



Tlemcen N° D'ordre .....



République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche

Scientifique

UNIVERSITE de TLEMCEN

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et de l'Univers

**Département de Biologie**

*Laboratoire* de Biologie Moléculaire Appliquée et d'Immunologie

## MEMOIRE

Présenté par

**SARI Nidel**

*En vue de l'obtention du*

**Grade de Master**

Spécialité Immunologie

**Thème**

**Effet de la metformine et du sélénium sur l'expression du Bcl-2 dans le monocyte issu de la leucémie lymphoblastique aiguë T**

Soutenu le 18 juillet 2019, devant le jury composé de :

Président	SMAHI Mohammed Chems Eddine	professeur	Université de Tlemcen
Encadreur	ARIBI Mourad	Professeur	Université de Tlemcen
Examinatrice	EL MEZOUAR Chahrazed	MAA	Université de Tlemcen
Examinatrice	BRAHAMI Nabila	MCA	Université de Tlemcen

**Année universitaire 2018/2019**

## Résumé

**Introduction:** Les monocytes sont des cellules clefs de l'immunité non-adaptative. Au niveau du microenvironnement tumoral, elles peuvent soit favoriser soit prévenir la progression tumorale, selon leur orientation et leur mode de différenciation, et, par conséquent, leur état d'activation et leur survie pourraient être altérée.

**Objectifs:** Nous avons évalué l'effet de la metformine (Met) et du sélénium (sous la forme du sodium sélénite, Ss) combinés ou non sur l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 au niveau du monocyte issu de la leucémie aigüe lymphoblastique T (LLA-T).

**But:** Nous avons essayé de montrer que le Met associée ou non au Ss pourrait moduler les taux d'expression du Bcl-2 dans le monocyte issu de la LLA-T.

**Matériels et méthodes:** Les essais ont été effectués sur des cellules primaires. L'expression du Bcl-2 a été quantitativement évaluée par ELISA indirecte.

**Résultats:** Les taux de Bcl-2 ne présentaient pas de variations statistiquement significatives dans les monocytes cultivés dans différentes conditions en la présence ou en l'absence de la Met ou du Ss (Met-/Ss-, Met+/Ss-, Met-/ Ss+, Met+ /Ss+) ( $p > 0.05$  par le test ANOVA). Cependant, nous remarquons une faible augmentation du taux de Bcl-2 dans le groupe des monocytes traitées par la combinaison Met + Ss par rapport au groupe contrôle ( $p > 0,05$  par le test  $t$  de Student).

**Conclusions:** Le monocyte s'avère résistant à l'effet de la Met et du Ss, ce qui suggère que les deux molécules pourraient être de très bons agents thérapeutiques contre le cancer, car ils n'ont pas affecté le taux d'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 au niveau monocyttaire.

**Mots clés:** Bcl-2, leucémie lymphoblastique aigüe T, metformine, monocyte, sodium sélénite

**Abstract**

**Introduction:** Monocytes are key cells of non-adaptive immunity. In the tumor microenvironment, they can either promote or prevent tumor progression, depending on their orientation and mode of differentiation, and therefore their activation state and survival may be impaired.

**Objectives:** We evaluated the effect of metformin (Met) and selenium (in the form of sodium selenite, Ss) combined or not on the expression of anti-apoptotic protein Bcl-2 in monocyte derived from acute leukemia T lymphoblastic (LLA-T).

**Aim:** We have tried to show that the Met associated or not with Ss could modulate the expression of Bcl-2 levels in the monocyte derived from LLA-T.

**Materials and methods:** Assays were performed on primary cells. Expression of Bcl-2 was quantitatively evaluated by indirect ELISA.

**Results:** Bcl-2 levels did not show statistically significant variations in cultivated monocytes, either in presence or in absence of Met or Ss (Met-/Ss-, Met+/Ss-, Met-/ Ss+, Met+/Ss+) ( $p > 0.05$  using the test ANOVA). However, we observed a small increase in Bcl-2 levels in monocytes group treated by combination (Met+ /Ss+) than control group ( $p > 0,05$  using the test t de student).

**Conclusion:** Monocyte appears to be resistant to the effect of Met and Ss, which suggest that both molecules may be a very good therapeutic agent against cancer because they do not affect expression levels of anti-apoptotic protein Bcl-2 of the monocyte.

**Keywords:** Bcl-2, acute lymphoblastic leukemia , metformine , monocyte , sodium selenite

## الملخص

**المقدمة:** الخلايا أحادية النواة هي لخلايا الرئيسية للمناعة الطبيعية. في الوسط الورمي ، يمكنهم إمتاحفيز أو منع تطور الورمي ، وهذا يتوقف على اتجاههم وطريقة تمايزهم ، وبالتالي قد تتأثر حالة التنشيط والبقاء لديهم.

**الغاية من الدراسة:** قمنا بتقييم تأثير الميتفورمين و السيلينيوم مجتمعين او لا على تعبير البروتين المضاد للموت المبرمج في الخلية أحادية النواة المستمدة من سرطان الدم الليمفاوي الحاد T.

**أهداف الدراسة:** إبراز أن الميتفورمين و السيلينيوم يمكن أن يعدلا مستويات تعبير (ICB-2) الخلايا أحادية النواة المستمدة من سرطان الدم الليمفاوي الحاد T.

**المواد والأساليب:** تم إجراء الاختبارات على الخلايا الأولية. تم تقييم التعبير Bcl-2 كميًا بواسطة ELISA غير المباشر.

**النتائج:** مستويات (+Ss /- teM) (+Ss /-+teM) (-Ss /- teM) (teM+/-Ss) لم تظهر اختلافات في ظل الظروف المختلفة في وجود أو عدم وجود الميتفورمين و السيلينيوم و مع ذلك لاحظنا زيادة طفيفة في مستوى ICB-2 في مجموعة أحادية النواة التي تمت معالجتها بتركيبه (+ Ss /- teM+).

**الاستنتاج:** الخلايا أحادية النواة مقاومة لتأثير الميتفورمين و السيلينيوم هذا يشير إلي أن العلاجين يمكن أن يكونا عاملا علاجيا جيدا ضد السرطان لأنهما لم يؤثرًا على مستوى تعبير البروتين المضاد لموت الخلايا المبرمج في الخلايا أحادية النواة.

**الكلمات المفتاحية :** ICB-2, سرطان الدم الليمفاوي الحادT, الميتفورمين, خلايا أحادية النواة, السيلينيوم

## Avant-propos

Je tiens d'abord à remercier « Allah » le tout puissant et miséricordieux de m'avoir guidé, et donné la foi et le courage d'accomplir ce modeste travail.

A mon défunt père, l'école de mon enfance

*« Il y a quelque chose de plus fort que la mort, c'est la présence des absents, dans la mémoire des vivants ».*

Jean d'Ormesson

Ce travail a été réalisé au niveau de laboratoire de Biologie Moléculaire Appliquée et Immunologie, sous la direction du Pr. ARIBI Mourad qui m'a ouvert les portes de son laboratoire. Je vous adresse mes plus sincères remerciements. Que ce travail soit le témoignage de ma reconnaissance et de mon profond respect.

*« Le sage enseigne par ses actes, non par ses paroles ».*

Lao-Tseu

Je tiens à remercier les membres du jury, d'avoir accepté de juger ce travail, malgré leurs obligations professionnelles.

Je remercie également tous les membres du laboratoire de biologie moléculaire appliquée et d'immunologie (BIOMOLIM). Je tiens à remercier de façon plus particulière Mme HADJIJ Zineb, Merci infiniment pour ton inconditionnel soutien et ta disponibilité.

Je tiens à exprimer mes sincères remerciements à MESSALI Rabia et à Fekhraddine merci pour vos encouragements et vos conseils. Je remercie mes amis, Fella et Ilyes pour leur sincère amitié et confiance. A tous ces intervenants, je présente mes remerciements, mon respect et ma gratitude.

*Je dédie Ce travail à ma très chère maman, le symbole de la tendresse, qui a toujours été là pour moi, qui as tout sacrifié pour ses enfants n'épargnent ni santé ni efforts. Enfin, je remercie mon frère Ilyes, et mes sœurs Fadía et Wafaa et ma belle sœur et mes beaux frères, mes neuves et mes nièces et toutes les personnes que j'estime.*

## Table des matières

<b>Résumé</b>	<b>ii</b>
<b>Abstract</b>	<b>iii</b>
<b>Avant-propos</b>	<b>v</b>
<b>Table des matières</b>	<b>vi</b>
<b>Liste des figures</b>	<b>vii</b>
<b>Liste des abréviations</b>	<b>ix</b>
<b>Introduction</b>	
<b>Chapitre 1. Revue de la littérature</b>	<b>1</b>
1. Leucémie aiguë lymphoblastique à cellules T	1
1.1. Leucémie aiguë lymphoblastique	1
1.1.1. Généralités	1
1.1.2. Pathogenèse	1
1.1.3. Classification	1
1.2. Leucémie aiguë lymphoblastique à cellules T	2
1.2.1. Généralité	2
1.2.2. Classification	2
1.2.3. Diagnostic	3
1.2.4. Signes cliniques	3
1.2.5. Développement des lymphocytes T	3
1.2.6. Immunité et leucémie aiguë lymphoblastique à cellules T	4
2. Monocyte	4
2.1. Généralités	4
2.2. Sous-ensembles de monocytes	5
2.3. Monocytopoièse	5
2.4. Trafic de sous-ensembles de monocytes en circulation	7
2.5. Monocytes et leucémie	8
3. Le gène du lymphome à cellules B	8
3.1. Généralité	8
3.2. Famille Bcl-2	8
3.3. L'importance de la famille Bcl-2 dans T-LAL	9
3.4. Famille Bcl-2 des protéines régulatrices de l'apoptose	10
3.5. Bcl-2 protéine anti-apoptotique	11
3.6. Bcl-2 protéine anti-apoptotique et monocyte	12
4. Metformine	13
4.1 Généralités	13
4.2 Metformine et system immunitaire	14
4.3 Mécanisme d'action de la metformine	13

---

a) Chez les diabétiques	14
b) Chez les cancéreux	14
5. Sélénium	16
5.1. Généralités	17
5.2. Source nutritionnelle de sélénium	17
5.3. Sélénite de sodium	17
5.4. Sélénium et Système immunitaire	17
a) Système immunitaire innée	18
b) Système immunitaire adaptative	18
5.5. Sélénium et cancer	19
<b>Chapitre2. Matériels et méthodes</b>	<b>21</b>
<b>Chapitre 3. Résultats et interprétations</b>	<b>26</b>
<b>Chapitre 4. Discussion</b>	<b>27</b>
<b>Chapitre 5. Conclusion</b>	<b>29</b>
<b>Chapitre 6. Bibliographie</b>	<b>30</b>

## Liste des figures

- Figure 1.1.** Origine des monocytes et des macrophages à l'état d'équilibre et de la maladie.
- Figure 1.2.** Les rôles fonctionnels du sous-ensemble des monocytes.
- Figure 1.3.** Classification de la famille de Bcl-2.
- Figure 1.4.** Les deux voies principales de l'apoptose.
- Figure 1.5.** Le lilas français (*Galega officinalis*).
- Figure 1.6.** Structure chimique de la metformine.
- Figure 1.7.** Mécanismes d'actions de la metformine dans les cellules cancéreuses.
- Figure 1.8.** Effets physiologiques du sélénium.
- Figure 1.9.** Effets de la consommation du sélénium sur la différenciation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>.
- Figure 2.1.** Schéma récapitulatif de la partie matériel et méthodes.
- Figure 2.2.** Énumération des PBMCs sur cellules de Malassez.
- Figure 2.3.** Monocytes observés par microscope inversé.
- Figure 2.4.** Conditions de culture cellulaire.
- Figure 2.5.** Décongélation des cellules au bain marie.
- Figure 2.6.** Dosage du Bcl-2 par ELISA indirect (plaque à 96 puits).
- Figure 2.7.** Lecteur ELISA.
- Figure 3.1.** Effet de la metformine et du Sélénite de sodium combinés ou non sur l'expression du Bcl-2 dans les monocytes activés par du LPS.

## Liste des tableaux

**Tableau 1.1** Classification de l'OMS pour la leucémie aigüe lymphoblastique.

**Tableau 1.2** Classification des monocytes.

**Tableau 1.3** Caractéristiques de la protéine Bcl2.

---

## Liste des abréviations

- AMP:** adénosine monophosphate.
- AMPK:** AMP-activated protein kinase.
- ATP:** L'adénosine triphosphate.
- Bcl-2 :** B-cell lymphoma 2.
- CCR2 :** récepteur de chimiokine en C – C de type 2
- CCR5 :** récepteur de chimiokine en C – C de type 5
- CD :** clusters de différenciation
- CLP :** progéniteurs lymphoïdes communs
- CMH :** complexe majeur d'histocompatibilité.
- CMP :** progéniteurs myéloïdes communs
- CSH :** Cellules souches hématopoïétiques
- CX3CR1:** récepteur 1 de chimiokine CX3C
- DC :** dendritic cell.
- DN :** double négative
- DP :** double positive
- DT2 :** diabète de type 2
- EDTA :** Ethylène diamine tétra acétique
- ELISA :** Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
- FAB :** classification franco-américano-britannique
- GMP :** progéniteurs de granulocytes et de macrophages
- GPx :** La glutathion peroxydase
- HLA :** antigène humain des leucocytes
- IFN :** interféron.
- IL :** interleukine
- LA :** leucémie aiguë
- LLA :** leucémie lymphoblastique aiguë
- LLA-T :** La leucémie lymphoblastique aiguë à cellules T
- LCR :** liquide cérébro –spinale
- MEP :** progéniteurs de mégacaryocytes-érythrocytes
- MO :** Monocyte
- mTOR :** mammalian target of rapamycin
- OMS :** Organisation mondiale de la santé
- PBMC :** Cellule mononucléaires sanguine périphérique
- PBS :** phosphate buffered saline.
- RE :** réticulum endoplastique
- ROS :** espèces réactives de l'oxygène

**SP** : simple positive

**Tcr** : récepteur des cellules T

**TD2** : diabète de type 2

**TIE2** : le récepteur de l'angiopietine -1

**TMB** : Tetra methyl benzidine

**TNF** : facteur de nécrose tumorale

**VEGF** : récepteur du facteur de croissances endothélial vasculaire

### Introduction

Chaque année, il y'a 351000 nouveaux cas de leucémie dans le monde qui représentent 2,8% de tous les cancers et 3,4% des décès par cancer. La leucémie se caractérisent par une prolifération intense de blastes immunitaires leucémiques arrêtés à différents stades de différenciation respectivement dans les lignées lymphoïdes ou myéloïdes(Rosilio et al., 2014).

