivage et l'activation des calpaïnes, le calcium participe également à l'activation

de plusieurs endonucléases dites dépendantes du calcium ou dépendantes du calcium et du magnésium, jouant un rôle dans la fragmentation de l'ADN durant l'apoptose. Il a été rapporté récemment que le calcium peut activer les caspases, notamment la caspase 3 (Bernardi & Rasola 2007; Verkhratsky 2007). Le calcium active également diverses protéines kinases, dont la protéine kinase C, la calmoduline, et la phospholipase A, toutes connues pour jouer un rôle dans l'apoptose (Colomer & Means 2007; Huang & Miller 2007).



**Figure 14 : Représentation schématique du rôle du calcium dans la régulation des fonctions cellulaires et l'apoptose.** (A) Le calcium est un second messenger cellulaire aux bio-propriétés multifonctionnelles. Il est indispensable au fonctionnement de la cellule et à sa réplication et joue un rôle important dans plusieurs processus métaboliques cellulaires; tels que le maintien de l'équilibre basique (acidité/alcalinité) dans les organelles et l'activation de plusieurs enzymes calcium dépendantes. (B) Le calcium joue également un rôle important dans les phases d'induction et/ou d'exécution de la mort cellulaire programmé. Divers stimuli apoptotiques (exemple: céramides et staurosporine) peuvent affecter l'homéostasie calcique qui elle-même peut induire l'apoptose et mener à l'activation des protéases calcium dépendantes (caspases et des calpaïnes). L'accumulation de calcium dans le cytosol suite à la perte de l'homéostasie calcique est souvent la cause de la perméabilisation de la membrane mitochondriale par un déséquilibre du ratio Bax/Bcl-2 et le relargage des divers facteurs pro-apoptotiques, y compris le calcium. Le calcium active également plusieurs facteurs de transcriptions et endonucléases calcium ou calcium/magnésium dépendantes impliqués dans la régulation du processus apoptotique. Figure adaptée de (Bettaieb 2009).

## V. Objectifs généraux de la thèse

De nombreux travaux ont décrits les effets immunomodulateurs des polyphénols. D'autre part, les études cliniques sur les effets des polyphénols dans un contexte tumoral restent peu nombreuses mais soutiennent toujours l'hypothèse d'une action bénéfique des polyphénols dans la prévention et le traitement des cancers. Les acteurs cellulaires et les mécanismes moléculaires à l'origine de l'effet immunomodulateur et anti-cancéreux des polyphénols commencent à être bien décrits dans des modèles pré-cliniques *in vitro* et *in vivo*.

Cependant, très peu d'études ont montré l'implication des polyphénols d'origine alimentaire dans la modulation de la réponse immunitaire et dans la régulation de la prolifération des cellules cancéreuses.

L'objectif de ce présent travail a consisté à étudier l'effet modulateurs des polyphénols du mil, *Pennisetum glaucum*, (PGPC) sur l'activation des lymphocytes T, et analyser les mécanismes cellulaires qui pourraient être à l'origine de l'action antiproliférative et pro-apoptotique de ces polyphénols sur les cellules de ostéosarcome.

Une réponse immunitaire exagérée est souvent associée à l'inflammation. Aussi, l'inflammation chronique est décrite un facteur de risque des cancers.

Ainsi, une seconde étude a été porté sur l'étude des voies de signalisations cellulaires, plus particulièrement la voie AKT (serine/threonine protein kinase), impliquées dans l'effet anticancéreux des PGPC.

Nous avons choisi comme modèle d'étude l'ostéosarcome. Après avoir criblé plusieurs lignées cancéreuses (HCT116, HCT8, U2OS), nous avons retenu les cellules humaines U2OS pour leur sensibilité au traitement PGPC.

# **Etude expérimentale**

**PARTIE I**

---

***POUVOIR ANTIOXYDANT DES  
POLYPHENOLS DE MIL***

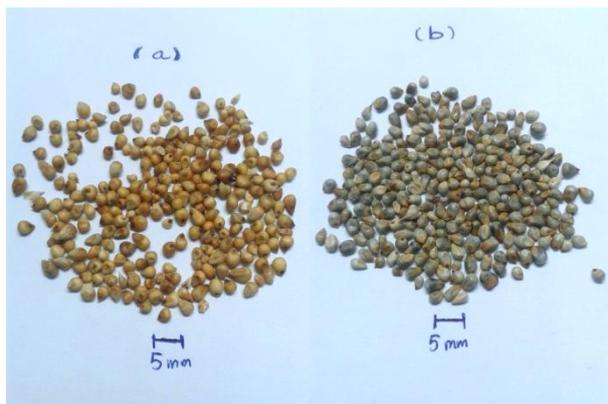
### I. Pouvoir antioxydant des polyphénols de mil

Notre choix s'est porté sur une céréale consommée par la population du sud d'Algérie, appartenant à la famille des Poacées (graminées), appelée le « mil perlé ». Les panicules ont été récoltées au stade de maturité le mois d'Octobre 2010 d'une exploitation située à la région d'Ouled Aïssa (174 Km du nord d'Adrar et 70 Km du nord-ouest de Timimoune).

Dans cette partie, nous nous sommes intéressés à faire une extraction des polyphénols, par macération, de grains de deux cultivars de mil (*Pennisetum glaucum*), Bechna et Mekrout, avec trois solvants polaires: l'eau, le méthanol, et l'acétone. Ensuite, nous avons fait un dosage colorimétrique des polyphénols et des flavonoïdes dans chaque extrait. En fin, nous avons testé le potentiel antioxydant des extraits aussi obtenus sur un radical libre de synthèse relativement stable, DPPH<sup>•</sup>.

#### I.1. Préparation du matériel biologique végétal

Les grains des deux cultivars de mil, qui sont connus par les appellations vernaculaires Bechna (grains ovales jaunâtres) et Mekrout (grains ovales gris), ont été broyés à l'aide d'un broyeur à lame, puis conservés dans des flacons opaques en verre pour des analyses ultérieures.



**Figure15: grains de mil.**

a: Bechna, b: Mekrout



**Figure16: farines des grains de mil.**

a: Bechna, b: Mekrout

### I.2. Détermination du taux d'humidité

La détermination du taux d'humidité est effectuée par une dessiccation de l'échantillon dans une étuve isotherme de 103 à 105°C jusqu'à une masse pratiquement constante. Pour éviter toute reprise d'humidité, il convient d'opérer dans des vases de tare, placées dans un dessiccateur.

### I.3. Préparation des extraits polyphénoliques

La préparation des extraits polyphénoliques est réalisée selon la méthode de Jimoh et al. (2010). Afin d'obtenir trois extraits: aqueux, acétonique, et méthanolique, nous avons procédé à deux extractions consécutives des échantillons en macérant 2 g de chaque cultivars dans 40 mL de chaque solvant (eau, acétone, ou méthanol) sous agitation à température ambiante pendant 2 h. Puis, le mélange a été filtré, et le filtrat a été récupéré. Ensuite, les deux filtrats sont réunis puis séchés sous pression réduite à basse température de 40 à 45°C à l'aide d'un rotavapeur modèle Nahita. En fin, les résidus de séchage ont été récupérés dans 5 mL de méthanol.

### I.4. Dosage des polyphénols

La teneur des polyphénols totaux contenus dans l'extrait des grains de mil est déterminée par une méthode colorimétrique (Folin & Ciocalteu 1927). Ce dosage est basé sur le couplage du réactif *Folin-Ciocalteu* avec les composants phénoliques du matériel végétal (Brune et al. 1991) où la réduction d'acide phosphotungstique ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) et d'acide phosphomolybdique ( $H_3PMo_{12}O_{40}$ ) du réactif de *Folin-Ciocalteu* par les groupements oxydables dans les polyphénols de l'échantillon en milieu alcalin induit un développement d'une coloration bleu foncée due à la formation des oxydes métalliques  $W_8O_{23}/Mo_8O_{23}$  dont l'intensité est proportionnelle à la quantité des composés phénoliques présents dans l'échantillon (Catalano et al. 1999).

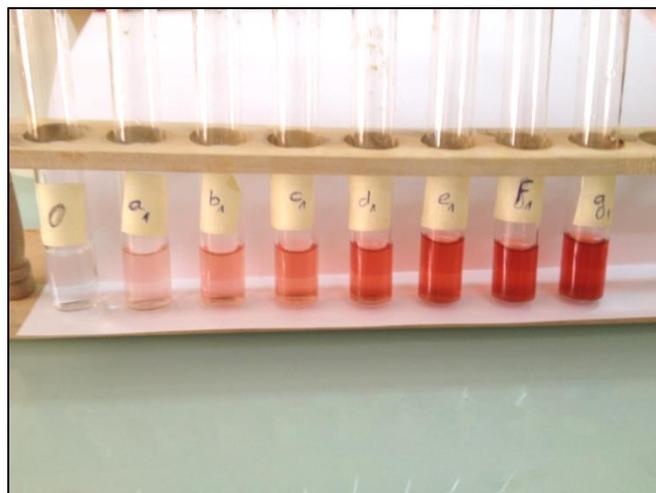


**Figure 17: gamme d'étalonnage des polyphénols totaux**

### I.5. Dosage des flavonoïdes

Le dosage des flavonoïdes est réalisé en utilisant la méthode colorimétrique au trichlorure d'aluminium et la soude. Le trichlorure d'aluminium forme un complexe jaune avec les flavonoïdes, la soude forme ensuite un complexe de couleur rose qui absorbe dans le visible à 510 nm.

La quantification des flavonoïdes totaux contenus dans l'extrait polyphénolique est réalisée selon la méthode de Ardestani & Yazdanparast. (2007).



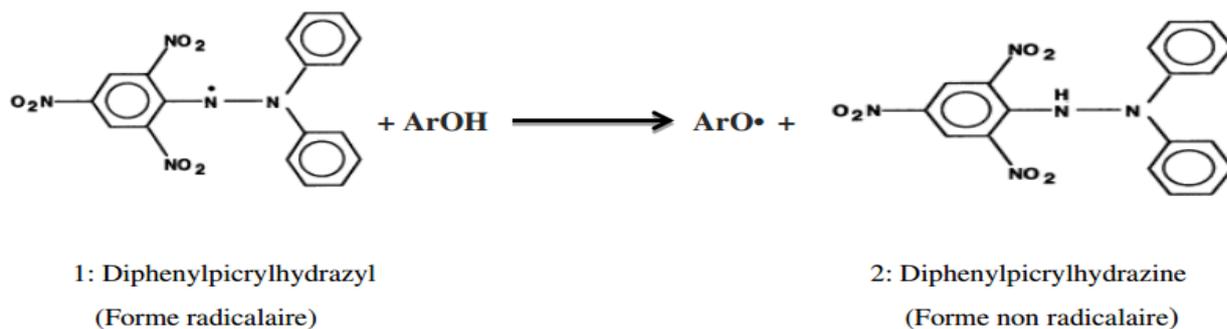
**Figure 18: gamme d'étalonnage des flavonoïdes**

### I.6. La quantification des polyphénols par HPLC dans les grains de mil, cultivar Bechna

La détermination des *polyphénols dans l'extrait brut obtenu par macération avec un mélange des trois solvants*, MeOH, AcOH, H<sub>2</sub>O (7/7/6 ; V/V/V) a été réalisée par chromatographie liquide de haute performance (HPLC) (Modèle Agilent Technologies 1260, Allemagne). 20 µL d'extrait polyphénolique sont injectés dans une colonne à phase inversée (Zorbax Eclipse XDB-C18 ; 4,6 x 100 mm). La phase mobile à gradient se compose de deux solvants: A et B. Le solvant A est le méthanol et le solvant B est l'acide formique à 0,1% (v / v). La séparation des composés phénoliques a été réalisée pendant 35 min en utilisant un gradient linéaire solvant à un débit de 0,4 mL / min comme suit: 0 min 90 % de B, 5 min 80 % B, 10 min 70% B, 15 min 50 % B, 20 min 30 % B, 25 min 10 % B, 30 min 50 % B, 35 min 90% B. La détection des composés phénoliques est faite à 280 nm. Les composés phénoliques ont été identifiés en se référant aux temps de rétention des standards utilisés et quantifiés grâce aux pics de leurs aires. Les standards utilisés sont les suivants: acide p-coumarique, acide chlorogénique, acide férulique, acide gallique, acide transhydroxycinnamic, acide syringique, acide ellagique, quercétine, et apigénine.

### I.7. Pouvoir antioxydant *in vitro* de mil : test de DPPH

Le mécanisme général de cette réaction est la réduction du radical libre 2:2 diphénylepicylhydrazyl (DPPH<sup>•</sup>) ayant une couleur violette par les antioxydants (ArOH) en lui transférant un proton, alors il se transforme en composé jaune 2:2 diphénylepicylhydrazine stable DPPHH (figure 19). L'intensité de la couleur violette est inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu à piéger les radicaux libres.



**Figure 19: réaction de réduction du DPPH<sup>•</sup> par les antioxydants** (Pyrzynska & Pękal 2013).

L'évaluation de piégeage du radical DPPH<sup>•</sup> par les différents extraits est réalisée selon la méthode de Masuda et al. (1999), avec une légère modification. L'acide gallique, la vitamine C, et le BHA sont utilisées en tant qu'antioxydants de références. Pratiquement, un volume de 50 µL de la solution méthanolique du DPPH<sup>•</sup> (5 mM) est ajouté à 50 µL de l'extrait (0,05- 0,1- 0,2- 0,4- 0,6- 0,8- 1- 1,2 mg/mL) dans 2000 µL MeOH. Le mélange est bien homogénéisé puis incubé à l'obscurité pendant 30 min. L'absorbance est mesurée à 517 nm contre un blanc sans DPPH<sup>•</sup>.

Le taux de piégeage du radical DPPH<sup>•</sup> est calculé comme suit:

$$\% \text{ piégeage} = \left( \frac{A_0 - (A_1 - A_s)}{A_0} \times 100\% \right)$$

**A<sub>0</sub>** correspond au tube contenant 2000 µl MeOH, 50 µL DPPH<sup>•</sup>, et 50 µL MeOH (contrôle négatif du radical);

**A<sub>s</sub>** correspond au tube contenant 2000 µl MeOH, 50 µL extrait, et 50 µL MeOH (contrôle négatif de dilution);

**A<sub>1</sub>** correspond au tube contenant 2000 µl MeOH, 50 µL DPPH<sup>•</sup>, et 50 µL extrait (Contrôle positif).

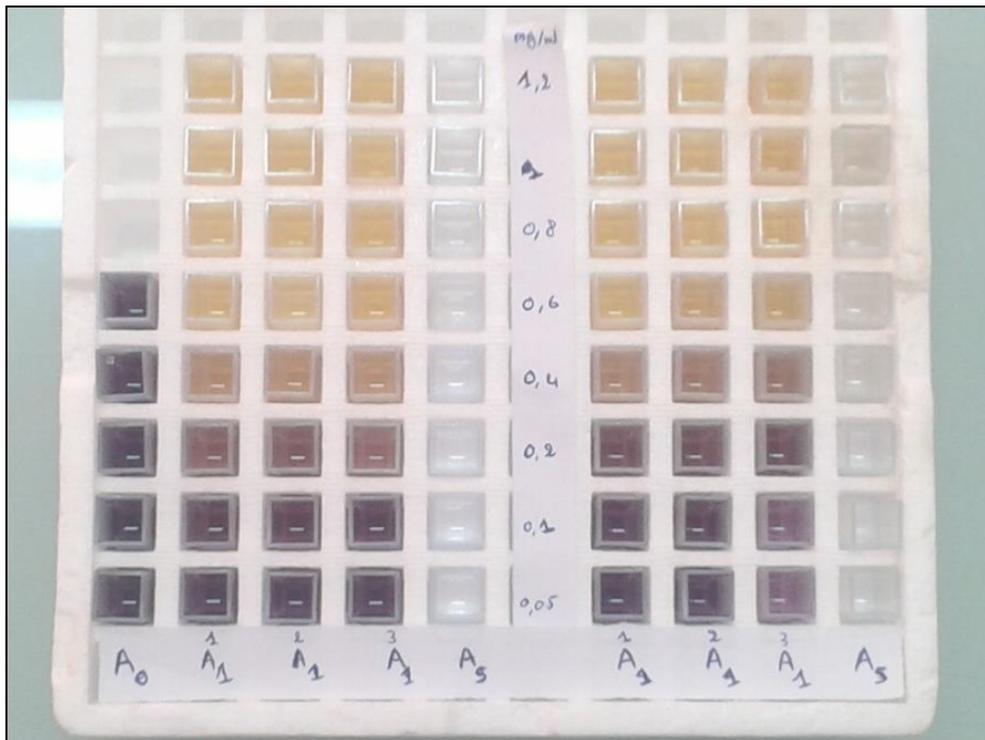


Figure 20: Evaluation du pouvoir antioxydant, test de DPPH.

### I.8. Suivi de la cinétique de la réaction de piégeage de DPPH<sup>\*</sup>

L'étude cinétique est réalisée par mise en réaction le radicale libre DPPH<sup>\*</sup> avec la concentration inhibitrice EC<sub>50</sub> d'échantillon analysé, on note l'absorbance du mélange à 517 nm pendant une heure à 37°C à différents intervalles du temps dans un spectrophotomètre UV-Vis modèle Agilent technologies modèle cary60 (Ragae et al. 2006).

**PARTIE II**

---

***EFFET IMMUNOMODULATEUR DES  
POLYPHENOLS ET DES LIPIDES DE  
MIL***

## II. Effet immunomodulateur des polyphénols et des lipides de mil

Dans cette partie, nous avons évalué l'activité immunomodulatrice des polyphénols et des lipides de mil 'cultivar *Bechna*', et ce en testant leurs effets sur la prolifération des lymphocytes T spléniques. Ensuite, nous avons évalué leurs effets sur l'augmentation du calcium cytoplasmique en tant que premier signe mitogénique. L'activation des ERK1/2 MAPK kinase et l'expression de l'IL-2, éléments clefs impliqués dans l'activation des lymphocytes T, a été aussi déterminée suite à un traitement avec des mitogènes : phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) et ionomycin.

### II.1. Détermination de la composition en acides gras par chromatographie en phase gazeuse (CPG)

La méthode d'analyse des acides gras repose sur une réaction de saponification de la fraction lipidique permettant de libérer des esters de glycérol. Les acides gras libres sont ensuite transformés en des composés volatiles, les esters méthyliques d'acides gras (EMAG). Cette réaction chimique s'appelle la méthylation.

Brièvement, environ 1 mL de NaOH méthanolique (0,5 N) a été ajouté à 200 mg de l'extrait lipidique puis, le mélange a été chauffé à 80 ° C pendant 20 min. Après refroidissement à 4 ° C, 2 mL de solution de trifluorure de bore-méthanol (BF<sub>3</sub>) ont été ajoutés, et la méthylation a été effectuée à 80 ° C pendant 20 min. Après avoir refroidi dans la glace, on a ajouté 2 mL de NaCl (35%) plus 2 mL d'hexane dans les tubes. Après une agitation vigoureuse et une centrifugation (1200 g / 5 min), la phase supérieure contenant EMAG a été transférée dans un nouveau tube, et analysée par chromatographie en phase gazeuse.

Les esters méthyliques sont ensuite identifiés par chromatographie en phase gazeuse (CPG). Les échantillons sont quantifiés par un système constitué d'un chromatographe en phase gazeuse (Packard modèle 417) équipé d'une colonne capillaire (30 m (longueur), CP-WAX) couplé à un détecteur à ionisation de flamme (FID). La température de la colonne est programmée de 85 à 210°C et celle de l'injecteur est de 250°C. La température du four a augmenté de 85°C (1 min) à 150°C à 30 min, puis de 150°C à 210°C à raison de 4°C/min. Le gaz vecteur étant de l'hélium avec un débit 0.4 mL/min.

Pour identifier chacun des acides gras présents dans l'échantillon analysé, nous avons comparé les temps de rétention des composés de l'échantillon avec ceux du mélange d'étalons. Chaque expérimentation est répétée trois fois et les résultats sont exprimés sous forme de moyenne.

### II.2. Isolement des lymphocytes T

Des rats Wistar sont tués par translocation cervicale. Puis, la rate est prélevée sous hotte stérile pour limiter les risques de contamination. La rate est ensuite placée dans un tamis cellulaire, 100  $\mu\text{m}$ , dans une boîte de Pétri contenant du milieu RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute Medium) complété avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF), 2 mM de L-glutamine, 100 U / mL de pénicilline et 100  $\mu\text{g}$  / mL de streptomycine et 25 mM de HEPES). A l'aide d'un piston de seringue de 5 mL, la rate est écrasée et filtrée à travers le tamis, tout en restant dans le milieu RPMI. Le filtrat est homogénéisé à l'aide d'une pipette de 10 mL, transféré dans un falcon de 50 mL et complété à 25 mL avec du milieu RPMI. Après centrifugation 5 min à 4°C à une vitesse de 200 g, le culot était repris dans 5 mL de Red Cell Lyse Buffer (Sigma, USA) et mis en incubation 2 min à température ambiante. 25 mL de RPMI sont ensuite ajoutés afin de stopper la lyse des érythrocytes, et deux lavages sont effectués, avec 25 mL de RPMI. Le culot cellulaire est remis en suspension dans un milieu RPMI-1640 complet, puis placé dans une boîte de pétri stérile pour 1 h à 37 ° C dans une chambre humidifiée contenant 95% d'air et 5% de CO<sub>2</sub>, pour éliminer les macrophages, par adhérence.

Les lymphocytes T sont isolés par lavage (Triboulot et al. 2001). Les cellules non collées ont été décantées, centrifugées (200 x g, 5 min) et transférées dans des boîtes de Petri préalablement revêtue d'anti-IgG de rat (5  $\mu\text{g}$  / mL) pendant une nuit à 4°C.

Par conséquent, la déplétion sélective des lymphocytes B se produit parce qu'ils adhèrent au substrat du des boîtes de Pétri. Après une incubation de 1 h à 4°C, le surnageant riche en lymphocytes T est décanté et centrifugé (200 x g, 5 min), deux fois avec du RPMI-1640 complet. Cette technique nous a fourni une population enrichie (99%) en lymphocytes T vérifiée par cytométrie en flux. Le nombre de cellules a été déterminé par hémocytomètre.

### II.3. Test de transformation lymphoblastique (TTL)

La prolifération des lymphocytes T spléniques en réponse au traitement avec des polyphénols a été évaluée par la méthode de Bonin & Khan (2000) avec une légère modification.

Les lymphocytes T ( $5 \times 10^5$  cellules / puits) sontensemencés dans des plaques de culture à 96 puits pendant une nuit. Les polyphénols les lipides de mil, solubilisés dans l'éthanol, ont été ajoutés à différentes concentrations (de 1 à 40  $\mu\text{g/mL}$ , finales) 1 h avant leur activation avec du phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) à 50 nM et de l'ionomycine (500 nM). Après 48 h de traitement, la prolifération des cellules T a été mesurée par le kit Cayman WST-8 de dosage de la prolifération cellulaire (Cayman Chemical, ETATS-UNIS). L'indice de stimulation (SI) a été calculé comme suit:  $\text{SI} = \text{densité optique (450 nm) des cellules stimulées} / \text{la densité optique (450 nm) de cellules non stimulées} \times 100$ .

### II.4. Préparation des échantillons pour Western blot

Les lymphocytes T ont été privés de sérum pendant 6 h dans un milieu RPMI-1640 sans sérum. Ensuite, les lymphocytes T ( $5 \times 10^6$  / mL) ont été pré-incubés ou non pendant 5 min avec de l'extrait polyphénolique ou lipidique avant stimulation avec PMA (200 nM) pour un temps supplémentaire de 30 min (Nel et al. 1990). L'incubation a été arrêtée par centrifugation et les culots cellulaires ont été lavés deux fois avec du phosphate buffered saline (PBS) et remises en suspension dans 50  $\mu\text{L}$  de tampon de lyse (HEPES 20 mM, pH 7,3; EDTA 1 mM; EGTA 1 mM; NaCl, 0,15 mM; Triton X-100, 1% de glycérol, 10%; phénylméthylsulfonyl fluorure, 1 mM; orthovanadate de sodium, 2 mM; cocktail antiprotéase, 2  $\mu\text{L}$  dans 1 mL de tampon).

Après centrifugation (2500 g pendant 1 min), la quantité des protéines dans le surnageant a été quantifiée avec l'acide bicinchoninique (BCA) (Thermo Fisher Scientific, France) puis les surnageants sont stockés à  $-80^\circ\text{C}$ .

### II.5. Détection des MAP kinases par Western blot

Les protéines dénaturées (60 µg) ont été séparées sur SDS-PAGE (10%) et transférées sur des membranes polyvinylidène difluorure (PVDF), puis l'immunodétection a été réalisée en utilisant des anticorps de lapin dirigés contre MAPK P44 / P42 phosphorylées ou non. Les anticorps primaires ont été détectés avec des anticorps de souris anti-lapin conjuguée à la peroxydase et visualisés en utilisant un Kit ECL (Merck Millipore) sur le système Bio-Rad ChemiDoc XRS +. L'analyse densitométrique a été réalisée sur Bio-Rad Photo Lab Software (version 4.1).

### II.6. Détermination de l'expression des ARNm par RTqPCR

Les cellules ont été cultivées comme décrit ci-dessus, en présence des extraits polyphénoliques et lipidiques, et stimulées avec anti-CD3 pendant 2 h (Sojka et al. 2004; Yessoufou et al. 2009). Les ARNs totaux ont été extraits à l'aide du réactif TRIzol (Invitrogen) avant avoir subi un traitement par la DNase en utilisant la RNase-free DNase Set (Life Technologies). 500 ng d'ARN total ont été transcrit de manière inverse avec Superscript II H-reverse transcriptase (Life Technologies) en utilisant oligo (dT) selon les instructions du fabricant.

PCR en temps réel a été effectuée sur le temps réel iCycler iQ Système de détection, et l'amplification a été faite en utilisant SYBR GREEN PCR Master Mix (Life Technologies) comme décrit précédemment (Abdoul-Azize et al. 2013). Les amorces oligonucléotidiques utilisées sont: bêta-actine sens: 5'-ATGATA TCGCCGC GCTCGTCGTC-3', la bêta-actine antisens 5'-AGGTCCCGG CCAGCCAGGTCCAG-3'; IL-2 sens 5' 'CACTAATTCTTGCACTTGTCAC-3' IL-2 5' antisens CTTCTTG GGCATGTAAAAC-3'. La quantification relative de l'expression de l'IL-2 a été déterminée par la méthode  $\Delta\Delta Ct$  comme suit:

$ACt = Ct \text{ de l'IL-2} - Ct \text{ de bêta-actine}$ .  $\Delta\Delta Ct = ACt \text{ de les cellules traitées} - \text{cellules témoins}$   
 $ACt$ . quantité relative (RQ) a été calculé comme suit:  $RQ = (1 + E) - (\Delta\Delta Ct)$ .

### II.7. Mesure de la signalisation calcique

Les cellules T ( $2 \times 10^6$  cellules / mL) ont été lavées avec un tampon phosphate, pH 7,4, puis incubées avec Fura-2 / AM ( $1 \mu\text{M}$ ) pendant 60 min à  $37^\circ\text{C}$  dans le tampon de charge contenant: 110 mM, NaCl; 5,5 mM, KCl; 25 mM,  $\text{NaHCO}_3$ ; 0,8 mM  $\text{MgCl}_2$ ; 0,4 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0,33 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; 20 mM d'HEPES; 1,2 mM de  $\text{CaCl}_2$ , et le pH a été ajusté à 7,4. Après le chargement, les cellules ont été lavées trois fois ( $720 \text{ g} \times 10 \text{ min}$ ) pour éliminer l'excès de sonde, et le calcium libre est mesuré par la méthode décrite par Grynkiewicz et al. (1985). Dans certaines expériences nous avons utilisé un tampon dépourvu de calcium (0% calcium) ; la composition de ce tampon est identique à celle du tampon riche en calcium sauf que le  $\text{CaCl}_2$  est remplacé par l'EGTA à 1 mM (Aires et al. 2004).

Les intensités de fluorescence ont été mesurées par le spectrophotomètre PTI à des longueurs d'ondes de 340 nm et 380 nm pour l'excitation, et à 510 nm pour l'émission. Un barreau magnétique a permis d'effectuer une agitation tout au long de l'enregistrement. Les solutions à tester ont été ajoutées pendant l'expérimentation dans la cuve de lecture sans interrompre l'enregistrement. La concentration de calcium libre a été calculée suivant la formule suivante :

$[\text{Ca}^{2+}]_i = K_d \times (R - R_{\text{min}}) / (F_{\text{max}} - F) \times (S_{f2} / S_{b2})$ .  $K_d$  est la constante de dissociation du complexe Fura-2/Calcium et a pour valeur 224 nM.  $R$  est le rapport de l'émission à 340 nm divisée par celle à 380 nm.  $R_{\text{min}}$  représente la valeur de  $R$  en absence de calcium (solution 0%  $\text{Ca}^{2+}$ ) et  $F_{\text{max}}$  la valeur de  $R$  en présence de  $\text{Ca}^{2+}$ .  $S_{f2} / S_{b2}$  est le rapport entre les fluorescences émises à 380 nm dans des solutions à 0% et riche en  $\text{Ca}^{2+}$ .  $F_{\text{max}}$  et  $R_{\text{min}}$  sont obtenus respectivement par addition d'ionomycine ( $5 \mu\text{M}$ ) et de  $\text{MnCl}_2$  (2 mM).

