

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
UNIVERSITÉ DE CONSTANTINE 1
جامعة قسنطينة 1
Faculté des Science de la Nature et de la Vie
Département de Biologie Animale



N° d'ordre : 103/DS/2014

N° de Série : 02/BioA/201

THÈSE

EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE DOCTORAT EN SCIENCE

Spécialité : Immunologie

Option : Bio-signalisation et Cancer

THEME

Recherche et évaluation des effets d'un extrait aqueux de gastéropode du genre Helix (Helix aspersa) sur quelques voies de bio signalisation dans la réponse immunitaire inflammatoire et anti tumorale

Présentée Par

EL OUAR Ibtissem

Devant le jury :

Président :	Pr MERAIHI Zahia	Université Constantine 1
Papporteur :	Pr NAIMI Dalila	Université Constantine 1
Examinateurs :	Pr TOUIL Chafia	USTHB Alger
	Pr BENBOUBATRA Mustafa	Université Setif 1
	Pr LAHOUEL Mesbah	Université Jijel
	Pr BERCHI Selima	Université Constantine 1

Soutenue le 16 /10 / 2014.

Remerciements

Je remercie en premier lieu *Madame le professeur Dalila Naimi qui m'a accueillie au sein de son équipe de recherche de Biologie et Physiologie Cellulaire et Moléculaire du laboratoire de Génie Microbiologique et Applications et de m'avoir fait confiance en me chargeant d'explorer et d'exploiter l'un des objectifs importants de son projet de recherche sur les gastéropodes (agrée par le MESRS) qu'elle dirige. Merci pour m'avoir aidée et dirigée, par vos remarques pertinentes, vos riches connaissances et votre entière disponibilité.*

J'exprime mes vifs remerciements à madame le Professeur Meraihi Zahia, Directrice de laboratoire de Génie Microbiologique et Application pour m'avoir fait l'honneur de présider ce jury.

Je remercie Madame le Professeur Touil Chafia et Monsieur Le Professeur Benboubatra Mustafa *pour avoir consacré de leur temps à la lecture et à l'analyse de ce travail.*

Je remercie également Madame le Professeur Berchi Selima et Monsieur Le Professeur Lahouel Mesbah *pour m'avoir fait l'honneur d'examiner et de juger ce travail.*

Enfin je remercie toute personne qui a participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

SOMMAIRE

I. INTRODUCTION.....	1
-----------------------------	----------

II. PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 1 : Radicaux libres et stress cellulaire

1- Les radicaux libres.....	6
2- Le stress oxydant.....	6
3- Les dommages induits par le stress oxydant.....	8
3-1 - Peroxydation des lipides.....	8
3-2- Oxydation des protéines.....	8
3-3- Altérations de l'ADN.....	10
4 - Stress oxydant, inflammation et cancer.....	10

Chapitre 2: L'inflammation

1- L'inflammation	13
1-2- L'inflammation aiguë.....	13
1-2-1 La phase vasculaire ou vasculo-exudative	15
1-2-2 La phase cellulaire.....	16
1-2-3 La résolution et la détersion.....	17
1-2-4 Réparations et cicatrisation	17
1-3- L'inflammation chronique	19
1-4- Inflammation et cancer.....	19

Chapitre 3: La mort cellulaire programmée

1- Définition	22
2- L'apoptose	22
2-1- Les voies d'induction de l'apoptose	22
2-1- 1- La voie extrinsèque ou dépendante des récepteurs de mort cellulaire.....	23

2-1- 2- La voie mitochondriale ou intrinsèque.....	25
2-1- 2- 1- Les caspases	26
2-1- 2- 2 La voie mitochondriale dépendantes des caspases.....	28
2-1- 3- La voie dépendante du réticulum endoplasmique.....	29
2-2- Régulation moléculaire de l'apoptose	30
2-2-1- La famille des Bcl2	30
2-2-2- Le facteur de transcription P53	31
2-2-3- Le gène PTEN	33
2-2-4- Le facteur de transcription NF-κB	35
2-2-4-1- Les protéines NF-κB/Rel	35
2-2-4-2- Les protéines IκB	36
2-2-4-3- Complexe IKKs (IκB kinase)	36
2-2-4-4- Activation de la voie NF-κB	37
2-2-4-4-1- La voie classique ou canonique	37
2-2-4-4- 2- La voie alternative	37
3- La nécrose programmée	39
3-1- La voie de signalisation nécrotique	39
3-1-1 Initiation de nécroptose	39
3-1-2 Exécution de la nécroptose.....	40
4- L'autophagie.....	44
4-1- Les différentes étapes de l'autophagie.....	44
4-1-1- Phase d'initiation	44
4-1-2- Phase d'élongation	45
4-1-3- Maturation et fusion	45
4-1-4- Dégradation lysosomale	47
5- Mort programmé et pathologie	47
5-1- Mort cellulaire programmé et pathologie	47
5-2- Types de mort cellulaire et cancer	48