Par ailleurs ,la reconnaissance des antigènes exprimés par les cellules tumorales conduit au déclenchement de divers réactions assurées par les cellules du système immunitaires tels que les monocytes (Cavaillon, 2011).Les monocytes sont une population hétérogène des cellules mononucléaires sanguines, impliquées dans la réponse inflammatoire et le maintien de l'homéostasie tissulaire (Rahman et al., 2017), selon leurs polarisations, leurs types ainsi que les conditions présentes dans le microenvironnement tumorale les monocytes peuvent soit inhiber soit favoriser la prolifération tumorale(Ibberson et al., 2013).

La famille de la protéine Bcl-2, est la marque de régulation de l'apoptose (Evangelisti et al., 2018) .Il est probable que les cellules cancéreuses nécessitent un blocage de l'apoptose pour survivre, La surexpression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 est fréquemment observée dans les cancer y compris les leucémies (Del Gaizo Moore et al., 2008).

La metformine (Met, chlorhydrate de 1,1-diméthylbiguanide) est un médicament de la classe de biguanide à action antihyperglycémique, largement utilisé en clinique(Meziane et al., 2019). La metformine semble avoir des propriétés pléiotropes ,plusieurs études ont démontré qu' elle possède un effet antiprolifératif sur les cellules cancéreuses Médie par des voies de signalisation dépendantes et indépendantes de l'AMPK(Daugan et al., 2016).

Le sélénium est considéré comme un oligo-élément nécessaire à la santé humaine (Rayman, 2012). Des études ont montré que les personnes présentant des niveaux élevés de sélénium dans leur alimentation ou dans leurs tissus corporels présentaient un risque de cancer moins élevé et Certaines études de laboratoire ont montré que le sélénium pouvait inhiber la croissance des cellules cancéreuses(Vinceti et al., 2018).

Ainsi ce travail a pour objectif d'évalué les effets de la metformine (Met, chlorhydrate de 1,1-diméthylbiguanide) et du sélénite de sodium (Ss, Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>) combinés ou non sur les activités fonctionnelles du Bcl2 des monocytes issue de la leucémie aigue lymphoblastique à cellule T.

## Chapitre 1 Revue de littérature

### 1. Leucémie aiguë lymphoblastique à cellules T

#### 1.1. Leucémie aiguë lymphoblastique

##### 1.1.1. Généralités

La leucémie lymphoblastique aiguë (LLA) est une transformation et une prolifération maligne des cellules progénitrices lymphoïdes dans la moelle osseuse, le sang et les sites extramédullaires. Alors que 80% de la LLA survient chez les enfants, cela représente une maladie dévastatrice chez les adultes (Kulsoom et al., 2018; Terwilliger and Abdul-Hay, 2017).

##### 1.1.2. La pathogenèse

La pathogenèse de la LLA implique la prolifération anormale et la différenciation d'une population clonale de cellules lymphoïdes. Des études menées ont mis en évidence des syndromes génétiques prédisposant à une minorité de cas de LLA, tels que le syndrome de Down, l'anémie de Fanconi, le syndrome de Bloom, l'ataxie télangiectasie et le syndrome de Nijmegen. Autres facteurs prédisposants comprennent l'exposition aux rayonnements ionisants, aux pesticides, à certains solvants ou à des virus tels que le virus d'Epstein-Barr et le virus de l'immunodéficience humaine. Cependant, dans la majorité des cas, il apparaît comme une tumeur maligne de novo chez des individus auparavant en bonne santé (Terwilliger and Abdul-Hay, 2017).

##### 1.1.3. Classification

Il existe actuellement deux types de classifications pour les LLA : La classification franco-américano-britannique (FAB) la moins utilisée et la classification de l'Organisation mondiale de la santé (OMS).

- La classification FAB est basée sur les critères morphologiques (la taille de la cellule, le cytoplasme, les nucléoles, la vacuolisation et la basophilie.) divisant LLA en 3 sous-types (L1, L2 et L3)(Terwilliger and Abdul-Hay, 2017).

- La classification OMS

Leucémie / lymphome lymphoblastique à cellules B, non spécifié ailleurs
Leucémie / lymphome lymphoblastique à cellules B, avec anomalies génétiques récurrentes
Leucémie lymphoblastique à lymphocytes B / lymphome avec hypodiploïdie
Leucémie lymphoblastique à lymphocytes B / lymphome avec hyperdiploïdie
Leucémie / lymphome lymphoblastique à cellules B avec t (9; 22) (q34; q11.2) [BCR-ABL1]
Leucémie / lymphome lymphoblastique à cellules B avec t (v; 11q23) [MLL réarrangé]
Leucémie / lymphome lymphoblastique à cellules B avec t (12; 21) (p13; q22) [ETV6-RUNX1]
Leucémie / lymphome lymphoblastique à cellules B avec t (1; 19) (q23; p13.3) [TCF3-PBX1]
Leucémie / lymphome lymphoblastique à cellules B avec t (5; 14) (q31; q32) [IL3-IGH]
Leucémie / lymphome lymphoblastique à cellules B avec amplification intrachromosomique du chromosome 21 (iAMP21)
Leucémie / lymphome lymphoblastique à cellules B avec translocations impliquant des récepteurs à tyrosine kinases ou des cytokines («ALL de type BCR-ABL1»)
Leucémie lymphoblastique à lymphocytes T / lymphomes
Leucémie lymphoblastique précurseur des lymphocytes T précoces

**Tableau1.1** : Classification de l'OMS pour la leucémie aiguë lymphoblastique (Terwilliger and Abdul-Hay, 2017)

## 1.2 La leucémie aiguë lymphoblastique à cellules T

### 1.2.1. Généralité

La leucémie lymphoblastique aiguë à cellules T (LLA-T) est une maladie agressive causée par une hémopathie maligne du sang qui résulte de la transformation de progéniteurs immatures amorcés pour le développement des cellules T (Bongiovanni et al., 2017; Evangelisti et al., 2018; Kermezli et al., 2019).

### 1.2.2. Classification

La LLA-T est basé sur le stade de maturation du développement thymique normal auquel la transformation se produit, elle peut être classiquement sous classée en corticole précoce, corticole tardive ou mature. Récemment, un nouveau sous-groupe appelé LLA-T progéniteur de la lignée précoce (ETP-LLA) présente un bloc aux premiers stades de la

différenciation des lymphocytes T et manque d'expression de plusieurs marqueurs de surface des lymphocytes T [Cluster of Differentiation (CD) 1a , CD8 et CD5], mais exprime à la place des marqueurs myéloïdes, a été décrite (Bongiovanni et al., 2017).

### 1.2.3. Diagnostic

Les techniques de biologie moléculaire sont aujourd'hui devenues indispensables. Leur sensibilité élevée et les possibilités de standardisation en ont fait des outils de choix dans l'évaluation diagnostique et pronostique des maladies.

Le diagnostic est établi par la présence de 20% ou plus de lymphoblastes dans la moelle osseuse ou le sang périphérique. La cytométrie en flux, de l'immunophénotypage et des tests cytogénétiques sont utiles tant pour confirmer le diagnostic que pour la stratification du risque, ainsi que La ponction lombaire avec l'analyse du liquide cérébro-spinal(LCR). Une autre évaluation comprend une numération globulaire complète et un frottis pour évaluer les autres lignées de cellules hématopoïétiques, les profils de coagulation et les compositions chimiques du sérum, les valeurs initiales d'acide urique, de calcium, de phosphate et de lactate déshydrogénase doivent être consignées pour surveiller le syndrome de lyse tumorale (Terwilliger and Abdul-Hay, 2017).

### 1.2.4. Signes cliniques

La plupart des manifestations cliniques de la LLA-T reflètent une infiltration diffuse de la moelle osseuse, le sang périphérique et les sites extramédullaires par des blastes de lymphocytes T immatures (Bongiovanni et al., 2017).

La présentation peut être non spécifique, avec une combinaison de symptômes constitutionnels et des signes d'insuffisance médullaire (anémie, thrombocytopénie, leucopénie).

Les symptômes courants incluent :

- Les patients atteints présentent souvent de la fièvre (Les états fébriles sont généralement associés à des processus infectieux qui génèrent une réponse inflammatoire impliquant diverses molécules, notamment des cytokines)(Pérez-Figueroa et al., 2016).
- La perte de poids, sueurs nocturnes, saignements ou ecchymoses faciles, fatigue, dyspnée et infection.
- Une atteinte des sites extramédullaires est fréquente et peut provoquer une adénopathie, une splénomégalie ou une hépatomégalie chez 20% des patients.

### 1.2.5. Développement des lymphocytes T

Les lymphocytes T sont l'un des principaux acteurs de l'immunité adaptative. Le développement des cellules T dans le thymus nécessite des réarrangements des gènes du récepteur des cellules T (*Tcr*) *régulés dans le temps* et une série d'événements de sélection, par lesquels les complexes de TCR nouvellement assemblés signalent les processus de survie, de prolifération et de différenciation des cellules. Le locus *Tcrb* se réorganise dans les thymocytes les plus immatures, appelés CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> thymocytes double négatives (DN). Les thymocytes ayant réarrangé avec succès un allèle *Tcrb* se différencient en CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> thymocytes doubles positifs (DP) dans un processus connu sous le nom de  $\beta$ -sélection. Ce processus est conduit par la signalisation via le pré-TCR, qui est composé du TCR $\beta$  et de la protéine pT $\alpha$  invariante, et par la coopération avec la voie de signalisation Notch. Le processus de  $\beta$ -sélection déclenche l'activation des réarrangements et de la transcription de *Tcra* ainsi que des voies intracellulaires complexes, entraînant de larges changements dans les programmes transcriptionnels et épigénétiques des lymphocytes T immatures. L'expression d'un gène *Tcra* fonctionnellement réarrangé conduit à la formation d'un hétérodimère de TCR $\alpha\beta$  variable et, finalement, à la sélection de cellules exprimant TCR $\alpha\beta$  qui se différencieront de manière terminale en CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup> lymphocytes T simples positifs (SP). Les perturbations de ces procédés génétiques et épigénétiques peuvent donner lieu à la transformation oncogénique des précurseurs de cellules T tel que la Leucémie et le lymphome ou des pathologies liées au système immunitaire (Saadi et al., 2019).

### 1.2.6. Immunité et La leucémie lymphoblastique aiguë à cellules T

Bien qu'un certain nombre de modifications génétiques et épigénétiques au sein des cellules leucémiques fournissent des antigènes qui devraient être facilement reconnus par le système immunitaire, il a été rapporté que les blastes leucémiques réduisent les molécules de l'antigène humain des leucocytes (HLA) et en altèrent les propriétés de présentation et d'activation des cellules T.

Les réponses immunitaires intrinsèques à la leucémie aiguë sont inhibées par divers mécanismes, tels que l'expression de l'antigène aberrant par les cellules leucémiques, la sécrétion de cytokines immunosuppressives, d'autres mécanismes de fuite immunitaire incluent la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) par les cellules leucémiques elles-mêmes ou dans leur microenvironnement et une altération de la fonction des cellules tueuses naturelles (NK) (Knaus et al., 2017).

En outre, le sous-ensemble de monocytes CD14<sup>+</sup> CD16<sup>+</sup>, y compris les monocytes intermédiaires et non classiques, chez les patients atteints de LA augmentait de manière significative en nombre et que la proportion de ce sous-ensemble évoluait parallèlement à l'évolution de la maladie. Dans diverses tumeurs malignes solides et hématologiques, le nombre de monocytes absolus (AMC) au moment du diagnostic a une signification pronostique. La proportion de monocytes CD14<sup>+</sup> CD16<sup>+</sup> est liée à la progression de la leucémie aiguë et l'expansion de ce sous-ensemble de monocytes peut indiquer la gravité de la maladie (Friedman et al., 2016; Jiang et al., 2015).

## 2. Monocyte

### 2.1. Généralités

Les monocytes (MO) sont des cellules myéloïdes dérivées de la moelle osseuse qui circulent dans le sang pendant l'état d'équilibre (Brempeles and Crispe, 2016). Ils sont un sous-ensemble des globules blancs (Mytych et al., 2017), qui font partie du système des phagocytes mononucléés, ils proviennent de progénitures médullaires. Les MO se caractérisent par un noyau en fer à cheval et par un cytoplasme parsemé de fines granulations (Shi and Pamer, 2011).

### 2.2. Sous-ensembles de monocytes

Les Mo sont classés en trois sous-populations en fonction de leurs récepteurs de surface comme le CD16 (récepteur IgG à faible affinité) et le récepteur CD14 (récepteur des lipopolysaccharides) (Arfvidsson et al., 2017) comme cela figure dans le Tableau 1.2.