Toutes les molécules d'essai ont été ajoutées en petites volumes sans interruption dans les enregistrements.

**PARTIE III**

---

***EFFET ANTICANCEREUX DES  
POLYPHENOLS DU MIL***

### III. Effet anticancéreux des polyphénols du mil

Dans cette partie, nous avons évalué l'activité anticancéreuse des grains de mil cultivar *Bechna* (PGPC), et ce en testant l'effet de l'extrait polyphénolique sur plusieurs lignées cancéreuses humaines. Une seule lignée d'ostéosarcome humaine (U2OS) a répondu au mieux aux traitements, et par conséquent dans les expériences suivantes nous avons vérifié l'effet des polyphénols de mil sur l'induction de l'apoptose dans les cellules U2OS. La signalisation calcique ainsi que la progression du cycle cellulaire ont été aussi étudiées à la réponse du traitement avec PGPC.

#### III.1. Culture cellulaire et traitements

##### III.1.1 Lignées cellulaires et entretien

Au cours de ces travaux, nous avons utilisé des lignées cellulaires humaines du cancer du côlon (HCT8 et HCT116) et une lignée cellulaire humaine d'ostéosarcome (U2OS) provenant de l'American Type Culture Collection (ATCC).

Le milieu de culture utilisée pour leur entretien est le RPMI 1640 supplémenté avec 10% de SVF (sérum de veau fœtal décomplémenté par chauffage au préalable à 56°C pendant 30 min) et d'antibiotiques (Pénicilline 100U/mL ; Streptomycine 100µg/mL) (Dutsher).

Les lignées sont cultivées dans un incubateur sous atmosphère contrôlée à 37°C et à 5% CO<sub>2</sub>. Le passage des cellules est réalisé lorsqu'elles sont sub-confluentes, *i.e.* ayant atteint 80% de confluence, ce qui représente environ 2 passages par semaine. Pour cela, les cellules sont lavées avec du tampon PBS sans calcium et sans magnésium stérile (Dutsher) puis recouvertes de 1 mL trypsine/EDTA (Dutsher) avant d'être placées à 37°C pendant 5 min. L'arrêt de la trypsination est effectué par l'ajout d'un grand volume de milieu complet. Un dixième de la suspension cellulaire de la flasque à sub-confluence sera réensemencée dans une nouvelle flasque, avec un volume de milieu de culture suffisant.

### III.1.2. Traitements PGPC, p-CA et 5-FU

La solution de l'acide p-coumarique (p-CA) est préparée dans du PBS selon les concentrations voulues. Le 5-Fluoro-Uracile (5-FU à 2.5  $\mu\text{M}$ ) est préparé dans le milieu RPMI 1640.

Le volume nécessaire de l'extrait polyphénolique du mil est prélevé de la solution mère de PGPC (préparée dans du MeOH) puis réduit à sec sous azote dans un tube eppendorf avant d'être repris avec du milieu de culture selon les concentrations voulues.

### III.1.3. Traitements avec les inhibiteurs

Le chélateur de calcium cytoplasmique (BAPTA-AM), l'inhibiteur de la protéine uniport mitochondriale (ruthenium red 'RuR'), et les inhibiteurs d'autophagie (3-Methyladenine '3-MA' et chloroquine 'CQ'), et l'inhibiteur des capases (ZVAD-FMK) sont conservés à  $-20^{\circ}\text{C}$  dilués dans du DMSO. Les concentrations finales de ces molécules sont les suivantes : 5  $\mu\text{M}$  (BAPTA-AM), 5  $\mu\text{M}$  (RuR), 5 mM (3-MA), 50  $\mu\text{M}$  (CQ) et 50  $\mu\text{M}$  (ZVAD).

L'ajout de PGPC est réalisé 1 h après le traitement avec les molécules citées ci-dessus.

## III.2. Mesure de la prolifération cellulaire

La viabilité cellulaire est évaluée par comptage au bleu Trypan au microscope après 24 h d'incubation sous une atmosphère humide à 95% d'air et 5%  $\text{CO}_2$ . Les cellules qui excluent le bleu Trypan sont considérées comme viables. Les cellules sontensemencées en plaque 24 puits à raison de 30 000 cellules par puits. Après 24 h, les cellules sont traitées à des concentrations croissantes de PGPC (de 20 à 150  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) et de p-CA (de 5000 à 25000  $\mu\text{M}$ ) pendant 24 h. Les cellules adhérentes ont ensuite été trypsinées et diluées dans une solution de bleu Trypan de 0,5%. Les cellules sont comptées à l'aide d'une cellule de Malassez.

### III.3. Marquage Annexin V et 7AAD

L'évaluation de l'apoptose est réalisée par marquage des cellules avec un intercalant de l'ADN, 7-amino-actinomycine D (7AAD), et avec l'Annexin V à l'aide du kit APC Annexin V Apoptosis Detection kit (Biolegend) selon les recommandations du fabricant. Les marquages sont ensuite analysés par cytométrie en flux (FACS Calibur, Becton Dickinson).

Les cellules U2OS ont étéensemencées dans une plaque de 6 puits à raison de 200 000 cellules/puits. Après 24 h d'incubation, les cellules ont été traitées ou pas avec 50  $\mu$ M z-VAD-fmk pendant 1 h, puis les cellules ont été traitées avec PGPC (60  $\mu$ g/mL) et p-CA (12 500  $\mu$ M). Après 24 h, les cellules ont été collectées et culotées par centrifugation à 520 g pendant 10 min dans des tubes Falcon de 15 mL. Après un lavage avec PBS, les cellules sont reprises dans 200  $\mu$ L de tampon (Binding buffer) auquel sont ajoutés 4  $\mu$ L d'Annexin V et 3  $\mu$ L de 7AAD. Après 15 min d'incubation à l'obscurité et à température ambiante, les échantillons sont passés au cytomètre en flux (FACS Calibur, Becton Dickinson).

Les résultats sont exprimés en pourcentage dont les cellules marquées uniquement à l'Annexin V (AnV+/7AAD-) sont considérées comme étant en stade précoce de l'apoptose. Les cellules doublement marquées à l'Annexin V et 7AAD (AnV+/7AAD+) sont au stade tardif de l'apoptose et enfin les cellules marquées uniquement au 7AAD (AnV-/7AAD+) sont les cellules nécrotiques.

### III.4. Détermination de l'expression des ARNm par RTqPCR

Les cellules U2OS ont été cultivées dans des plaques de 6 puits comme décrit ci-dessus, puis traitées avec PGPC (60 et 75  $\mu$ g/mL) pendant 12 h. Les ARNs totaux ont été extraits à l'aide du réactif TRIzol avant avoir subi un traitement par la DNase en utilisant RNase-free DNase Set (Invitrogen Life Technologies). 1  $\mu$ g d'ARNs totaux a été transcrit de manière inverse avec Superscript II H-reverse transcriptase en utilisant oligo (dT) selon les instructions du fabricant (Invitrogen Life Technologies, France).

La PCR en temps réel a été effectuée dans icycler iQ™ Real Time Detection system (Applied), et l'amplification a été faite en utilisant SYBR Green I detection 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) comme décrit précédemment (Minville-Walz et al. 2010). Les amorces oligonucléotidiques utilisées sont: bêta-actine sens 5'-CTG GTG CCT GGG GCG-3', bêta-actine antisens 5'-AGC CTC GCC TTT GCC GA-3'; CHOP sens 5'-ACA CAG ATG AAA ATG GGG GTA CCT-3', CHOP antisens 5'-AGA AGC AGG ATC AAG

AGT GGT CCT-3' ; BAK sens 5'-TTA CCG CCA TCA GCA GGA ACA-3', BAK antisens: 5'-ATG GGA CCA TTG CCC AAG TTC-3'. BAX sens 5'-ACC AGC TCT GAG CAG ATC ATG G-3', BAX antisens: 5'-CCT CTT CCA GAT GGT GAG CGA-3' ; BCL-2 sens 5'-GTC ATG TCT GTC GAG AGC GT-3', BCL-2 antisens 5'-ACA GTT CCA CCA AGG CAT CC-3' ; XBP1 sens 5'-AAA CAG AGT AGC AGC TCA GAC TGC-3', antisens 5'-TCC TTC TGG GTA GAC CTC TGG GAG-3'.

### III.5. Western blot

#### III.5.1. Extraction et dosage des protéines

Les cellules U2OS ont étéensemencées dans des boîtes de 100 mm<sup>2</sup> à raison de 2 x 10<sup>6</sup> par boîte. Après 24 h d'incubation, les cellules ont été traitées avec PGPC (60 et 75 µg/mL) pendant 24 h. Les cellules flottantes sont récupérées dans des tubes eppendorf et centrifugées, le surnageant est éliminé puis le culot de cellules est lavé avec de PBS froid et centrifugé à 800 g pendant 5 min à 4°C. Les cellules adhérentes sont lavées 2 fois avec du PBS à 4°C, puis incubées pendant 30 min à 4 °C avec 200 µL de tampon de lyse : le tampon RIPA (Tris-base 1 M pH 7.4, NaCl 5 M, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, Triton X-100 1%) supplémenté en DTT (1 mM), PMSF (1 mM), anti-protéases (P8340, Sigma). Les cellules sont ensuite raclées avec un rubber policeman.

Les cellules adhérentes ainsi que flottantes sont récupérées dans des tubes Falcon 15 mL, puis passées à l'aiguille (25 G) et incubées dans la glace pendant 15 min. Les débris cellulaires sont culotés par une centrifugation à 12 000 g pendant 10 min à 4°C, et le surnageant contenant les protéines est récupéré et stocké à -80°C.

Les protéines du surnageant sont dosées par la méthode BCA. Les protéines réduisent le Cu<sup>2+</sup> en Cu<sup>1+</sup> en milieu alcalin, or le BCA est un réactif spécifique du Cu<sup>1+</sup> formant un complexe pourpre ayant une absorption maximale à 570 nm : L'absorbance étant proportionnelle à la concentration de protéines.

Afin de déposer la même quantité sur le gel de séparation, un dosage des protéines dans chaque lysat est indispensable. Les échantillons en triplicata sont ajoutés au réactif BCA/Cu<sup>2+</sup> (Sigma) avec un rapport 50 :1 et le tout est incubé à 37°C pendant 30 min. La plaque de 96 puits est lue au lecteur ELISA à 570 nm.

## Etude expérimentale

Après avoir déterminé la concentration en protéines des échantillons à partir de la gamme étalon réalisée avec de l'albumine (Bovine Serum Albumine, BSA), ceux-ci sont dilués afin d'obtenir une concentration finale de 2,5 µg/µL dans un volume final de 210 µL dont 28 µL de tampon de charge (Composition du Tampon de charge 5X : 10% (w/v) SDS (sodium dodécylsulfate), 40% (v/v) Glycérol, 25% (v/v) Tris 1M pH=6,8, 20% (v/v) β-mercaproéthanol, 0,005% (w/v) Bleu de Bromophénol).

### III.5.2. Migration et transfert

80 µg de protéines sont dénaturés 5 min à 95°C puis les échantillons sont déposés sur un gel d'acrylamide/ bisacrylamide 10 % contenant du SDS 0,1%. La migration est effectuée dans un tampon Tris-glycine (Tris 72 mM ; glycine 200 mM ; SDS 0,1%),

L'étape de migration des protéines s'est déroulée comme suit :

- Le gel de séparation à 10 %, le gel de concentration à 5% ainsi que le gel de blocage sont préparés comme indiqués dans le tableau 3. Puis, ces gels sont coulés et placés dans la cuve d'électrophorèse.

**Tableau 3 : Compositions des gels de migration**

	<b>Blocage (x4)</b>	<b>10% (x4)</b>	<b>5% (x4)</b>
<b>40 % Acrylamide/Bis</b>	1 mL	5 mL	1,61 mL
<b>0,5 M Tris-HCl, pH 6,8</b>	-	-	3,125 mL
<b>1,5 M Tris-HCl, pH 8,8</b>	-	5 mL	-
<b>10% SDS</b>	-	200 µL	125 µL
<b>Eau bidistillée</b>	1 mL	9,7 mL	7,95 mL
<b>TMED</b>	10 µL	10 µL	12,5 µL
<b>10 % APS</b>	50 µL	100 µL	125 µL

- La cuve d'électrophorèse a été remplie par la solution de migration ;

- 80 µg de lysat protéique sont déposés dans chaque puits avec les marqueurs de tailles ;

-la cuve est ensuite connectée au courant électrique à 80 V. Lorsque les échantillons protéiques forment une ligne droite entre le gel de concentration et le gel de séparation, le voltage est augmenté à 110 V et les protéines migrent jusqu'à ce que la séparation soit achevée.

Passé le temps de migration, ces protéines sont transférées électriquement à l'aide du tampon de transfert sur une membrane de PVDF à 300 mA pendant 75 min à 4°C.

### III.5.5. Immunoblotting et révélation

Les membranes sont ensuite saturées pendant 1 h à température ambiante dans un tampon salin TBS-T (TBS 1X ; Tween-20 0,1%) contenant 5% de BSA. Durant cette étape, les protéines dans la solution de BSA se lient à la membrane dans tous les sites non-occupés par la protéine-cible et lorsque les anticorps sont appliqués lors de l'étape suivante, ils vont donc s'attacher uniquement sur les sites de liaison de la protéine-cible, ce qui réduit le bruit de fond. Après l'incubation, 3 lavages de 5 min chacun, par du TBS-T sont effectués pour éliminer l'excès du BSA. Les membranes sont incubées avec les anticorps primaires (tableau 4) dilués dans du TBS-T, 2,5% BSA pendant une nuitée à 4°C. Les membranes sont lavées 4x avec du TBS-T pendant 5 min sous agitation à température ambiante. Les membranes sont par la suite incubées avec les anticorps secondaires conjugués à la peroxydase pendant 1 h à température ambiante. Les membranes sont lavées 4 x avec du TBS-T puis 2 x avec du TBS pendant 5 min sous agitation à température ambiante.

**Tableau 4 : Les anticorps utilisés en western blot**

<b>Antigen</b>	<b>WB dilution</b>	<b>Source/ Host</b>	<b>Catalog number</b>	<b>Company</b>
AKT	1:1000	Rabbit	4685	Cell Signaling Technology
Caspase-8	1:1000	Mouse	9746	Cell Signaling Technology
Caspase-9	1:1000	Mouse	9508	Cell Signaling Technology
Cdc2 (POH1)	1 :1000	Mouse	9116	Cell Signaling Technology
CDK2	1 :1000	Rabbit	2546	Cell Signaling Technology
Cleaved PARP (Asp214)	1 :1000	Rabbit	9541	Cell Signaling Technology
c-Src (SRC 2)	1:500	Rabbit	sc-18	Santa Cruz Biotechnology
Cyclin A	1:500	Rabbit	sc-751	Santa Cruz Biotechnology
Cyclin E	1:500	Rabbit	sc-481	Santa Cruz Biotechnology
p38 MAPK	1 :500	Rabbit	622401	BioLegend
p53	1:1000	Mouse	2524	Cell Signaling Technology
p70 S6K (Ribosomal protein S6 kinase)	1 :1000	Rabbit	2708	Cell Signaling Technology
Phospho -STAT3 (Ser 727)	1:200	Rabbit	sc-135649	Santa Cruz Biotechnology
Phospho-AKT (Ser473)	1 :1000	Mouse	4051	Cell Signaling Technology
Phospho-AKT (Thr308)	1:1000	Rabbit	9275	Cell Signaling Technology
Phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182)	1:1000	Rabbit	4511	Cell Signaling Technology
Phospho-p53 (Ser46)	1:1000	Rabbit	2521	Cell Signaling Technology
Phospho-p70 S6K (Thr389)	1 :1000	Rabbit	9205	Cell Signaling Technology
Phospho-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185)	1 :0000	Mouse	9255	Cell Signaling Technology
SAPK/JNK	1 :0000	Rabbit	9252	Cell Signaling Technology
$\beta$ -actin	1:5000	Mouse	sc-47778	Santa Cruz Biotechnology
$\beta$ -catenin	1:000	Rabbit	8480	Cell Signaling Technology
p44/42 MAPK (ERK1/2)	1 :1000	Rabbit	9102	Cell Signaling Technology
Phospho-p44/42 MAPK (ERK1/2)	1 :1000	Rabbit	9100	Cell Signaling Technology

La protéine d'intérêt (les sondes marquées) est détectée grâce à la technique de la chimiluminescence amplifiée (Enhanced Chemiluminescence) ECL fourni par Clarity™, Western ECL Substrat, Biorad, à l'obscurité et exposée grâce à un système d'acquisition d'image (Chemi-Doc MP Imager Station, Biorad).

### III.5.6. Arrachage d'anticorps et réutilisation de la membrane

Une membrane peut être réutilisée pour plusieurs marquages, à condition d'éliminer les anticorps attachés en utilisant la solution d'arrachage d'anticorps « Stripping Buffer ». Tout d'abord, la membrane est lavée avec du TBS-T 3 fois pendant 5 min à température ambiante, pour éliminer le reste du réactif de chemiluminescence, ensuite avec l'eau distillée pendant 5 min pour éliminer le TBS-T. Ensuite, la membrane est introduite avec la solution d'arrachage d'anticorps « Stripping Buffer » pendant 45 min à 50°C. La membrane est ensuite lavée 6 X abondamment pendant 5 min avec TBS-T. Enfin, la membrane est prête pour être utilisée une autre fois après avoir été bloquée avec du BSA (5 %).

Il est à noter que la  $\beta$ -actine est utilisée comme marqueur de dépôt afin de normaliser les expériences du fait que, sa concentration est la même au niveau de toutes les cellules (contrôle interne).

### III.6. Etude du cycle cellulaire sur cellules fixées par Cytométrie de flux

La cytométrie de flux est utilisée pour déterminer la distribution des cellules U2OS dans le cycle cellulaire. Les cellules ont été préalablementensemencées pendant 24 h à raison de 200 000 cellules/puits dans une plaque à 6 puits. Après traitements durant 24 h avec PGPC (60  $\mu$ g/mL) ou p-CA (12 500  $\mu$ M), combinés ou non au 5-FU, les cellules sont lavées 2 x (centrifugation 1500 rpm, 5 min, 4°C) et resuspendues dans 1 mL PBS. La fixation des cellules a été alors réalisée en ajoutant goutte à goutte 3 mL d'une solution d'éthanol absolu froid (-20°C) tout en vortexant, puis les cellules ont été mises à incuber pendant au moins 3 h à 4°C. Passé ce délai, les cellules ont été centrifugées (6000 rpm pendant 5 min) et le culot cellulaire a été repris par 250  $\mu$ L de PBS supplémenté de 100  $\mu$ g/mL de RNase et 10 $\mu$ g/mL d'iodure de propidium (marqueur fluorescent), puis nous les avons laissé incuber 1 h à 37°C avant le passage des tubes au cytomètre.

### IV. Analyse statistique

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel GraphPad Prism. Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne  $\pm$  SD (déviation standard). La différence significative entre ces moyennes est déterminée par un test de Student (t-test) ou un test Mann-Whitney pour les comparaisons par paires, et un test ANOVA pour les comparaisons multiples.

# **Résultats et discussions**

---

***POUVOIR ANTIOXYDANT  
DES EXTRAIS POLYPHENOLIQUES DE  
GRAINS DE MIL***

**PARTIE I**

---

# I. Pouvoir antioxydant des extrais polyphénoliques de grains de mil

## I.1. Détermination du taux d'humidité

Nos résultats ont révélé des taux moyens d'humidité très rapprochés entre les cultivars étudiés, le cultivar Bechna présente un taux estimé à 7,22%, et le cultivar Mekrout à 7,66%. Les valeurs d'humidité, nous ont permis de calculer les pourcentages de la matière sèche (MS) pour les deux cultivars du mil; 92,78% pour le cultivar Bechna, et 92,34% pour le cultivar Mekrout.

## I.2. Rendements des extractions

Après avoir dégraissé le filtrat et évaporé le solvant d'extraction, il s'est révélé que le cultivar; Bechna présente un rendement supérieur à celui du cultivar Mekrout lorsqu'ils ont subi une extraction avec l'eau ou le méthanol. Par contre, avec l'acétone, le cultivar Mekrout présente un rendement élevé.

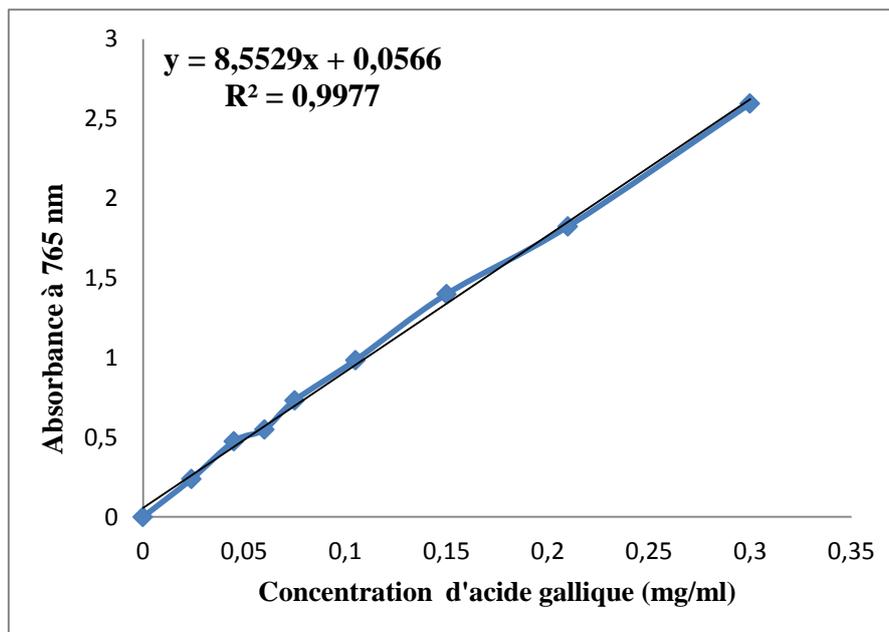
**Tableau 5: rendements des extractions en pourcentage.**

Cultivars de mil	Solvants d'extraction		
	Méthanol	Eau	Acétone
Bechna	6,17 %	12,34%	5,335 %
Mekrout	4,245 %	10,07%	6,120 %

D'une manière générale, la teneur en extrait sec ne dépendrait pas seulement de l'espèce, ou bien du cultivar, mais elle varierait également en fonction des conditions de l'extraction solide-liquide des polyphénols: la température, le solvant d'extraction, la taille des particules et le coefficient de diffusion du solvant d'extraction .

### I.3. Détermination de la teneur en polyphénols totaux

La concentration en polyphénols de chaque extrait a été déterminée grâce à l'équation de régression linéaire suivante:  $Abs = 8,5529 C + 0,0566$ . Après le calcul, la teneur des polyphénols trouvée est exprimée en milligramme équivalent acide gallique par gramme de matière sèche (mg EAG/g MS)

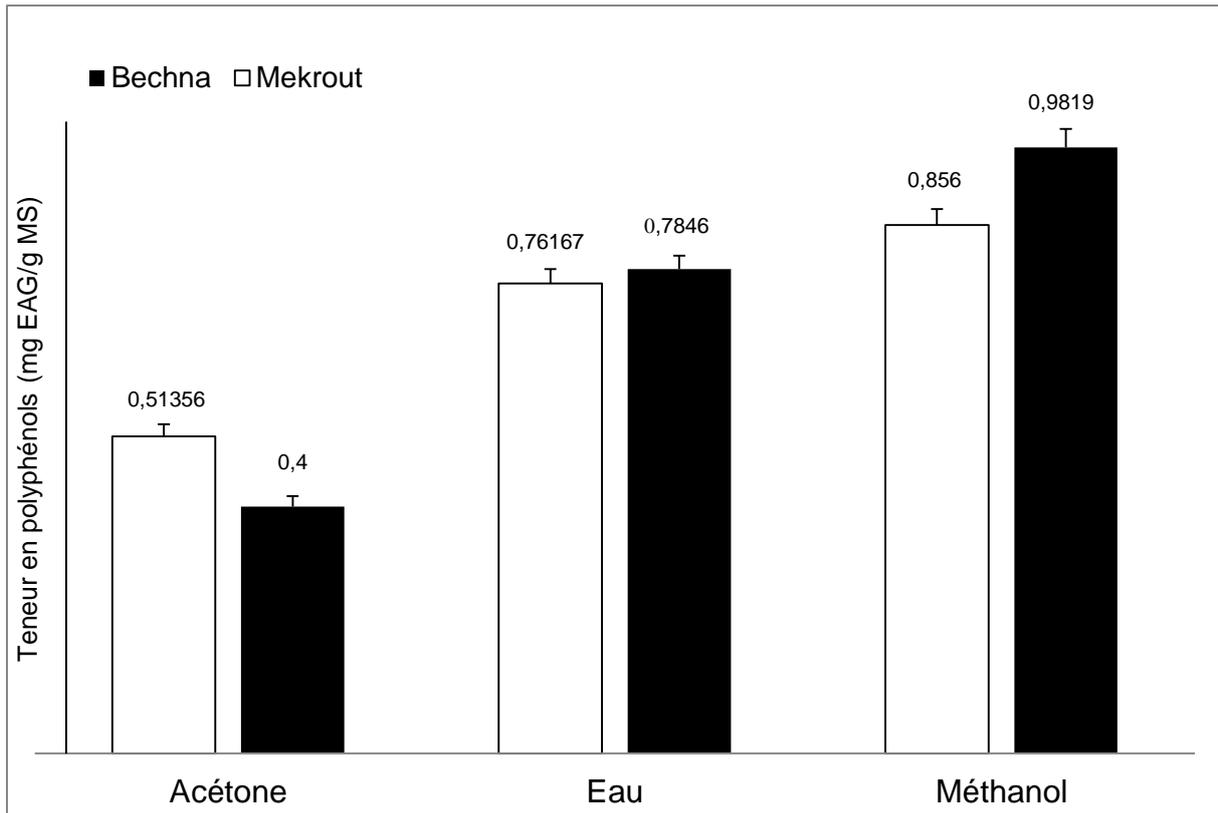


**Figure 21: courbe d'étalonnage des polyphénols totaux**

Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 22, les extraits méthanoliques et aqueux du cultivar Bechna contiennent des teneurs en polyphénols légèrement supérieures à celles du cultivar Mekrout. Cependant, l'extrait acétonique révèle que le cultivar Mekrout contient plus de polyphénols que le cultivar Bechna. La teneur des polyphénols pour chaque solvant concorde avec son rendement d'extraction.

Nous avons remarqué que pour chaque cultivar, l'extraction par le méthanol présente le taux le plus élevé en polyphénols totaux, suivi par l'eau, puis l'acétone

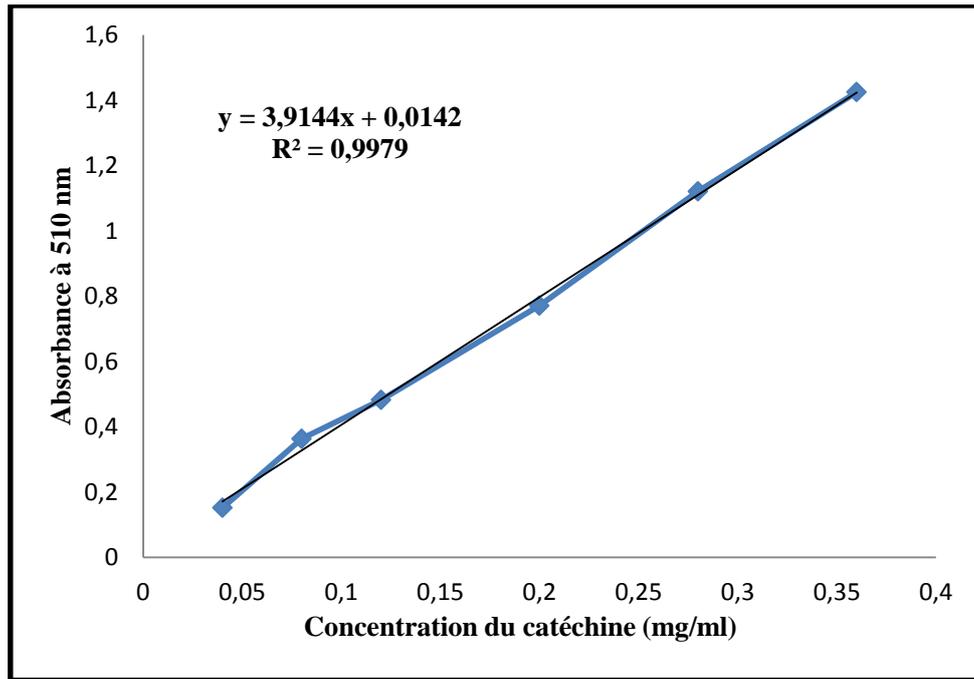
En termes de profil phénolique total, il apparaît que le cultivar Bechna contient plus de polyphénols que le cultivar Mekrout. Ces résultats sont en accord avec la révélation de Lestienne (2004) qui a rapporté que la teneur en acides phénoliques est plus élevée dans les graines du mil jaune que dans celles des autres couleurs. Toutefois, les différences notées seraient liées en grande partie à la différence variétale de chaque type de mil.