III PARTIE EXPERIMENTALE

Chapitre 1: Evaluation de l'activité anti-oxydante de l'extrait d'escargot.....	50
--	----

1. Matériel et Méthodes.....	50
1-1- Matériel biologique <i>Helix aspersa</i> (Müller 1774)	50
1-2- Préparation de l'extrait aqueux	50
1-3- Propriétés antioxydantes de l'extrait	52
1-3-1-Test DPPH	52
1-3-2- Capacité total de réduction (Test de la réduction du fer FRAP).....	53
1-3-3- Capacité de l'extrait a piégé le peroxyde d'hydrogène	53
1-3-4- Capacité de l'extrait a inhibé la peroxydation des lipides	54
1-4- Analyse quantitatives des composés phénoliques	54.
1-5- Analyse statistique.....	55
2- Résultats	56
2-1- Propriétés anti-oxydantes de l'extrait	56
2-1-2-1 Le test DPPH	56
2-1-2-2 La capacité de total de réduction de l'extrait	56
2-1-2-5 Capacité de l'extrait a piégé le peroxyde d'hydrogène.....	57
2-1-2-6 Effet de l'extrait sur peroxydation des lipides	58
2-2- Analyse quantitative des polyphenols	58
3. Discussion.....	59

Chapitre 2: Evaluation de l'effet de l'extrait sur la réponse inflammatoire

1. Matériels et Méthodes.....	63
1-1- Effet de l'extrait sur l'activité des macrophages	63
1-1-1 Culture cellulaires.....	63
1-1-2 Différentiation en macrophages.....	63
1-1-3- Etude de l'effet de l'extrait sur la viabilité cellulaire	64
1-1-4 Effet de l'extrait sur l'activité des macrophages	64
1-1-4-1 Effet de l'extrait sur l'activité phagocytaire	65
1-1-4-2 Effet de l'extrait sur la production des radicaux libres oxygénés par la mesure de la réduction du bleu de nitrotétrazolium (NBT)	66
1-1-4-3 Effet de l'extrait sur la production du TNF α par les macrophages	67

1-1-4-4 Etude de l'effet de l'extrait sur la production d'oxyde nitrique NO.....	69
1-2- L'effet de l'extrait sur la réponse inflammatoire <i>in vivo</i> chez les souris	70
1-2-1- Elevage et traitement des souris	71
1-2-2- Prélèvement du sanguin et des organes	71
1-2-3 Préparation des coupes histologiques	71
1-2-4- Dosage des taux plasmatiques du TNF α	71
1-3 Analyse statistique	71
2. Résultats.....	72
2-1- Effet de l'extrait sur l'activité des macrophages.....	72
2-1-1 Etude de la cytotoxicité de l'extrait sur la lignée THP1	72
2-1-1-1 Effet de l'extrait sur la viabilité des monocytes	72
2-1-1-2 Etude de l'effet de l'extrait sur la viabilité des macrophages.....	73
2-1-2 Effet de l'extrait sur la morphologie des macrophages	74
2-1-3 Effet de l'extrait sur l'activité phagocytaire.....	76
2-1-4 Effet de l'extrait sur la production des radicaux libres oxygénés.....	77
2-1-5 Effet de l'extrait sur la production du TNF α par les macrophages	78
2-1-6 Effet de l'extrait sur la production du NO par les macrophages	79
2-2- Effet de l'extrait d' <i>H. aspersa</i> sur la réponse inflammatoire <i>in vivo</i>	80
2-2-1 Effet de l'extrait sur les taux plasmatiques du TNF α	80
2-2-2 - Etude de l'effet de l'extrait d'escargots sur la réponse inflammatoire au niveau du foie....	82
2-2-2 -1 Effet de l'extrait d'escargot sur la structure histologique du foie.....	82
2-2-2 -2 Effet du LPS sur la structure histologique du foie.....	84
2-2-2 -3 Effet du traitement combiné sur la structure histologique du foie.....	85
2-2-3 - Etude de l'effet de l'extrait d'escargots sur la réponse inflammatoire au niveau de la	
rate.....	87
2-2-3 -1- Effet de l'extrait sur la structure de la rate.....	87
2-2-3 -2- Effet du LPS sur la structure histologique de la rate	89
2-2-3 -3- Effet du traitement combiné sur la structure histologique de la rate.....	90