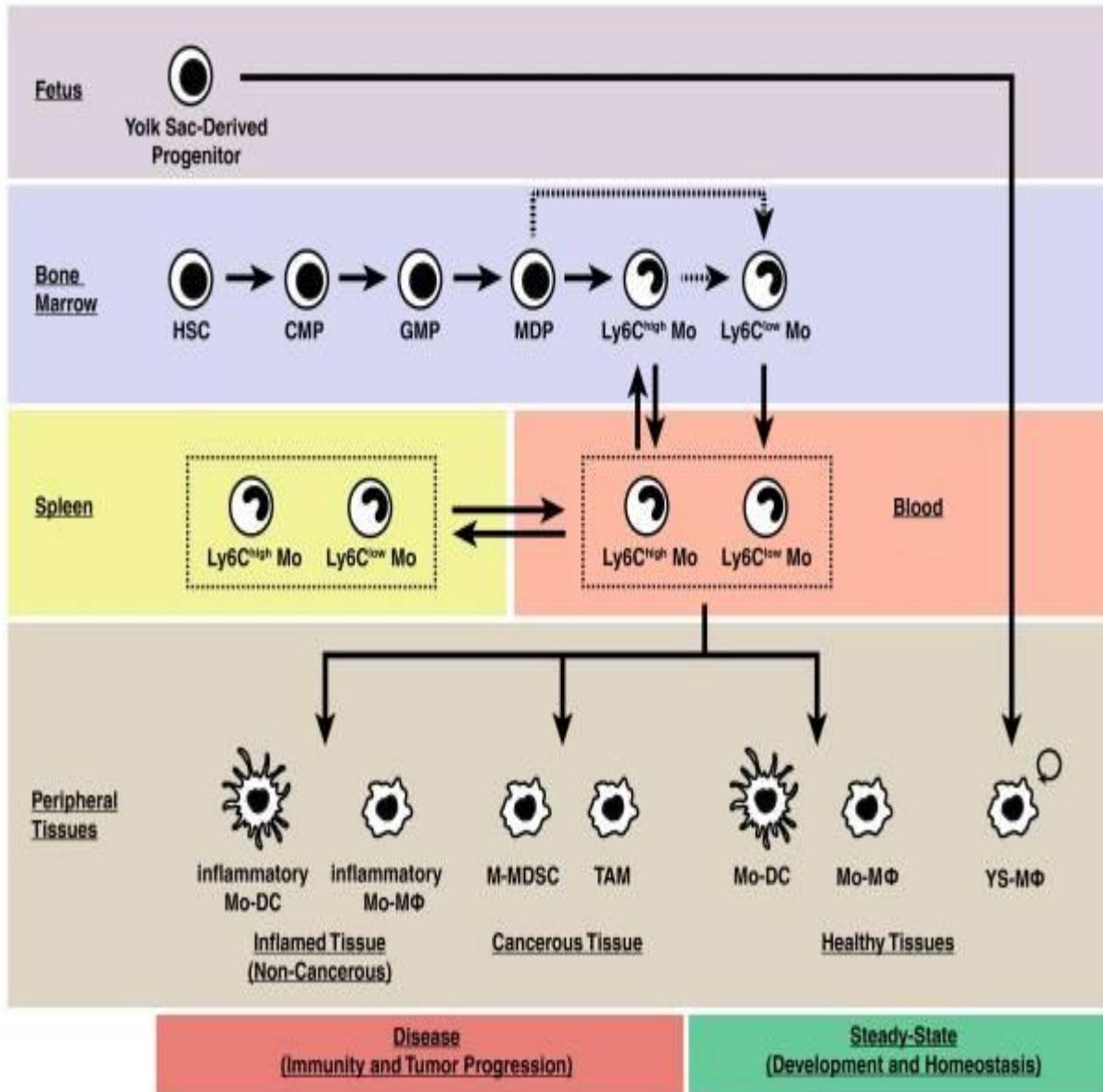
Monocytes	Les marqueurs de surface		% de monocyte dans le sang
	CD14 <sup>high</sup>	CD16 <sup>low</sup>	
Classique	CD14 <sup>high</sup>	CD16 <sup>low</sup>	85%
Non classique	CD14 <sup>low</sup>	CD16 <sup>high</sup>	10%
Intermédiaire	CD14 <sup>high</sup>	CD16 <sup>high</sup>	5%

**Tableau 1.2 :** Classification des monocytes (Italiani and Boraschi, 2014; Thaler et al., 2016).

D'autres sous-ensembles de Mo et leurs progéniteurs existent probablement, mais n'ont pas encore été identifiés. La découverte de nouveaux sous-ensembles et des facteurs de transcription contrôlant leur développement fourniraient de nouvelles informations sur les maladies inflammatoires chroniques telles que l'athérosclérose et le cancer, dans lesquels les Mo et les macrophages jouent un rôle clé (Zhu et al., 2016).

### **2.3. Monocytopoièse**

Différents sous-ensembles de monocytes (Mo) sont générés dans la moelle osseuse à partir de cellules souches hématopoïétiques (CSH) via les progéniteurs myéloïdes (CMP), les progéniteurs de granulocytes-macrophages (GMP) et des progéniteurs dendritiques (Mo-DC) / (Mo-MΦ). Actuellement, l'origine des monocytes bas Ly6C n'est pas claire (lignes pointillées). Les sous-ensembles de monocytes sont mobilisés par la moelle osseuse dans la circulation sanguine et forment un réservoir local dans le taux. Les monocytes sont à l'état d'équilibre, ils sont recrutés dans les différents tissus et la naissance des populations de macrophages dérivés de monocytes (Mo-MΦ) et de CD (Mo-DC) l'homéostasie. Il est important de noter que ces populations sont distinctes des macrophages dérivés du sac vitellin (YS-MΦ), renouvelées localement et indépendamment des monocytes, et des CD dérivées des progéniteurs de CD courants. Dans les conditions inflammatoires, la mobilisation des monocytes et leur recrutement dans les tissus sont considérablement améliorés, ce qui conduit à la génération de populations de macrophages inflammatoires et de PED dérivées de monocytes, supportant les réponses immunitaires innées et adaptatives (Richards et al., 2012).



**Figure 1.1:** Origine des monocytes et des macrophages à l'état d'équilibre et de la maladie (Richards et al., 2012).

#### 2.4. Trafic de sous-ensembles de monocytes en circulation

Les Mo quittent la moelle osseuse de manière classique (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup>), les cellules qui ont une capacité antimicrobienne élevée en raison de leur potentielle de phagocytose. Les Mo classiques peuvent envahir directement les tissus enflammés et se différencier en MO à /ou CD, ou ils peuvent se différencier en Mo intermédiaires (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup>) dans la circulation. La haute expression de certains récepteurs et marqueurs, tels que HLA-DR et CD74, prédispose les Mo intermédiaires au rôle de présentation d'antigène. De plus, ils produisent des niveaux élevés d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et médiateurs

inflammatoires (tels que le TNF et le IL-1) ; ils régulent positivement divers récepteurs de chimiokines (tels que CCR2, CCR5 et CX3CR1). Les Mo intermédiaires peuvent se différencier en non classique (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup>) les monocytes, qui patrouillent l'interface endothélial-sang et affichent un comportement rampant. Les Mo peuvent envahir l'endothélium, renouvelant ainsi le pool de MO et de CD(Figure2).

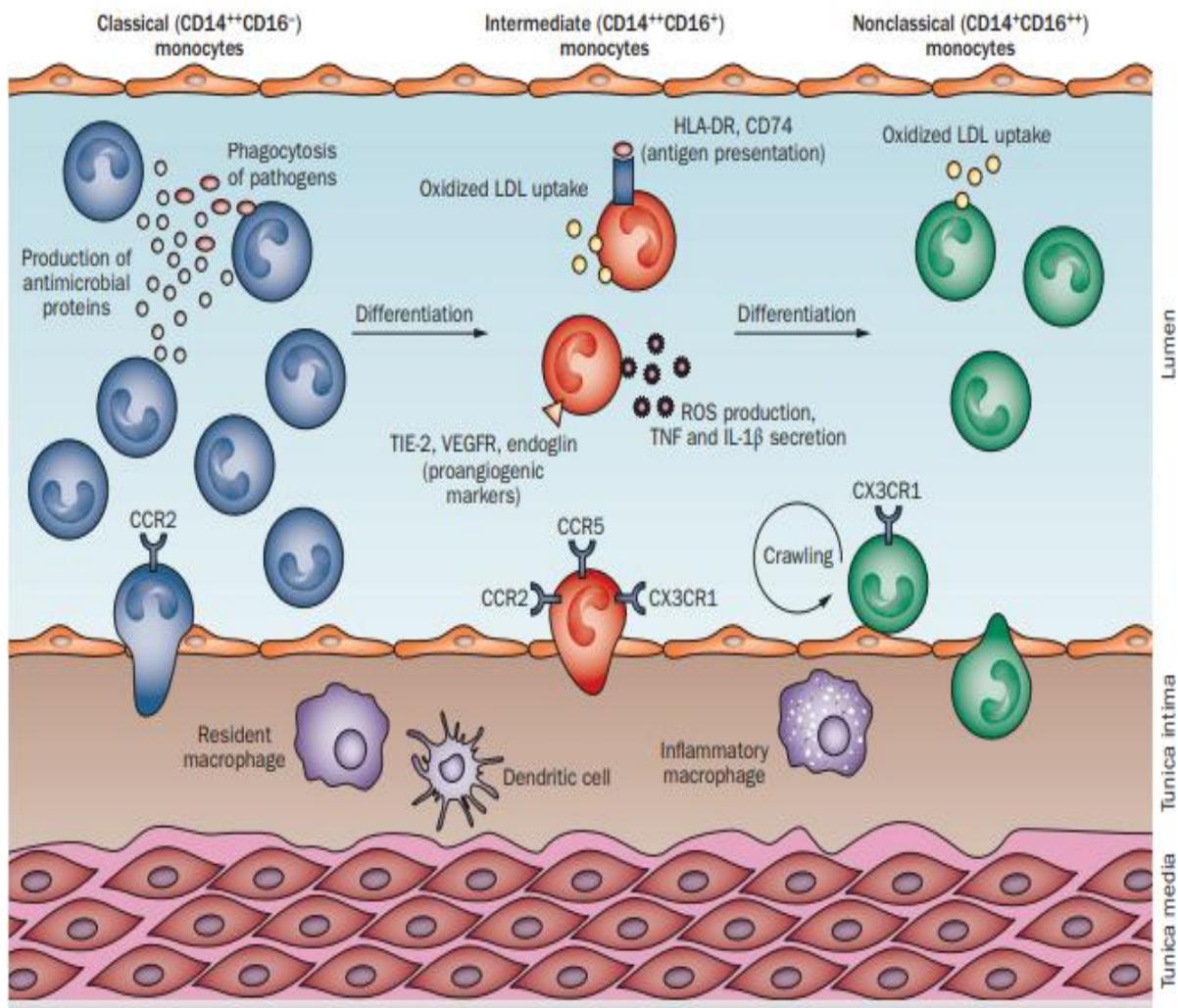


Figure 1.2 : Les rôles fonctionnels du sous-ensemble des monocytes (Heine et al., 2012).

## 2.5. Monocytes et leucémie

Un microenvironnement tumoral altéré est reconnu comme une caractéristique du cancer .Dans la leucémie lymphocytaire ,une tumeur maligne incurable avec un spectre d'agressivité clinique, de nombreuses études ont confirmé le concept selon lequel les phagocytes mononuclées (monocytes et macrophages) sont dérivés de monocytes de sang périphérique inflammatoires ou de macrophages résidants dans les tissus , dans le

microenvironnement tumoral, moduler la viabilité des cellules Leucémique .Les monocytes en circulation pourraient contribuer à la population de macrophages associés à la leucémie dans les ganglions lymphatiques, la rate et la moelle osseuse. Un taux élevé de monocytes les monocytes du sang en circulation reflètent le microenvironnement des ganglions lymphatiques et de la moelle osseuse. Des macrophages de soutien ou des cellules de type infirmière ont été établis en tant que constituants importants de ce microenvironnement, favorisant la viabilité des cellules leucémique et offrant une protection contre de nombreuses thérapies dirigées contre la leucémie (Friedman et al., 2016).

### 3. Le gène du lymphome à cellules B 2

#### 3.1. Généralités

Le gène du lymphome a cellules B2 (Bcl-2 )a été identifié à l'origine au seuil de t (14; 18) dans le lymphome folliculaire, et sa découverte a conduit à l'identification d'une famille de protéines contrôlant l'engagement de l'apoptose en utilisant la voie mitochondriale, ou intrinsèque(Del Gaizo Moore et al., 2008). L'homéostasie des cellules T nécessite de maintenir un équilibre délicat entre les taux de mort cellulaire (apoptose) et de prolifération cellulaire, la famille des gènes Bcl-2 sont un des gènes les plus importants contrôlant la mort cellulaire.

#### 3.2. La famille Bcl2

La famille de protéines Bcl-2 de mammifères comprend au moins 30 protéines apparentées, caractérisées par la présence de quatre motifs de séquence relativement courts, appelés domaines d'homologie Bcl-2 (BH). La famille Bcl-2 est divisée en trois sous-classes différentes basées sur des caractéristiques structurelles et fonctionnelles (Figure 1.3) :

- a) La famille des protéines anti-apoptotiques : qui comprend Bcl-2 MCL-1, BCL-XL, Bcl-w et BFL-1, qui possèdent les quatre domaines BH conservés, appelés BH1-4, et une partie C-terminale hydrophobe. Les domaines BH1-BH3 forment un sillon hydrophobe et le domaine BH4 N-terminal stabilise cette structure(Le domaine BH4 est généralement absent des protéines apoptotiques et constitue donc un facteur clé de l'activité anti-apoptotique).
- b) La famille des protéines pro-apoptotiques : qui comprend BAX et BAK, qui partagent toutes une homologie homogène dans plusieurs homologies de BCL-2 (BH) domaines.

c) La famille des protéines BH3 uniquement : Ces protéines ont une homologie dans un seul domaine, le domaine BH3, qui est essentiel à leur fonction pro-apoptotique. Les protéines BH3 uniquement se distinguent en 2 catégories, activatrices et sensibilisantes. (Del Gaizo Moore et al., 2008; Tzifi et al., 2012).