**Figure 22: teneur en polyphénols totaux des extraits aqueux, acétoniques et méthanoliques des grains de mil en mg EAG/g de MS**

### I.4. Détermination de la teneur en flavonoïdes

Grâce à l'équation de régression linéaire de la courbe d'étalonnage ( $y = 3,9144x + 0,0142$ ) nous avons pu calculer la teneur en flavonoïdes totaux des deux cultivars du mil. Après le calcul, la teneur des flavonoïdes trouvée est exprimée en milligramme équivalent de catéchine par gramme de matière sèche (mg EC/g MS).



**Figure 23: courbe d'étalonnage des flavonoïdes.**

Les résultats obtenus sont représentés dans la figure 24. Nous avons observé l'existence des flavonoïdes à différentes proportions allant de 0,0416 à 0,4474 mg EC/g MS. Ces différences seraient liées à la provenance du cultivar et le type des polyphénols qui interagissent avec le solvant d'extraction. En comparant avec le cultivar Mekrou, le cultivar Bechna libère plus de flavonoïdes avec l'eau et le méthanol, mais une moindre teneur avec l'acétone.

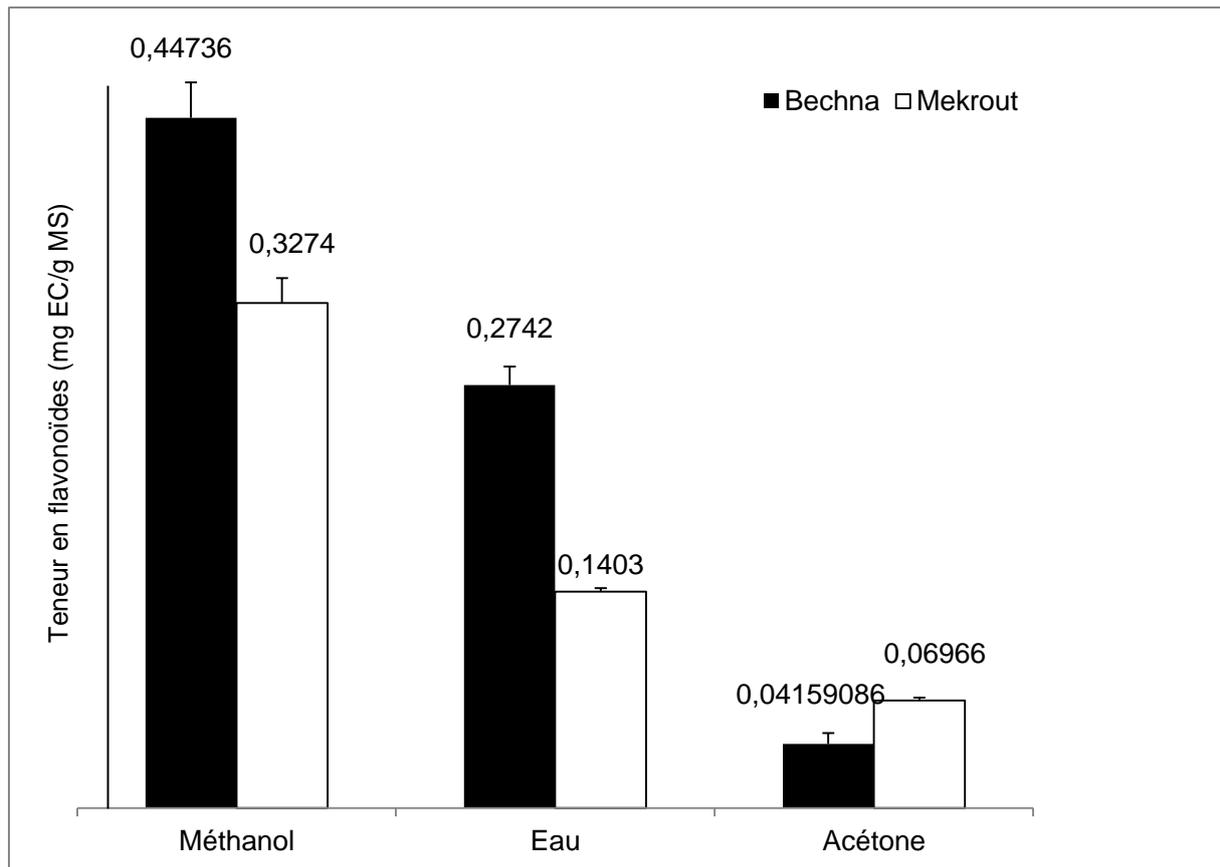


Figure 24: teneur en flavonoïdes des mils étudiés en mg EC/g M.S.

### I.5. Le profil phénolique des grains du mil, cultivar Bechna

La teneur totale en composés phénoliques dans les grains de mil a été estimée à 1660  $\mu\text{g}$  EAG / g. Le tableau 07 montre que l'acide *p*-coumarique représente 81%, et l'acide férulique représente 12% du total des composés phénoliques.

**Tableau 6 : La composition en polyphénols des grains de mil**

Composés phénoliques	Temps de rétention (min)	µg /g échantillon (MS)
Acide gallique	7.957	15.351
Acide chlorogénique	15.298	16.074
Acide syringique	17.361	7.380
Acide <i>p</i> -coumarique	19.565	1350.884
Acide férulique	20.158	199.562
Acide <i>trans</i> hydroxycinnamique	20.932	41.330
Acide ellagique	22.388	14.4364
Quercétine	24.005	5.904
Apigénine	25.874	9.078

### I.6. Pouvoir antioxydant: test DPPH antiradicalaire

Le test de DPPH est couramment utilisé pour déterminer l'activité anti radicalaire des extraits de plantes. Le pourcentage du piégeage du radical libre DPPH est défini par le rapport d'absorbance à 517 nm du mélange réactionnel qui contient le radical libre et l'extrait testé à différentes concentrations contre l'absorbance du radical libre. La capacité antiradicalaire d'un composé est souvent exprimée par l'indice "EC<sub>50</sub>" qui représente la concentration en ce composé qui neutralise 50% de DPPH mis en jeu. La capacité antiradicalaire d'un composé est inversement proportionnelle à son EC<sub>50</sub>.

Dans notre expérimentation, nous avons utilisé l'acide gallique, la Butyléd hydroxyanisole (BHA) et la vitamine C entant qu'antioxydants de références. Nous avons établi la courbe de pourcentage de piégeage en fonction de la concentration des polyphénols totaux présents dans chaque extrait, puis la valeur d'EC<sub>50</sub> a été déterminée.

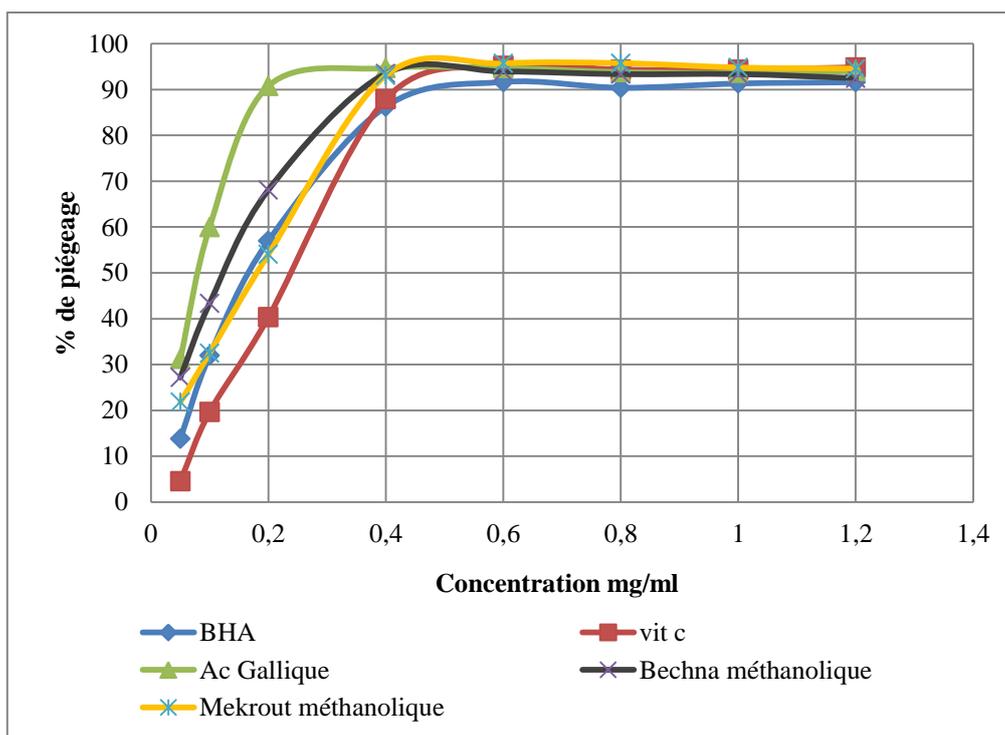


Figure 25: Pourcentage d'inhibition du radical DPPH des extraits méthanoliques des grains de mil.

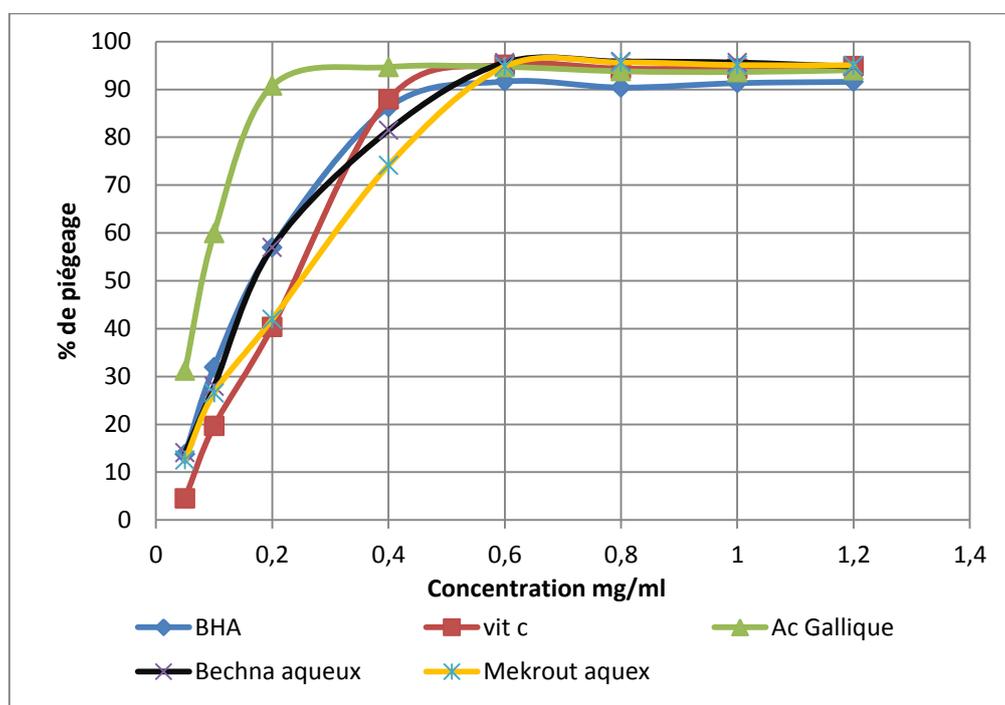


Figure 26: Pourcentage d'inhibition du radical DPPH des extraits aqueux des grains de mil.

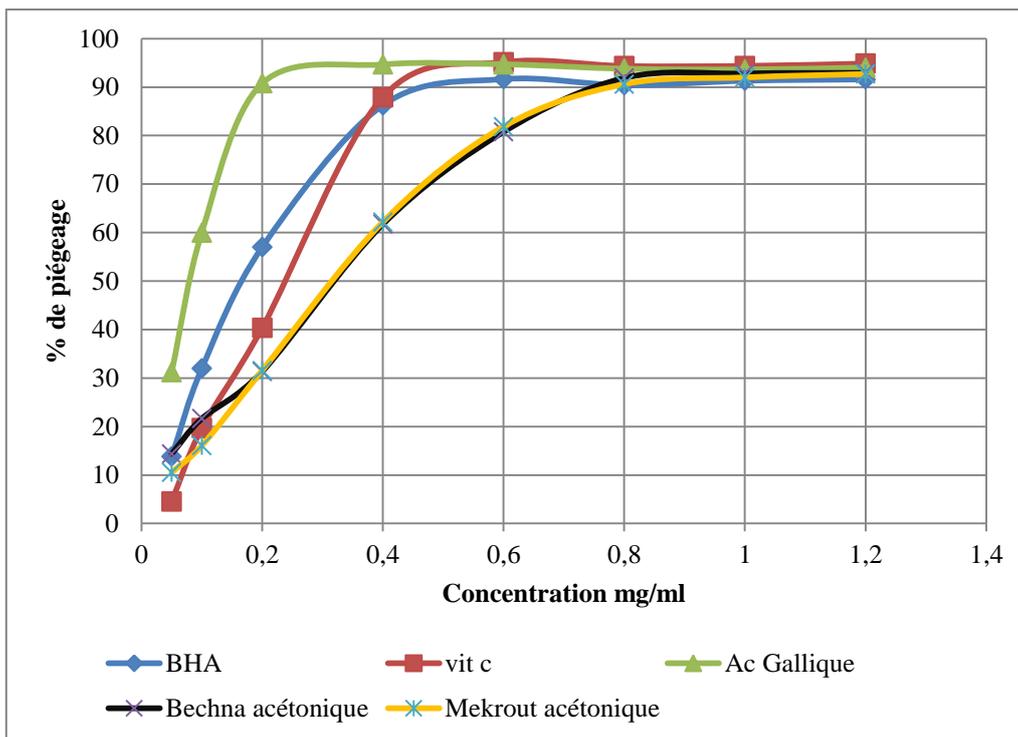


Figure 27: Pourcentage d'inhibition du radical DPPH des extraits acétoniques des grains de mil.

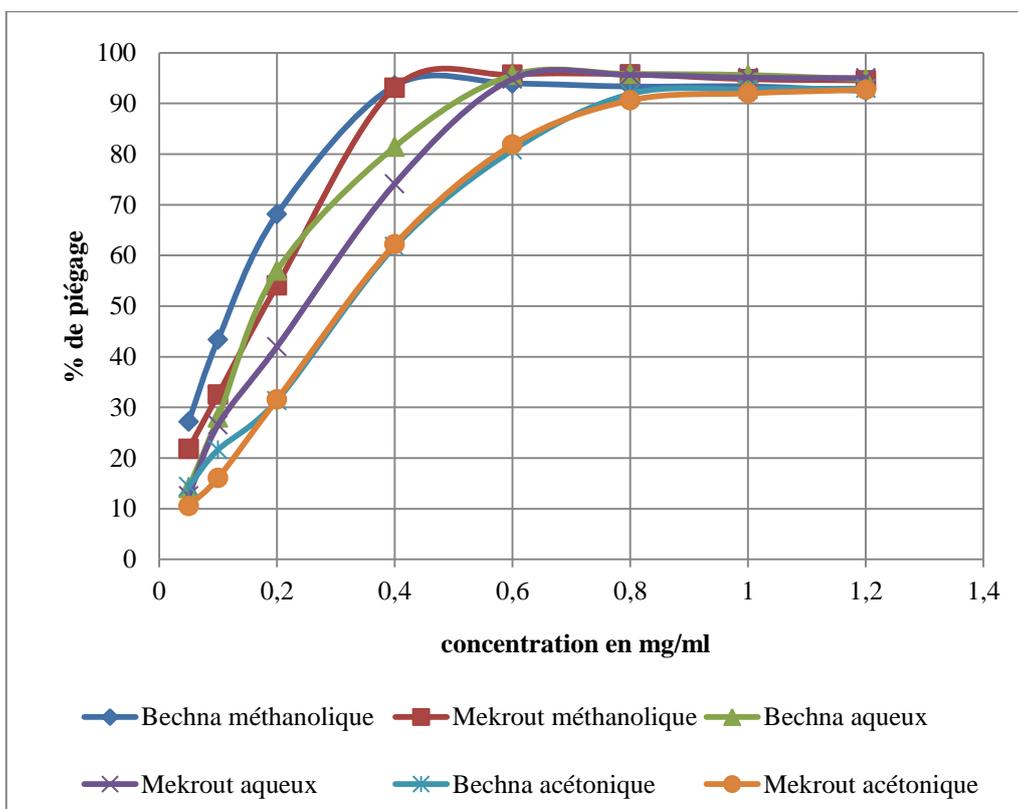
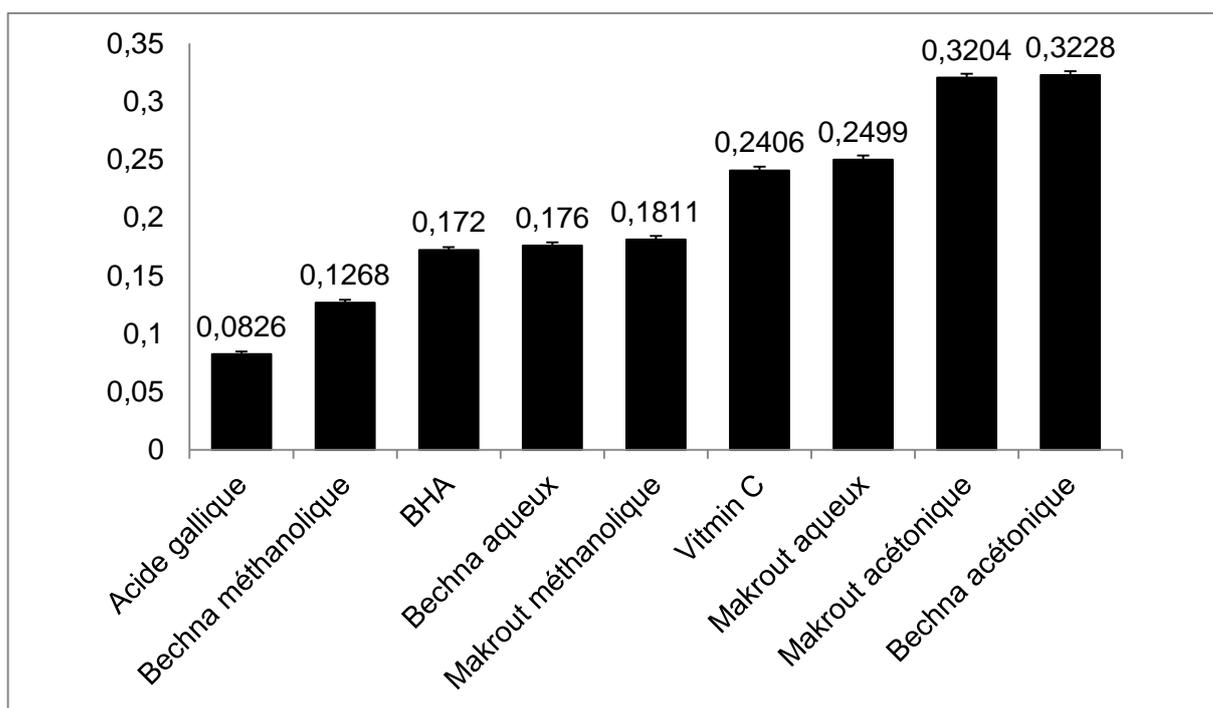


Figure 28: comparaison des pourcentages d'inhibition du radical DPPH des extraits des grains de mil.

Les valeurs d'EC<sub>50</sub> sont représentées dans la figure ci-dessous:



**Figure 29: valeurs d'EC<sub>50</sub> (en mg/mL) des extraits testés comparées aux antioxydants de références.**

D'après les résultats de l'évaluation des pouvoirs antioxydants de nos extraits, nous avons remarqué que les antioxydants de référence ont des capacités antiradicalaires différentes, d'ailleurs l'acide gallique se révèle l'antioxydant le plus puissant parmi les antioxydants de référence utilisés avec une valeur d'EC<sub>50</sub> équivalent 0,0826 mg/ml suivi par la BHA avec une valeur d'EC<sub>50</sub> estimée à 0,1720 mg/ml, et pour la vitamine C, elle a une valeur d'EC<sub>50</sub> égale à 0,2406 mg/ml.

On remarque que les extraits aqueux du Bechna et méthanolique du Mekrout ont des capacités antiradicalaires très proches de celle du BHA, avec des valeurs d'IC<sub>50</sub> estimées à 0,1760 et 0,1811 mg/ml respectivement. Nos résultats ont révélé que la capacité antiradicalaire de l'extrait aqueux du Mekrout est très proche de celle de la vitamine C, et que l'extrait méthanolique du Bechna est le plus puissant, en le comparant aux autres extraits testés, avec une valeur d'EC<sub>50</sub> intermédiaire entre celle de l'acide gallique et la BHA; 0,1268 mg/ml. Les extraits acétoniques du Bechna et de Mekrout ont montré moins de capacité antiradicalaire par rapport aux autres extraits avec des valeurs 0,3228 et 0,3204 mg/ml respectivement.

## Résultats & discussions

Le suivi de la cinétique de la réaction nous a permis de repérer l'extrait qui réagit rapidement avec le radical DPPH<sup>•</sup>. Nous avons remarqué que la couleur violette du milieu vire en fonction du temps, et la diminution de l'absorbance est proportionnelle à la vitesse de la neutralisation du radical DPPH<sup>•</sup>.

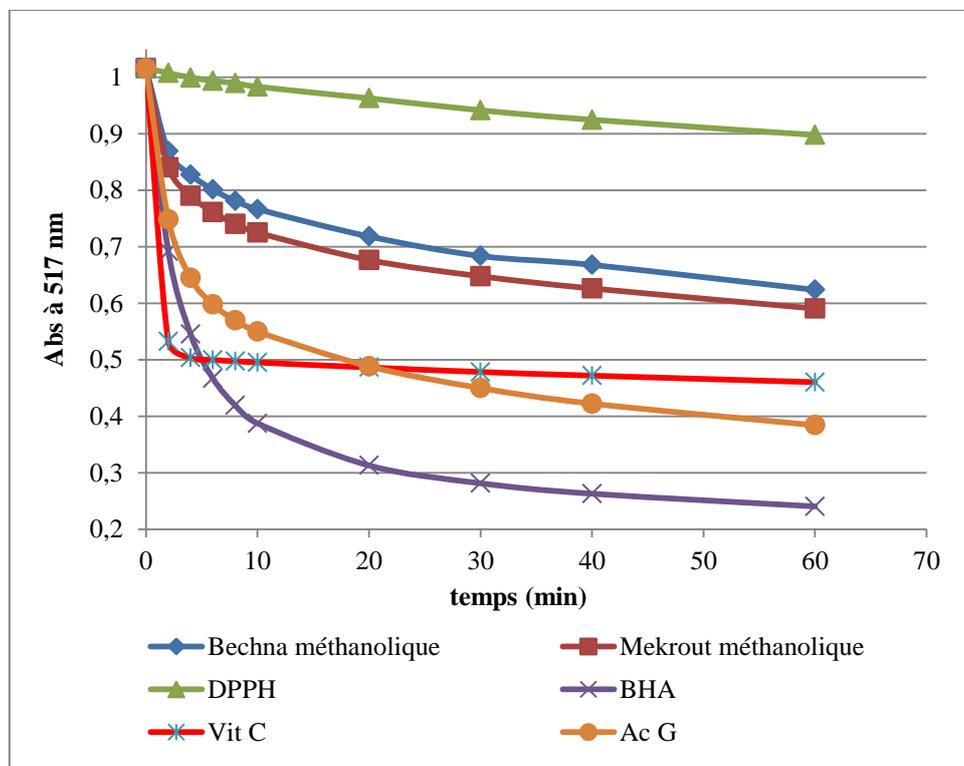


Figure 30: Cinétique du piégeage du radical DPPH<sup>•</sup> par les extraits méthanoliques.

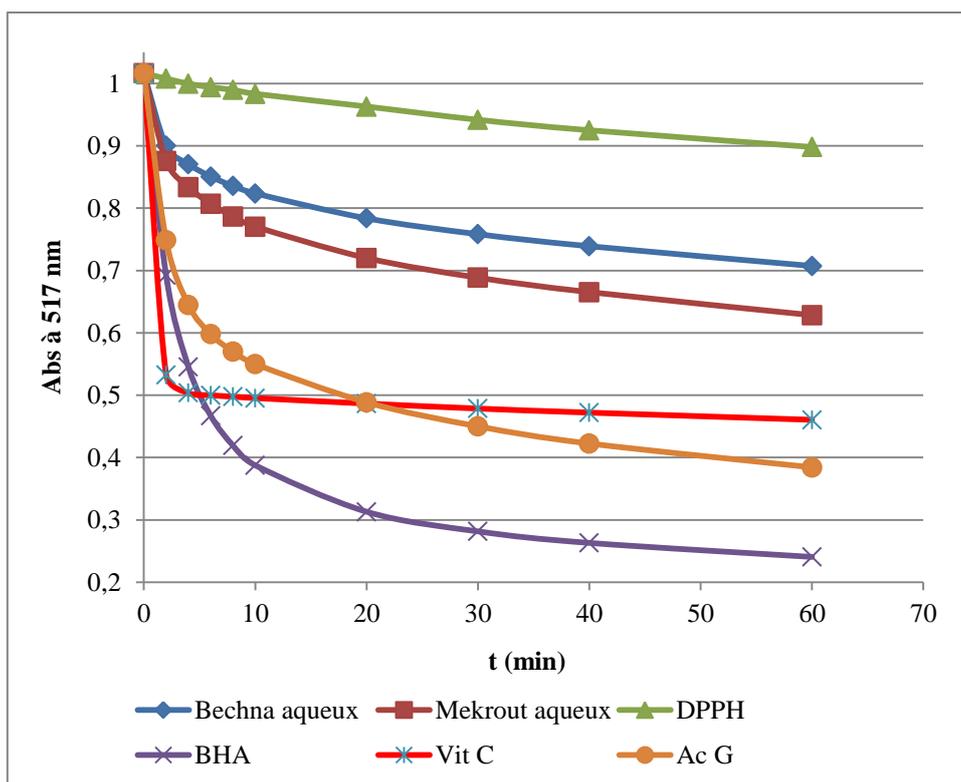


Figure 31: Cinétique du piégeage du radical DPPH' par les extraits aqueux.

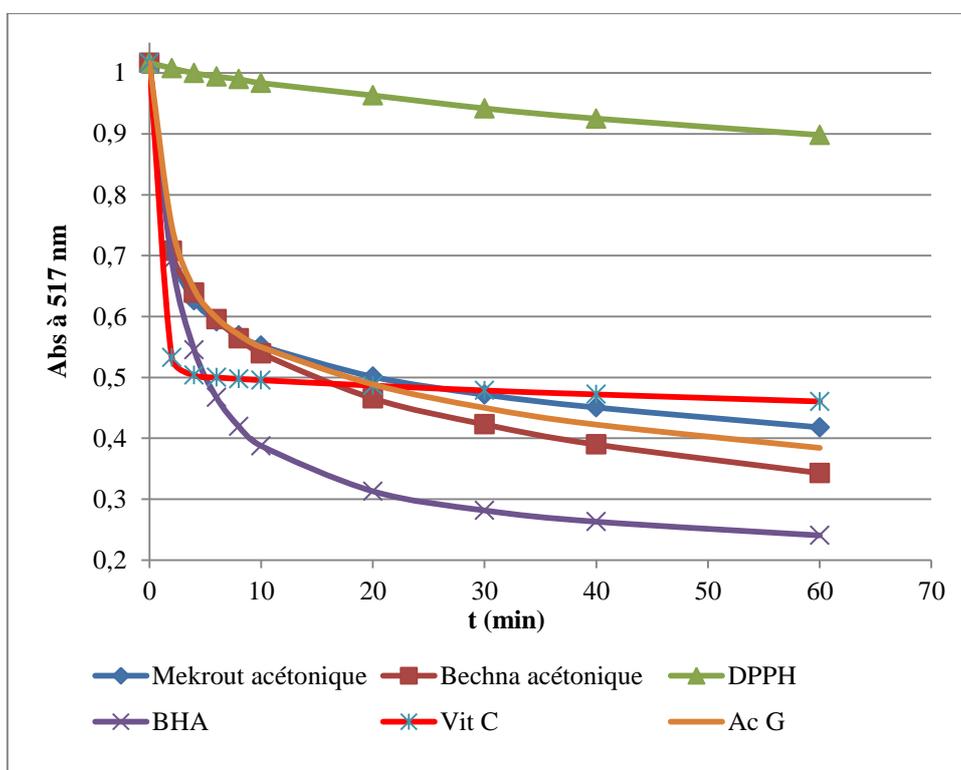
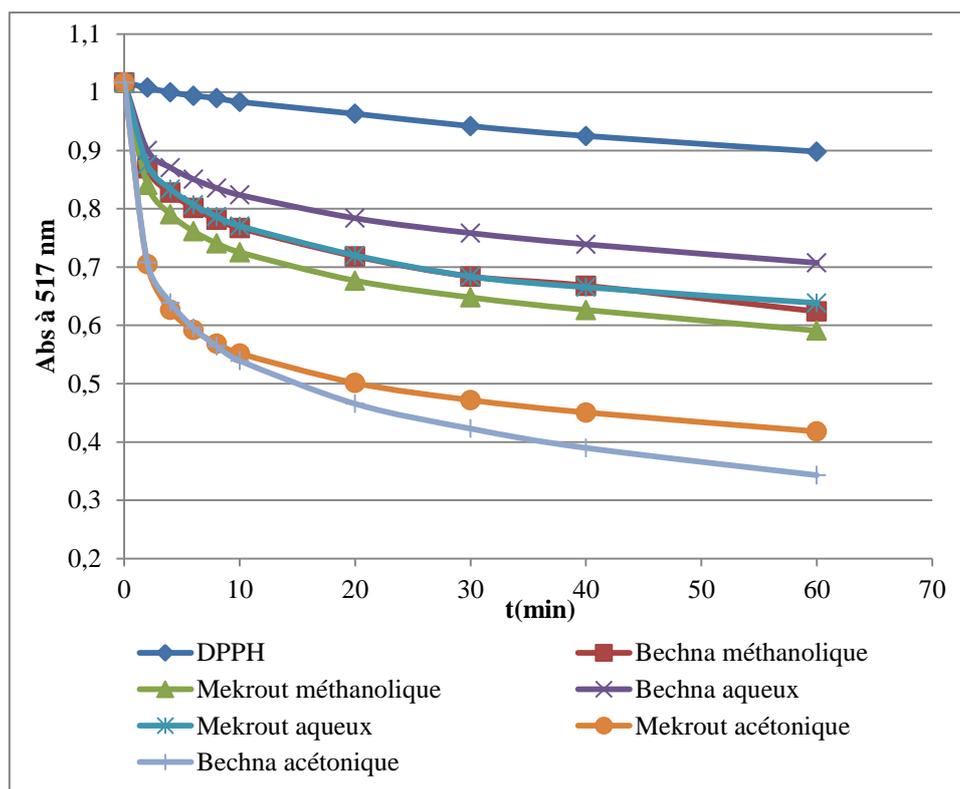


Figure 32: cinétique du piégeage du radical DPPH' par les extraits acétoniques.