3. Discussion.....	92
3-1 Effet de l'extrait d' <i>H. aspersa</i> sur l'activité des macrophages <i>in vitro</i>	92
3-2- Effet de l'extrait d' <i>H. aspersa</i> sur la réponse inflammatoire <i>in vivo</i>	96
3-2-1 Effet de l'extrait sur les taux plasmatiques du TNF α	96
3-2-2 Effet de l'extrait sur structure histologique du foie	97
3-2-3 Effet de l'extrait sur structure histologique du foie	98

Chapitre 3 : Evaluation de l'effet anti tumoral de l'extrait *in vitro*

1- Matériel et Méthodes	101
1-1 Lignée et culture cellulaire	101
1-2 Etude de la cytotoxicité de l'extrait vis-à-vis des cellules tumorales.....	101
1-3- Détermination du mode d'action de l'extrait	101
1- 3-1- Analyse quantitative de l'apoptose.....	101
1- 3-2- Détermination des différentes formes de mort cellulaire par microscopie à fluorescence	103
1- 3-2-1 Double Marquage des cellules Hs578T par Calcéine AM/PI	103
1- 3-2- 2 -Double marquage à l'Acridine orange (AO)/Ethidium bromide (EB)	104
1-4- Analyse de l'expression des gènes.....	104
1-4-2-1- Extraction des ARN totaux	105
1-4-2-2- Transcription inverse	105
1-4-2-3- Analyse de la qualité de l'ARN	106
1-4-2-4- Réaction de polymérisation en chaine (PCR).....	109
1-4-3- Quantification des ARN et analyse des données	110
1-5- Dosage du taux TNF α par ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay).....	113
1- 6- Analyse statistique.....	113
2- Résultats	114
2-1- Evaluation de l'activité cytotoxique de l'extrait sur les cellules tumorales.	114
2-3- Etude du mode d'action de l'extrait Hs578T.....	115
2-3-1 - Effet de l'extrait sur la morphologie des cellules Hs578T	115
2-3 -2- Etude de l'apoptose	116
2-3 -3- Détermination de la nécrose	117

2-3 -4- Effet de l'extrait sur l'expression du gène BCL2	121
2-3 -5- Effet de l'extrait sur l'expression du gène TNF α	121
2-3 -6- Effet de l'extrait sur l'expression du gène NK- κ B	122
2-3 -7- Effet de l'extrait sur l'expression du gène PTEN.....	123
2-3 -8- Effet de l'extrait sur l'expression du gène P53.....	124
2-4- Effet de l'extrait sur la production du TNF α par les cellules tumorales	125
3- Discussion.....	127
3- 1- Etude de la cytotoxicité de l'extrait vis- vis des cellules tumorales.....	127
3- 2- Etude du mode d'action l'extrait:.....	127
3-2-1 Effet de l'extrait sur le TNF α	127
3-2-2 Effet de l'extrait sur le NF- κ B	128
3-2-3 Effet de l'extrait sur la BcL2	129
3-2-4 Effet de l'extrait sur les gènes suppresseurs de tumeur P53 et PTEN	131
3-2-5 Type de mort cellulaire induit par l'extrait	132
IV- Hypothèse sur le mode d'action de l'extrait aqueux d'<i>H. aspersa</i>.....	134
V- Conclusion et perspectives.....	137
VI - Annexes.....	139
VII- Références bibliographiques.....	145

Liste des Figures.