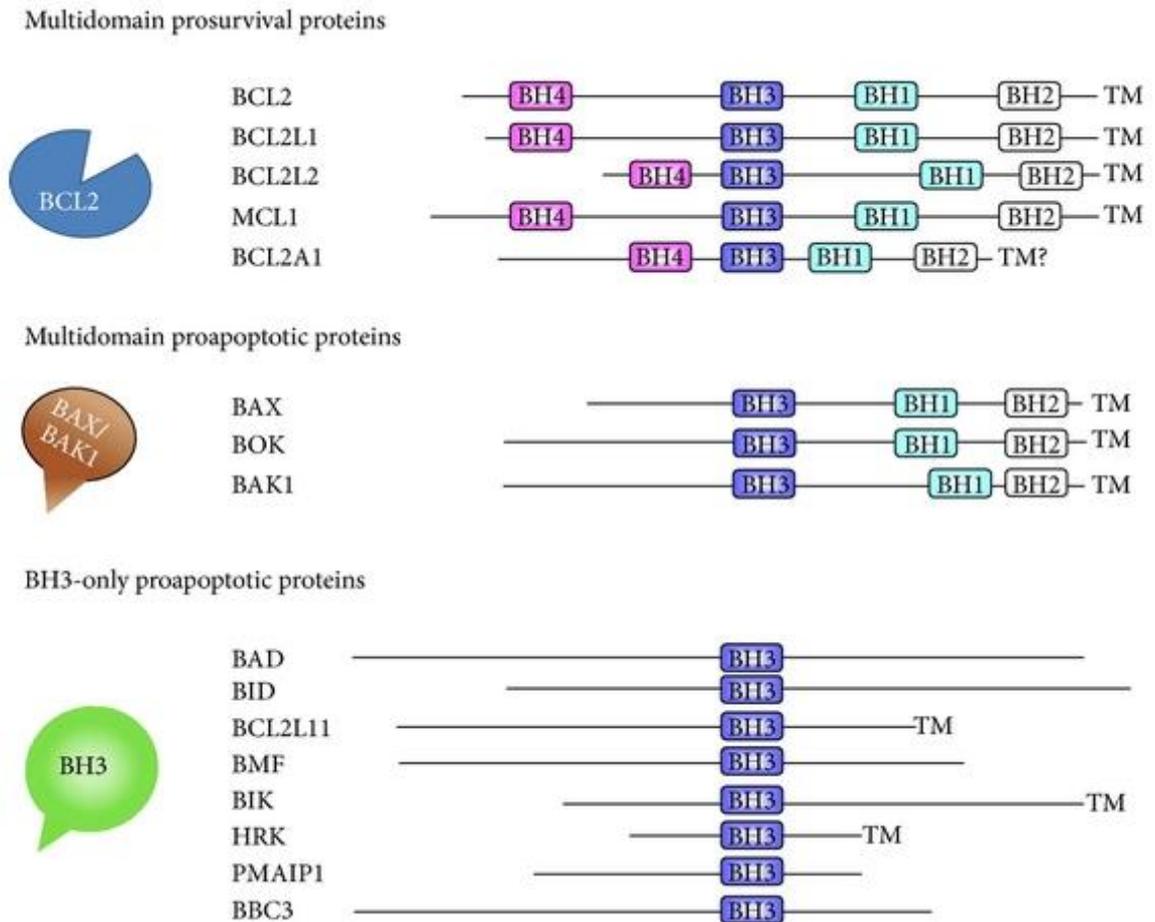


Figure 1.3 : Classification de la famille Bcl-2(Olsson et al., 2016).

### 3.3. L'importance de la famille Bcl-2 dans LAL-T

Normalement, les thymocytes ne survivront jusqu'à la maturité que s'ils peuvent réorganiser de manière productive leurs récepteurs de cellules T (TCR) de manière à ce qu'ils réagissent avec des antigènes étrangers et ne réagissent pas avec les antigènes «autonomes».

L'homéostasie des cellules T nécessite de maintenir un équilibre délicat entre les taux de mort cellulaire (apoptose) et de prolifération cellulaire(Saadi et al., 2019), la grande majorité des thymocytes qui ne parviennent pas à réorganiser leurs TCR de cette manière sont éliminés par activation des membres pro-apoptotiques de la famille Bcl-2, suivis de la mort

cellulaire induite par les caspases. Une signalisation défectueuse par cette voie permettrait aux thymocytes destinés à être détruits de survivre et d'acquérir des lésions supplémentaires qui favorisent une transformation maligne complète. Ceci suggère que les cellules LLA –T pourraient avoir acquis une dépendance à cette voie spécifique dont les actions perturbent l'équilibre normal entre Les signaux de signalisation de vie ou de mort des thymocytes (Sanda et al., 2013).

### **3.4. Famille Bcl-2 des protéines régulatrices de l'apoptose**

Le gène Bcl-2 est un important régulateur de la mort cellulaire (apoptose)(Saadi et al., 2019), est un programme de suicide cellulaire, qui est activé dans des processus physiologiques tels que le développement et la différenciation des tissus, ainsi que dans des conditions physiopathologiques(Tzifi et al., 2012) .La famille de protéines Bcl-2 joue un rôle important dans la régulation du programme cellulaire d'apoptose. L'homéostasie cellulaire normale semble dépendre de l'équilibre entre les membres pro et anti-apoptotiques de la famille

Bcl-2.

Deux voies distinctes conduisant à l'apoptose sont connues (Figure 1.4). La première, appelée voie de mort cellulaire intrinsèque, est provoquée par des stress intracellulaires tels que les radiations, le retrait du facteur de croissance, la privation de cytokines, les médicaments cytotoxiques et est régulée par les protéines de la famille Bcl2 .La progression par cette voie conduit à la libération du cytochrome c de la mitochondrie endommagée, qui se lie ensuite à la molécule adaptatrice APAF-1 et à une caspase «initiatrice» inactive, procaspase 9, au sein d'un complexe multiprotéique appelé apoptosome. Cela conduit à l'activation de la caspase 9, qui déclenche ensuite une cascade d'activation des caspases (caspases 3 et 7), entraînant les modifications morphologiques et biochimiques associées à l'apoptose. La deuxième voie de mort cellulaire est la voie extrinsèque, qui fonctionne indépendamment des mitochondries. Cette voie est activée par les protéines de la famille des récepteurs CD95 (Apo-1 ou Fas) / TRAIL / facteur de nécrose tumorale (TNF) de la surface cellulaire qui sont situées sur la membrane plasmique(Tzifi et al., 2012).

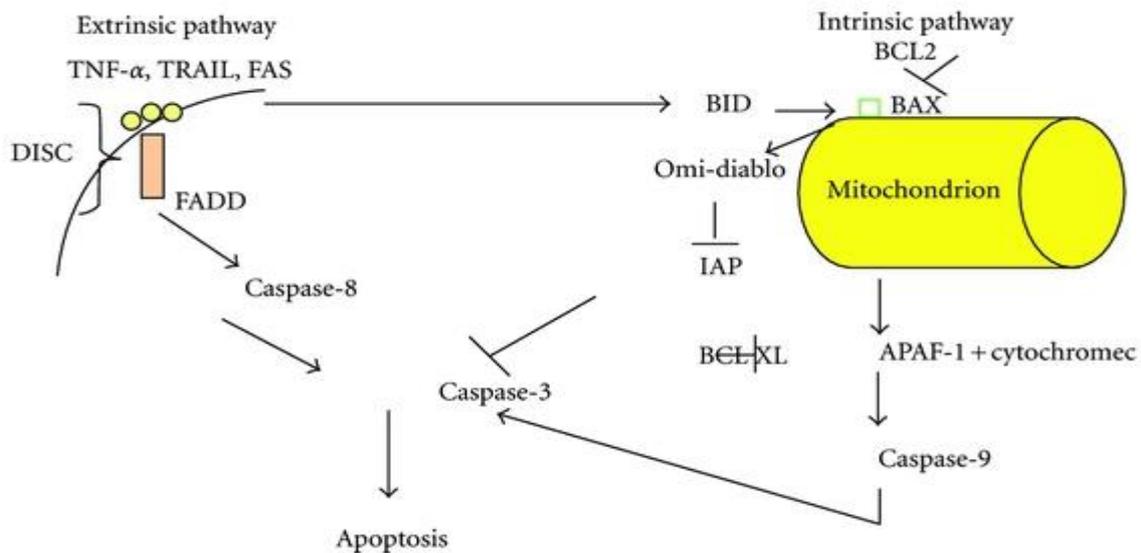


Figure 1.4 : Les deux voies principales de l'apoptose (Tzifi et al., 2012).

### 3.5. Bcl-2 protéine anti-apoptotique

Les cellules cancéreuses acquièrent des perturbations dans les voies de transduction du signal et dans les mécanismes homéostatiques qui déclencheraient l'apoptose dans les cellules normales. Ces anomalies comprennent l'instabilité génomique, l'activation oncogène et la prolifération indépendante du facteur de croissance. Par conséquent, les cellules cancéreuses nécessitent probablement un blocage de l'apoptose pour survivre. La surexpression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 qui bloque l'apoptose est fréquemment observée dans les cellules cancéreuses.

Molécule	Action	Mécanisme d'action	Localisation sub cellulaire
Bcl-2	-Anti apoptotique - La régulation du stockage du calcium dans le réticulum endoplasmique (RE).	- Inhibe l'apoptose en supprimant la libération du cytochrome C. - Maintien de l'homéostasie membranaire en préservant l'intégrité de membrane mitochondriale.	-Membrane mitochondriale externe (présente de manière permanente) -Enveloppe nucléaire -Membrane de l'RE

Tableau 1. 3 : Caractéristiques de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 (Sanda et al., 2013).

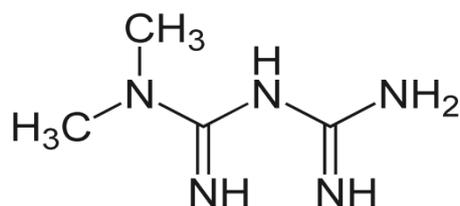
### 3.6. Bcl-2 protéine anti-apoptotique et monocyte :

Les effets bénéfiques de l'expression de Bcl-2 spécifique aux monocytes sont associés à l'inhibition de l'apoptose des cellules mononuclées infiltrés, à la normalisation des niveaux de protéine C-réactive en circulation, à l'atténuation des infiltrats cellulaires, à l'activation des macrophages et à la production de cytokines proinflammatoire ,du facteur de nécrose tumorale (TNF)-  $\alpha$ , interleukine(IL) -1 $\beta$  et IL-6 (Niu et al., 2006).

## 4. Metformine

### 4.1. Généralité

La metformine (Met, chlorhydrate de 1,1-diméthylbiguanide) est un médicament de la classe des biguanides à action antihyper glycémique, largement utilisé en clinique (Meziane et al, 2019) . Prescrit pour la première fois en Europe en 1979 et maintenant dans le monde entier à plus de 120 millions de personnes atteintes de diabète de type 2 (DT2). (Rosilio et al., 2014)



**Figure 1.5** : Structure chimique de la metformine.

La Met connue sous l'appellation commerciale de Glucophage est dérivée de la galegine, un produit naturel issu de la plante *Galega officinalis* (Rena et al., 2017) ,une plante utilisée depuis le milieu âge pour le traitement du diabète (Rosilio et al., 2014b). La Met a récemment été mis en évidence pour ses effets antitumoraux et préventifs contre le cancer. De plus, le potentielle rôle thérapeutique de Met peut être étendu dans diverses conditions, notamment :diabète, cancer, infections et plusieurs maladies inflammatoires (Meziane et al., 2019).



**Figure 1.6 :** Lilas français (*Galega officinalis*)

#### **4.2 Metformine et system immunitaire**

Dans l'activation de l'AMPK, la Met peut inhiber les voies pro-inflammatoires, qui peuvent jouer un rôle important dans l'initiation et la promotion de la carcinogenèse, Dans le microenvironnement de la tumeur, la Met inhibe la synthèse de nombreuses cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF, l'interleukine-6, l'interleukine-8(Takemura et al., 2007). Ainsi, la Met peut aussi stimuler les cellules immunitaires et plus particulièrement les lymphocytes T, qui sont responsables d'une réponse cytotoxique contre les cellules cancéreuses ,diminuer le nombre de LTreg immunosuppresseurs(Memmott et al., 2010), elle est aussi capable de bloquer la polarisation des macrophages de type M2 via la voie AMPK , Cette immuno-modulation des réponses immunitaires innées et adaptatives confère une protection contre la croissance tumorale(Ding et al., 2015).

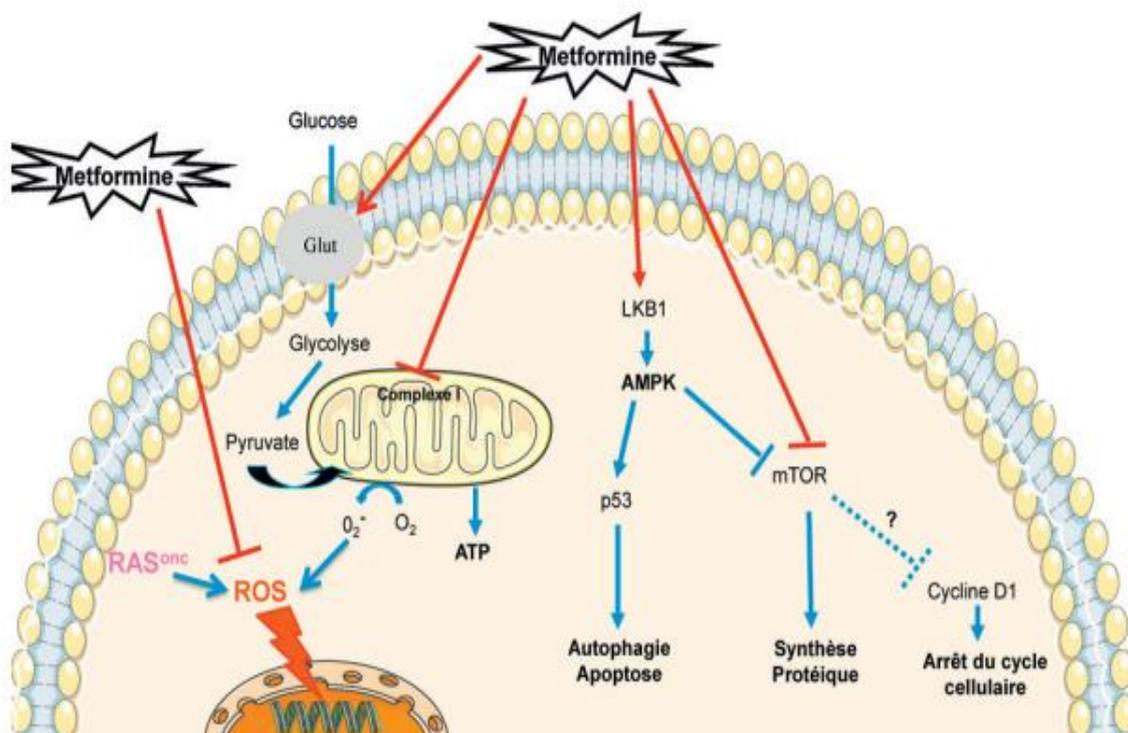
#### **4.3 Mécanisme d'action de la metformine**

##### **a) Chez les diabétiques**

Chez les patients diabétiques, les mécanismes d'action de la Met sont bien connus au niveau du foie, du cœur, du tissu adipeux et du muscle squelettique. Ses effets sur la glycémie sont principalement dus à une diminution de la production hépatique de glucose, une augmentation de la sensibilité musculaire à l'insuline et à une meilleure utilisation du glucose par le tissu adipeux et les muscles qui entraînent une diminution de la glycémie et de l'insulinémie. La Met possède également une action cardioprotectrice chez ces patients diabétiques via ses effets antihyperglycémiques et ses effets bénéfiques sur le métabolisme lipidique (Zhou et al., 2001).