**Figure 33: récapitulatif de la cinétique du piégeage du radical DPPH' par les extraits testés.**

D'après l'analyse des courbes ci-dessus, il s'avère que la vitamine C réagit rapidement avec le radical DPPH' par rapport aux autres références, suivies par la BHA, ensuite l'acide gallique.

Par ordre croissant des vitesses de réaction avec le radical DPPH' les extraits sont classés comme suit: l'extrait aqueux du cultivar Bechna, puis les extraits méthanoliques du Bechna et aqueux du Mekrout qui réagissent de la même manière, puis vient l'extrait méthanolique du cultivar Mekrout, et enfin les extraits acétoniques s'avèrent les plus rapides.

Les extraits méthanoliques et aqueux réagissent plus lentement par rapport aux références étudiées, alors que les extraits acétoniques ont une vitesse de réaction proche de celle de l'acide gallique.

Les différents pouvoirs antiradicalaires et la cinétique de réaction, pourraient être justifiés par la différence dans la composition phytochimique trouvée dans chaque extrait.

### I.7. Discussion

Au cours de son métabolisme, notre organisme produit des composés biochimiques ayant un électron célibataire dits radicaux libres ou espèces réactives d'oxygènes (ERO). En biologie, ces radicaux libres exercent des effets paradoxaux. Ils sont à la fois susceptibles d'engendrer un nombre considérable de maladies et très indispensables à la vie. Les radicaux libres jouent un rôle primordial dans la réponse immunitaire innée. Ils sont aussi impliqués dans plusieurs voies cellulaires : signalisation cellulaire, arrêt du cycle cellulaire, apoptose, etc. (Favier 2003). On parle du stress oxydatif (ou stress oxydant) lorsqu'il s'agit un déséquilibre entre les systèmes oxydants, ERO, et les capacités antioxydantes d'un organisme. Le stress oxydatif est responsable de lésions directes au niveau moléculaire (oxydation de l'ADN, des protéines, des lipides, des glucides), pouvant affecter considérablement les mécanismes cellulaires. Il peut aussi causer de lésions secondaires dues au caractère cytotoxique et mutagène des produits libérés, notamment lors de l'oxydation des lipides. Ces produits se lient à l'ADN, formant des adduits responsables de mutagenèse et carcinogénèse (Gardès-Albert et al. 2003). Le stress oxydatif serait également impliqué dans les maladies neurodégénératives, notamment la maladie d'Alzheimer, où la mort neuronale pourrait être liée à un phénomène d'apoptose impliquant les radicaux libres (Klein & Ackerman 2003). Dans la maladie de Parkinson, il s'agit d'un stress oxydatif en relation à la fois avec un dysfonctionnement mitochondrial et un défaut de l'élimination des protéines oxydées par le protéasome (Jenner 2003).

Le système antioxydant endogène est composé d'enzymes (superoxyde dismutase, glutathion peroxydase, catalase), de protéines (ferritine, transferrine, céruléoplasmine, albumine) et de systèmes de réparation des dommages oxydatifs comme les endonucléases. A cela s'ajoutent quelques oligoéléments comme le sélénium, le cuivre et le zinc qui sont des cofacteurs d'enzymes antioxydantes. Cependant, il y a des antioxydants dits exogènes qui ne sont pas synthétisés par l'organisme et qui sont apportés par l'alimentation sous forme de fruits et légumes riches en vitamines C, E, caroténoïdes, ubiquinone, polyphénols, glutathion ou acide lipoïque (Haleng et al. 2007).

Les polyphénols sont les antioxydants naturels les plus abondants dans notre alimentation. De ce fait, les polyphénols intéressent de plus en plus les chercheurs car plusieurs études ont montré leur implication probable dans la prévention de diverses pathologies associées au

stress oxydatif, telles que le cancer, les maladies neurodégénératives ou encore les maladies cardiovasculaires (Robards & Antolovich 1997; Yao et al. 2004; Manach et al. 2006). Les polyphénols sont apportés par une alimentation d'origine végétale et présentent une grande diversité structurale. Plusieurs recherches ont rapporté la richesse des céréales, incluant les mils, en polyphénols (Viswanath et al. 2009; Hithamani & Srinivasan 2014; Gorinstein et al. 2007; Ragaei et al. 2006; Shahidi & Chandrasekara 2013).

Les fruits, le thé et le vin rouge constituent les principales sources de polyphénols. Certains polyphénols sont spécifiques à des aliments particuliers (flavanones dans les agrumes, isoflavones dans le soja, la phloridzine dans les pommes), tandis que d'autres, comme la quercétine, se trouvent dans tous les produits végétaux (fruits, légumes, céréales, légumineuses, thé, vin, etc.) (D'Archivio et al. 2007). Généralement, les aliments contiennent des mélanges complexes de polyphénols. Par exemple, les pommes, qui représentent un rare exemple de nourriture pour lequel des données précises sur sa composition de polyphénols sont disponibles, contiennent des monomères ou oligomères de flavanol, de l'acide chlorogénique et de petites quantités d'autres acides hydroxycinnamiques, de plusieurs glycosides de la quercétine, 2 glycosides de la phlorétine et des anthocyanines. Les profils de polyphénols de toutes les variétés de pommes sont pratiquement identiques, mais les concentrations peuvent différer significativement entre différentes variétés (de 0,1 à 10 g de polyphénols totaux / kg de poids frais (Guyot et al. 2001; Sanoner et al. 1999) D'autre part, pour de nombreux produits végétaux, la composition en polyphénol est moins connue. En outre, de nombreux facteurs, tels que la maturité au moment de la récolte, les facteurs environnementaux et le stockage, peuvent affecter la teneur en polyphénols des plantes. Les facteurs environnementaux, tels que le climat (exposition au soleil, précipitations) ou agronomiques (différents types de la culture, du rendement des fruits par arbre, etc.) jouent un rôle clé dans la détermination de la teneur en polyphénols. En particulier, l'exposition à la lumière a un effet considérable sur la plupart des flavonoïdes. Le degré de maturité affecte différemment les concentrations et les proportions des différents polyphénols. En général, les concentrations d'acide phénolique diminuent pendant la maturation, alors que les concentrations d'anthocyanines augmentent. Le stockage peut également affecter le contenu des polyphénols oxydés, conduisant à la formation de substances plus ou moins polymérisées, qui altèrent particulièrement la couleur et les caractéristiques organoleptiques des fruits. Le stockage à froid, en revanche, n'affecte pas le contenu des polyphénols (van der Sluis et al. 2001; DuPont et al. 2000). La teneur en polyphénol des aliments est également influencée par les méthodes de préparation culinaire; le simple épluchage des fruits et des légumes peut

réduire de manière significative la teneur en polyphénols, car ces substances sont souvent présentes dans des concentrations élevées dans les téguments. La cuisson a également un effet remarquable: par exemple, les oignons et les tomates perdent environ 75% de leur teneur initiale en quercétine après 15 minutes d'ébullition, 65% après la cuisson dans un four à micro-ondes et 30% après la friture. Les pommes de terre contiennent jusqu'à 190 mg d'acide chlorogénique / kg principalement dans la peau (Friedman 1997). Cependant, une perte importante survient pendant la cuisson, et aucun acide phénolique restant n'a été trouvé dans les frites (Clifford 2000).

Peu de travaux concernant les teneurs en composés phénoliques des graines de *Pennisetum glaucum* ont été réalisés. De ce fait, dans notre présente étude nous avons évalué le profil phénolique dans deux cultivars de mil perlé : cultivar Bechna et cultivar Mekrout. Ensuite nous avons évalué, *in vitro*, le pouvoir antioxydant des extraits obtenus.

Nous avons procédé à une extraction par un mélange MeOH/ActOH/H<sub>2</sub>O des grains de mil de cultivar Bechna avant d'analyser le profil phénolique de l'extrait par HPLC. La teneur totale en polyphénols de l'extrait obtenu a été estimée à 1660 µg EAG / g. Une valeur qui concorde avec celles trouvées dans d'autres études où elles sont comprises entre 1387 à 2580 µg EAG / g (Ragae et al. 2006; Hithamani & Srinivasan 2014). De même que les travaux de Shahidi & Chandrasekara (2013), nous avons observé que les grains du mil perlé contiennent principalement l'acide *p*-coumarique et l'acide férulique. En outre, l'apigénine, un flavonoïde, a été détecté dans les grains du mil perlé (Shahidi & Chandrasekara 2013).

Selon Shahidi & Chandrasekara (2013), les acides phénoliques et les flavonoïdes se trouvent dans différentes parties du grain dont la teneur et la composition en ces molécules varient d'une espèce à l'autre et d'une variété à l'autre. Dans le cas des extractions aqueuses, organiques, ou bien combinées, on trouve surtout les composés phénoliques solubles. Par ailleurs, plusieurs acides hydroxybenzoïques ont été identifiés dans les grains entiers de mil. Ces acides et leurs dérivés sont concentrés dans la fraction soluble des composés phénoliques de mil dans les grains entiers. Les acides hydroxycinnamiques sont rapportés dans les grains du mil, et qui sont généralement concentrés dans la fraction insoluble des composés phénoliques. En plus de ces monomères, des dimères et trimères de férulates possèdent aussi une importante activité antioxydante. Un certain nombre d'études ont rapporté que l'acide férulique, *p*-coumarique, et cinnamique sont les principaux acides phénoliques du mil.

Les flavonoïdes sont une grande famille des polyphénols avec plusieurs structures qui sont souvent recherchés pour leur pouvoir antioxydant. Les proportions des flavonoïdes dans les

polyphénols totaux, varient de 10,4% à 45,56%, or ils sont estimés à 45,56% et 38,26% dans le cultivar Bechna et cultivar Mekrout respectivement lorsque ces derniers ont subi une extraction avec le méthanol, et 34,95 % et 18,43% respectivement pour les extraits aqueux, enfin 10,4% et 13,56% respectivement pour les extrait acétoniques. Aussi, nous avons remarqué la richesse du cultivar Bechna en flavonoïdes lorsqu'il s'agit une extraction avec le méthanol ou l'eau.

Plusieurs flavonoïdes sont rapportés dans les mils. L'apigénine, lutéoline, tricine et kaempférol sont les plus fréquents dans plusieurs types du mil. Des travaux ont rapporté que la lutéoline, flavone, avec ses glycosides ont des effets antioxydants, anti-inflammatoires, chémopréventives, et antiarythmiques (Shahidi & Chandrasekara 2013).

Certains chercheurs suggèrent que les deux-tiers des plantes au monde ont des propriétés médicinales, surtout celles qui ont pouvoir antioxydant important. Les antioxydants réduisent le stress oxydatif cellulaire conférant aux plantes des vertus thérapeutiques contre plusieurs maladies tel le cancer, les maladies cardiométaboliques, et les maladies inflammatoires.

Des études récentes, ont démontré qu'il y a une relation inversée entre la consommation des plantes riches en antioxydants et l'incidence des maladies (Sies 1993).

Plusieurs méthodes ont été développées pour déterminer l'activité antioxydante des plantes. La consistance et la rapidité sont les critères les plus recherchés dans une technique utilisée. Chaque méthode a ses avantages et ses inconvénients, toutefois, il a été trouvé que le test ABTS et le test DPPH sont les méthodes les plus communes et les plus fiables (Krishnaiah et al. 2011).

Dans notre étude, les propriétés antioxydantes des graines de mils ont été évaluées par la méthode DPPH. Dans ce test, le radical DPPH<sup>•</sup> stable est réduit en présence d'un antioxydant ou un donneur d'hydrogène en un composé non-radicalaire, DPPH-H. Nous avons montré que les extraits méthanoliques des graines des deux cultivars du mil sont les plus efficaces avec une  $EC_{50} = 0,1268$  mg/mL, inférieure à celle de BHA ( $EC_{50} = 0,172$  mg/mL) pour le cultivar Bechna. Par contre le cultivar Mekrout a une  $EC_{50} = 0,1811$  légèrement supérieur à celle de BHA, mais qui reste inférieure à celle de la Vitamine C (0,2406 mg/mL). De plus, les extraits méthanoliques et aqueux du cultivar Bechna s'avèrent plus efficaces que les extraits méthanoliques et aqueux du cultivar Mekrout.

Ensuite, la réduction de la couleur de DPPH est surveillée dans le temps. Comparés aux autres extraits, les extraits acétoniques ont montré une forte baisse de l'intensité de la couleur, reflétant une forte activité antioxydante pendant les premières minutes de suivi de la cinétique du pouvoir piègeur du radical DPPH. L'extrait acétonique du cultivar Bechna était plus efficace que l'acide gallique. Cependant, l'intensité de couleur a rapidement diminué en présence de BHA.

Comparés à ceux d'autres céréales, les polyphénols du mil perlé ont montré plus d'efficacité en terme de réactivité (Ragae et al. 2006). Aussi l'acide *p*-coumarique, l'acide phénolique majoritaire dans le mil perlé, a montré un effet préventif contre l'oxydation des LDL *in vivo* (Zang et al. 2000).

---

***LES EFFETS IMMUNO-  
MODULATEURS DE L'EXTRAIT  
POLYPHENOLIQUE ET LIPIDIQUE DU  
MIL, PENNISETUM GLAUCUM,  
CULTIVAR BECHNA***

## II. Les effets immuno-modulateurs de l'extrait polyphénolique et lipidique des grains de mil, *Pennisetum glaucum*, cultivar Bechna

### II.1. La composition en acides gras des grains du mil, cultivar Bechna

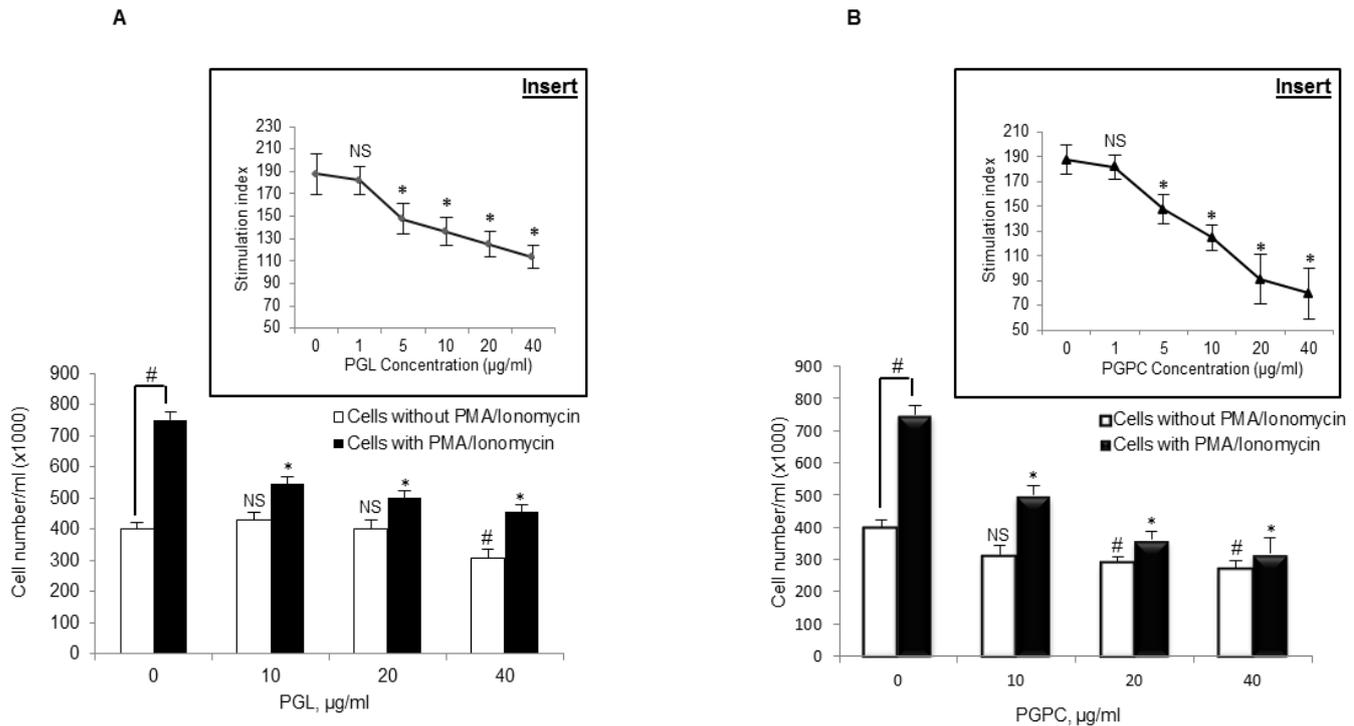
Les lipides totaux ont été estimés à 4,5%. L'acide alpha-linolénique (18: 2n-6) est l'acide gras le plus abondant (44,95%) suivi par l'acide oléique (18: 1 n-9) avec une teneur de 24,88% (tableau 7). La proportion d'acides gras insaturés a été estimée à 72%.

**Tableau 7 : La composition en acides gras des lipides des grains du mil.**

Acides gras		(%) dans les lipides totaux
Acide palmitique	16:0	20.13 ± 0.16
Acide palmitoléique	16:1	0.52 ± 0.04
Acide stéarique	18:0	5.11 ± 0.19
Acide oléique	18:1	24.88 ± 0.19
Acide linoléique	18:2n-6	44.95 ± 0.32
Acide linolénique	18:3n-3	3.03 ± 0.03
Acide arachidique	20:0	0.90 ± 0.02
Acide gonodoïque	20:1	0.25 ± 0.01
Acide béhénique	22:0	0.23 ± 0.01

### II.2. PGPC et PGL diminuent la prolifération des lymphocytes T

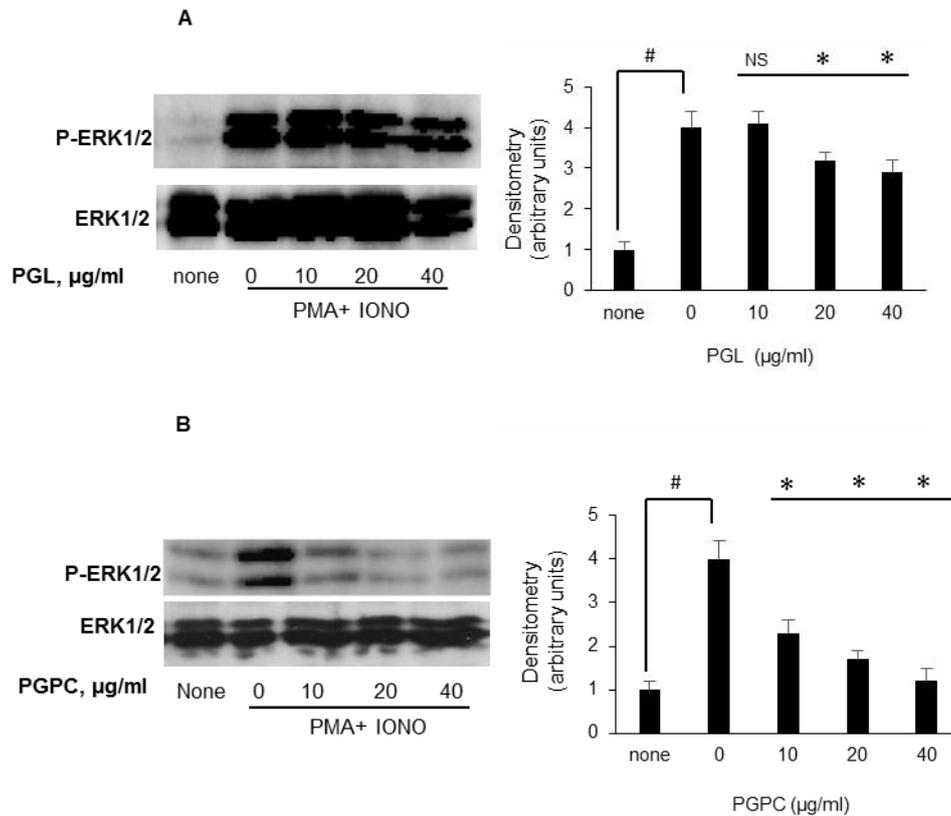
La figure 34 A, montre les effets de l'augmentation de la concentration de l'extrait lipidique (PGL) sur la prolifération des lymphocytes T spléniques en présence ou en l'absence de mitogènes (PMA + Iono). Nous avons observé que PGL jusqu'à la concentration 20 µg/ml n'ont aucun effet significatif sur la prolifération lymphocytaire. Cependant, l'extrait polyphénolique (PGPC) à 20 µg /mL diminue la prolifération basale des cellules T (figure 34 B). Nous avons également observé que les deux extraits PGL et PGPC réduisent, d'une manière dose-dépendante, la prolifération des lymphocytes T induite par PMA + Iono. PGPC exerce un effet inhibiteur plus marquant sur la prolifération des lymphocytes T que PGL.



**Figure 34 : Effets de l'extrait polyphénolique et lipidique sur la prolifération des lymphocytes T spléniques.**

### II.3. PGL et PGPC diminuent l'activation de ERK1 / ERK2 induite par PMA

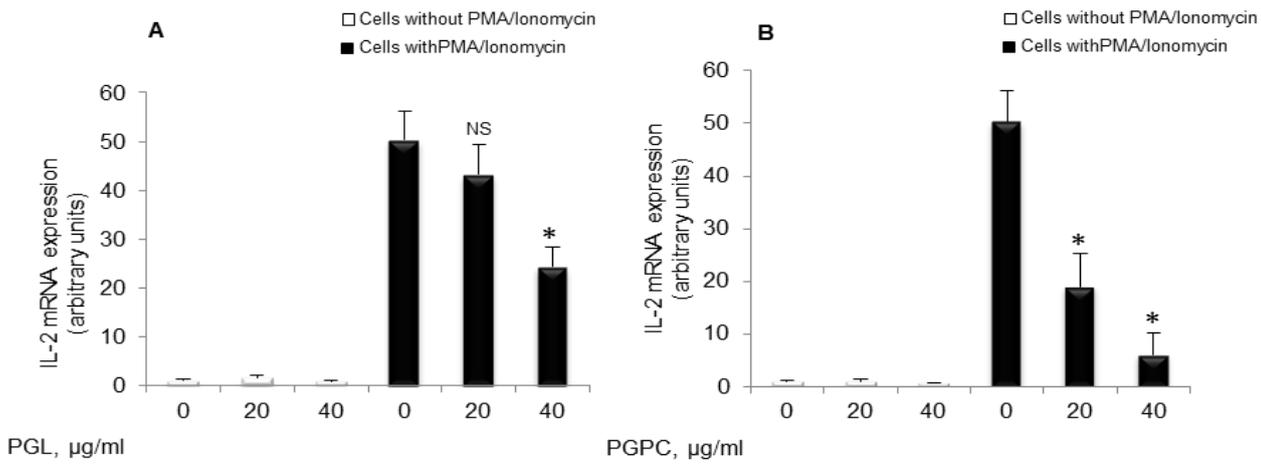
La figure 35, montre que les deux extraits, PGL et PGPC, ont diminué d'une manière dose dépendante la phosphorylation de ERK 1/2 induite par PMA dans les lymphocytes T spléniques. PGPC a complètement bloqué la phosphorylation de la MAP kinase, même à une faible concentration (10 µg / ml) (figure 35B), tandis que les effets de PGL ont été plus faibles que ceux PGPC (figure 35A).



**Figure 35 : Effets de l'extrait polyphénolique et l'extrait lipidique sur la phosphorylation des ERK1/ERK2 des lymphocytes T spléniques stimulés par PMA+Iono.**

#### II.4. PGL et PGPC diminuent l'expression d'IL-2 dans l'ARNm

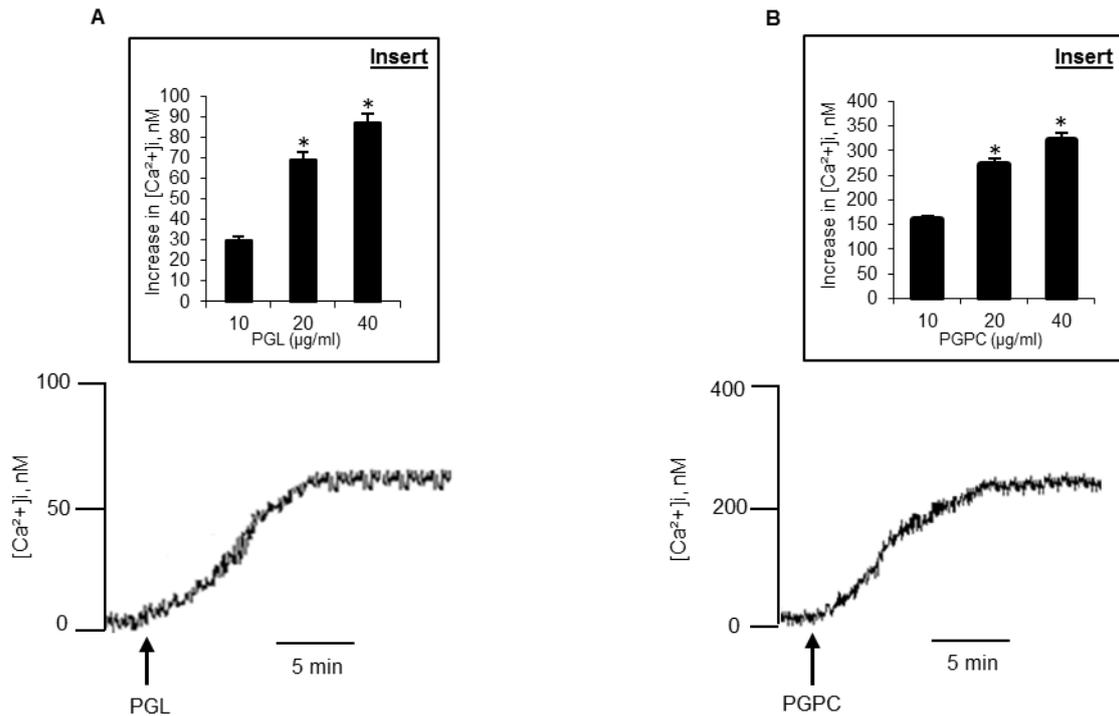
Nos résultats montrent que PGL et PGPC n'ont pas un effet sur l'expression basale de l'ARNm de l'IL-2 dans les cellules T spléniques. Cependant, les deux extraits de PGL et PGPC ont diminué, d'une manière dose dépendante l'expression de l'IL-2 induite par PMA + Iono (figure 36). Comme observé pour la prolifération des lymphocytes T et la phosphorylation ERK1/2, PGPC ont exercé un effet inhibiteur plus important que PGL sur l'expression de l'IL-2 dans l'ARNm.