Figure	Titre	Page
1	Schéma représentant les différentes voies de signalisation cellulaire	05
2	Schéma représentant les différents facteurs induisant la génération des radicaux libres oxygénés et les conséquences de cette production au niveau cellulaire	07
3	Réactions biochimiques de peroxydation des lipides	09
4	Réactions biochimiques d'oxydation des protéines	09
5	Schéma représentant le rôle des radicaux libres dans l'inflammation et la tumorigénèse	12
6	Structure de l'inflammasome	14
7	Les différentes étapes de migration des leucocytes vers le site inflammatoire	16
8	Schéma récapitulatif des différentes phases de l'inflammation aiguë	18
9	Schéma représentant les deux voies intrinsèque et extrinsèque de l'apoptose.	24
10	Schéma représentant les différentes structures des caspases et leurs rôles biologiques	27
11	Structure et rôle des protéines de la famille Bcl2.	31
12	Rôle du P53 dans l'apoptose	32
13	Voie de signalisation PI3K-PTEN	34
14	Schéma de représentant les deux voies d'activation canonique et alternative de l'NF-κB	38
15	Voie de signalisations induites par le récepteur TNF-R1	41
16	Rôle de l'enzyme PARP dans la nécroptose	42
17	Rôle des ions calcium dans la nécroptose	43
18	Représentation schématique des étapes de la formation du phagosomes	46
19	<i>Helix aspersa</i> (Müller 1774)	51

20	Extrait aqueux d' <i>H. aspersa</i>	51
21	La réaction du DPPH avec un anti oxydant (A).	52
22	Capacité de l'extrait d'escargot à réduire le DPPH, exprimé en %.	56
23	Capacité totale de réduction des ions Fe ³⁺ de l'extrait d'escargots.	57
24	Capacité de l'extrait a piégé le H ₂ O ₂	57
25	Capacité de l'extrait a inhibé la peroxydation lipidique.	58
26	Schéma représentant les échanges d'électrons entre les antioxydants et les radicaux libres	59
27	Génération des radicaux libres oxygénés par la réaction du Fenton. (AscH-) ions d'acide ascorbique (ascorbate) ; (Asc-) radical ascorbate.	60
28	Schéma représentant le principe de test MTT (A) et la structure du MTT et du Formazan	65
29	Schéma représente le principe du dosage ELISA sandwich	68
30	Principe de la réaction de Griess	69
31	Effet de l'extrait d' <i>H. aspersa</i> sur la viabilité des monocytes de lignée THP1 après 24 heures de traitement.	72
32	Effet de l'extrait d' <i>H. aspersa</i> sur la viabilité les macrophages de la lignée THP1 après 24 heures de traitement.	73
33	Variations morphologiques observées au niveau des cellules THP1 (objectif X20) après 24 heures de traitement avec l'extrait. (A) Cellules non traitées (Contrôle). (B) Cellules traitées par la dilution 1%. (C) Cellules traitées par la dilution 0,1%. (D) Cellules traités avec la dilution 10%.	75
34	Effet de l'extrait d' <i>H. aspersa</i> sur l'activité phagocytaire des macrophages de la lignée THP1 après 24 heures de traitement.	76

35	Effet de l'extrait d'escargots sur la production des radicaux libres oxygénés mesurée par la méthode de réduction intracellulaire du NBT : résultats exprimé en pourcentage comparativement au contrôle.	77
36	Effet de l'extrait d'escargot sur la concentration du TNF α sécrété par les macrophages THP1 dans le milieu de culture après 24 heures de traitement à l'extrait d'escargot.	79
37	Effet de l'extrait d'escargot sur la concentration du NO sécrété par les macrophages THP1 dans le milieu de culture après 24 heures de traitement à l'extrait d'escargot.	80
38	Effet de l'extrait d'escargots sur les taux plasmatiques du TNF α chez les souris.	81
39	Coupe histologique du foie des souris contrôle Gx100. (VP) : Veine porte hépatique ; (H) : hépatocytes.	82
40	Coupe histologique du foie des souris traitées avec l'extrait d'escargot <i>H. aspersa</i> , pour une période de 7 (A), 15 (B), 21 (C) et 28 (D) jours GX100. (VCL) : Veinecentrolobulaire. (a) : artère hépatique. (CK) : cellules de Kupffer. (S) : sinusoïde. (N) : nécrose.	83
41	Coupe histologique du foie des souris traitées avec LPS, pour une période de 7 (A), 15 (B), 21 (C) et 28 (D) jours GX100. (a) : artère hépatique. (N) : nécrose (S) : sinusoïde. (VCL) : Veinecentrolobulaire... (L) : lymphatique.	84
42	Coupe histologique du foie des souris traitées avec la combinaison LPS+ Extrait d'escargot, pour une période de 7 (A), 15 (B), 21 (C) et 28 (D) jours GX100, (E) agrandissement GX400 d'un granulome. (V) : veine. (CI) cellules immunitaires. (G) granulome. (S) sinusoïde. (M) macrophages. (H) hépatocyte.	86
43	Coupe histologique de la rate des souris contrôle (A) GX40 et (B) GX100. (PB): pulpe blanche, (PR) pulpe rouge, (a) artériole. (c): capsule externe fibro-élastique. (T): travée, (ZM) : zone marginale.	87