## b) Effets de la Met sur le métabolisme des cellules cancéreuses

La « reprogrammation métabolique », décrite pour la première fois par Otto-Warburg, est une des caractéristiques des cellules cancéreuses qui privilégie la glycolyse plutôt que la phosphorylation oxydative comme principale source d'énergie. Présent dans la majorité des cellules cancéreuses, cette reprogrammation permet aux cellules de s'adapter à leur environnement hypoxique et leur permet de produire rapidement l'énergie nécessaire à partir du substrat majoritairement présent, le glucose. Toutefois, et malgré ce changement, une phosphorylation oxydative basale est maintenue dans les cellules cancéreuses. Il a été montré que la Met inhibe le complexe 1 de la chaîne respiratoire mitochondriale dans les cellules cancéreuses, ce qui entraîne une diminution de la concentration intracellulaire en L'adénosine triphosphate(ATP) et s'accompagne d'une augmentation de la glycolyse. L'ensemble de ces résultats démontre que la Met agit comme un inducteur du stress métabolique qui conduit à une diminution du métabolisme énergétique et à l'inhibition des voies anaboliques (Loubière et al., 2013).



**Figure 1.7 :** Mécanismes d'actions de la metformine dans les cellules cancéreuses. La metformine stimule la glycolyse et inhibe le complexe I mitochondrial. Elle active l'AMPK activated kinase (AMPK) conduisant à l'inhibition de la voie mammalian target of rapamycin (mTOR) et de la prolifération cellulaire. Elle induit, en fonction des types cellulaires,

l'autophagie, l'apoptose et un arrêt du cycle cellulaire. De plus, elle diminue la production des dérivés réactives d'oxygène (ROS) et donc par conséquent la mutagenèse (Loubière et al., 2013).

## 5. Sélénium

### 5.1. Généralité

Le sélénium (Se) est un métalloïde de numéro atomique 34 qui appartient au groupe 16 du tableau périodique. Il a été découvert en 1817 par le chimiste suédois Jöns Jacob Berzelius (Hosnedlova et al., 2017). Le Se est un micronutriment essentiel important pour divers aspects de la santé, Il se présente sous différentes formes chimiques ayant une activité biologique différente notamment le métabolisme correct des hormones thyroïdiennes, la santé cardiovasculaire, la prévention du cancer et protège les organes contre le stress oxydatif, affecte la fonction immunitaire et améliore la fertilité (Huang et al., 2012) , il est d'une importance fondamentale pour maintenir une fonction immunitaire optimale et renforcer l'immunité lors d'une infection(Aribi et al., 2015) il fait preuve d'activité antioxydant, anti-inflammatoire, antimutagène, antiviral, antibactérien, antifongique et des effets antiparasitaires ,anticancérogène ou chimiopréventfi . (Hosnedlova et al., 2017).

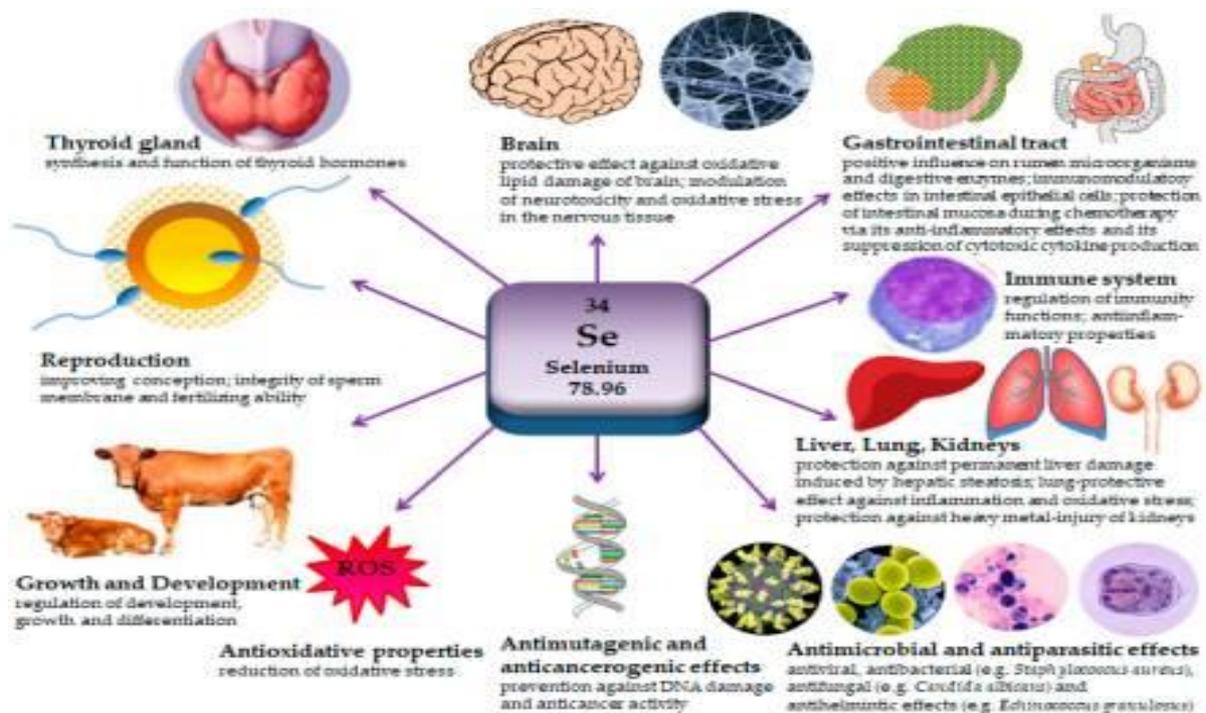


Figure 1.8 : Effets physiologiques du sélénium (Hosnedlova et al., 2017).

Cependant de nombreuses caractéristiques du Se doivent être clarifiées, y compris les doses optimales à consommer pour avoir un effet bénéfique. Une consommation de Se très faible (épuisée) ou très élevée (toxique) peut être préjudiciable, voire fatale (Rayman, 2012).

## 5.2. Source nutritionnelle de sélénium

Le Se est un élément naturel auquel les individus sont exposés principalement par la consommation d'aliments notamment la viande, le lait, les œufs et les légumes (Lemire et al., 2010). Bien que l'exposition puisse également se produire par l'air, l'eau de boisson et les compléments alimentaires (Vinceti et al., 2018).

## 5.3. Sélénite de sodium

Le sélénium est le composant principal des sélénoprotéines et joue le rôle de centre rédox. Il est transporté dans le sang avec la sélénoprotéine P (SePP) et peut être stocké sous forme de sélénométhionine (SeMet) dans différents tissus et organes, tels que le foie, les reins, le pancréas, le cœur, le cerveau et la rate. Le sélénite de sodium ( $\text{Ss}$ ,  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ ), une forme alimentaire courante du sélénium, est un micronutriment essentiel ainsi qu'un oligo-élément toxique dans l'alimentation humaine et animale (Aribi et al., 2015).

## 5.4. Sélénium et Système immunitaire

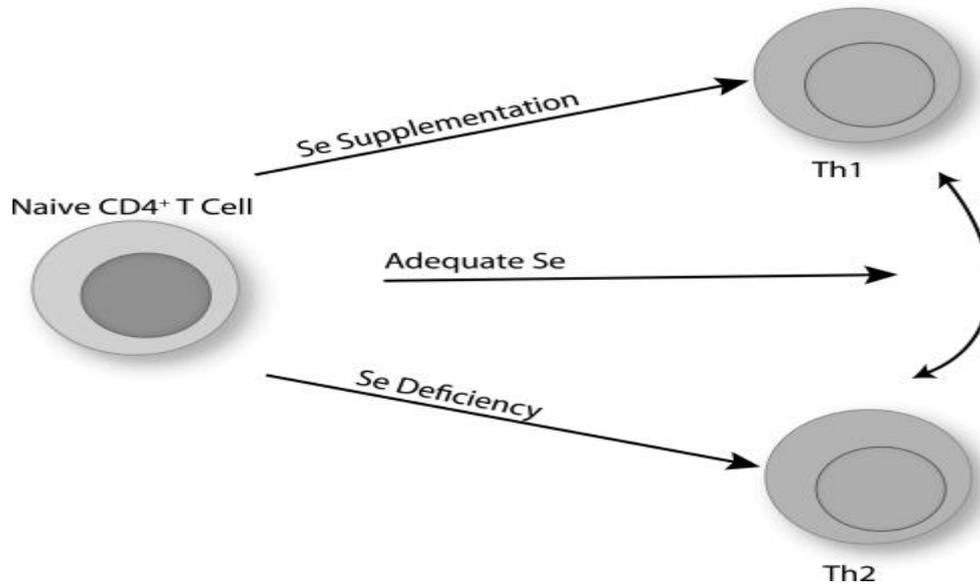
### a) Système immunitaire innée

Le Se est également important pour la régulation des fonctions immunitaires, joue un rôle essentiel dans la réponse immunitaire non spécifique et son faible niveau est lié à un système immunitaire affaibli. Dans les maladies inflammatoires, la concentration en sélénium diminue et la biosynthèse des sélénoprotéines est perturbée. L'application du Se diminue l'activité inflammatoire, il est très important pour l'activité chimiotactique et phagocytaire et pour l'éclatement des voies respiratoires. Une carence en Se entraîne une diminution de l'activité de l'enzyme La glutathion peroxydase (GPx) et une baisse de l'activité des neutrophiles, ainsi que la prédisposition des cellules aux dommages oxydatifs (Hosnedlova et al., 2017).

### b) Système immunitaire adaptative

Le Se augmente la prolifération des lymphocytes, y compris l'expression d'une haute affinité pour IL-2R, lymphocytes T cytolytiques, destruction de la tumeur et fonction des cellules NK chez l'homme, il améliore également la résistance aux maladies infectieuses en modulant la production d'interleukine, puis la réponse TH1 / TH2; en effet, le sélénium peut réguler positivement l'expression des récepteurs de l'IL2 à la surface des lymphocytes T activés et

des cellules NK, ce qui favorise l'interaction de ces récepteurs. cytokine avec ses récepteurs spécifiques , d'autre part, il a été démontré qu'un apport élevé en sélénium augmentait la production de TNF lors de la stimulation du TCR, alors qu'un apport alimentaire réduit en sélénium favorisait un profil TH2 attribué à une augmentation du taux d'IL4(Campa et al., 2000).



**Figure 1.9.** : Effets de la consommation du sélénium sur la différenciation des lymphocytes TCD4+ (Huang et al., 2012)

De même, il a été découvert que le sélénium peut favoriser un phénotype TREG à partir de cellules T CD4 + naïves stimulées par le TCR, mais d'autres études doivent être explorées afin de montrer comment le sélénium alimentaire influe sur la régulation immunitaire.(Groux et al., 1997).

Pour la fonction des cellules B et la production d'anticorps, une étude concluante a montré que le taux de sélénium pouvait affecter la production d'anticorps d'un agent pathogène spécifique, mais en général, le taux de sélénium n'influençait pas l'immunité humorale (Sánchez-Gutiérrez et al., 2008).

Des molécules d'adhésion sont nécessaires pour les cellules immunitaires, l'infiltration dans les tissus par les cellules endothéliales, un des membres de la sélectine est la L-selectine qui est exprimée sur les lymphocytes et les monocytes humains et qui est importante pour la pénétration et le déplacement le long de la paroi capillaire, de manière inattendue, Se (2 ug / lm) aux monocytes a provoqué une diminution de l'expression des molécules d'adhérence(Ahrens et al., 2008) .

### **5.5. Sélénium et cancer**

La capacité du Se à contrecarrer la croissance des cellules cancéreuses, comme cela a été observé dans un grand nombre d'études, peut être due à ses effets sur la stabilité de l'ADN, la prolifération cellulaire, la mort cellulaire nécrotique et apoptotique dans les cellules saines et malignes, la régulation du stress oxydatif et du système immunitaire (Vinceti et al., 2018).

## **Problématique et objectifs**

**Problématique :** Les monocytes sont des cellules immunitaires clefs des réponses innées, jouant des rôles importants dans l'inflammation et le maintien de l'homéostasie tissulaire, mais également dans les réponses adaptatives. Ces cellules peuvent être présentes dans le microenvironnement tumoral, et, par conséquent, leur état d'activation et leur survie pourraient être altérée. Par ailleurs, la reprogrammation métabolique ou Effet Warburg, est l'une des caractéristiques des cellules cancéreuses qui privilégient la glycolyse plutôt que la phosphorylation oxydative comme principale source d'énergie. Des études récentes bien argumentées (Meziane et al., 2019) ont montré que la Met inhibe le complexe 1 (NADH déshydrogénase) de la chaîne respiratoire mitochondriale dans le macrophage. Le même constat a été observé antérieurement dans les cellules cancéreuses, ce qui entraîne une diminution de la concentration intracellulaire en adénosine triphosphate (ATP), nécessaire à la fabrication des molécules organiques riches en énergie (protéines, glucides et lipides), et la survie de la cellule. Outre ses capacités à induire une diminution de la production de l'ATP, ses effets sur le cancer pourraient être expliqués, d'une part, par la diminution des taux circulants d'insuline, et, d'autre part, par son action sur la voie mTOR, et par conséquent, sur l'autophagie (effet Warburg inverse), et l'apoptose. Enfin, il a été montré que les oligoéléments, notamment le Ss pourraient moduler les effets de la Met au sein du monocyte-macrophage (Meziane et al., 2019). Dans cette optique, nous avons évalué l'effet de la Met et du Ss sur l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 dans le monocyte issu de leucémie aigüe lymphoblastique T.