**Figure 36 : l'extrait polyphénolique et lipidique modulant l'expression génique de l'IL-2.**

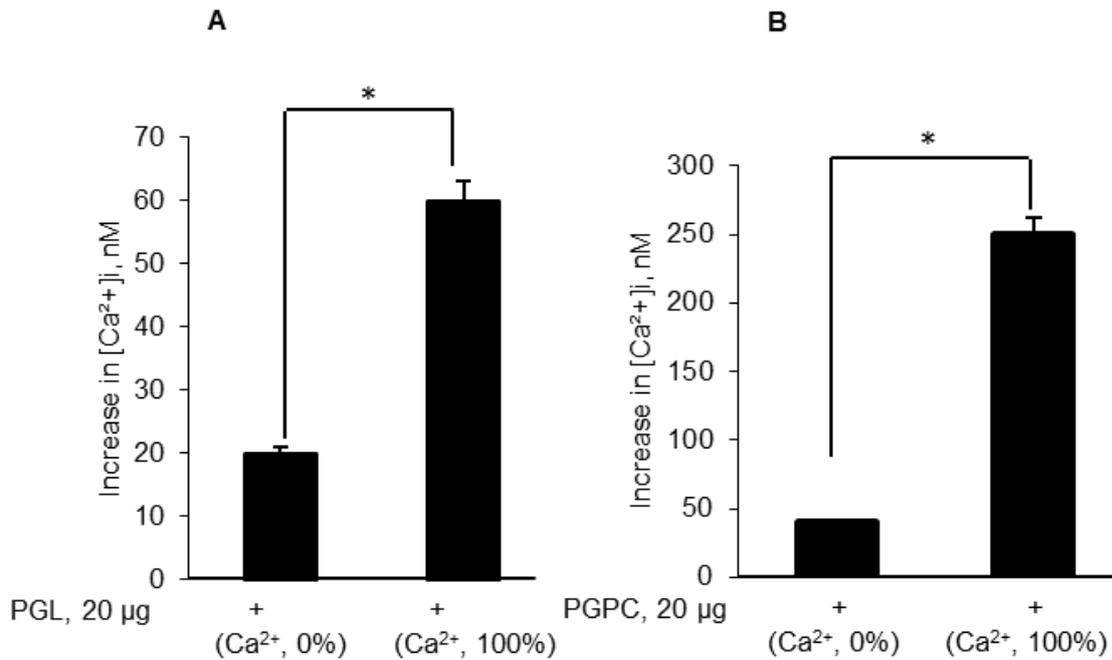
### II.5. PGL et PGPC induisent des augmentations de $[Ca^{2+}]_i$ dans les cellules T spléniques

La figure 37, montre que PGL et PGPC induisent une augmentation dose-dépendante du  $[Ca^{2+}]_i$  dans les cellules T spléniques, cependant, l'augmentation de la  $[Ca^{2+}]_i$  induite par PGPC est significativement supérieure à celle provoquée par PGL.



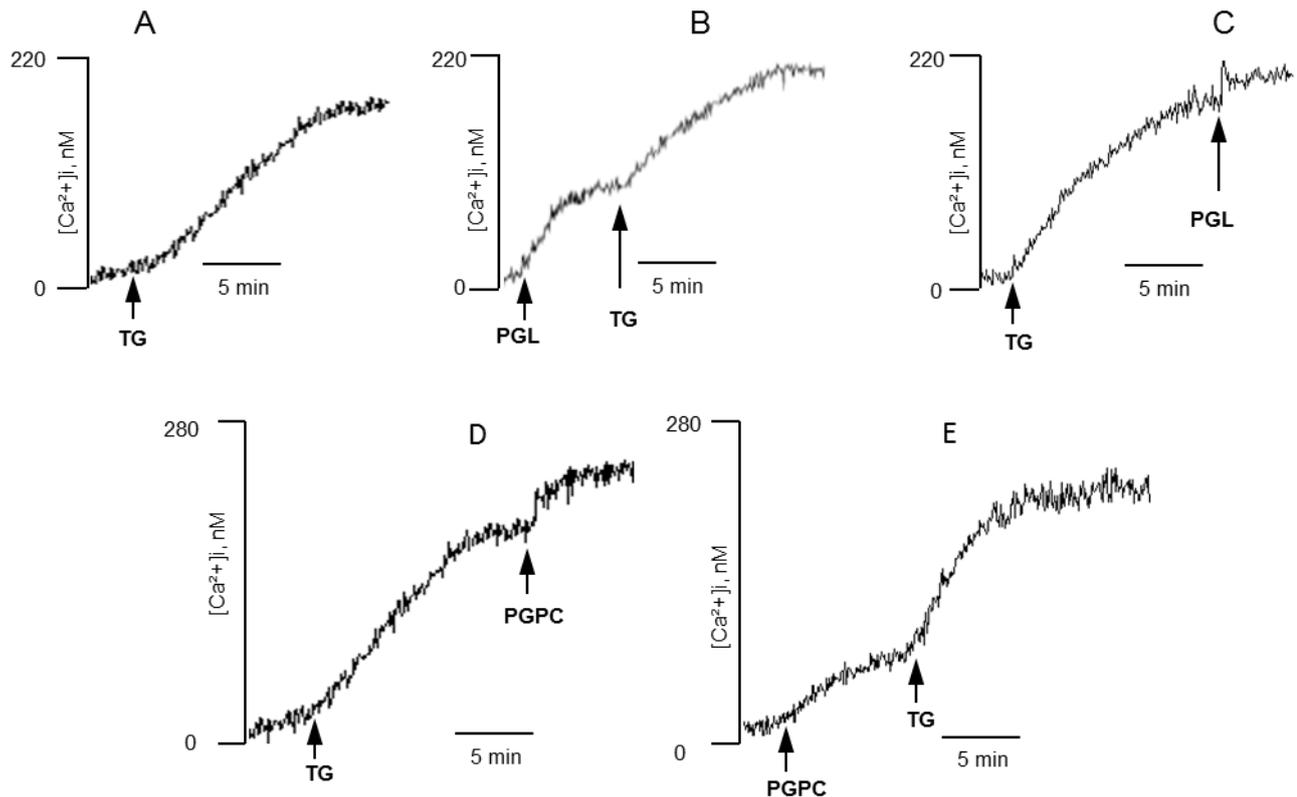
**Figure 37 : La modulation de la signalisation calcique dans les cellules T spléniques par les polyphénols et les lipides du mil.**

Afin d'évaluer l'origine des ions  $\text{Ca}^{2+}$  mobilisés par les lipides et les composés phénoliques, nous avons effectué des expériences en l'absence (0%  $\text{Ca}^{2+}$ ) et en présence (100%  $\text{Ca}^{2+}$ ) de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le milieu extracellulaire. La figure 38, montre que le PGPC et PGL ont induit une augmentation faible et discrète dans  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  dans 0%  $\text{Ca}^{2+}$  milieu par rapport à celle induite par 100%  $\text{Ca}^{2+}$ .



**Figure 38 : La modulation de la signalisation calcique dans les cellules T spléniques par les polyphénols et les lipides du mil en présence et en absence du calcium extracellulaire.**

Comme PGPC et PGL étaient capables d'induire des augmentations de  $[Ca^{2+}]_i$ , même en l'absence de calcium externe, nous avons jugé utile d'examiner la nature des réserves intracellulaires impliquées dans cette augmentation de  $[Ca^{2+}]_i$ . Nous avons utilisé la thapsigargine, connu pour induire une augmentation du  $[Ca^{2+}]_i$  en inhibant  $Ca^{2+}$  ATPase du réticulum endoplasmique (Thastrup et al. 1990; Pan et al. 2012). La figure 41 illustre que la thapsigargine seul a déclenché un pic de calcium, et l'ajout de PGL ou PGPC après thapsigargine ou vice versa a induit des effets additifs sur les augmentations de  $[Ca^{2+}]_i$  dans les cellules T spléniques.



**Figure 39 :** Effets de thapsigargin (TG) sur l'augmentation de la concentration du calcium libre intracellulaire  $[Ca^{2+}]_i$  induite par les polyphénols et les lipides du mil.

## II.5. Discussion

Il a été rapporté que les grains de mil, largement consommés dans de nombreuses régions d'Asie, d'Afrique et d'Amérique latine, ont plusieurs effets sur la santé (Shobana et al. 2010). Parmi les espèces de mils, le mil perlé a été moins étudié. Dans cette étude, nous avons examiné les effets des polyphénols et des lipides, des extraits de mil perlé, sur la prolifération des cellules T. Nous avons également étudié l'implication de calcium et de la voie de MAP kinase dans ce processus.

La plupart des espèces de mil contiennent des composés phénoliques, qui sont détectés dans le péricarpe, le tégument, la couche d'aleurone, et albumen (Dykes & Rooney 2006).

Il est bien établi qu'à l'exception du petit mil (appelé finger millet), les autres espèces de mil ont des teneurs en lipides, allant de 3,5% à 5,2%, en comparaison avec d'autres céréales (Shahidi & Chandrasekara 2013). L'évaluation du profil lipidique du mil, a révélé une teneur moyenne de l'ordre de 4,5% de MS. En effet, Ragaee et al. (2006) ont trouvé que la farine du PM avait la plus forte teneur en lipides (4,2%) par rapport aux farines de blé et d'autres céréales. La teneur élevée en lipides dans les grains du mil pourrait être due à la présence d'embryons dans lesquels les lipides sont concentrés (Daniel et al. 2012).

La composition en acides gras fait apparaître une richesse en acide oléique et acide linoléique à savoir  $25.27 \pm 0.19\%$  et  $46.42 \pm 0.32\%$  respectivement. De même la composition en acides gras fait apparaître une richesse en acide palmitique ( $16.76 \pm 0.16\%$ ).

L'analyse quantitative des résultats de la composition en acides gras de l'huile du mil conduit à deux remarques suivantes :

Les trois acides gras essentiels (acide oléique, linoléique et linoléique) représentent les  $73.97 \pm 0.54\%$ . Une étude faite par Gupta (1980) a prouvé qu'environ 70.3% des lipides libres sont des acides gras insaturés et les triacylglycérols sont les composants majeurs des lipides du mil, le reste ce sont des stérols, des hydrocarbures et des acides gras libres.

Les acides gras mono-insaturés et polyinsaturés représentent par rapport aux acides gras totaux  $23.09 \pm 0.57\%$  et  $48.7 \pm 0.35\%$  respectivement, contre un taux des acides gras saturés estimé à  $25.16 \pm 0.38\%$ .

Les lymphocytes T représentent une composante fondamentale de la réponse immunitaire adaptative. Le test de transformation des lymphocytes est un outil important pour mesurer, *in vitro*, la prolifération des lymphocytes induite par un mitogène (Hamed et al. 2012; Christiansen et al. 2006). Après la stimulation des récepteurs des cellules T (TCR), l'un des premiers événements dans l'activation des lymphocytes T est la phosphorylation de la tyrosine kinases et la génération de l'inositol 1,4,5-triphosphate (IP3), conduisant à la libération et l'afflux de  $Ca^{2+}$  et l'augmentation de la concentration de  $Ca^{2+}$  cytoplasmique (Donnadieu et al. 1992). L'augmentation de  $[Ca^{2+}]_i$  via l'activation de la calcineurine induit l'expression génique de IL-2 (Negulescu et al. 1994). À notre connaissance, la présente étude est la première évaluant les effets immunomodulateurs des polyphénols et des lipides des grains du mil. L'extrait polyphénolique est riche en acide *p*-coumarique et l'acide férulique. Il a été rapporté que l'acide *p*-coumarique exerce des effets anticancéreux (Hudson et al. 2000), anti-mutagènes (Ferguson et al. 2003), et des activités anti-inflammatoires (Luceri et al. 2004).

PGPC a fortement inhibé la prolifération des lymphocytes T et l'expression de l'IL-2 dans l'ARNm. D'autres travaux ont également démontré que les polyphénols inhibent la prolifération et la production d'IL-2 dans les lymphocytes humains (Abdoul-Azize et al. 2013; Atluru et al. 1991; Devi & Das 1993). Gao et al. (2001) ont rapporté que le resvératrole, un stilbène, a inhibé la prolifération et la production de l'IL-2 et l'interféron (IFN)  $\gamma$  par les lymphocytes spléniques. Kaempférol, un flavonoïde, a pu réduire l'IFN- $\gamma$  et IL-2 par les lymphocytes T murins (Okamoto et al. 2002). Curcumine, qui donne lieu principalement à l'acide férulique et de la vanilline, a également inhibé la prolifération des lymphocytes T spléniques induite par l'IL-2 (Wang et al. 1997).

PGL aussi, dans une moindre mesure que PGPC, inhibe la prolifération des lymphocytes T. Dans PGL, n-3: n-6 ratio a été estimé à 1:14 qui est très proche du ratio recommandé (1:10), rapporté par Ma et al. (2015). L'effet inhibiteur de l'extrait lipidique peut être attribué à l'acide linoléique, un acide gras n-6. L'acide linoléique (18: 2n-6), qui représente 44,95% des acides gras totaux PGL, pourrait être impliqué dans une immunosuppression des lymphocytes T. En effet, Liu et al. (2003) ont rapporté que l'acide linoléique, a inhibé l'expression de l'IL-2 d'ARNm et, par conséquent, la prolifération des lymphocytes. Une autre étude a montré que l'acide linoléique est un puissant inducteur de la mort cellulaire dans les lymphocytes du sang périphérique humain. Le mécanisme d'action de l'acide linoléique sur l'apoptose des cellules implique des modifications du potentiel transmembranaire de mitochondrie et la production de ROS (Cury-Boaventura et al. 2006). De même, l'acide linoléique (18: 2n-3) pourrait avoir un effet immunosuppresseur des lymphocytes T. En effet, Denys et al. (2005) ont démontré que les acides gras n-3 inhibent la translocation nucléaire de NF- $\kappa$ B et par conséquent l'expression de l'IL-2 induite par PMA dans les cellules T humaines. L'effet inhibiteur du PGPC et PGL sur la prolifération des lymphocytes T pourrait être médié par leur capacité à réduire l'expression de l'IL-2 dans l'ARNm. En fait, la transition des lymphocytes T durant la phase S du cycle cellulaire est associée avec l'expression de l'IL-2 dans l'ARNm. Les cellules T progressent dans leur cycle suite à leur activation de façon autocrine par l'IL-2. En outre, l'inhibition de la production d'IL-2 est associée à un arrêt du cycle cellulaire (Crabtree 1999).

Une fois activées, les mitogen-activated protein kinases (MAP kinases), y compris extracellular signal-regulated kinase-1/2 (ERK1/ERK2) phosphorylent des facteurs de transcription, régularisant l'expression de plusieurs gènes, tels ceux responsables sur la synthèse d'IL-2 (Nel et al. 1990; Cantrell 1996). PGL et PGPC ont diminué d'une manière dose-dépendante la phosphorylation de ERK1 / ERK2 induite par PMA dans les cellules T

spléniques; cependant, l'effet inhibiteur de PGPC était plus prononcé. Nos résultats sont en accord avec ceux de Neuhaus et al. (2004) qui ont démontré que la phosphorylation de ERK1 / ERK2 a été inhibée par l'épigallocatechine-3 gallate (EGCG). De plus, le traitement des cellules ECV304 avec de l'acide férulique, un acide phénolique majeur dans le mil, a inhibé à la fois la prolifération cellulaire et la phosphorylation de ERK1 / ERK2 (Hou et al. 2004). En outre, les teneurs en lipides dans les grains du mil pourraient être responsables de l'inhibition de la phosphorylation de MAPK tel qu'il a été rapporté précédemment (Denys et al. 2005).

Nous avons examiné les actions de PGL et PGPC sur les augmentations de  $[Ca^{2+}]_i$  dans les cellules T. En présence de 100%  $Ca^{2+}$ , PGPC et PGL induisent de fortes augmentations de  $[Ca^{2+}]_i$ , ce qui suggère que  $Ca^{2+}$  joue un rôle majeur dans l'augmentation de  $[Ca^{2+}]_i$  induit par des extraits testés. L'étude de la cinétique de la mobilisation du  $Ca^{2+}$  induite par PGL et PGPC a montré que ces composés ont produit une augmentation maintenue de  $[Ca^{2+}]_i$ . Nous avons également noté que PGPC induit des augmentations plus importantes en  $Ca^{2+}$  (environ 6 fois), par rapport à PGL. Ces augmentations en  $[Ca^{2+}]_i$  sont corrélées avec les effets immunosuppresseurs des extraits du mil, comme il a été démontré pour les composés phénoliques des grains du figuier de barbarie (Aires et al. 2004).

Pour déterminer la nature des pools calciques intracellulaires mobilisés par les lipides et les composés phénoliques, la thapsigargine, un inhibiteur de  $Ca^{2+}$  ATPase du réticulum endoplasmique (Thastrup et al. 1990), a été employé. L'ajout de thapsigargine au cours des pics de  $Ca^{2+}$  induit par PGL ou PGPC, et vice versa, induit une augmentation de  $[Ca^{2+}]_i$  ce qui suggère que PGL et PGPC ne semblent pas agir sur  $Ca^{2+}$  ATPase.

Enfin, nous pouvons dire que les polyphénols et les lipides de mil exercent un effet immunosuppresseur, bien que les polyphénols semblent être plus actifs que les lipides. Les mécanismes impliqués dans l'activité immunosuppressive de ces extraits sont médiés par: 1) une augmentation du  $Ca^{2+}$  intracellulaire et 2) une inhibition de l'expression de IL-2 et la phosphorylation de ERK1/2 MAP kinase. Nos résultats plaident pour l'utilisation des régimes alimentaires à base de mil pour le traitement des maladies associées avec une hyperactivation du système immunitaire telles que les maladies auto-immunes.

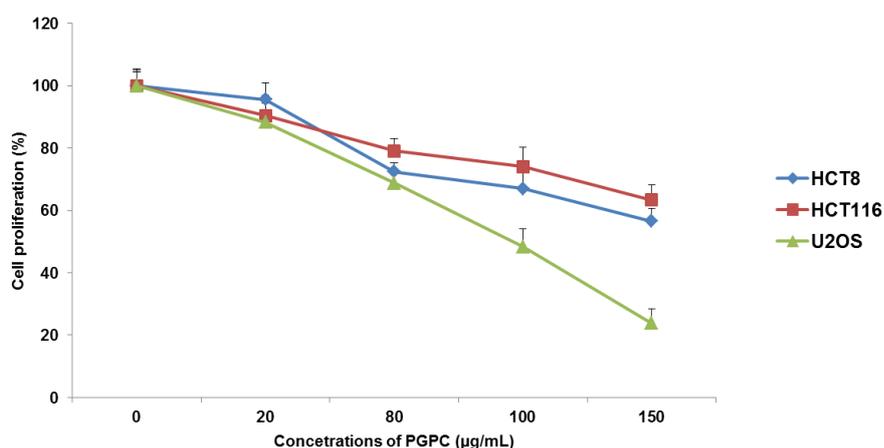
---

***EFFET ANTICANCEREUX DE  
L'EXTRAIT POLYPHENOLIQUE DES  
GRAINS DE MIL, PENNISETUM  
GLAUCUM, CULTIVAR BECHNA***

### III. Effet anticancéreux de l'extrait polyphénolique des grains de mil, *Pennisetum glaucum*, cultivar Bechna

#### III.1. Viabilité cellulaire

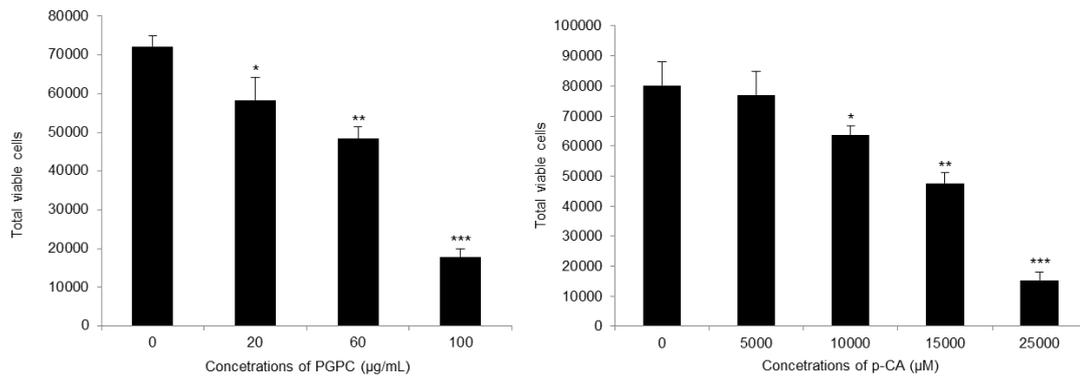
Le bleu de trypan a été utilisé afin d'évaluer l'effet cytotoxique de PGPC envers deux lignées de cellules cancéreuses du colon (HCT116 et HCT8) et une lignée humaine d'ostéosarcome (U2OS). Après 24 heures de traitement, les résultats obtenus ont montré que l'extrait a exercé un effet toxique plus marquant sur les cellules U2OS avec une concentration inhibitrice « EC<sub>50</sub> » de 80 µg/mL (figure 40).



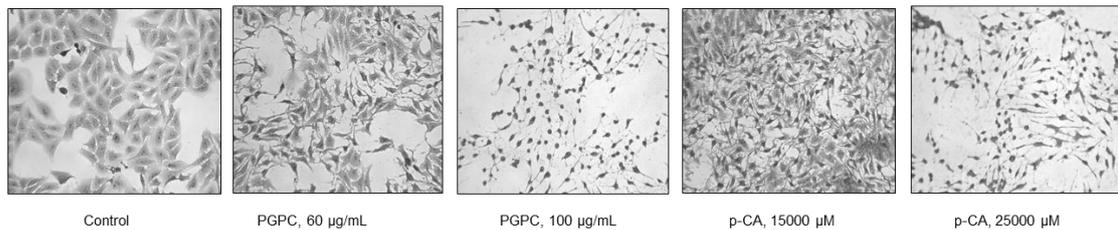
**Figure 40 : Effets des polyphénols de mil sur la viabilité des cellules cancéreuses.**

De ce fait, nous avons choisi d'étudier l'effet de notre extrait polyphénolique (PGPC) et l'acide p-coumarique (p-CA), l'acide phénolique majoritaire dans les grains de mil, sur les cellules d'ostéosarcome qui se révèlent les plus sensibles au traitement. Nous avons constaté que PGPC et p-CA ont significativement réduit la viabilité des cellules cancéreuses U2OS d'une manière dose dépendante (figure 41). L'IC<sub>50</sub> a été estimée à 80 µg/mL pour PGPC et environ 17000 µM pour p-CA. Par ailleurs, le p-CA à 25 000 µM a induit plus de 80% de mort cellulaire. Cependant, la concentration de 100 µg/mL de PGPC a induit 75% de mort cellulaire. Par conséquent, nous avons choisi des doses moins toxiques de PGPC (à savoir 60 µg/mL et 75 µg/mL) et de p-CA (12 500 µM) pour toutes les expériences suivantes.

A



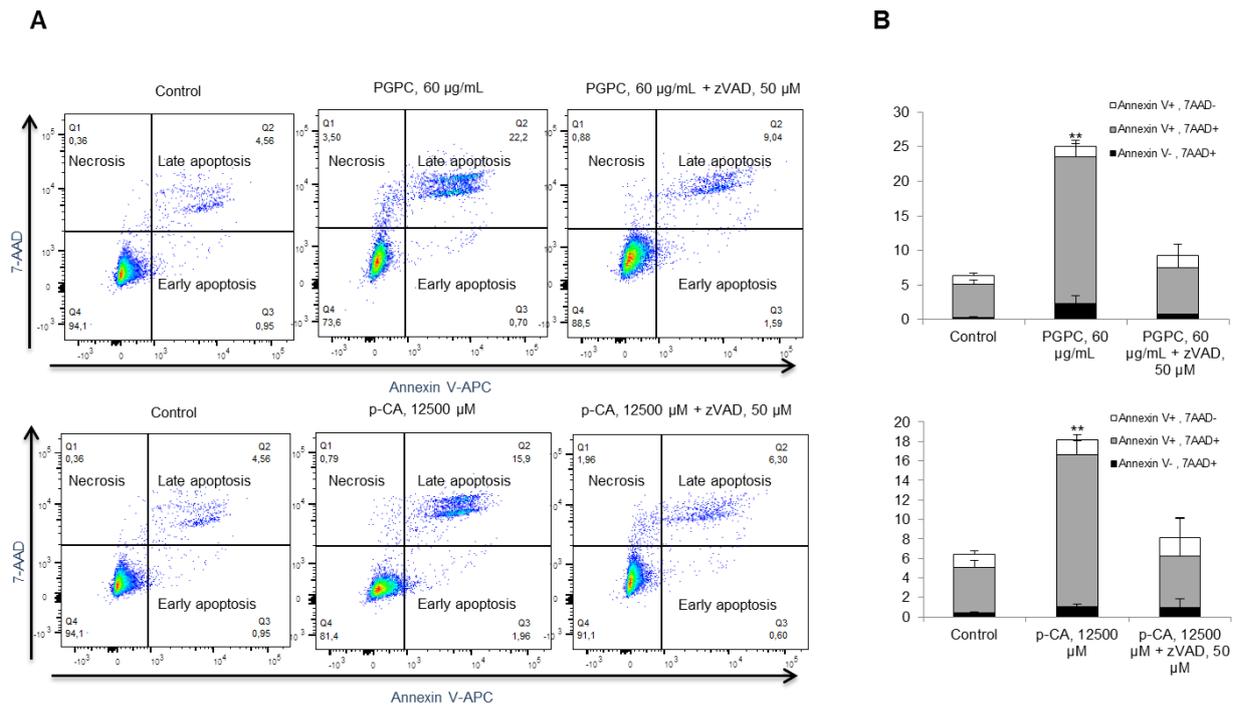
B



**Figure 41 : Effets des polyphénols du mil et l'acide *p*-coumarique sur la prolifération des cellules d'ostéosarcome U2OS.**

### III.2. Induction de l'apoptose par PGPC et p-CA

Nous avons utilisé le marquage Annexin-V/7-AAD pour étudier la mort cellulaire induite par PGPC et p-CA. Nos résultats ont démontré que PGPC et, dans une moindre mesure, le p-CA ont induit la mort cellulaire principalement par apoptose qui a été confirmée par une diminution significative de la mort cellulaire lorsque les cellules ont été co-traitées avec z-VAD-fmk, un inhibiteur des caspases (Figure 42).



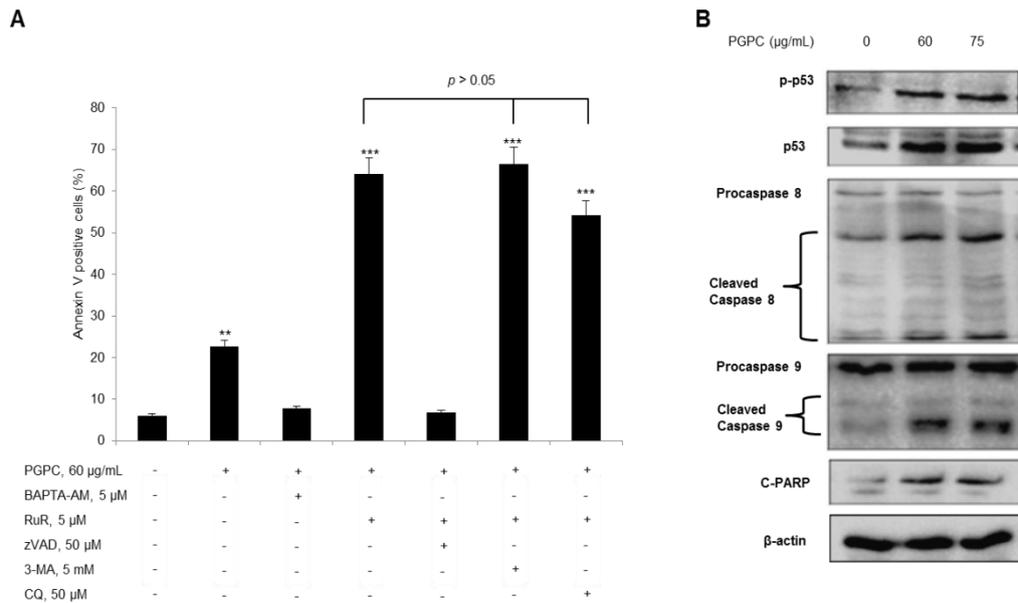
**Figure 42 : Effets apoptotiques des polyphénols du mil et l'acide *p*-coumarique sur les cellules d'ostéosarcome U2OS.**

Nous avons exploré davantage l'implication du calcium dans l'apoptose induite par PGPC. À cet égard, les cellules U2OS ont été traitées avec PGPC (60 µg/mL) en présence de BAPTA-AM, un chélateur de calcium cytoplasmique, à 5 µM ou le rouge de ruthénium (RuR), un inhibiteur de l'absorption du  $\text{Ca}^{2+}$  par la mitochondrie, à 5 µM.

Comme attendu, nous avons observé que le co-traitement avec BAPTA-AM a prévenu la mort cellulaire induite par PGPC. Par contre, RuR a potentialisé la mort cellulaire induite par PGPC ; 64% des cellules étaient Annexin V positives (figure 44A).

Comme l'inhibition de la protéine uniport mitochondrial a accentué la mort cellulaire induite par PGPC, dans l'expérience suivante, des cellules U2OS pré-incubées avec RuR ont été co-traitées avec z-VAD-fmk ou avec les inhibiteurs de l'autophagie ; 3-Méthyladenine (3-MA) et la chloroquine (CQ).