44	Coupe histologique de la rate des souris traitées avec l'extrait d'escargot pour une période de 7 (A), 15 (B), 21 (C) et 28 (D) jours GX40. (PB): pulpe blanche, (PR): pulpe rouge, (ZM) zone marginale, (c): capsule externe fibro-élastique. (PA) protéines amyloïdes, (T): travée.	88
45	Coupe histologique de la rate des souris traitées avec le LPS pour une période de 7 (A), 15 (B), 21 (C) et 28 (D) jours GX40. (PB): pulpe blanche, (PR): pulpe rouge, (a): artère, (ZM) zone marginale, (PA) protéines amyloïdes.	89
46	Coupe histologique de la rate des souris traitées avec la combinaison LPS+ Extrait pour une période de 7 (A), 15 (B), 21 (C) et 28 (D) jours GX40. (E) structure histologique de la rate après 15 jours GX400. (F) structure histologique des cellules de Muller (GX1000). (PB): pulpe blanche, (PR): pulpe rouge, (ZM) zone marginale, (T): travée, (PA) protéines amyloïdes, (c): capsule externe fibro-élastique, (CM) : cellule de Muller.	91
47	Dégranulation lysosomiale et production des radicaux libres au cours de la phagocytose	93
48	Structure et voies de signalisation stimulée par les LPS d' <i>E.coli</i>	95
49	Principe du marquage Annexine-PI.	102
50	Structure et mode d'action de la Calcéine et la PI	103
51	Schéma représentant les différentes étapes du contrôle de la qualité des ARN.	108
52	Les différentes étapes de la RT-PCR	111
53	Représentation graphique de l'intensité de fluorescence en fonction du nombre de cycles pour deux amplifications à partir d'ADNc d'un échantillon ou sans ADNc contrôle	112
54	Effet de l'extrait d' <i>H. aspersa</i> sur la viabilité des cellules de lignées Hs758T après 24 heure de traitement.	114

55	Altérations morphologiques (X100) observées au niveau des cellules Hs578T après 24 heures de traitement avec l'extrait. (A) Cellules non traitées (Contrôle). (B) Cellules traitées par la dose 0,1%. (C) Cellules traitées par la dose 1%.	115
56	Analyse quantitative de l'apoptose : Taux d'apoptose exprimés en % dans les lignées Hs578T	116
57	Analyse morphologique (GX100) de l'effet d'extrait d' <i>H. aspersa</i> sur les cellules de la lignée Hs578T : Photo prise au microscope a fluorescence <i>Leica</i> des cellules traitées avec l'extrait d' <i>H. aspersa</i> et marquées par les fluorochromes Calcein AM/PI. La calcein marque uniquement les cellules vivantes Le PI marque le noyau en rouge á une longueur d'onde d'émission de 645 nm. (A) : cellules du contrôle (B) cellules traitées á la dose 0,1% de l'extrait. (C) : cellules traitées á la dose1% de l'extrait.	118
58	Analyse morphologique de l'effet d'extrait d' <i>H. aspersa</i> sur les cellules de la lignée Hs578T : Photo prise au microscope a fluorescence <i>Leica</i> des cellules traitées avec l'extrait d' <i>H. aspersa</i> et marquées á l'AO/EB. (A) Contrôle. (B) Cellules traitées á la dose 0,1%. (C) Cellules traitées á la dose 1%.	120
59	Effet de l'extrait d' <i>H. aspersa</i> sur l'expression du gène BCL2 au niveau des cellules Hs578T.	121
60	Effet de l'extrait d' <i>H. aspersa</i> sur l'expression du gène TNF α au niveau des cellules Hs578T.	122
61	Effet de l'extrait d' <i>H. aspersa</i> sur l'expression du gène NF- κ B au niveau des cellules Hs578T.	123
62	Effet de l'extrait d' <i>H. aspersa</i> sur l'expression du gène PTEN au niveau des cellules Hs578T.	124
63	Effet de l'extrait d' <i>H. aspersa</i> sur l'expression du gène TP53 au niveau des cellules Hs578T.	125
64	Effet de l'extrait aqueux d' <i>H. aspersa</i> sur les concentrations du TNF α dans le milieu de culture	126
65	Cibles et niveau d'action des molécules bioactives dans la voie NF- κ B	130