**Objectifs:** Nous avons évalué l'effet de la Met et du Ss combinés ou non sur l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 au niveau du monocyte issu de la LLA-T.

**But:** Nous avons essayé de montrer que le Met associée ou non au Ss pourrait moduler les taux d'expression du Bcl-2 dans le monocyte issu de la LLA-T.

## Chapitre 2. Matériel et méthodes

## 2.1. Diagramme d'étude

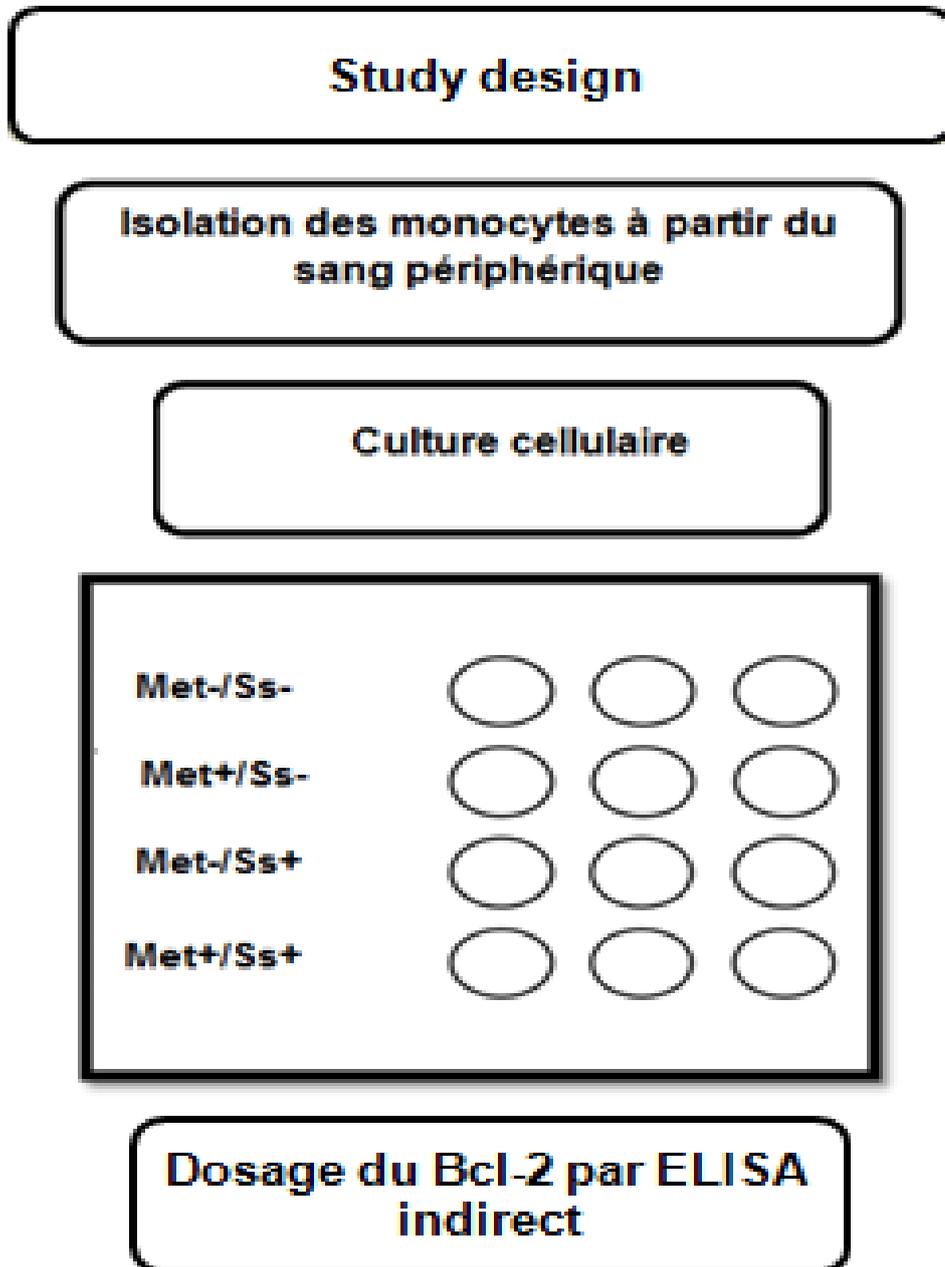


Figure 2.1. Schéma récapitulatif de la partie matériel et méthodes.

L'objectif principal de ce travail est d'étudier l'effet ex-vivo de la Met et du Ss combinés ou non sur l'expression du Bcl-2 dans les monocytes isolés à partir des cellules mononuclées du sang périphérique PBMC (peripheral blood mononuclear cells) issu de la leucémie aigue lymphoblastique à cellule T.

Le matériel et les méthodes utilisées dans notre étude sont cités ci-dessous :

## 2.2. Préparation des solutions

### • Préparation du milieu de culture complet

Pour préparer 15mL du milieu de culture contenant 1µg/mL de LPS, des antibiotique (Pénicilline, L-Glutamine et Streptomycine) et 5% SVF. Pour la préparation de ce milieu nous avons utilisé la formule suivante :

- 13.95 mL de MEM
- 1,5µL de LPS à 10mg/mL
- 750 µL SVF
- 150µL de Pénicilline/Streptomycine
- 150µL de L-Glutamine à 29.23 mg/ml

### • Préparation du bleu de trypan à 0.4%

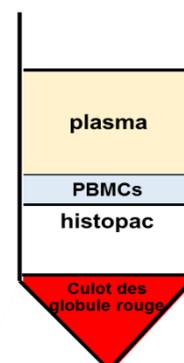
Pour préparer 0.4% du bleu de trypan, nous avons utilisé la formule suivante :

- 40mg de bleu de trypan +10ml d'eau distillé

## 2.3. Isolation des PBMCs

Un prélèvement de sang périphérique a été réalisé dans des tubes Ethylène diamine tétra acétique (EDTA) vacutainer, à partir d'une patiente, âgée de 14ans, atteinte d'une leucémie aigue lymphoblastique T admise au niveau du Service de Pédiatrie du Centre Hospitalo-universitaire de Tlemcen (CHU). Par la suite, les PBMC ont été isolées à partir du sang récupéré :

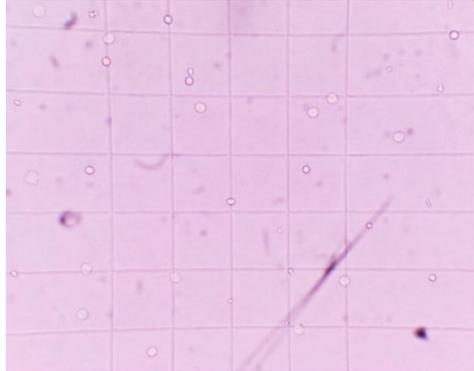
- 6mL de sang dilué à ½ dans le phosphate buffered saline (PBS) ont été déposés sur 3mL d'histopaque et centrifugés à 400g pendant 30min. Les PBMC ont été directement collectées par micropipette dans l'interface entre l'histopaque et le plasma et lavés trois fois en ajoutant 9mL de PBS et réalisant une centrifugation de 10 min à 700g.
- Les cellules du sang périphérique (PBMC) ainsi récoltées et lavées ont été suspendues dans 1mL du milieu de culture complet et énumérées sur cellule de Mallassez.



#### 2.4. Enumération des PBMCs sur cellule de Malassez

- 5 $\mu$ l de suspension cellulaire + 5 $\mu$ L du bleu de trypan.

Après énumération, nous avons obtenus  $2.4 \times 10^6$  PBMC/ml, soit approximativement  $2.4 \times 10^5$  de monocytes.



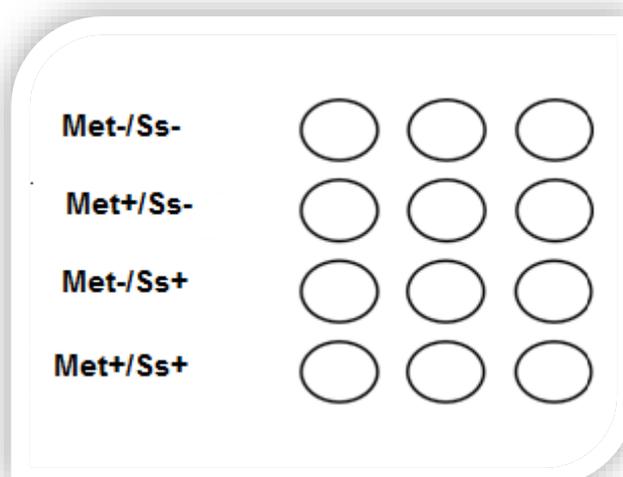
**Figure 2.2 .** Enumération des PBMCs sur cellules de Malassez

- Nous avons ajusté la concentration de la suspension cellulaire à  $1.2 \times 10^6$  Cellule/mL pour remplir 12 puits par  $2 \times 10^5$  PBMC/puits. Pour cela, Nous avons déposé 150 $\mu$ L de la suspension cellulaire dans chaque puits.
- Les cellules ont été incubées pendant 1h pour l'adhérence des monocytes.
- L'adhérence des monocytes a été vérifiée par microscope inversé.



**Figure 2.3.** Monocytes observés par microscope inversé

- Après l'adhérence des monocytes, nous avons éliminé le surnageant et ajouté 200  $\mu$ L de MEM complet avec ou sans metformine et sélénite de sodium soit : 5ng/ml de sélénite de sodium et 1 $\mu$ M de metformine. La distribution des échantillons est indiquée dans la Figure 2.4.



**Figure 2.4.** Conditions de culture cellulaire

- Incubation a 37°C 5% CO2 pendant 24h
- Elimination des surnageants
- Conservation des cellules à -80°C dans une solution de conservation à 0,1% de DMSO.
- 

### 2.5. Dosages du Bcl-2

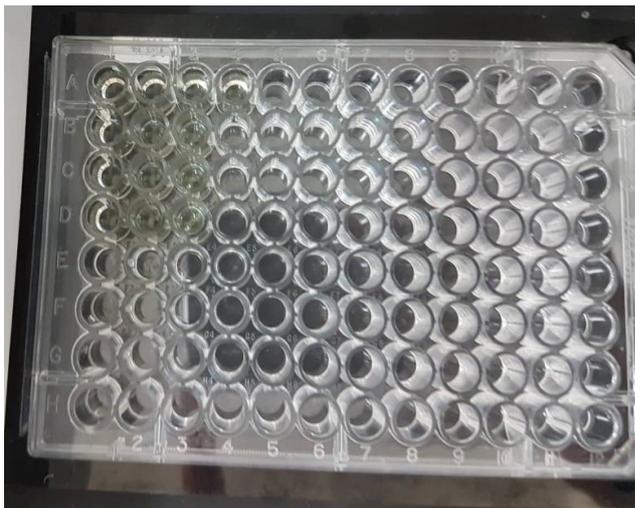
Nous avons évalué le Bcl-2 dans les monocytes par la méthode Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) indirecte après stockage des cellules à -80°C dans une solution de conservation à 0,1% de DMSO.

- Décongélation, les cellules ont été immédiatement Placées dans un bain marie à 37° et lavées trois fois par PBS à 10% SVF (2 ml SVF +18 ml de PBS) pendant 10min afin d'éliminer le DMSO.



**Figure 2.5.** Décongélation des cellules à bain marie

- Chaque échantillon été fixé par 100µL de solution de fixation (paraformaldéhyde à 4%), Incubation pendant 30 min à température ambiante ensuite lavées trois fois à l'aide du tampon de lavage.
- Chaque échantillon a été traité avec une solution de perméabilisation (100µl de triton x à 10%) pendant 10 min ensuite lavées trois fois.
- Ajout de 100µl de solution d'anticorps primaires anti Bcl-2 à 1µg/MI à chaque échantillon.
- Incubation de 1h30 min ensuite on a effectués trois lavage par le wash buffer.
- Ajout de 100µl d anticorps secondaire couplé a HRP dilué 2000fois.
- Incubation sous agitation pendant 1h ensuite Lavage trois fois par wash buffer.
- Ajout de 100µl de Tetra methyl benzidine (TMB).
- Incubation à l'obscurité pendant 30 min.
- Ajout de 50µl de solution stop.
- Lecture à 450 nm par lecteur ELISA.



**Figure 2.6 :** Dosage du Bcl-2 (plaque à 96 puits)

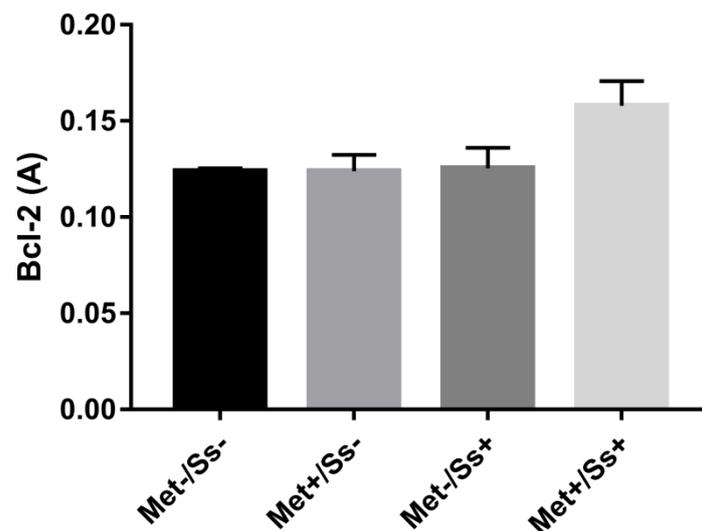


**Figure 2.7 :** Lecteur ELISA

## Chapitre 3 Résultats et interprétations

### 3.1. Résultats de dosage du Bcl-2

Dans le cadre de cette étude, nous avons évalué *in vitro* l'effet de la Met et du Ss combinés ou non sur l'expression du Bcl-2 dans le monocyte issue de la leucémie aiguë lymphoblastique T. D'après les résultats présentés dans la Figure 3.1, nous observons que les taux de Bcl-2 ne présentait pas de variations statistiquement significatives dans les monocytes cultivés dans différentes conditions en la présence ou en l'absence de la Met ou du Ss (Met-/Ss-, Met+/Ss-, Met-/ Ss+, Met+,Ss+) ( $p > 0.05$  par le test ANOVA). Cependant, nous remarquons une faible augmentation du taux de Bcl-2 dans le groupe des monocytes traitées par la combinaison Met+ /Ss+ par rapport au groupe contrôle ( $p > 0,05$  par le test *t* de student).