Encore une fois z-VAD-fmk a atténué la mort cellulaire causée par le co-traitement avec RuR, mais 3-MA et CQ ont échoué dans la prévention de la mort cellulaire observée (figure 43A).

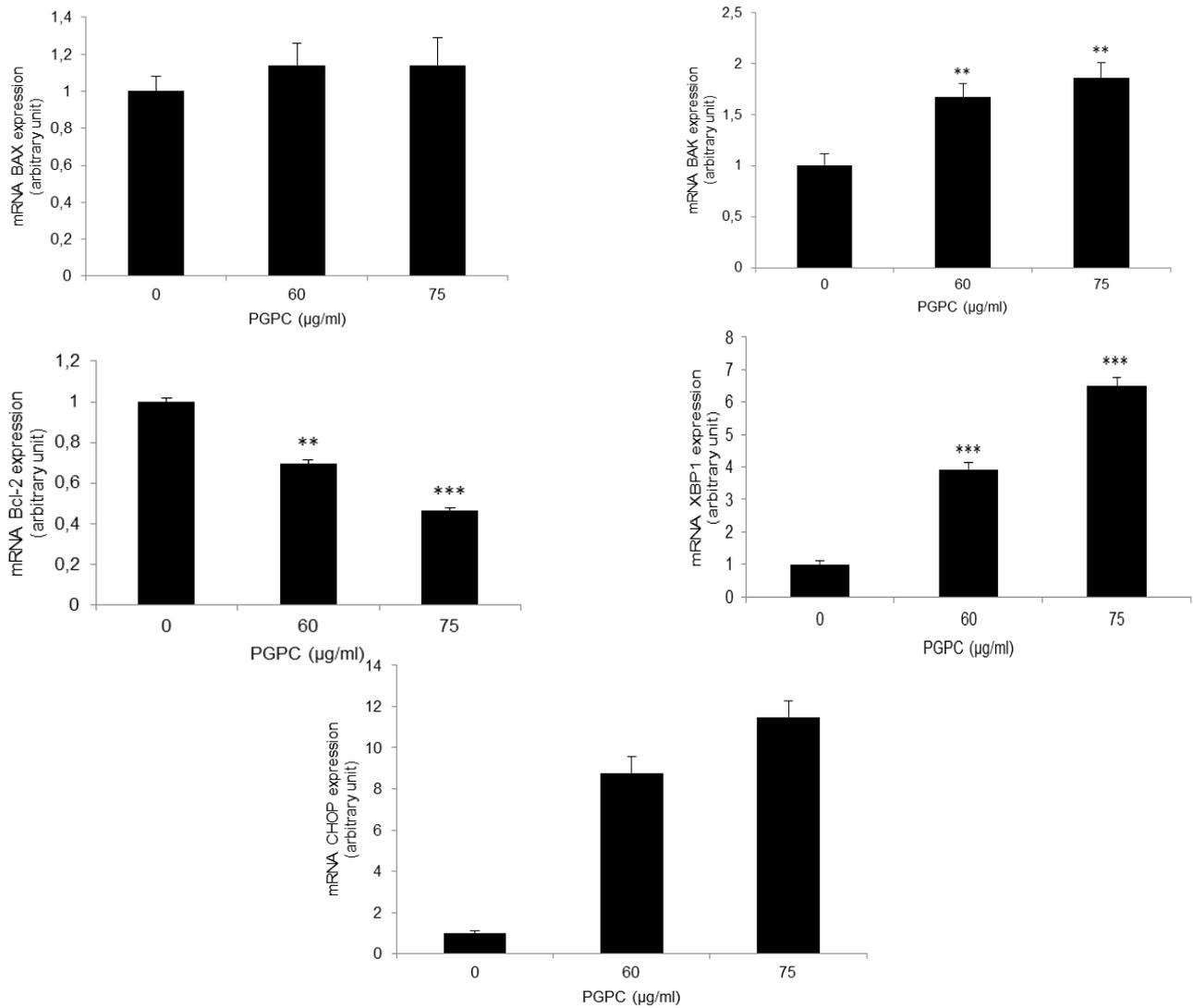


**Figure 43 : Implication du calcium dans l’apoptose induite par les polyphénols du mil sur les cellules d’ostéosarcome U2OS.**

### III.3. Détection des protéines apoptotiques

La Figure 43B, montre que le traitement des cellules U2OS avec PGPC a induit la phosphorylation de la protéine p53 dans ces cellules. Ainsi, PGPC ont induit l'activation de la caspase-8 et la caspase-9. Cette dernière constitue un substrat pour la p53. En effet, PGPC a déclenché le clivage de la pro-caspase-8 et la pro-caspase-9 à leurs fragments actifs. En outre, PGPC a induit le clivage de la PARP, un substrat en aval de la caspase-8 et caspase-9.

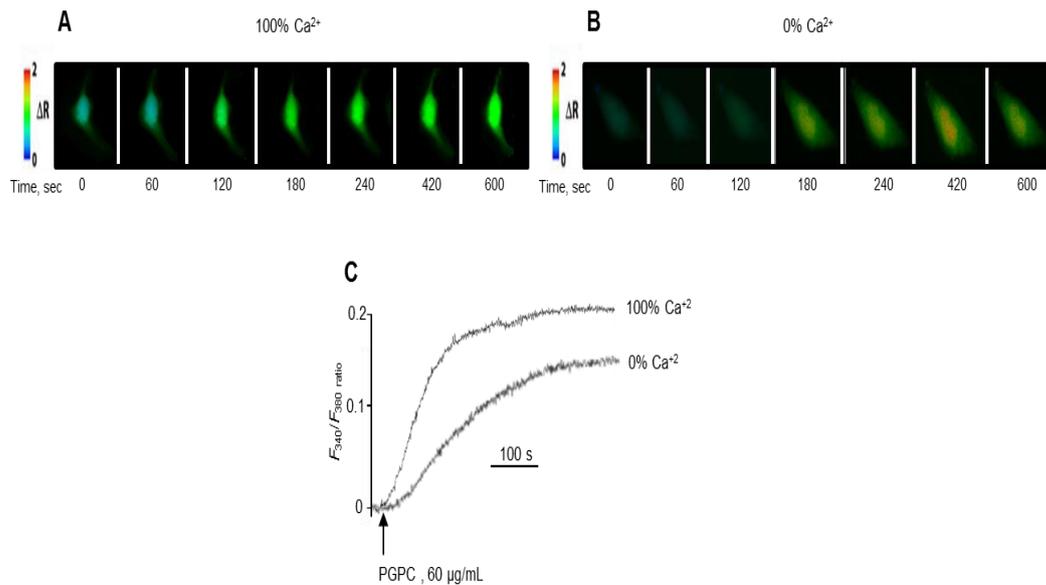
L’activation des protéines pro-apoptotiques XBP1, BAX/BAK, et CHOP, et l’inactivation de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 jouent un rôle très important dans les situations de stress prolongé du réticulum. Les résultats de PCR ont montré que le traitement avec PGPC a augmenté la transcription de XBP1, BAX/BAK, et CHOP associé avec une baisse transcriptionnelle de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 dans les cellules cancéreuses U2OS (figure 44).



**Figure 44: Effets des polyphénols de mil sur l'expression des protéines apoptiques**

### III.4. Effet du PGPC sur l'augmentation du $Ca^{2+}$ intracellulaire dans les cellules U2OS

PGPC a induit une augmentation du  $[Ca^{2+}]_i$  dans les cellules U2OS. Afin d'évaluer l'origine des ions  $Ca^{2+}$  mobilisés par les composés phénoliques, nous avons effectué des expériences en absence (0%) et en présence (100%) de  $Ca^{2+}$  dans le milieu extracellulaire. La figure 45, montre que PGPC ont induit des augmentations significatives de  $[Ca^{2+}]_i$  dans le milieu 0% et le milieu 100% calcium extracellulaire, ce qui suggère que PGPC induisent un influx calcique et mobilise le calcium à partir des réserves intracellulaires.

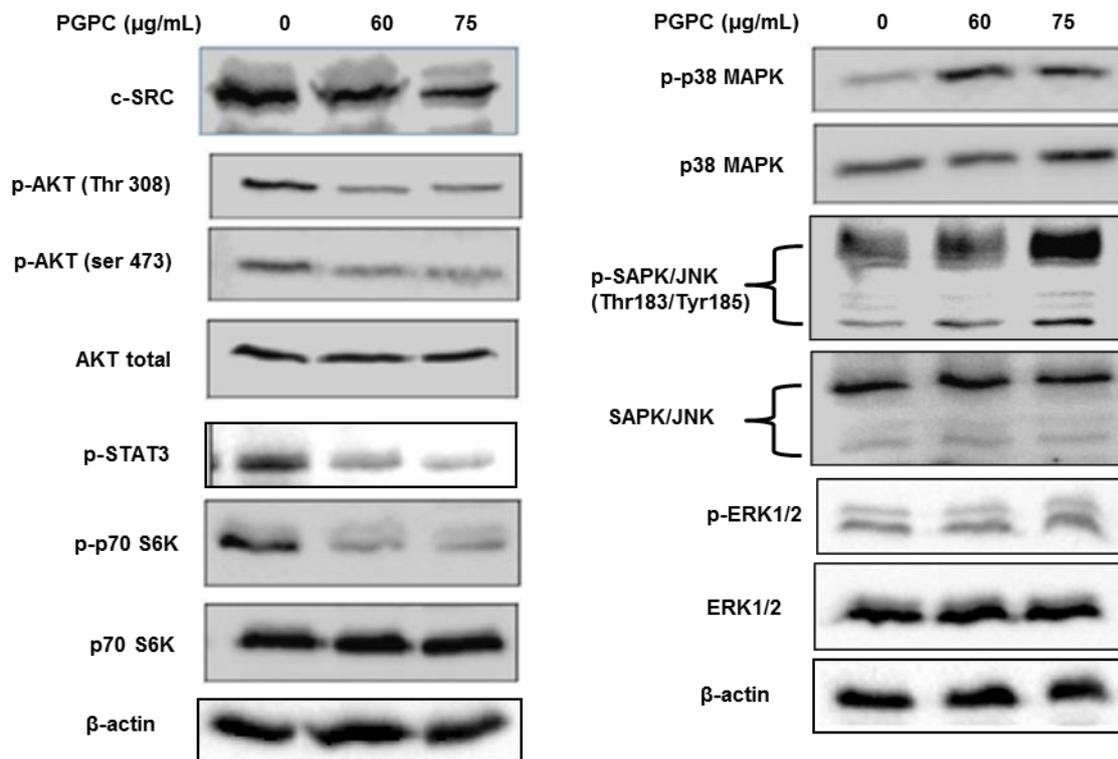


**Figure 45 : Modulation de la signalisation calcique par les polyphénols du mil dans les cellules U2OS.**

### III.5. Effet de PGPC sur les voies de signalisation impliquées dans la prolifération des cellules U2OS

L'activation des protéines de la survie cellulaire AKT, et la protéine antiapoptotique Bcl-2 jouent un rôle très important dans la progression de la prolifération des cellules cancéreuses.

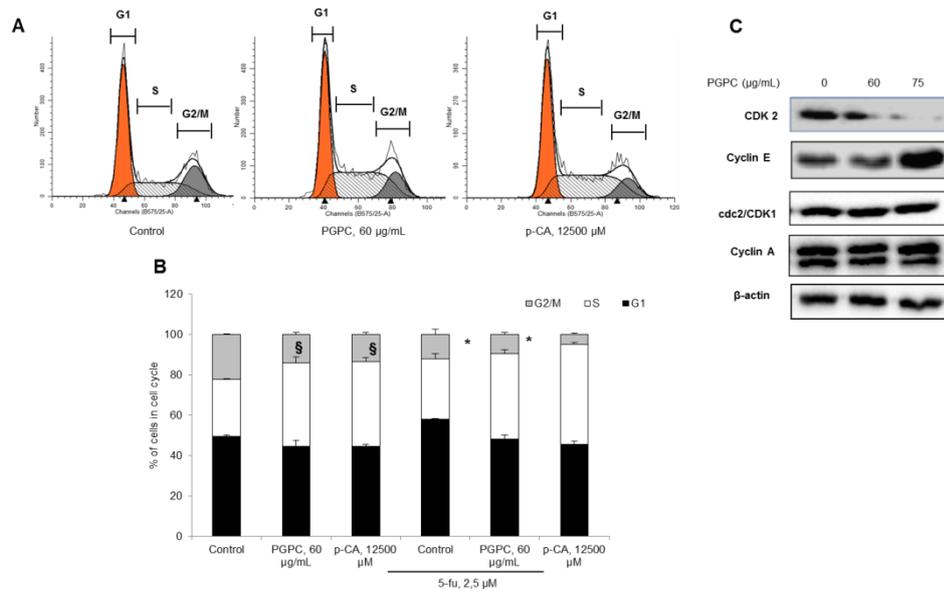
Nous avons évalué l'effet de PGPC sur l'activation de la protéine oncogène "AKT" dans les cellules d'ostéosarcome U2OS. Le traitement avec PGPC a entraîné une diminution significative de la phosphorylation de l'AKT dans les résidus Thr308 et Ser473 qui ont été associés à une diminution de la proto-oncogène tyrosine kinase (c-Src), un substrat en amont de l'AKT. En ce qui concerne les substrats en aval AKT, le traitement PGPC a négativement régulé la phosphorylation de P70 S6K et STAT3. En plus d'une augmentation significative de la phosphorylation de p38, SAPK / JNK est également phosphorylée en réponse au traitement PGPC. Cependant, PGPC n'ont pas affecté l'activation de ERK1/2 MAPK (Figure 46).



**Figure 46 : Effets des polyphénols du mil sur la voie de MAPK et AKT dans les cellules U2OS.**

### III.6. Analyse de la distribution du cycle cellulaire

Nous avons analysé l'effet de PGPC sur la progression du cycle cellulaire en utilisant l'iodure de propidium. Nous avons observé que PGPC (60 µg/mL) et dans une grande mesure le p-CA (12 500 µM) induisent l'arrêt du cycle cellulaire des cellules d'ostéosarcome (U2OS) dans la phase S (figure47A). Comme le montre la Figure 47B, la répartition des populations de cellules entre les différentes phases du cycle cellulaire était la suivante: 49,53% en G1, 28,37% en S et 22,09% en G2/M. L'extrait polyphénolique (PGPC, 60 µg/mL) a augmenté la population de la phase S à 41,37% et p-CA à 42,18%. Une faible concentration de 5-fu, 2,5 µM, a induit un arrêt du cycle cellulaire en phase G1. Cependant le co-traitement du 5-fu avec PGPC ou p-CA induit l'arrêt du cycle cellulaire dans la phase S avec une diminution significative de la phase G2/M.



**Figure 47 : Effets des polyphénols sur la progression du cycle cellulaire des cellules U2OS.**

### III.7. Cyclines et CDK analyse d'expression

Les résultats de western blot ont montré que le traitement avec PGPC a induit une diminution significative de la kinase dépendante des cyclines 2 (CDK2), associée d'une augmentation de la cycline E par rapport aux cellules non traitées. Cependant, aucun effet n'a été observé sur l'expression de la kinase dépendante des cyclines cdc2 / CDK1, ni sur celle de la cycline A dans des cellules U2OS (Figure 47C).

### III.8. Discussion

La consommation des aliments riches en polyphénols a été corrélée avec une faible incidence de cancer. Par ailleurs, plusieurs composés phénoliques ont été proposés comme agents potentiels anti-cancéreux seuls ou adjuvants à la chimiothérapie classique (León-González et al. 2015). Les polyphénols alimentaires exercent leur activité anticancéreuse par plusieurs mécanismes. De plus, en fonction du tissu ou du type cellulaire, les effets des polyphénols pourraient être différents s'ils sont utilisés à des faibles ou bien à des fortes concentrations (Ramos 2008).

Notre objectif est d'étudier les effets des composés phénoliques du *Pennisetum glaucum* (PGPC) sur les cellules d'ostéosarcome humaines (U2OS) *in vitro*.

Nous avons précédemment montré, que le p-CA est le composé phénolique le plus abondant dans *Pennisetum glaucum*. Nos résultats indiquent que PGPC et, dans une moindre mesure, le p-CA induisent de façon dose-dépendante la mort des cellules d'ostéosarcome (U2OS) avec une EC50 d'environ 80 µg/mL et 17 000 µM, respectivement. Ensuite, nous avons investigué le type de mort cellulaire induite par PGPC et p-CA. Le marquage avec Annexine V/7-AAD a révélé que PGPC et p-CA ont induit une mort cellulaire principalement par apoptose ce qui a été confirmé par une diminution de cette mort lorsque les cellules sont co-traitées avec z-VAD-fmk. Les polyphénols d'origine alimentaires ainsi que les composés phénoliques purifiés ont été largement étudiés pour leurs effet apoptotiques (Mouria et al. 2002; Jaganathan et al. 2013; Darvin et al. 2015; Moore et al. 2016). Il a été démontré que les polyphénols du sorgho, une céréale largement consommée à côté du mil dans de nombreux pays, ont exercé des activités apoptotiques sur les cellules du cancer colorectale humaines ; HCT-15 et HCT-116 (Darvin et al. 2015). Aussi, il a été rapporté que l'acide p-coumarique a des effets apoptotiques sur les cellules cancéreuses du côlon, HCT-15 (Jaganathan et al. 2013).

Le calcium est connu pour son rôle crucial dans l'apoptose (Nicotera & Orrenius 1998). Dans l'expérience ultérieure, les cellules U2OS ont été pré-incubées avec BAPTA-AM (5 µM) ou avec RuR (5 µM) pendant 1 h, puis traitées avec PGPC pendant 24 h. Le co-traitement avec BAPTA-AM a significativement réduit la mort cellulaire induite par PGPC, mais RuR a intensifié la mort cellulaire induite par PGPC. L'apoptose est le principal type de mort cellulaire qui se produit en réponse à des dommages à l'ADN irréparable. D'autre part, le blocage de l'apoptose classique peut promouvoir d'autres voies de la mort cellulaire programmée, tels l'autophagie ou la nécroptose, bien que la frontière entre l'apoptose et l'autophagie n'a jamais été tout à fait claire (Goodall et al. 2016; Lockshin & Zakeri 2004; Ouyang et al. 2012).

Pour voir s'il y avait un passage à l'autophagie lorsque l'absorption de calcium mitochondrial a été inhibée, les cellules ont été pré-incubées avec RuR (5 µM), puis co-traitées avec z-VAD-fmk (50 µM) ou 3-MA (5 mM) ou de CQ (50 µM). Les résultats ont montré que z-VAD-fmk a atténué la mort cellulaire induite par le co-traitement avec RuR. En revanche, on n'a pas remarqué un effet préventif de 3-MA et CQ sur la mort cellulaire induite par le co-traitement

avec RuR. Ces résultats suggèrent que l'inhibition de l'apoptose dépendante à la voie mitochondriale pourrait accentuer une voie alternative d'apoptose indépendante à la voie mitochondriale plutôt que d'induire l'autophagie.

La voie extrinsèque des récepteurs à domaines de mort (Fas, TNF), et la voie intrinsèque (ou voie mitochondriale) sont les deux voies les plus décrites de la machinerie de l'apoptose (Eum & Lee 2011). Dans la plupart des cancers humains la p53, une protéine suppresseur de tumeur, est mutée ou sa voie est inactivée (Vogelstein et al. 2000). La p53 est impliquée dans l'apoptose dépendante des caspases induite par de nombreux stimuli, y compris les polyphénols, en déclenchant l'apoptose par l'activation des caspases initiatrices (caspase-8 et caspase-9) (Torkin et al. 2005; Hajiaghaalipour et al. 2015). Dans la présente étude, les résultats de western blot ont montré que le traitement PGPC a amélioré l'expression de p53 associée d'une activation à la fois la caspase-8 et caspase-9. En effet, la PARP, un substrat en aval de la caspase-8 et la caspase-9, a également été clivé en réponse au traitement PGPC. Ces résultats suggèrent que PGPC induisent une caspase-dépendante, médiée par p53 dans les cellules d'ostéosarcome U2OS.

Une nouvelle voie intrinsèque de l'apoptose a été décrite impliquant le réticulum endoplasmique (RE) (Rodriguez et al. 2011; Li et al. 2014). Le RE est le compartiment intracellulaire dans lequel les protéines natives subissent leur maturation. Un processus de contrôle de la qualité de repliement et de conformation des protéines nouvellement synthétisées assure leurs destinations finales. Les protéines sont conduites soit vers l'appareil de Golgi pour être secrétées, soit vers la dégradation en cas de mauvaise conformation. Dans certaines conditions physiologiques et physiopathologiques tel le stress de RE, des protéines anormalement conformées s'accumulent dans le RE, ce qui entraîne une réponse adaptative nommée *unfolded protein response* (UPR) dans le but de supprimer ce stress (Foufelle & Ferré 2007). Toutefois, un stress prolongé peut induire une apoptose impliquant une dérégulation de l'homéostasie calcique, un épissage de l'ARNm XBP1, une phosphorylation -inactivatrice- de eIF2 $\alpha$  et augmentation de l'expression CHOP (Minville-Walz 2012). Il a été reporté que l'UPR active aussi les voies de mort cellulaire par autophagie (Zinszner et al. 1998).

La réponse UPR est constituée de trois voies de signalisation impliquant trois protéines transmembranaires : la protéine kinase PERK (Protein kinase RNA (PKR)-like Endoplasmic Reticulum Kinase), le facteur de transcription ATF6 (Activated Transcription Factor 6) et l'IRE1 (Inositol Requiring Enzyme 1). Ce dernier représente le bras le plus conservé de

l'UPR. IRE1 pouvant s'associer avec TRAF2 (TNF-ReceptorAssociated Factor) et qui en se liant sur le domaine cytoplasmique du récepteur du TNF va activer la voie pro-apoptotique des JNK kinases (Urano et al. 2000). De plus, IRE1, *via* l'induction de la voie IRE1/TRAF2/JNK, semble jouer un rôle crucial dans la survie cellulaire par l'induction d'autophagie. JNK pourrait également inhiber la voie mTOR (mammalian *target of rapamycin*) qui, à l'inverse d'IRE1, inhibe la formation d'autophagosomes (Ding et al. 2007). Cependant, le rôle d'IRE1 dans l'autophagie n'est pas exclusif puisque dans certains cas particulier (polyglutamination), la voie PERK/eIF2a peut également induire la formation d'autophagosomes (Kouroku et al. 2007). Concernant la voie de PERK, elle est la première qui se met en place pour ralentir momentanément la synthèse protéique afin d'éviter un afflux supplémentaire de protéines dans le RE (Foufelle & Ferré 2007). La protéine PERK ainsi activée phosphoryle la sous-unité  $\alpha$  du facteur d'initiation de la traduction eIF-2 (*eukaryotic translation initiation factor 2*) (Harding et al. 1999). L'activation de la voie PERK/eIF2a. C'est le cas de l'ARNm codant le facteur de transcription ATF4. Ce dernier est impliqué dans l'activation de la voie apoptotique en induisant l'expression de la protéine CHOP (*CEBP homologous protein*) (Foufelle & Ferré 2007). Lors d'un UPR, ATF6 va migrer vers l'appareil de Golgi où il est clivé en sa forme active. Il va ensuite aller au noyau et induire la transcription des gènes des chaperonnes du RE ainsi que les facteurs de transcription CHOP et XBP1 (X box-bindingprotein 1). Les facteurs de transcription ATF4, XBP1 et ATF6 induisent la transcription du facteur CHOP et p38 MAPK stimule l'activité de CHOP qui régule l'expression des gènes codant des protéines impliquées dans l'apoptose en inhibant la transcription du gène anti-apoptotique Bcl-2 (McCullough et al. 2001; Fougeray 2012). Par conséquent, Bax et Bak vont faciliter le relargage de  $\text{Ca}^{2+}$  hors du RE ce qui va déclencher la perméabilité des membranes mitochondriales (Szegezdi et al. 2006).

Similairement à nos observations, le resvératrol a provoqué l'arrêt du cycle cellulaire par induction de l'UPR dans les lignées cellulaires de leucémie humaine (Liu et al. 2010). Ce polyphénol a stimulé une réponse transcriptionnelle de Grp78 et CHOP, la phosphorylation de eIF2 $\alpha$ , et l'épissage de XBP1.

L'apoptose est souvent associée d'une augmentation du calcium cytoplasmique (Nicotera & Orrenius 1998)). Nous avons examiné l'action de PGPC sur l'augmentation de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  dans les cellules U2OS. En présence de 100%  $\text{Ca}^{2+}$ , PGPC ont induit des augmentations importantes de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , ce qui suggère que le  $\text{Ca}^{2+}$  joue un rôle majeur dans l'augmentation du  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  induite par cet extrait. D'autre part, dans le milieu sans calcium (0%  $\text{Ca}^{2+}$ ), nous avons

également constaté des augmentations de  $[Ca^{2+}]_i$ , ce qui suggère que PGPC mobilise le calcium des réserves internes. L'étude cinétique de la mobilisation du  $Ca^{2+}$  induite par PGPC a montré que ces composés ont produit une augmentation maintenue du  $[Ca^{2+}]_i$ .

La signalisation Akt est l'une des voies les plus couramment aberrantes dans les cellules cancéreuses. AKT a émergé en tant que médiateur en aval primaire de signalisation PI3K, et de multiples médiateurs en aval d'AKT, y compris mammalian target of rapamycin (mTOR) et le facteur de transcription STAT3, ont été proposées (Riemenschneider et al. 2006; Nitulescu et al. 2016; Nishimoto 2004). En fait, l'activation de la signalisation mTOR résulte en une inhibition des protéines pro-apoptotiques via la voie AKT, et par conséquent, progression des cellules tumorales (Osaki et al. 2004; Datta et al. 1999). En effet, il a été rapporté que la protéine oncogène AKT pourrait promouvoir l'inactivation et la dégradation du suppresseur de la tumeur p53 (Downward 2004). Par conséquent, il y a un intérêt croissant aux inhibiteurs de AKT en tant qu'agents anticancéreux il y a près de deux décennies (Nitulescu et al. 2016).

Src est un non-récepteur tyrosine kinase proto-oncogène qui est activé dans de nombreux cancers, y compris dans les ostéosarcomes (Díaz-Montero et al. 2006). Src peut activer diverses voies de signalisation : la voie de PI3K/AKT/STAT3 (Hingorani et al. 2009; Fossey et al. 2009; Díaz-Montero et al. 2006). Il a été rapporté que l'activation de Src a entraîné une augmentation de la phosphorylation d'AKT à Ser473 dans les cellules d'ostéosarcome humaines SAOSp (Díaz-Montero et al. 2006). En outre, il a été démontré que STAT3 a été phosphorylée dans un ensemble de tissus et de lignées cellulaires d'ostéosarcome humain (Fossey et al. 2009). Dans notre étude, l'extrait polyphénolique du mil a réduit l'expression de c-SRC, la phosphorylation de la protéine AKT (à Ser 473 et à Thr 308) ainsi que celle de STAT3, ce qui suggère que les PGPC exercent une activité anti-proliférative via la régulation négative de la voie c-SRC/Akt/STAT3 dans les cellules d'ostéosarcome U2OS. En accord avec nos résultats, de nombreuses recherches ont montré que les polyphénols peuvent réguler les effecteurs en amont et en aval d'AKT (Wang et al. 2016; Yu et al. 2001; Darvin et al. 2015). Il a été rapporté que l'acide férulique, le second acide phénolique dans *Pennisetum glaucum*, a un effet inhibiteur sur la phosphorylation de l'AKT dans les cellules d'ostéosarcome (Wang et al. 2016). Aussi, les polyphénols de sorgho ont diminué de façon dose dépendante la phosphorylation de STAT3 dans les cellules cancéreuses du côlon HCT-116 et HCT-15 (Darvin et al. 2015). Enfin, le resvératrol a diminué l'activité de c-Src dans des cellules Hela (Yu et al. 2001).

ERK MAPK peuvent être activées par les mitogènes et les facteurs de croissance (Robinson & Cobb 1997). Par contre, p38 MAPK (également dénommé p38) et SAPK/JNK ont été considérées comme des suppresseurs de tumeurs (Olson & Hallahan 2004; Wagner & Nebreda 2009) et l'activation de l'AKT est supposée supprimer l'activation de SAPK/JNK et p38 en réponse à divers stress (Berra et al. 1998; Cerezo et al. 1998; Okubo et al. 1998). La p38 peut phosphoryler p53 dans plusieurs résidus, y compris Ser46, qui sont tous des acteurs dans la machinerie de l'apoptose (Zechner et al. 1997; Huang et al. 1999; Perfettini et al. 2005). De ce fait, nous avons jugé utile d'évaluer les effets des PGPC sur la voie de MAPK. Le traitement des cellules U2OS avec PGPC a augmenté significativement l'activité de SAPK/JNK et p38, mais aucun effet n'a été observé sur l'activité des ERKs. Ceci est cohérent avec les résultats démontrant les propriétés anticancéreuses des polyphénols, tels que la quercétine et le resvératrol, par la modulation de l'activité de SAPK/JNK et p38 (Kim et al. 2016; She et al. 2001). Aussi, la quercétine a augmenté la sensibilisation des cellules cancéreuses du pancréas à l'apoptose induite par TRAIL via l'activation de SAPK/JNK (Kim et al. 2016). Le resvératrol a induit la phosphorylation de p53 médiée par p38 dans les cellules JB6 Cl 41 (She et al. 2001).