66	Voie mort cellulaire programmé induite par les léctines	135
67	Stimulation de la production TNF et NO par les léctines.	136
68	Capacité total de l'acide ascorbique á réduire les ions fer ³⁺ par le test FARP	139
69	Gamme d'étalonnage de polyphénols réalisé á partir de différentes concentration d'acide gallique	139
70	Illustration d'une plaque de 96 puits laquelle le test colorimétrique MTT a été réalisé. Les puits encadré montrent une cytotoxicité élevée.	140
71	Etude de l'apopose : représentation graphique en nuage de point de la florescence. Les cellules marquées par l'annexine sont encadré en rouge.	141
72	Courbes d'amplification des gènes β actine et du NF- κ B, obtenues du light cycler (chaque courbe correspond á un cycle d'amplification).	142
73	Courbes d'amplification des gènes BcL2 et PTEN, obtenues á partir du light cycler.	142
74	Courbes d'amplification des gènes TNF et P53, obtenues á partir du lignt cycler.	143
75	Gamme d'étalonnage réalisé par TNF α recombinant de souris	143
76	Gamme d'étalonnage réalisé par TNF α recombinant humain	144
77	Gamme d'étalonnage du NO réalisé á l'aide du NaNO ₂	144

Liste des tableaux

Tableau	Titre	Page
01	Teneur de l'escargot <i>Helix aspersa</i> en vitamines	61
02	Différents constituant de la solution Rondon Hexamère Master mix (Roche)	106
03	Les amorces utilisées pour la PCR.	109
04	Altérations de la voie NF- κ B dans le cancer	129

Liste des Abbreviations

A

ADN: Acide déoxyribonucléique.

ADNc : ADN complémentaire.

ADP ribose : adénosine diphosphate ribose

ADP: adenosine di phosphate

AIF : Apoptosis Inducing Factor

AKT/PKB: Protein kinase B

Ambra 1

AMBRA1: autophagy/beclin-1 regulator 1

Ann : annexine

AO : acridine orange.

AP1: activating protein-1

Apaf-1 : Apoptotic protease activating factor-1

ARNm: Acide ribonucléique messagé

ATCC: American Type Culture Collection

Atg

Atg14 : Atg14L ou Barkor.

ATM: ataxia telangiectasia mutated

ATP: adenosine tri phosphate

B

Bad: BCL2-associated agonist of cell death

BAFF: B cell activating factor appelée également tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 13b.

Bak : BCL2-Antagonist/Killer

Bax: BCL2-associated X protein

BcL2 : B cell lymphoma-2

Bcl2l10: Bcl2 like 10.

Bcl-G: BCL2-like 14 (apoptosis facilitator).

Bcl-rambo: BCL2-like 13 (apoptosis facilitator).

Bcl-w: BCL2-like 2

Bcl-xl : BCL2-like 1

Bfk: BCL2-like 15

BFL1: BCL2-related protein A1

BH3 : Bcl-2 homology 3

Bid: BH3 interacting domain death agonist.

BiK: BCL2-interacting killer (apoptosis-inducing)

Bim: BCL2-like 11 (apoptosis facilitator)

Bir: baculoviral IAP repeat

Bmf: Bcl2 modifying factor

Bok : BCL2-related ovarian kille

Bpr: bacillopeptidase F

C

Calceine AM: Calcein acetoxymethyl ester

CARD : caspase recrutment domain.

Caspase : Cystéine ASPartyl protéASEs

CBP : co-activateur transcriptionnel protein

CCL2: Chemokine (C-C motif) ligand 2 (MCP) pour les monocytes

CCL5: Chemokine (C-C motif) ligand 5, (RANTES) pour les lymphocytes

CD: cluster differenciation.

CD: Cluster of differentiation

Cdc42 : cell division cycle 42.

CENP-C : centromere protein C

CHOP :C/EBP homologus protein,

c-IAP-1 : Cellular IAP 1

c-IAP-2: Cellular IAP 2

Con A: Concanavalin A.

COPD: chronic obstructive pulmonary disease.