**Figure 3.1. Effet de la metformine et du Sélénite de sodium combinés ou non sur l'expression du Bcl-2 dans le monocyte activé par du LPS.** A : absorbance. Met-/Ss- : Monocytes issue d'un patient atteints d'une leucémie aiguë a lymphocyte -T non traitée par la metformine et le sélénite de sodium. Met+/Ss- : Monocytes issue d'un patient atteints d'une leucémie aiguë a lymphocyte -T traitée par la metformine et non traitée par le sélénite de sodium. Met-/Ss+ : Monocytes issue d'un patient atteints d'une leucémie aiguë a lymphocyte -T non traitée par la metformine et traitée par le sélénite de sodium. Met+/Ss+ : Monocytes issue d'un patient atteints d'une leucémie aiguë a lymphocyte -T traitée par la combinaison de la metformine et le sélénite de sodium.

## Chapitre 4. Discussion

Les monocytes sont une population hétérogène des cellules mononucléaires sanguines, impliquées dans la réponse inflammatoire et le maintien de l'homéostasie tissulaire (Rahman et al., 2017), selon leurs polarisations, leurs types ainsi que les conditions présentes dans le microenvironnement tumoral les monocytes peuvent soit inhiber soit favoriser la prolifération tumorale (Ibberson et al., 2013).

Les cellules cancéreuses développent diverses stratégies pour échapper à l'apoptose. elles peuvent atteindre cet objectif en augmentant le niveau d'expression des régulateurs anti-apoptotiques tels que Bcl-2 (Yue et al., 2015). Il a été rapporté que les cellules cancéreuses chimiosensibles, telles que les cellules de la LAL, étaient sujettes à l'apoptose plus que celles provenant de tissus normaux. Les cellules leucémiques ont besoin de Bcl-2 en plus d'autres membres de la famille Bcl-2 anti-apoptotiques pour séquestrer des protéines pro-apoptotiques telles que la BIM, ce qui indique que l'inhibition de la protéine Bcl-2 est une stratégie utile pour induire l'apoptose dans les cellules leucémiques déjà «amorçées» (Sanda et al., 2013).

La biologie de la cellule cancéreuse étant de mieux en mieux comprise. Des anciennes molécules telles que la Met et/ou le Ss pourraient trouver une place dans la prise en charge des maladies néoplasiques. La Met et le Ss ont fait l'objet d'une grande attention pour leurs activités antitumorales et peuvent induire l'apoptose dans différentes cellules cancéreuses. Cependant, le mécanisme moléculaire de l'apoptose induit par la Met et/ou le Ss n'a pas encore été clairement élucidé. Il est intéressant de noter que la Met et le Ss partagent plusieurs mécanismes sous-jacents aux effets protecteurs contre le cancer, y compris l'inhibition de la protéine Bcl-2 (Yasmeen et al., 2011).

Dans cette étude la protéine Bcl-2 anti-apoptotique a été évaluée *in vitro* dans les monocytes d'un patient atteint d'une leucémie aigue lymphoblastique à cellules T après avoir été traité par la Met et le Ss combinés ou non dans différents groupes (Met- /Ss-), (Met+ /Ss-), (Met- /Ss+), (Met+ /Ss+).

L'effet de la metformine sur la modulation de l'expression du Bcl-2 dans les monocytes issue d'un patient atteint d'une leucémie aigue lymphoblastique à cellules T. Au niveau cellulaire la Met agit par deux principaux modes d'action, le premier, indirect, implique la diminution des taux circulants d'insuline, le second, via une action directe sur la cellule, passe par l'activation de la voie AMPK/mTOR qui joue un rôle central dans de nombreux processus cellulaires tels que l'apoptose par la régulation en baissant la protéine anti-apoptotique Bcl-2 (Gao et al., 2016; Loubière et al., 2013). Dans nos résultats, l'effet antiprolifératif de la Met n'a pas eu lieu vu qu'il n'y a pas eu de différence significative entre le traitement avec (Met+/Ss-) par rapport au groupe contrôle (Met- /Ss-) ( $p > 0,05$  par le test *t* de Student). La Metformine semble cibler spécifiquement les cellules cancéreuses puisque les monocytes de notre

étude n'ont pas été affectés par l'effet antiprolifératif de la metformine en diminuant le taux d'expression de la protéine Bcl-2. Ceci est en accord avec une étude préclinique qui a montré que la Met prévient la carcinogénèse induite par le tabac chez la souris avec une diminution de 72 % de la masse tumorale mais de façon intéressante, la Met agit spécifiquement sur les cellules cancéreuses puisque les cellules épithéliales normales du sein et de la prostate restent résistantes à la Met (Loubière et al., 2013)

L'effet du Sélénite de sodium sur la modulation de l'expression du Bcl-2 dans les monocytes issue d'un patient atteint d'une leucémie aigue lymphoblastique à cellules T. Le Ss présente également des propriétés préventives contre le cancer en tant que régulateur du rédox cellulaire via les sélénoprotéines à faible concentration; tandis que, à des concentrations plus élevées, il est démontré que le sélénite induit l'apoptose dans les cellules malignes par le biais du stress oxydatif (Nilsson et al., 2006), ainsi via la voie de signalisation PKD1 / CREB / Bcl-2 régulée par MAPK pK, le Ss a déclenché la régulation à la hausse de p-p38 MAPK et a ensuite inhibé la phosphorylation de PKD1. L'effet inhibiteur sur PKD1 a été associé à la suppression de l'activité transcriptionnelle de CREB, ce qui a entraîné une diminution de l'expression de son gène cible Bcl-2 (Hui et al., 2014; Nilsson et al., 2006). Dans nos résultats, l'effet antiprolifératif Ss n'a pas eu lieu vu qu'il n'y a pas eu de différence significative entre le traitement avec (Met-/Ss+) par rapport au groupe contrôle (Met- /Ss-)( $p > 0,05$  par le test *t* de student). Il semblerait que le Ss n'agit que sur le Bcl-2 des cellules cancéreuses. Ces résultats, sont en accord avec des données antérieures démontrant que le Ss n'avait aucun effet sur l'apoptose des monocytes isolés à partir du sang de cordon ombilical d'une personne normale par rapport au groupe traité avec le Ss (Hui et al., 2014).

L'effet de la combinaison de la metformine et du Sélénite de sodium sur la modulation de l'expression du Bcl-2 dans les monocytes issue d'un patient atteint d'une leucémie aigue lymphoblastique à cellules T. Dans nos résultats, nous avons remarqué une faible augmentation du taux de Bcl-2 dans le groupe des monocytes traités par la combinaison Met+ /Ss+ par rapport au groupe contrôle ( $p > 0,05$  par le test *t* de student). De la sorte, la combinaison Met+/Ss+ semblerait ne pas être recommandée si l'on envisageait de faire baisser les niveaux de la molécule Bcl-2, sachant que nous avons montré tout récemment que le Ss pourrait immunomoduler les effets de la Met (Meziane et al., 2019). Aussi, il a été rapporté que la survie des monocytes pourrait constituer un mauvais pronostic des patients atteints de la leucémie lymphoïde (Jiang et al., 2015). Néanmoins, il serait judicieux de tester une telle combinaison avec des doses différentes de la Met et du Ss, afin d'interpréter les résultats sans ambages.

## Chapitre 5. Conclusions et perspectives

En conclusion le monocyte s'avère résistant à l'effet de la Met et du Ss, ce qui suggère que les deux molécules pourraient être de très bons agents thérapeutiques contre le cancer, car ils n'ont pas affecté le taux d'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 au niveau monocytaire.

En termes de perspectives, des études approfondies seront nécessaires pour expliquer la résistance du monocyte à l'effet de la metformine et du sélénium. Il serait judicieux de tester une telle combinaison avec des doses différentes de la metformine et du sélénium, afin d'interpréter les résultats sans ambages. Des recherches poussées évaluant l'effet de la metformine et du sélénium seuls ou combinés sur d'autres protéines anti-apoptotiques tels que Bcl-xL dans le monocyte seraient utiles pour comprendre l'importance de cette famille de gènes dans le monocyte au cours de la leucémie aiguë. Étudier l'effet de la metformine et du sélénium sur la polarisation des monocytes provenant de patients atteints de leucémie aiguë et le co-cultiver avec des cellules cancéreuses tel que la lignée cellulaire immortalisée de leucémie aiguë lymphoblastique T (JURKAT) serait aussi intéressant pour mieux comprendre les mécanismes d'interaction cellulaire.

## Chapitre 6. Bibliographie

- Ahrens, I., Ellwanger, C., Smith, B.K., Bassler, N., Chen, Y.C., Neudorfer, I., Ludwig, A., Bode, C., and Peter, K. (2008). Selenium supplementation induces metalloproteinase-dependent L-selectin shedding from monocytes. *J. Leukoc. Biol.* *83*, 1388–1395.
- Arfvidsson, J., Ahlin, F., Vargas, K.G., Thaler, B., Wojta, J., and Huber, K. (2017). Monocyte subsets in myocardial infarction: A review. *Int. J. Cardiol.* *231*, 47–53.
- Aribi, M., Meziane, W., Habi, S., Boulatika, Y., Marchandin, H., and Aymeric, J.-L. (2015). Macrophage Bactericidal Activities against *Staphylococcus aureus* Are Enhanced In Vivo by Selenium Supplementation in a Dose-Dependent Manner. *PLoS One* *10*.
- Bongiovanni, D., Saccomani, V., and Piovan, E. (2017). Aberrant Signaling Pathways in T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Int J Mol Sci* *18*.
- Brempele, K.J., and Crispe, I.N. (2016). Infiltrating monocytes in liver injury and repair. *Clin Transl Immunology* *5*, e113.
- Campa, A., Shor-Posner, G., and Baum, M. (2000). Selenium status and the human immunodeficiency virus. *J Am Diet Assoc* *100*, 418.
- Cavaillon, J.-M. (2011). La réponse immunitaire à l'agression: le B.A.-BA — Système immunitaire inné. *Réanimation* *20*, 393–405.
- Daugan, M., Dufaj Wojcicki, A., d'Hayer, B., and Boudy, V. (2016). Metformin: An anti-diabetic drug to fight cancer. *Pharmacol. Res.* *113*, 675–685.
- Del Gaizo Moore, V., Schlis, K.D., Sallan, S.E., Armstrong, S.A., and Letai, A. (2008). BCL-2 dependence and ABT-737 sensitivity in acute lymphoblastic leukemia. *Blood* *111*, 2300–2309.
- Ding, L., Liang, G., Yao, Z., Zhang, J., Liu, R., Chen, H., Zhou, Y., Wu, H., Yang, B., and He, Q. (2015). Metformin prevents cancer metastasis by inhibiting M2-like polarization of tumor associated macrophages. *Oncotarget* *6*, 36441–36455.
- Evangelisti, C., Chiarini, F., McCubrey, J.A., and Martelli, A.M. (2018). Therapeutic Targeting of mTOR in T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia: An Update. *Int J Mol Sci* *19*.
- Friedman, D.R., Sibley, A.B., Owzar, K., Chaffee, K.G., Slager, S., Kay, N.E., Hanson, C.A., Ding, W., Shanafelt, T.D., Weinberg, J.B., et al. (2016). Relationship of blood monocytes with chronic lymphocytic leukemia aggressiveness and outcomes: a multi-institutional study. *Am J Hematol* *91*, 687–691.
- Gao, Z.-Y., Liu, Z., Bi, M.-H., Zhang, J.-J., Han, Z.-Q., Han, X., Wang, H.-Y., Sun, G.-P., and Liu, H. (2016). Metformin induces apoptosis via a mitochondria-mediated pathway in human breast cancer cells in vitro. *Exp Ther Med* *11*, 1700–1706.
- Groux, H., O'Garra, A., Bigler, M., Rouleau, M., Antonenko, S., de Vries, J.E., and Roncarolo, M.G. (1997). A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* *389*, 737–742.
- Heine, G.H., Ortiz, A., Massy, Z.A., Lindholm, B., Wiecek, A., Martínez-Castelao, A., Covic, A., Goldsmith, D., Süleymanlar, G., London, G.M., et al. (2012). Monocyte subpopulations and cardiovascular risk in chronic kidney disease. *Nat Rev Nephrol* *8*, 362–369.