La protéine ribosomale P70 S6K, un des effecteurs de la voie mTOR, peut favoriser la prolifération cellulaire, en partie par l'inactivation du promoteur de mort 'Bad' (Harada et al. 2001). Dans notre étude, nous avons exploré davantage l'effet du PGPC sur P70 S6K.

PGPC semblent efficaces dans l'inhibition de l'activation p70 S6K, suggérant que le traitement PGPC a aboli la voie AKT/mTOR/p70S6K dans les cellules d'ostéosarcome U2OS. En outre, des études précédentes, ont révélé que les polyphénols peuvent supprimer la prolifération cellulaire en inhibant la voie AKT/mTOR/P70S6k (Castillo-Pichardo & Dharmawardhane 2012; Moore et al. 2016).

Les cellules cancéreuses sont connues pour leur capacité de se répliquer indéfiniment et de s'échapper à la mort cellulaire programmée (Pentimalli & Giordano 2009). Il a été rapporté que la protéolyse de p53 et les inhibiteurs des cyclines dépendantes de kinases (CKIs), tels que p21 et p27, ont été corrélés avec une surexpression des cyclines et la perte de l'expression des CKIs dans de nombreuses cellules cancéreuses (Rastogi & Mishra 2012). En effet, un rapport a suggéré que p53 est nécessaire pour le maintien du blocage de la phase S (Giono & Manfredi 2006). Par conséquent, des grands efforts sont orientés vers la conception des approches thérapeutiques basées sur l'inhibition des kinases dépendantes des cyclines (CDK

pour cyclin-dépendant kinase) (Malumbres & Barbacid 2009). Dans la présente étude, nous avons montré que les deux traitements, PGPC et p-CA, ont induit un arrêt du cycle cellulaire dans la phase S. Tandis que le 5-fu à faible dose (2,5  $\mu\text{M}$ ) a bloqué la progression des cellules en phase G1. Cependant, la combinaison 5-fu avec PGPC ou p-CA a provoqué une accumulation des cellules U2OS en phase S, ce qui suggère que PGPC et p-CA ne partagent pas les mêmes cibles avec le 5-fu. En ce qui concerne les cyclines et CDK impliqués dans l'entrée et la progression dans la phase S, l'expression de CDK2 a été significativement diminuée et la cycline E a été significativement augmentée en réponse au traitement PGPC. Néanmoins, PGPC ne semble pas affecter l'expression de la cycline A et cdc2/CDK1.

Des études antérieures, ont démontré que les polyphénols ont provoqué une accumulation de cellules dans la phase S en diminuant CDK2 et/ou l'augmentation de l'expression la cycline E (Larrosa et al. 2003; Chou et al. 2010). Une autre étude a mis en évidence l'effet inhibiteur de l'acide férulique sur l'expression de CDK2 dans des cellules d'ostéosarcome (Wang et al. 2016).

Enfin, nous pouvons déduire que les polyphénols de mil (PGPC) ont induit un arrêt de cycle cellulaire et une augmentation de calcium intracellulaire associée avec un stress de réticulum endoplasmique et celui de la mitochondrie conduisant à l'activation de la machinerie de l'apoptose intrinsèque dans les cellules d'ostéosarcomes U2OS.

Le mécanisme d'action des PGPC sur l'induction de l'apoptose dans les cellules U2OS est illustré dans le schéma ci-dessous :

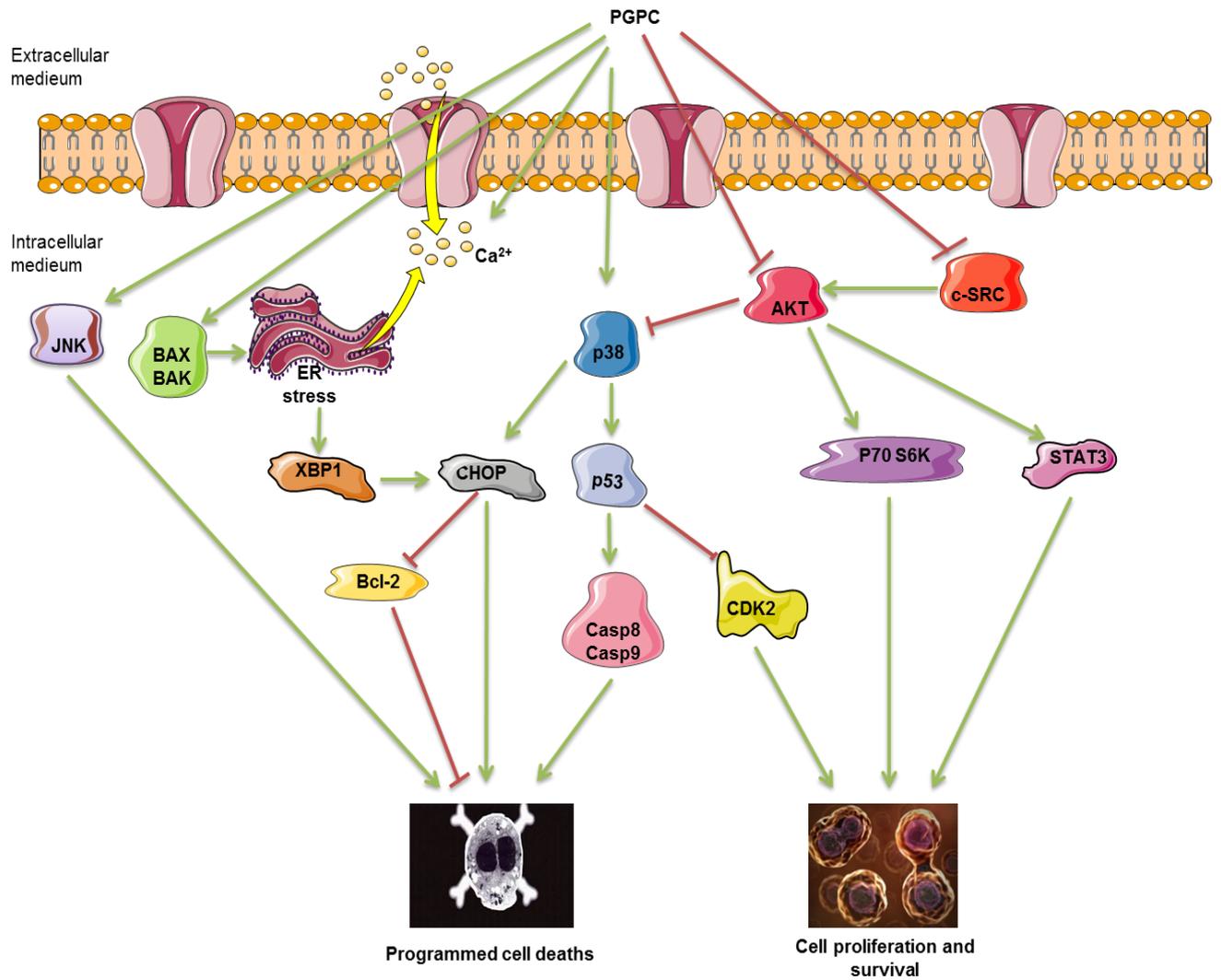


Figure 48: Schéma récapitulatif de l'effet anticancéreux des polyphénols du mil.

# **Conclusion générale**

### Conclusion

Plusieurs études sont focalisées sur la connaissance des propriétés antioxydantes, immunomodulatrices et anti-cancéreuses des polyphénols. Ce travail s'était porté sur l'évaluation du pouvoir antioxydant, l'effet immunomodulateur et anticancéreux de l'extrait polyphénolique des grains du mil.

Le dosage des polyphénols a révélé que les grains du mil contiennent des teneurs importantes en polyphénols (jusqu'à 1660 µg/g). Nous avons trouvé que les extraits méthanoliques et aqueux des deux cultivars, Bechna et Mekrout, ont des activités antioxydantes notables en les comparant aux antioxydants de référence, la BHA et la vitamine C, avec des valeurs d'EC<sub>50</sub> qui oscillent entre 0,1268 et 0,2499 mg/mL. Le suivi de la cinétique de la réaction du piégeage du radical DPPH a révélé que les extraits acétoniques réagissent le plus rapidement avec le radical DPPH•.

L'évaluation de l'effet des extraits polyphénoliques et lipidiques sur l'activation des lymphocytes T splénique a révélé que les polyphénols et les lipides de mil perlé présentent un effet immunosuppresseur. Les polyphénols semblent être plus actifs que les lipides. Deux mécanismes moléculaires semblent être impliqués dans l'activité immunosuppressive des extraits:

- 1) une augmentation du Ca<sup>2+</sup> intracellulaire ;
- 2) une inhibition de l'expression de IL-2 et la phosphorylation de ERK1/2 MAP kinase.

Nos résultats plaident pour l'utilisation des régimes alimentaires à base de mil pour le traitement des maladies associées avec une hyperactivation du système immunitaire telles que les maladies auto-immunes.

L'évaluation de l'effet anticancéreux a montré que les polyphénols du mil régulent négativement les effecteurs en amont et en aval de la pro-oncogène AKT associés à une régulation positive des suppresseurs des tumeurs (p53, p38 et SAPK/JNK) et une augmentation du calcium cytoplasmique [Ca<sup>2+</sup>]<sub>c</sub>, ce qui entraîne l'arrêt du cycle cellulaire et déclenche une apoptose caspase-dépendante dans les cellules d'ostéosarcome U2OS. Dans l'ensemble, cette étude encourage l'exploration des polyphénols du mil pour la prévention et le traitement de l'ostéosarcome. Néanmoins, les effets anti-tumoraux sur des modèles animaux restent à étudier.

# **Références bibliographiques**

### Références bibliographiques

- Abdoul-Azize, S. et al., 2013. Effects of Zizyphus lotus L. (Desf.) polyphenols on Jurkat cell signaling and proliferation. *International Immunopharmacology*, 15(2), pp.364–371. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2012.11.013>.
- Administration, U.S.F. and D., 1998. Food labeling: health claims; soluble fiber from certain foods and coronary heart disease. *Fed Regist*, 63(Docket no. 96P-0338).
- Aires, V. et al., 2004. Modulation of intracellular calcium concentrations and T cell activation by prickly pear polyphenols. *Mol Cell Biochem*, 260(1-2), pp.103–110. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15228091>.
- Alais, C. & Linden, G., 1997. Abrégé de biochimie alimentaire. 4<sup>ème</sup> Edition Masson. Paris,(119-123).
- Alexandre, S., 2000. Apoptose et transformation morphologique des cellules embryonnaires de hamster syrien (SHE). Thèse de doctorat. Metz.
- Allison, D.C. et al., 2012. A meta-analysis of osteosarcoma outcomes in the modern medical era. *Sarcoma*, 2012.
- Appleman, L.J. & Boussiotis, V.A., 2003. T cell anergy and costimulation. *Immunological reviews*, 192(1), pp.161–180.
- Ardestani, A. & Yazdanparast, R., 2007. Inhibitory effects of ethyl acetate extract of Teucrium polium on in vitro protein glycoxydation. *Food and chemical toxicology*, 45(12), pp.2402–2411.
- Atluru, D., Jackson, T.M. & Atluru, S., 1991. Genistein, a selective protein tyrosine kinase inhibitor, inhibits interleukin-2 and leukotriene B4 production from human mononuclear cells. *Clinical immunology and immunopathology*, 59(3), pp.379–387.
- Attakpa, E.S., 2010. Rôle du récepteur nucléaire d'activation et de prolifération des peroxyosomes (PPAR-alpha) dans la modulation de l'inflammation et l'activation des cellules T. Thèse de doctorat. Université de Bourgogne.
- Bakhshi, S. & Radhakrishnan, V., 2010. Prognostic markers in osteosarcoma. *Expert review*

- of anticancer therapy*, 10(2), pp.271–287.
- De Barros, M.P. et al., 2008. Evaluation of antiulcer activity of the main phenolic acids found in Brazilian Green Propolis. *Journal of Ethnopharmacology*, 120(3), pp.372–377.
- Bender, A.E., 2013. *Dictionary of nutrition and food technology*, Elsevier.
- Bénéteau, M., 2006. La modulation de l'apoptose dépendante du récepteur Fas: étude des évènements précoces de la voie de signalisation apoptotique dans un modèle de lymphocytes T humains. Thèse de doctorat. Bordeaux 2.
- Benjelloun, S., 2002. Nutrition transition in Morocco. *Public health nutrition*, 5(1a), pp.135–140.
- Bernardi, P. & Rasola, A., 2007. Calcium and cell death: the mitochondrial connection. In *Calcium Signalling and Disease*. Springer, pp. 481–506.
- Berra, E., Diaz-Meco, M.T. & Moscat, J., 1998. The Activation of p38 and Apoptosis by the Inhibition of Erk Is Antagonized by the The Activation of p38 and Apoptosis by the Inhibition of Erk Is Antagonized by the Phosphoinositide 3-Kinase / Akt Pathway \*. *The Journal of biological chemistry*, 273(17), pp.10792–10797.
- Bettaieb, A., 2009. Mécanismes d'induction de l'apoptose par le choc thermique et effet protecteur de la thermotolérance induite à 40° C. Thèse de doctorat. Université du Québec à Montréal.
- Bonin, A. & Khan, N.A., 2000. Regulation of calcium signalling by docosahexaenoic acid in human T-cells: implication of CRAC channels. *Journal of lipid research*, 41(2), pp.277–284.
- Bootman\*, M.D. et al., 2000. Nuclear calcium signalling. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 57(3), pp.371–378.
- Brade, W.P. et al., 1991. Dosing and side-effects of ifosfamide plus mesna. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 117(4 Supplement).
- BRUNE, M., HALLBERG, L. & SKÅNBERG, A., 1991. Determination of Iron-Binding Phenolic Groups in Foods. *Journal of Food Science*, 56(1), pp.128–131.
- Bruneton, J., 1999. Tanins. *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales*, pp.370–404.

## Références bibliographiques

- Caballero, B., Trugo, L. & Finglas, P., 2003. *Encyclopedia of food sciences and nutrition: Volumes 1-10.*, Elsevier Science BV.
- Cantrell, D., 1996. T cell antigen receptor signal transduction pathways. *Annual review of immunology*, 14(1), pp.259–274.
- Carafoli, E., 2002. Calcium signaling: a tale for all seasons. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(3), pp.1115–1122.
- Castillo-Pichardo, L. & Dharmawardhane, S.F., 2012. Grape Polyphenols Inhibit Akt/Mammalian Target of Rapamycin Signaling and Potentiate the Effects of Gefitinib in Breast Cancer. *Nutrition and Cancer*, 64(7), pp.1058–1069. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4286176&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Catalano, L. et al., 1999. Polyphenols in olive mill waste waters and their depuration plant effluents. A comparison of the Folin-Ciocalteu and HPLC methods. *Agrochimica (Italy)*.
- Cerezo, a et al., 1998. Role of Akt and c-Jun N-terminal kinase 2 in apoptosis induced by interleukin-4 deprivation. *Molecular biology of the cell*, 9(11), pp.3107–18. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=25596&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Chavassieux, P. & Meunier, P., 2003. Histologie et cytologie de l'os normal. *Encycl Méd Chir*.
- Chenu, C. & Delmas, P.-D., 1994. Physiologie de l'os. *Appareil locomoteur*, p.YP –. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S02460524144994>.
- Chethan, S. & Malleshi, N.G., 2007. Finger millet polyphenols: Optimization of extraction and the effect of pH on their stability. *Food Chemistry*, 105(2), pp.862–870.
- Chethan, S., Sreerama, Y.N. & Malleshi, N.G., 2008. Mode of inhibition of finger millet malt amylases by the millet phenolics. *Food Chemistry*, 111(1), pp.187–191.
- Chira, K. et al., 2008. Les polyphénols du raisin. *Phytothérapie*, 6(2), pp.75–82.
- Chou, C.-C. et al., 2010. Quercetin-mediated cell cycle arrest and apoptosis involving

## Références bibliographiques

- activation of a caspase cascade through the mitochondrial pathway in human breast cancer MCF-7 cells. *Archives of Pharmacal Research*, 33(8), pp.1181–1191.
- Christiansen, J. et al., 2006. Interferon- $\gamma$  secreted from peripheral blood mononuclear cells as a possible diagnostic marker for allergic contact dermatitis to gold. *Contact Dermatitis*, 55(2), pp.98–109.
- Clifford, M.N., 2000. Chlorogenic acids and other cinnamates—nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(7), pp.1033–1043.
- Cohen, G.M., 1997. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochemical Journal*, 326(1), pp.1–16.
- Colomer, J. & Means, A.R., 2007. Physiological roles of the Ca<sup>2+</sup>/CaM-dependent protein kinase cascade in health and disease. In *Calcium Signalling and Disease*. Springer, pp. 169–214.
- Cookson, B.T. & Brennan, M.A., 2001. Pro-inflammatory programmed cell death. *Trends in microbiology*, 9(3), pp.113–114.
- Crabtree, G.R., 1999. Generic signals and specific outcomes: signaling through Ca<sup>2+</sup>, calcineurin, and NF-AT. *Cell*, 96(5), pp.611–614.
- Cui, J. et al., 2011. Epigenetic changes in osteosarcoma. *Bulletin du cancer*, 98(7), pp.E62–E68.
- Cury-Boaventura, M.F. et al., 2006. Comparative toxicity of oleic and linoleic acid on human lymphocytes. *Life sciences*, 78(13), pp.1448–1456.
- D'Archivio, M. et al., 2007. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Annali-Istituto Superiore di Sanita*, 43(4), p.348.
- Daniel, M., Denni, M. & Chauhan, D., 2012. Polyphenols, phospholipids and fixed oil composition of pearl millet [*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.]. *International Journal of Pharmacy & Life Sciences*, 3(11).
- Darvin, P. et al., 2015. Sorghum polyphenol suppresses the growth as well as metastasis of colon cancer xenografts through co-targeting jak2/STAT3 and PI3K/Akt/mTOR

- pathways. *Journal of Functional Foods*, 15, pp.193–206. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2015.03.020>.
- Datta, S.R., Brunet, A. & Greenberg, M.E., 1999. Cellular survival: A play in three acts. *Genes and Development*, 13(22), pp.2905–2927.
- Denys, A., Hichami, A. & Khan, N.A., 2005. n-3 PUFAs modulate T-cell activation via protein kinase C- $\alpha$  and- $\varepsilon$  and the NF- $\kappa$ B signaling pathway. *Journal of lipid research*, 46(4), pp.752–758.
- Derbel, S. & Ghedira, K., 2005. Les phytonutriments et leur impact sur la santé. *Phytothérapie*, 3(1), pp.28–34.
- Devereux, G. & Seaton, A., 2005. Diet as a risk factor for atopy and asthma. *Journal of allergy and clinical immunology*, 115(6), pp.1109–1117.
- Devi, M.A. & Das, N.P., 1993. In vitro effects of natural plant polyphenols on the proliferation of normal and abnormal human lymphocytes and their secretions of interleukin-2. *Cancer letters*, 69(3), pp.191–196.
- Devi, P.B. et al., 2014. Health benefits of finger millet (*Eleusine coracana* L.) polyphenols and dietary fiber: a review. *Journal of food science and technology*, 51(6), pp.1021–1040.
- Díaz-Montero, C.M., Wygant, J.N. & McIntyre, B.W., 2006. PI3-K/Akt-mediated anoikis resistance of human osteosarcoma cells requires Src activation. *European Journal of Cancer*, 42(10), pp.1491–1500.
- Ding, W.-X. et al., 2007. Linking of autophagy to ubiquitin-proteasome system is important for the regulation of endoplasmic reticulum stress and cell viability. *The American journal of pathology*, 171(2), pp.513–524.
- Donnadieu, E., Bismuth, G. & Trautmann, A., 1992. Calcium fluxes in T lymphocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 267(36), pp.25864–25872.
- Downward, J., 2004. PI 3-kinase, Akt and cell survival. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 15(2), pp.177–182.
- Ducy, P. et al., 1997. Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *cell*,

- 89(5), pp.747–754.
- DuPont, M.S. et al., 2000. Effect of variety, processing, and storage on the flavonoid glycoside content and composition of lettuce and endive. *Journal of agricultural and food chemistry*, 48(9), pp.3957–3964.
- Dykes, L. & Rooney, L.W., 2006. Sorghum and millet phenols and antioxidants. *Journal of Cereal Science*, 44(3), pp.236–251.
- Eiró, N. & Vizoso, F.J., 2012. Inflammation and cancer. *World journal of gastrointestinal surgery*, 4(3), p.62.
- Erlund, I., 2004. Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. *Nutrition research*, 24(10), pp.851–874.
- Eum, K.H. & Lee, M., 2011. Crosstalk between autophagy and apoptosis in the regulation of paclitaxel-induced cell death in v-Ha-ras-transformed fibroblasts. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 348(1-2), pp.61–68.
- FAOSTAT, F., 2004. Agriculture Organisation of the United Nations: Online statistical service <http://faostat.fao.org>.
- Fardet, A., Souchon, I. & Dupont, D., 2013. *Structure des aliments et effets nutritionnels*, Editions Quae.
- Favero, J. & Lafont, V., 1998. Effector pathways regulating T cell activation. *Biochemical pharmacology*, 56(12), pp.1539–1547.
- Favier, A., 2003. Le stress oxydant. *L'actualité chimique*, 108.
- Ferguson, L.R. et al., 2003. Bacterial antimutagenesis by hydroxycinnamic acids from plant cell walls. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 542(1), pp.49–58.
- Fink, S.L. & Cookson, B.T., 2005. Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infection and immunity*, 73(4), pp.1907–1916.
- Firestein, G.S., 2003. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature*, 423(6937), pp.356–

361.

Fletcher, C.D.M., Unni, K.K. & Mertens, F., 2002. *Pathology and genetics of tumours of soft tissue and bone*, Iarc.

Folin, O. & Ciocalteu, V., 1927. On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. *J. biol. Chem*, 73(2), pp.627–650.

Follet, H., 2003. Caractérisation Biomécanique et Modélisation 3D par Imagerie X et IRM haute résolution de l'os spongieux humain: Evaluation du risque fracturaire. Thèse de doctorat. INSA de Lyon.

Fossey, S.L. et al., 2009. Characterization of STAT3 activation and expression in canine and human osteosarcoma. *BMC cancer*, 9, p.81. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2666757&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

Foufelle, F. & Ferré, P., 2007. La réponse UPR-Son rôle physiologique et physiopathologique. *médecine/sciences*, 23(3), pp.291–296.

Fougeray, S., 2012. Rôle du stress du réticulum endoplasmique et de l'autophagie dans la régulation des réponses immune et angiogénique activées par des stress ischémiques et inflammatoires dans l'épithélium rénal humain. Thèse de doctorat. Université René Descartes-Paris V.

Friedman, M., 1997. Chemistry, biochemistry, and dietary role of potato polyphenols. A review. *Journal of agricultural and food chemistry*, 45(5), pp.1523–1540.

Fuchs, B. & Pritchard, D.J., 2002. Etiology of osteosarcoma. *Clinical orthopaedics and related research*, 397, pp.40–52.

Gao, T.J. et al., 1996. Enhanced healing of segmental tibial defects in sheep by a composite bone substitute composed of tricalcium phosphate cylinder, bone morphogenetic protein, and type IV collagen. *Journal of biomedical materials research*, 32(4), pp.505–512.

Gao, X. et al., 2001. Immunomodulatory activity of resveratrol: suppression of lymphocyte proliferation, development of cell-mediated cytotoxicity, and cytokine production. *Biochemical pharmacology*, 62(9), pp.1299–1308.

## Références bibliographiques

- Gardès-Albert, M. et al., 2003. Espèces réactives de l'oxygène. *L'actualité chimique*, p.91.
- Georges, S., 2012. Implication d'Adam12 dans la pathogenèse des ostéosarcomes. Thèse de doctorat. Nantes.
- Ghedira, K., 2005. Les flavonoïdes: structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie*, 3(4), pp.162–169.
- Giono, L.E. & Manfredi, J.J., 2006. The p53 tumor suppressor participates in multiple cell cycle checkpoints. *Journal of cellular physiology*, 209(1), pp.13–20.
- Giovannini, C. & Masella, R., 2012. Role of polyphenols in cell death control. *Nutritional neuroscience*, 15(3), pp.134–149.
- Goodall, M.L. et al., 2016. The Autophagy Machinery Controls Cell Death Switching between Apoptosis and Necroptosis. *Developmental Cell*, 37(4), pp.337–349. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1534580716302386>.
- Gorinstein, S. et al., 2007. The total polyphenols and the antioxidant potentials of some selected cereals and pseudocereals. *European Food Research and Technology*, 225(3-4), pp.321–328.
- Gorlick, R. et al., 2013. Children's Oncology Group's 2013 blueprint for research: bone tumors. *Pediatric blood & cancer*, 60(6), pp.1009–1015.
- Green, D.R., 2000. Apoptotic pathways: paper wraps stone blunts scissors. *Cell*, 102(1), pp.1–4.
- Gryniewicz, G., Poenie, M. & Tsien, R.Y., 1985. A new generation of Ca<sup>2+</sup> indicators with greatly improved fluorescence properties. *Journal of Biological Chemistry*, 260(6), pp.3440–3450.
- Gupta, V.P., 1980. Genetics of quality improvement. *Trends in genetical research on Pennisetums*. PAU, Ludhiana, pp.291–294.
- Guyot, S., Marnet, N. & Drilleau, J.-F., 2001. Thiolytic– HPLC characterization of apple procyanidins covering a large range of polymerization states. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(1), pp.14–20.
- Hajiaghaalipour, F. et al., 2015. White tea (*Camellia sinensis*) inhibits proliferation of the

- colon cancer cell line, HT-29, activates caspases and protects DNA of normal cells against oxidative damage. *Food Chemistry*, 169, pp.401–410. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.07.005>.
- Haleng, J. et al., 2007. Le stress oxydant. *Revue Medicale de Liege*, 62(10), pp.628–638.
- Hamed, Y.B. et al., 2012. 5, 6-Dihydro-2H-pyranones and 5, 6-dihydro-2H-pyridones and their derivatives modulate in vitro human T lymphocyte function. *Molecular and cellular biochemistry*, 360(1-2), pp.23–33.
- Harada, H. et al., 2001. p70S6 kinase signals cell survival as well as growth, inactivating the pro-apoptotic molecule BAD. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(17), pp.9666–70. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=55509&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Harding, H.P., Zhang, Y. & Ron, D., 1999. Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature*, 397(6716), pp.271–274.
- He, H.-T., Lellouch, A. & Marguet, D., 2005. Lipid rafts and the initiation of T cell receptor signaling. In *Seminars in immunology*. Elsevier, pp. 23–33.
- Heidland, A. et al., 2006. The contribution of Rudolf Virchow to the concept of inflammation: what is still of importance? *Journal of nephrology*, 19, pp.S102–9.
- Hilu, K.W., De Wet, J.M.J. & Seigler, D., 1978. Flavonoid patterns and systematics in Eleusine. *Biochemical Systematics and Ecology*, 6(3), pp.247–249.
- Hingorani, P. et al., 2009. Inhibition of Src phosphorylation alters metastatic potential of osteosarcoma in vitro but not in vivo. *Clinical Cancer Research*, 15(10), pp.3416–3422.
- Hithamani, G. & Srinivasan, K., 2014. Effect of domestic processing on the polyphenol content and bioaccessibility in finger millet (*Eleusine coracana*) and pearl millet (*Pennisetum glaucum*). *Food chemistry*, 164, pp.55–62.
- Hmamouchi, M., 1997. Plantes alimentaires, aromatiques, condimentaires, médicinales et toxiques au Maroc. *Identification of wild food and non-food plants of the Mediterranean region*. Chania: CIHEAM-IAMC, pp.89–108.

## Références bibliographiques

- Hospital, M.G., 2008. Oncologist. *Cancer Research*, (February), pp.16–24.
- Hou, Y. et al., 2004. Ferulic acid inhibits endothelial cell proliferation through NO down-regulating ERK1/2 pathway. *Journal of cellular biochemistry*, 93(6), pp.1203–1209.
- Huang, C. et al., 1999. p38 kinase mediates UV-induced phosphorylation of p53 protein at serine 389. *Journal of Biological Chemistry*, 274(18), pp.12229–12235.
- Huang, C. & Miller, R.T., 2007. The calcium-sensing receptor and its interacting proteins. *Journal of cellular and molecular medicine*, 11(5), pp.923–934.
- Huang, Y. & Wange, R.L., 2004. T cell receptor signaling: beyond complex complexes. *Journal of Biological Chemistry*, 279(28), pp.28827–28830.
- Hudson, E.A. et al., 2000. Characterization of potentially chemopreventive phenols in extracts of brown rice that inhibit the growth of human breast and colon cancer cells. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 9(11), pp.1163–1170.
- Jaffe, N. et al., 2002. Can cure in patients with osteosarcoma be achieved exclusively with chemotherapy and abrogation of surgery? *Cancer*, 95(10), pp.2202–2210.
- Jaganathan, S.K., Supriyanto, E. & Mandal, M., 2013. Events associated with apoptotic effect of p-Coumaric acid in HCT-15 colon cancer cells. *World Journal of Gastroenterology*, 19(43), pp.7726–7734.
- Jang, M. et al., 1997. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science*, 275(5297), pp.218–220.
- Jenner, P., 2003. Oxidative stress in Parkinson's disease. *Annals of neurology*, 53(S3), pp.S26–S38.
- Jeong-Yong, C.H.O. et al., 1998. Antimicrobial activity of 4-hydroxybenzoic acid and trans 4-hydroxycinnamic acid isolated and identified from rice hull. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 62(11), pp.2273–2276.
- Jimoh, F.O., Adedapo, A.A. & Afolayan, A.J., 2010. Comparison of the nutritional value and biological activities of the acetone, methanol and water extracts of the leaves of *Solanum nigrum* and *Leonotis leonorus*. *Food and Chemical Toxicology*, 48(3), pp.964–971. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2010.01.007>.