- Hosnedlova, B., Kepinska, M., Skalickova, S., Fernandez, C., Ruttkay-Nedecky, B., Malevu, T.D., Sochor, J., Baron, M., Melcova, M., Zidkova, J., et al. (2017). A Summary of New Findings on the Biological Effects of Selenium in Selected Animal Species-A Critical Review. *Int J Mol Sci* 18.
- Huang, Z., Rose, A.H., and Hoffmann, P.R. (2012). The role of selenium in inflammation and immunity: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxid. Redox Signal.* 16, 705–743.
- Hui, K., Yang, Y., Shi, K., Luo, H., Duan, J., An, J., Wu, P., Ci, Y., Shi, L., and Xu, C. (2014). The p38 MAPK-regulated PKD1/CREB/Bcl-2 pathway contributes to selenite-induced colorectal cancer cell apoptosis in vitro and in vivo. *Cancer Letters* 354, 189–199.
- Ibberson, M., Bron, S., Guex, N., Faes-van't Hull, E., Ifticene-Treboux, A., Henry, L., Lehr, H.-A., Delaloye, J.-F., Coukos, G., Xenarios, I., et al. (2013). TIE-2 and VEGFR Kinase Activities Drive Immunosuppressive Function of TIE-2-Expressing Monocytes in Human Breast Tumors. *Clinical Cancer Research* 19, 3439–3449.
- Italiani, P., and Boraschi, D. (2014). From Monocytes to M1/M2 Macrophages: Phenotypical vs. Functional Differentiation. *Front Immunol* 5, 514.
- Jiang, X.Q., Zhang, L., Liu, H.A., Yuan, N., Hou, P.Q., Zhang, R.Q., and Wu, T. (2015). Expansion of CD14(+)CD16(+) monocytes is related to acute leukemia. *Int J Clin Exp Med* 8, 12297–12306.
- Kermezli, Y., Saadi, W., Belhocine, M., Mathieu, E.-L., Garibal, M.-A., Asnafi, V., Aribi, M., Spicuglia, S., and Puthier, D. (2019). A comprehensive catalog of lncRNAs expressed in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leuk. Lymphoma* 1–13.
- Knaus, H.A., Kanakry, C.G., Luznik, L., and Gojo, I. (2017). Immunomodulatory Drugs: Immune Checkpoint Agents in Acute Leukemia. *Curr Drug Targets* 18, 315–331.
- Kulsoom, B., Shamsi, T.S., Afsar, N.A., Memon, Z., Ahmed, N., and Hasnain, S.N. (2018). Bax, Bcl-2, and Bax/Bcl-2 as prognostic markers in acute myeloid leukemia: are we ready for Bcl-2-directed therapy? *Cancer Manag Res* 10, 403–416.
- Lemire, M., Fillion, M., Barbosa, F., Guimarães, J.R.D., and Mergler, D. (2010). Elevated levels of selenium in the typical diet of Amazonian riverside populations. *Sci. Total Environ.* 408, 4076–4084.
- Loubière, C., Dirat, B., Tanti, J.-F., and Bost, F. (2013). Metformine et cancer : de nouvelles perspectives pour un ancien médicament. *Annales d'Endocrinologie* 74, 130–136.
- Memmott, R.M., Mercado, J.R., Maier, C.R., Kawabata, S., Fox, S.D., and Dennis, P.A. (2010). Metformin prevents tobacco carcinogen--induced lung tumorigenesis. *Cancer Prev Res (Phila)* 3, 1066–1076.
- Meziane, W., Mekkaoui, Z., Hai, I., Kacimi, K., Djilali, K., Touil-Boukoffa, C., Lefranc, G., Fernandez, A., Lamb, N., Mennechet, F., et al. (2019). Combination of metformin with sodium selenite induces a functional phenotypic switch of human GM-CSF monocyte-derived macrophages. *Int. Immunopharmacol.* 73, 212–224.
- Mytych, J., Romerowicz-Misielak, M., and Kozirowski, M. (2017). Long-term culture with lipopolysaccharide induces dose-dependent cytostatic and cytotoxic effects in THP-1 monocytes. *Toxicol In Vitro* 42, 1–9.
- Nilsonne, G., Sun, X., Nyström, C., Rundlöf, A.-K., Potamitou Fernandes, A., Björnstedt, M., and Dobra, K. (2006). Selenite induces apoptosis in sarcomatoid malignant mesothelioma cells through oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* 41, 874–885.
- Niu, J., Azfer, A., and Kolattukudy, P.E. (2006). Monocyte-specific Bcl-2 expression attenuates inflammation and heart failure in monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)-induced cardiomyopathy. *Cardiovasc. Res.* 71, 139–148.

- Olsson, G., Czene, S., Haghdoost, S., and Harms-Ringdahl, M. (2016). Transient delay of radiation-induced apoptosis by phorbol acetate. *Radiat Environ Biophys* 55, 95–102.
- Pérez-Figueroa, E., Sánchez-Cuaxospa, M., Martínez-Soto, K.A., Sánchez-Zauco, N., Medina-Sansón, A., Jiménez-Hernández, E., Torres-Nava, J.R., Félix-Castro, J.M., Gómez, A., Ortega, E., et al. (2016). Strong inflammatory response and Th1-polarization profile in children with acute lymphoblastic leukemia without apparent infection. *Oncol. Rep.* 35, 2699–2706.
- Rahman, M.S., Murphy, A.J., and Woollard, K.J. (2017). Effects of dyslipidaemia on monocyte production and function in cardiovascular disease. *Nat Rev Cardiol* 14, 387–400.
- Rayman, M.P. (2012). Selenium and human health. *Lancet* 379, 1256–1268.
- Rena, G., Hardie, D.G., and Pearson, E.R. (2017). The mechanisms of action of metformin. *Diabetologia* 60, 1577–1585.
- Richards, D.M., Hettlinger, J., and Feuerer, M. (2012). Monocytes and Macrophages in Cancer: Development and Functions. *Cancer Microenviron* 6, 179–191.
- Rosilio, C., Ben-Sahra, I., Bost, F., and Peyron, J.-F. (2014). Metformin: a metabolic disruptor and anti-diabetic drug to target human leukemia. *Cancer Lett.* 346, 188–196.
- Saadi, W., Kermezli, Y., Dao, L.T.M., Mathieu, E., Santiago-Algarra, D., Manosalva, I., Torres, M., Belhocine, M., Pradel, L., Loriol, B., et al. (2019). A critical regulator of Bcl2 revealed by systematic transcript discovery of lncRNAs associated with T-cell differentiation. *Sci Rep* 9, 4707.
- Sánchez-Gutiérrez, M., García-Montalvo, E.A., Izquierdo-Vega, J.A., and Del Razo, L.M. (2008). Effect of dietary selenium deficiency on the in vitro fertilizing ability of mice spermatozoa. *Cell Biol. Toxicol.* 24, 321–329.
- Sanda, T., Tyner, J.W., Gutierrez, A., Ngo, V.N., Glover, J., Chang, B.H., Yost, A., Ma, W., Fleischman, A.G., Zhou, W., et al. (2013). TYK2-STAT1-BCL2 pathway dependence in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Discov* 3, 564–577.
- Shi, C., and Pamer, E.G. (2011). Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* 11, 762–774.
- Takemura, Y., Osuga, Y., Yoshino, O., Hasegawa, A., Hirata, T., Hirota, Y., Nose, E., Morimoto, C., Harada, M., Koga, K., et al. (2007). Metformin suppresses interleukin (IL)-1beta-induced IL-8 production, aromatase activation, and proliferation of endometriotic stromal cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 92, 3213–3218.
- Terwilliger, T., and Abdul-Hay, M. (2017). Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update. *Blood Cancer J* 7, e577.
- Thaler, B., Hohensinner, P.J., Krychtiuk, K.A., Matzneller, P., Koller, L., Brekalo, M., Maurer, G., Huber, K., Zeitlinger, M., Jilma, B., et al. (2016). Differential in vivo activation of monocyte subsets during low-grade inflammation through experimental endotoxemia in humans. *Sci Rep* 6, 30162.
- Tzifi, F., Economopoulou, C., Gourgiotis, D., Ardavanis, A., Papageorgiou, S., and Scorilas, A. (2012). The Role of BCL2 Family of Apoptosis Regulator Proteins in Acute and Chronic Leukemias. *Adv Hematol* 2012, 524308.
- Vinceti, M., Filippini, T., Del Giovane, C., Dennert, G., Zwahlen, M., Brinkman, M., Zeegers, M.P., Horneber, M., D’Amico, R., and Crespi, C.M. (2018). Selenium for preventing cancer. *Cochrane Database Syst Rev* 1, CD005195.
- Yasmeen, A., Beauchamp, M.-C., Piura, E., Segal, E., Pollak, M., and Gotlieb, W.H. (2011). Induction of apoptosis by metformin in epithelial ovarian cancer: involvement of the Bcl-2 family proteins. *Gynecol. Oncol.* 121, 492–498.

Yue, W., Zheng, X., Lin, Y., Yang, C.S., Xu, Q., Carpizo, D., Huang, H., DiPaola, R.S., and Tan, X.-L. (2015). Metformin combined with aspirin significantly inhibit pancreatic cancer cell growth in vitro and in vivo by suppressing anti-apoptotic proteins Mcl-1 and Bcl-2. *Oncotarget* 6, 21208–21224.

Zhou, G., Myers, R., Li, Y., Chen, Y., Shen, X., Fenyk-Melody, J., Wu, M., Ventre, J., Doebber, T., Fujii, N., et al. (2001). Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J. Clin. Invest.* 108, 1167–1174.

Zhu, Y.P., Thomas, G.D., and Hedrick, C.C. (2016). 2014 Jeffrey M. Hoeg Award Lecture: Transcriptional Control of Monocyte Development. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 36, 1722–1733.

## Résumé

**Introduction:** Les monocytes sont des cellules clefs de l'immunité non-adaptative. Au niveau du microenvironnement tumoral, elles peuvent soit favoriser soit prévenir la progression tumorale, selon leur orientation et leur mode de différenciation, et, par conséquent, leur état d'activation et leur survie pourraient être altérée.

**Objectifs:** Nous avons évalué l'effet de la metformine (Met) et du sélénium (sous la forme du sodium sélénite, Ss) combinés ou non sur l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 au niveau du monocyte issu de la leucémie aigüe lymphoblastique T (LLA-T).

**But:** Nous avons essayé de montrer que le Met associée ou non au Ss pourrait moduler les taux d'expression du Bcl-2 dans le monocyte issu de la LLA-T.

**Matériels et méthodes:** Les essais ont été effectués sur des cellules primaires. L'expression du Bcl-2 a été quantitativement évaluée par ELISA indirecte.

**Résultats:** Les taux de Bcl-2 ne présentaient pas de variations statistiquement significatives dans les monocytes cultivés dans différentes conditions en la présence ou en l'absence de la Met ou du Ss (Met-/Ss-, Met+/Ss-, Met-/ Ss+, Met+ /Ss+) ( $p > 0.05$  par le test ANOVA). Cependant, nous remarquons une faible augmentation du taux de Bcl-2 dans le groupe des monocytes traitées par la combinaison Met + Ss par rapport au groupe contrôle ( $p > 0,05$  par le test  $t$  de Student).

**Conclusions:** Le monocyte s'avère résistant à l'effet de la Met et du Ss, ce qui suggère que les deux molécules pourraient être de très bons agents thérapeutiques contre le cancer, car ils n'ont pas affecté le taux d'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 au niveau monocyttaire.

**Mots clés:** Bcl-2, leucémie lymphoblastique aigüe T, metformine, monocyte, sodium sélénite

## Abstract

**Introduction:** Monocytes are key cells of non-adaptive immunity. In the tumor microenvironment, they can either promote or prevent tumor progression, depending on their orientation and mode of differentiation, and therefore their activation state and survival may be impaired.

**Objectives:** We evaluated the effect of metformin (Met) and selenium (in the form of sodium selenite, Ss) combined or not on the expression of anti-apoptotic protein Bcl-2 in monocyte derived from acute leukemia T lymphoblastic (LLA-T).

**Aim:** We have tried to show that the Met associated or not with Ss could modulate the expression of Bcl-2 levels in the monocyte derived from LLA-T.

**Materials and methods:** Assays were performed on primary cells. Expression of Bcl-2 was quantitatively evaluated by indirect ELISA.

**Results:** Bcl-2 levels did not show statistically significant variations in cultivated monocytes, either in presence or in absence of Met or Ss (Met-/Ss-, Met+/Ss-, Met-/ Ss+, Met+/Ss+) ( $p > 0.05$  using the test ANOVA). However, we observed a small increase in Bcl-2 levels in monocytes group treated by combination (Met+ /Ss+) than control group ( $p > 0,05$  using the test  $t$  de student).

**Conclusion:** Monocyte appears to be resistant to the effect of Met and Ss, which suggest that both molecules may be a very good therapeutic agent against cancer because they do not affect expression levels of anti-apoptotic protein Bcl-2 of the monocyte.

**Keywords:** Bcl-2, acute lymphoblastic leukemia , metformine , monocyte , sodium selenite

## المخلص

**المقدمة:** الخلايا أحادية النواة هي لخلايا الرئيسية للمناعة الطبيعية. في الوسط الورمي ، يمكنهم إمتاحفيز أو منع تطور الورمي ، وهذا يتوقف على اتجاههم وطريقة تمايزهم ، وبالتالي قد تتأثر حالة التنشيط والبقاء لديهم.

**الغاية من الدراسة:** قمنا بتقييم تأثير الميتفورمين و السيلينيوم مجتمعين او لا على تعبير البروتين المضاد للموت المبرمج في الخلية أحادية النواة المستمدة من سرطان الدم الليمفاوي الحاد T.

**اهداف الدراسة:** إبراز أن الميتفورمين و السيلينيوم يمكن أن يعدلا مستويات تعبير (IcB-2) الخلايا أحادية النواة المستمدة من سرطان الدم الليمفاوي الحاد T.

**المواد والأساليب:** تم إجراء الاختبارات على الخلايا الأولية. تم تقييم التعبير Bcl-2 كمي بواسطة ELISA غير المباشر.

**النتائج:** مستويات (+Ss) (+Ss /- teM) (-Ss /-+teM) (-Ss /- teM) لم تظهر اختلافات في ظل الظروف المختلفة في وجود أو عدم وجود الميتفورمين و السيلينيوم و مع ذلك لاحظنا زيادة طفيفة في مستوى 2- IcB في مجموعة أحادية النواة التي تمت معالجتها بتركيبة (Ss /+teM+).

**الاستنتاج:** الخلايا أحادية النواة مقاومة لتأثير الميتفورمين و السيلينيوم هذا يشير إلى أن العلاجين يمكن أن يكونا عاملا علاجيا جيدا ضد السرطان لأنهما لم يؤثر على مستوى تعبير البروتين المضاد لموت الخلايا المبرمج في الخلايا أحادية النواة.

**الكلمات المفتاحية:** IcB-2, سرطان الدم الليمفاوي الحاد T, الميتفورمين, خلايا أحادية النواة, السيلينيوم