## Références bibliographiques

- Joubert, V., 2006. Exposition in vitro de cellules neuronales aux radiofréquences: étude de l'apoptose. Thèse de doctorat. Université de Limoges.
- Kang, N.J. et al., 2011. Polyphenols as small molecular inhibitors of signaling cascades in carcinogenesis. *Pharmacology & therapeutics*, 130(3), pp.310–324.
- Katiyar, S.K., 2006. Matrix metalloproteinases in cancer metastasis: molecular targets for prostate cancer prevention by green tea polyphenols and grape seed proanthocyanidins. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*, 6(1), pp.17–24. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16611161>.
- Kelloff, G.J. et al., 1994. Mechanistic considerations in chemopreventive drug development. *Journal of Cellular Biochemistry*, 56(S20), pp.1–24.
- Kim, J.H. et al., 2016. Quercetin sensitizes pancreatic cancer cells to TRAIL-induced apoptosis through JNK-mediated cFLIP turnover. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 78, pp.327–334. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1357272516302072>.
- Klein, J.A. & Ackerman, S.L., 2003. Oxidative stress, cell cycle, and neurodegeneration. *The Journal of clinical investigation*, 111(6), pp.785–793.
- Konishi, Y., Kobayashi, S. & Shimizu, M., 2003. Transepithelial transport of p-coumaric acid and gallic acid in Caco-2 cell monolayers. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 67(11), pp.2317–2324.
- Kouroku, Y. et al., 2007. ER stress (PERK/eIF2 $\alpha$  phosphorylation) mediates the polyglutamine-induced LC3 conversion, an essential step for autophagy formation. *Cell Death & Differentiation*, 14(2), pp.230–239.
- Krishnaiah, D., Sarbatly, R. & Nithyanandam, R., 2011. A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. *Food and bioproducts processing*, 89(3), pp.217–233.
- Lacey, D.L. et al., 1998. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *cell*, 93(2), pp.165–176.
- Lacour, B. et al., 2010. Incidence of childhood cancer in France: national children cancer registries, 2000–2004. *European Journal of Cancer Prevention*, 19(3), pp.173–181.

## Références bibliographiques

- Lafouresse, F., 2012. Implication de la protéine du syndrome de Wiskott-Aldrich dans la migration et la rencontre des lymphocytes T CD4+ avec les cellules présentatrices de l'antigène. Thèse de doctorat. Université de Toulouse, Université Toulouse III-Paul Sabatier.
- Lanyon, L.E., 1993. Skeletal responses to physical loading. In *Physiology and pharmacology of bone*. Springer, pp. 485–505.
- Larrosa, M., Tomás-Barberán, F.A. & Espín, J.C., 2003. Grape polyphenol resveratrol and the related molecule 4-hydroxystilbene induce growth inhibition, apoptosis, S-phase arrest, and upregulation of cyclins A, E, and B1 in human SK-Mel-28 melanoma cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(16), pp.4576–4584.
- Lee, M.A. et al., 1998. Calcium regulation of nuclear pore permeability. *Cell calcium*, 23(2-3), pp.91–101.
- Lee, S.H. et al., 2010. Millet consumption decreased serum concentration of triglyceride and C-reactive protein but not oxidative status in hyperlipidemic rats. *Nutrition Research*, 30(4), pp.290–296.
- Leong, L.P. & Shui, G., 2002. An investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets. *Food chemistry*, 76(1), pp.69–75.
- León-González, A.J., Auger, C. & Schini-Kerth, V.B., 2015. Pro-oxidant activity of polyphenols and its implication on cancer chemoprevention and chemotherapy. *Biochemical Pharmacology*, 98(3), pp.371–380. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2015.07.017>.
- Lerner, U.H., 2006. Bone remodeling in post-menopausal osteoporosis. *Journal of Dental Research*, 85(7), pp.584–595.
- Lestienne, I., 2004. Contribution à l'étude de la biodisponibilité du fer et du zinc dans le grain de mil et conditions d'amélioration dans les aliments de complément. Thèse de doctorat. Université Montpellier II.
- Li, Y. et al., 2014. New insights into the roles of CHOP-induced apoptosis in ER stress Structure and Properties of C / EBP Homologous Protein Roles of CHOP in ER Stress-Mediated Apoptosis. , 46(8), pp.629–640.

## Références bibliographiques

- Liblau, R.S., Singer, S.M. & McDevitt, H.O., 1995. Th1 and Th2 CD4+ T cells in the pathogenesis of organ-specific autoimmune diseases. *Immunology today*, 16(1), pp.34–38.
- Liu, B.-Q. et al., 2010. Implication of unfolded protein response in resveratrol-induced inhibition of K562 cell proliferation. *Biochemical and biophysical research communications*, 391(1), pp.778–782.
- Liu, Y. et al., 2003. Effects of fish oil on lymphocyte proliferation, cytokine production and intracellular signalling in weanling pigs. *Archives of Animal Nutrition*, 57(3), pp.151–165.
- Liyana-Pathirana, C.M. & Shahidi, F., 2006. Importance of insoluble-bound phenolics to antioxidant properties of wheat. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(4), pp.1256–1264.
- Lockshin, R.A. & Zakeri, Z., 2004. Apoptosis, autophagy, and more. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 36(12), pp.2405–2419.
- Lodovici, M. et al., 2009. Protective effect of 4-coumaric acid from UVB ray damage in the rabbit eye. *Toxicology*, 255(1), pp.1–5.
- López-Guerrero, J.A. et al., 2004. Deregulation of the G1 to S-phase cell cycle checkpoint is involved in the pathogenesis of human osteosarcoma. *Diagnostic Molecular Pathology*, 13(2), pp.81–91.
- Lu, J. et al., 2011. Immunosuppressive activity of 8-gingerol on immune responses in mice. *Molecules*, 16(3), pp.2636–2645.
- Luceri, C. et al., 2007. p-Coumaric acid, a common dietary phenol, inhibits platelet activity in vitro and in vivo. *British Journal of Nutrition*, 97(03), pp.458–463.
- Luceri, C. et al., 2004. Plant phenolic 4-coumaric acid protects against intestinal inflammation in rats. *Scandinavian journal of gastroenterology*, 39(11), pp.1128–1133.
- Lucey, D.R., Clerici, M. & Shearer, G.M., 1996. Type 1 and type 2 cytokine dysregulation in human infectious, neoplastic, and inflammatory diseases. *Clinical microbiology reviews*, 9(4), pp.532–562.

## Références bibliographiques

- Luetke, A. et al., 2014. Osteosarcoma treatment - Where do we stand? A state of the art review. *Cancer Treatment Reviews*, 40(4), pp.523–532. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ctrv.2013.11.006>.
- Ma, X., Jiang, Z. & Lai, C., 2015. Significance for Human Health of Increasing n-3PUFA Content in Pork. *Crit Rev Food Sci Nutr*.
- Maire, R., 1952. Flore de l'Afrique du Nord 1-16. *Lechevalier, Paris*.
- Majno, G. & Joris, I., 1995. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *The American journal of pathology*, 146(1), p.3.
- Malumbres, M. & Barbacid, M., 2009. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nature reviews. Cancer*, 9(3), pp.153–166.
- Manach, C. et al., 2006. Consommation et disponibilité des polyphénols. *Les polyphénols en agroalimentaire. P. Sarni-Manchado and V. Cheynier. Paris, Lavoisier*, pp.361–380.
- Marie, P.J., 1992. Physiologie du tissu osseux. *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée*, 7(6), pp.17–24.
- Martin, C., 2009. Rôle de la signalisation Sphingosine kinase-1 Sphingosine 1-Phosphate dans les interactions stroma-cellules épithéliales au sein des métastases osseuses du cancer de la prostate. Thèse de doctorat. Université de Toulouse, Université Toulouse III-Paul Sabatier
- Martin, S. & Andriantsitohaina, R., 2002. Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium. In *Annales de Cardiologie et d'Angéiologie*. Elsevier, pp. 304–315.
- Masuda, T. et al., 1999. Evaluation of the antioxidant activity of environmental plants: activity of the leaf extracts from seashore plants. *Journal of Agricultural and Food chemistry*, 47(4), pp.1749–1754.
- McCullough, K.D. et al., 2001. Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state. *Molecular and cellular biology*, 21(4), pp.1249–1259.
- Mehinagic, E., Bourles, E. & Jourjon, F., 2011. Composés des fruits d'intérêt nutritionnel:

## Références bibliographiques

- impact des procédés de transformation sur les polyphénols. *Revue Suisse de Viticulture Arboriculture et Horticulture*, 43(6), p.364.
- Middleton, E., Kandaswami, C. & Theoharides, T., 2000. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: Implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological Reviews*, 52(4), pp.673–751. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11121513>.
- Miller, P., 2001. Contribution à l'étude sur l'ostéoporose chez les femmes ménopausées: corrélation entre la masse des cendres, la composition élémentaire minérale, les dimensions osseuses, l'ostéodensitométrie et le seuil de fracture dans les vertèbres et fémurs humains. Thèse de doctorat.
- Minville-Walz, M., 2012. Altérations métaboliques cellulaires: la voie de biosynthèse des acides gras monoinsaturés comme cible thérapeutique. Thèse de doctorat. Université de Bourgogne.
- Minville-Walz, M. et al., 2010. Inhibition of stearoyl-CoA desaturase 1 expression induces CHOP-dependent cell death in human cancer cells. *PloS one*, 5(12), p.e14363.
- Mirabello, L., Troisi, R.J. & Savage, S.A., 2009. Osteosarcoma incidence and survival rates from 1973 to 2004: Data from the surveillance, epidemiology, and end results program. *Cancer*, 115(7), pp.1531–1543.
- Missiaen, L. et al., 2004. Calcium release from the Golgi apparatus and the endoplasmic reticulum in HeLa cells stably expressing targeted aequorin to these compartments. *Cell calcium*, 36(6), pp.479–487.
- Mohseny, A.B. & Hogendoorn, P.C.W., 2011. Concise review: mesenchymal tumors: when stem cells go mad. *Stem cells*, 29(3), pp.397–403.
- Monderer, D., 2013. Potentiel thérapeutique de la différenciation dans les chondrosarcomes et les ostéosarcomes. Thèse de doctorat. Nantes.
- Moore, J. et al., 2016. Rosemary extract reduces Akt/mTOR/p70S6K activation and inhibits proliferation and survival of A549 human lung cancer cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 83, pp.725–732. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0753332216307235>.

## Références bibliographiques

- Mosmann, T.R. & Coffman, R.L., 1989. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annual review of immunology*, 7(1), pp.145–173.
- Mosmann, T.R. & Sad, S., 1996. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunology today*, 17(3), pp.138–146.
- Mourali, J., 2008. ALK, un nouveau récepteur à dépendance. Etude des mécanismes de son effet pro-apoptotique. Thèse de doctorat. Université de Toulouse, Université Toulouse III-Paul Sabatier.
- Mouria, M. et al., 2002. Food-derived polyphenols inhibit pancreatic cancer growth through mitochondrial cytochrome c release and apoptosis. *International Journal of Cancer*, 98(5), pp.761–769.
- MuNDY, G.R. et al., 1976. Direct stimulation of bone resorption by thyroid hormones. *Journal of Clinical Investigation*, 58(3), p.529.
- Negulescu, P.A., Shastri, N. & Cahalan, M.D., 1994. Intracellular calcium dependence of gene expression in single T lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(7), pp.2873–2877.
- Nel, A.E. et al., 1990. Stimulation of MAP-2 kinase activity in T lymphocytes by anti-CD3 or anti-Ti monoclonal antibody is partially dependent on protein kinase C. *The Journal of Immunology*, 144(7), pp.2683–2689.
- Nel, A.E., 2002. T-cell activation through the antigen receptor. Part 1: signaling components, signaling pathways, and signal integration at the T-cell antigen receptor synapse. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 109(5), pp.758–770.
- Neuhaus, T. et al., 2004. Inhibition of the vascular-endothelial growth factor-induced intracellular signaling and mitogenesis of human endothelial cells by epigallocatechin-3 gallate. *European journal of pharmacology*, 483(2), pp.223–227.
- Nicotera, P. & Orrenius, S., 1998. The role of calcium in apoptosis. *Cell calcium*, 23(2), pp.173–180.
- Nishimoto, T., 2004. Upstream and downstream of ran GTPase. *Biological chemistry*, 381(5-6), pp.397–405.

## Références bibliographiques

- Nitulescu, G.M. et al., 2016. Akt inhibitors in cancer treatment: The long journey from drug discovery to clinical use (Review). *International Journal of Oncology*, 48(3), pp.869–885.
- Oak, M.H., El Bedoui, J. & Schini-Kerth, V.B., 2005. Antiangiogenic properties of natural polyphenols from red wine and green tea. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 16(1), pp.1–8.
- Obrenovich, M.E. et al., 2010. The role of polyphenolic antioxidants in health, disease, and aging. *Rejuvenation research*, 13(6), pp.631–643.
- Okamoto, I. et al., 2002. The flavonoid Kaempferol suppresses the graft-versus-host reaction by inhibiting type 1 cytokine production and CD8+ T cell engraftment. *Clinical Immunology*, 103(2), pp.132–144.
- Okubo, Y. et al., 1998. Insulin-like Growth Factor-I Inhibits the Stress-activated Protein Kinase / c-Jun N-terminal Kinase \*. , 273(40), pp.25961–25966.
- Olson, J.M. & Hallahan, A.R., 2004. p38 MAP kinase: A convergence point in cancer therapy. *Trends in Molecular Medicine*, 10(3), pp.125–129.
- 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), pp.667–676.
- Ouyang, L. et al., 2012. Programmed cell death pathways in cancer: A review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. *Cell Proliferation*, 45(6), pp.487–498.
- Owen, J., Punt, J. & Stranford, S., 2014. *Immunologie-7e édition: Le cours de Janis Kuby avec questions de révision*, Dunod.
- Pan, Z., Zhao, X. & Brotto, M., 2012. Fluorescence-based measurement of store-operated calcium entry in live cells: from cultured cancer cell to skeletal muscle fiber. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (60), pp.e3415–e3415.
- Pentimalli, F. & Giordano, A., 2009. Promises and drawbacks of targeting cell cycle kinases in cancer. *Discovery medicine*, 8(43), pp.177–180.
- Perfettini, J.-L. et al., 2005. Essential role of p53 phosphorylation by p38 MAPK in apoptosis

## Références bibliographiques

- induction by the HIV-1 envelope. *The Journal of experimental medicine*, 201(2), pp.279–89. Available at: <http://jem.rupress.org/content/201/2/279.long>.
- Peter, M. El & Krammer, P.H., 2003. The CD95 (APO-1/Fas) DISC and beyond. *Cell Death & Differentiation*, 10(1), pp.26–35.
- Pinton, P. & Rizzuto, R., 2006. Bcl-2 and Ca<sup>2+</sup> homeostasis in the endoplasmic reticulum. *Cell Death & Differentiation*, 13(8), pp.1409–1418.
- Pozzan, T. et al., 1994. Molecular and cellular physiology of intracellular calcium stores. *Physiological reviews*, 74(3), pp.595–637.
- Prasad, S. et al., 2016. Oxidative Stress and Cancer: Advances and Challenges. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2016.
- Pyrzynska, K. & Pękal, A., 2013. Application of free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) to estimate the antioxidant capacity of food samples. *Analytical Methods*, 5(17), pp.4288–4295.
- Ragae, S., Abdel-Aal, E.-S.M. & Noaman, M., 2006. Antioxidant activity and nutrient composition of selected cereals for food use. *Food Chemistry*, 98(1), pp.32–38.
- Rahal Bouziane, H., 2006. Fourrages cultivés des oasis du Touat, Gourara et Tidikelt: caractéristiques ethnobotaniques, morphologiques et valeur alimentaire. *Algérie. Edition INRAA*. 42p.
- Ramos, S., 2008. Cancer chemoprevention and chemotherapy: Dietary polyphenols and signalling pathways. *Molecular Nutrition and Food Research*, 52(5), pp.507–526.
- Rastogi, N. & Mishra, D.P., 2012. Therapeutic targeting of cancer cell cycle using proteasome inhibitors. *Cell division*, 7, p.26. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3584802&tool=pmcentrez&endertype=abstract>.
- Razzaq, T.M. et al., 2004. Regulation of T-cell receptor signalling by membrane microdomains. *Immunology*, 113(4), pp.413–426.
- Rengarajan, J., Szabo, S.J. & Glimcher, L.H., 2000. Transcriptional regulation of Th1/Th2 polarization. *Immunology today*, 21(10), pp.479–483.

## Références bibliographiques

- Rezaire, A., 2012. Activité anti-oxydante, et caractérisation phénolique du fruit de palmier amazonien *Oenocarpus bataua* (patawa). Thèse de doctorat. Antilles-Guyane.
- Riemenschneider, M.J. et al., 2006. AKT activation in human glioblastomas enhances proliferation via TSC2 and S6 kinase signaling. *Cancer Research*, 66(11), pp.5618–5623.
- Ries, L.A.G. et al., 1999. Cancer incidence and survival among children and adolescents: United States SEER Program 1975-1995. *Cancer incidence and survival among children and adolescents: United States SEER Program 1975-1995*.
- Rizzuto, R. & Pozzan, T., 2006. Microdomains of intracellular Ca<sup>2+</sup>: molecular determinants and functional consequences. *Physiological reviews*, 86(1), pp.369–408.
- Robards, K. & Antolovich, M., 1997. Analytical chemistry of fruit bioflavonoids A review. *Analyst*, 122(2), p.11R–34R.
- Robinson, M.J. & Cobb, M.H., 1997. Mitogen-activated protein kinase pathways. *Current opinion in cell biology*, 9(2), pp.180–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9069255>.
- Rodriguez, D., Rojas-rivera, D. & Hetz, C., 2011. Biochimica et Biophysica Acta Integrating stress signals at the endoplasmic reticulum : The BCL-2 protein family rheostat ☆. *BBA - Molecular Cell Research*, 1813(4), pp.564–574.
- Rodriguez, J. & Lazebnik, Y., 1999. Caspase-9 and APAF-1 form an active holoenzyme. *Genes & development*, 13(24), pp.3179–3184.
- Rojas, F.J. & Moretti-Rojas, I., 2000. Involvement of the calcium-specific protease, calpain, in the fertilizing capacity of human spermatozoa. *international journal of andrology*, 23(3), pp.163–168.
- Saïdou, A.A. et al., 2009. Association studies identify natural variation at PHYC linked to flowering time and morphological variation in pearl millet. *Genetics*, 182(3), pp.899–910.
- Sandberg, A.A. & Bridge, J.A., 2003. Updates on the cytogenetics and molecular genetics of bone and soft tissue tumors: osteosarcoma and related tumors. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 145(1), pp.1–30.

## Références bibliographiques

- Sanoner, P. et al., 1999. Polyphenol profiles of French cider apple varieties (*Malus domestica* sp.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(12), pp.4847–4853.
- Shahidi, F. & Chandrasekara, A., 2013. Millet grain phenolics and their role in disease risk reduction and health promotion: A review. *Journal of Functional Foods*, 5(2), pp.570–581.
- She, Q.-B. et al., 2001. Resveratrol-induced activation of p53 and apoptosis is mediated by extracellular- signal-regulated protein kinases and p38 kinase. *Cancer Res.*, 61(4), pp.1604–1610.
- Shobana, S. et al., 2010. Amelioration of hyperglycaemia and its associated complications by finger millet (*Eleusine coracana* L.) seed coat matter in streptozotocin-induced diabetic rats. *British journal of nutrition*, 104(12), pp.1787–1795.
- Shobana, S., Sreerama, Y.N. & Malleshi, N.G., 2009. Composition and enzyme inhibitory properties of finger millet (*Eleusine coracana* L.) seed coat phenolics: Mode of inhibition of  $\alpha$ -glucosidase and pancreatic amylase. *Food Chemistry*, 115(4), pp.1268–1273.
- Shukla, K. & Srivastava, S., 2014. Evaluation of finger millet incorporated noodles for nutritive value and glycemic index. *Journal of food science and technology*, 51(3), pp.527–534.
- Sies, H., 1993. Strategies of antioxidant defense. *The FEBS Journal*, 215(2), pp.213–219.
- Singhatanadgit, W., Salih, V. & Olsen, I., 2006. Bone morphogenetic protein receptors and bone morphogenetic protein signaling are controlled by tumor necrosis factor- $\alpha$  in human bone cells. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 38(10), pp.1794–1807.
- van der Sluis, A.A. et al., 2001. Activity and concentration of polyphenolic antioxidants in apple: effect of cultivar, harvest year, and storage conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(8), pp.3606–3613.
- Sojka, D.K. et al., 2004. IL-2 secretion by CD4<sup>+</sup> T cells in vivo is rapid, transient, and influenced by TCR-specific competition. *The Journal of Immunology*, 172(10), pp.6136–6143.
- Srinivasula, S.M. et al., 2001. A conserved XIAP-interaction motif in caspase-9 and

## Références bibliographiques

- Smac/DIABLO regulates caspase activity and apoptosis. *Nature*, 410(6824), pp.112–116.
- Stephen, G.W., 1996. CD28: a signalling perspective. *Biochemical Journal*, 318(2), pp.361–377.
- Stoner, G.D. & Mukhtar, H., 1995. Polyphenols as cancer chemopreventive agents. *Journal of cellular biochemistry. Supplement*, 22(1 995), pp.169–180. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8538195>.
- Subba Rao, M. & Muralikrishna, G., 2002. Evaluation of the antioxidant properties of free and bound phenolic acids from native and malted finger millet (Ragi, Eleusine coracana Indaf-15). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(4), pp.889–892.
- Szegezdi, E. et al., 2006. Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *EMBO reports*, 7(9), pp.880–885.
- Thastrup, O. et al., 1990. Thapsigargin, a tumor promoter, discharges intracellular Ca<sup>2+</sup> stores by specific inhibition of the endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> (+)-ATPase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(7), pp.2466–2470.
- Thomas, T., Martin, A. & Lafage-Proust, M.-H., 2011. Physiologie du tissu osseux. *Podologie*, p.YP –. Available at: [http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0292-062X\(11\)58350-3](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0292-062X(11)58350-3).
- Thomasset, S.C. et al., 2007. Dietary polyphenolic phytochemicals - Promising cancer chemopreventive agents in humans? A review of their clinical properties. *International Journal of Cancer*, 120(3), pp.451–458.
- Thornberry, N.A. & Lazebnik, Y., 1998. Caspases: enemies within. *Science*, 281(5381), pp.1312–1316.
- Todoric, J., Antonucci, L. & Karin, M., 2016. Targeting Inflammation in Cancer Prevention and Therapy. *Cancer Prevention Research*, 9(12), pp.895–905.
- Toppets, V. et al., 2004. Morphologie, croissance et remaniement du tissu osseux. *Ann Med Vet*, 148, pp.1–13.
- TORII, Y. et al., 1996. Demonstration of alkaline phosphatase participation in the

## Références bibliographiques

- mineralization of osteoblasts by antisense RNA approach. *Cell biology international*, 20(7), pp.459–464.
- Torkin, R. et al., 2005. Induction of caspase-dependent, p53-mediated apoptosis by apigenin in human neuroblastoma. *Molecular cancer therapeutics*, 4(1), pp.1–11. Available at: PM:15657348\http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15657348.
- Tortora, G.J. & Grabowski, S.R., 2002. *Principes d'anatomie et de physiologie*, De Boeck Supérieur.
- Triboulot, C. et al., 2001. Dietary (n-3) polyunsaturated fatty acids exert antihypertensive effects by modulating calcium signaling in T cells of rats. *The Journal of nutrition*, 131(9), pp.2364–2369.
- Tzianabos, A.O., 2000. Polysaccharide immunomodulators as therapeutic agents: structural aspects and biologic function. *Clinical microbiology reviews*, 13(4), pp.523–533.
- Urano, F. et al., 2000. Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. *Science*, 287(5453), pp.664–666.
- Vauzour, D., Corona, G. & Spencer, J.P.E., 2010. Caffeic acid, tyrosol and p-coumaric acid are potent inhibitors of 5-S-cysteinyl-dopamine induced neurotoxicity. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 501(1), pp.106–111.
- Vergne, S., 2007. Les isoflavones de soja: leur biodisponibilité chez l'Homme et leurs effets sur la différenciation d'une lignée ostéoblastique humaine. Thèse de doctorat. Bordeaux 1.
- Verkhatsky, A., 2007. Calcium and cell death. In *Calcium Signalling and Disease*. Springer, pp. 465–480.
- Viswanath, V., Urooj, A. & Malleshi, N.G., 2009. Evaluation of antioxidant and antimicrobial properties of finger millet polyphenols (*Eleusine coracana*). *Food Chemistry*, 114(1), pp.340–346.
- Vogelstein, B., Lane, D. & Levine, a J., 2000. Surfing the p53 network. *Nature*, 408(6810), pp.307–310.
- Wadayama, B. et al., 1994. Mutation spectrum of the retinoblastoma gene in osteosarcomas.

- Cancer research*, 54(11), pp.3042–3048.
- Wagner, E.F. & Nebreda, A.R., 2009. Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. *Nature reviews. Cancer*, 9, pp.537–549. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nrc2694>.
- Wagner, E.R. et al., 2011. Defective osteogenic differentiation in the development of osteosarcoma. *Sarcoma*, 2011.
- Wang, T. et al., 2016. Ferulic acid inhibits proliferation and promotes apoptosis via blockage of PI3K/Akt pathway in osteosarcoma cell. *American journal of translational research*, 8(2), p.968.
- Wang, X., 2001. The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes & development*, 15(22), pp.2922–2933.
- Wang, Y.-J. et al., 1997. Stability of curcumin in buffer solutions and characterization of its degradation products. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 15(12), pp.1867–1876.
- Wennberg, C. et al., 2000. Functional characterization of osteoblasts and osteoclasts from alkaline phosphatase knockout mice. *Journal of Bone and Mineral Research*, 15(10), pp.1879–1888.
- Wernick, R. & Campbell, S.M., 2000. Update in rheumatology. *Annals of internal Medicine*, 132(2), pp.125–133.
- Wybrecht, B. et al., 2002. Memento de l'agronome.
- Wyllie, A.H., Kerr, J.F.R. & Currie, A.R., 1980. Cell death: the significance of apoptosis. *International review of cytology*, 68, pp.251–306.
- Yao, L.H. et al., 2004. Flavonoids in food and their health benefits. *Plant foods for human nutrition*, 59(3), pp.113–122.
- Yasuda, H. et al., 1998. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(7), pp.3597–3602.

## Références bibliographiques

- Yessoufou, A. et al., 2009. Docosahexaenoic acid reduces suppressive and migratory functions of CD4CD25 regulatory T-cells. *Journal of lipid research*, 50(12), pp.2377–2388.
- Yorimitsu, T. & Klionsky, D.J., 2005. Autophagy: molecular machinery for self-eating. *Cell Death & Differentiation*, 12, pp.1542–1552.
- Yu, R. et al., 2001. Resveratrol inhibits phorbol ester and UV-induced activator protein 1 activation by interfering with mitogen-activated protein kinase pathways. *Mol Pharmacol*, 60(1), pp.217–224. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11408617>.
- Zang, L.-Y. et al., 2000. Effect of antioxidant protection by p-coumaric acid on low-density lipoprotein cholesterol oxidation. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 279(4), pp.C954–C960.
- Zechner, D. et al., 1997. A Role for the p38 Mitogen-activated Protein Kinase Pathway in Myocardial Cell Growth, Sarcomeric Organization, and Cardiac-specific Gene Expression. *The Journal of Cell Biology*, 139(1), pp.115–127. Available at: [http://jcb.rupress.org/content/139/1/115?ijkey=937db0dd47758f792aefb6777167bbfd85bcd3f2&keytype2=tf\\_ipsecsha](http://jcb.rupress.org/content/139/1/115?ijkey=937db0dd47758f792aefb6777167bbfd85bcd3f2&keytype2=tf_ipsecsha).
- Zhang, M. et al., 2009. The characterization of high-fat diet and multiple low-dose streptozotocin induced type 2 diabetes rat model. *Experimental diabetes research*, 2008.
- Zinszner, H. et al., 1998. CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum. *Genes & development*, 12(7), pp.982–995.