COX2 : cyclooxygénase 2.

CRP : C- reactive protéin.

Cy-5: cyanines 5

CYLD: cylindromatosis.

D

DAMPs: damage asociated molecular patterns.

DD: Death Domain.

DED: death effector domain

Deptor: DEP domain-containing mTOR-interacting protein.

DFF40 : DNA fragmentation factor

DISC: death inducing signaling complex.

DMSO : dimethylsulfoxide

DMSO: diméthylsulfoxide

DNase I : Deoxyribonuclease I.

dNTP: 2'-désoxynucléotide-5' -triphosphate

DO: densité obtique

DPPH : 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyle

DR5: appelé Tnfrsf10b; tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10b

E

EB: ethidium bromide.

EC₅₀: efficient concentration 50

EDTA: acide éthylènediaminotétraacétique

EGF: epidermal growth Factor

ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay

ELKS : RAB6-interacting/CAST family member 1

ENO1 (enolase 1

ErK: Extracellular signal-Related Kinases

ESCRT: Endosomal Sorting Complex Required for Transport.

F

FACS: fluorescence-activated cell sorter

FADD: adaptatrices Fas associated death domain.

FADD: Fas-Associated protein with Death Domain

FAK : focal adhesion kinase

Fas : Fas cell surface death receptor

Fas: TNF receptor superfamily member 6.

FIP200

FITC: sothiocyanate de fluorescéine

FLIP : Flice inhibitory protein

FRAP : Ferric reducing ability of plasma

G

G-CSF: granulocyte- colony stimulating factor

GLUD1: glutamate déhydrogénase 1.

GLUL: glutamine- ammonia ligase.

GM-CSF: granulocyte- monocyte colony stimulating factor.

H

HGF: hepatocyte growth factor

HNE : hydroxynonenal.

HnRNPs: transcription factors heterogeneous nuclear ribo-nuclear protein.

Hrk: harakiri, BCL2 interacting protein

Hsp27: heat shock protein 2

I

IAP : Inhibitor apoptosis protein

IC₅₀: inhibitory concentration 50.

IC50: half maximal inhibitory concentration

ICAM-1 : inter cellular adhesion molecule

IFN: interferon

IFN β : interferon β

IKK β : Inhibitor of Kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells kinase β

IKKs (I κ B kinase

IKK β : inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase

IL- : interleukine

iNOS: NO synthase inductible.

I κ B : Inhibitor of Kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells

J

JAK: janus kinase

JNK : cJun N-terminal kinase.

K

kb: kilobase

kb: kilobase ;

kDa: kilodalton

kDa: kilodalton.

L

LAMP2: lysosome associated membrane protein

LBP: Lipopolysaccharide binding protein

LFA-1: lymphocyte function- associated antigen 1

LPS : lipopolysaccharides

LUBAC : linear ubiquitin chain assembly complex.

M

MAP kinase: Mitogen-activated protein kinases.

Mb: mégabase

Mcl-1: myeloid cell leukemia 1

MCP: macrophage chemotactic protein

M-CSF: monocyte colony stimulating factor

MDA: malondialdéhyde.

MDa: Mega Dalton

MIF: macrophage inhibitory factor.

MIP2: macrophage inhibitory proteine 2.

ML-I/ II: Mistletoe lectin 1 et 2.

mLST8: mammalian Lethal with SEC13 Protein 8

MMAC1: Mutated in multiple advanced cancer

MMP : matrix metalloproteinase

mTOC: MicroTubule-Organizing Center.

mTOR: mammalian target of rapamycin

mTORC1: mechanistic target of rapamycin complex 1

MTT: 3-(4,5-dimethylthiazoly-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

MyD88: myeloid differentiation primary response 88

N

NAD: nicotinamide adénine dinucléotide

NAM: acide nicotine mononucleotide.

NBT : nitrobleu tetrazolium

NEMO : NF-κB Essential Modulatory

NF-κB: nuclear factor kappa Light chain enhancer of activated B cell.

NIK: NF-κB inducing kinase.

NLR: leucine repeat containing receptors

NLS : NF-κB Localization Signal.

NO: oxyde nitrique

NOD like receptor: nucleotide oligomerization domain receptors

NOS : NO synthase.

Noxa: flavocytochrome b large subunit.

O

Omi/HtrA2: HtrA serine peptidase 2; high-temperature requirement A2;

P

p27: protein 27.

p53: protein 53.

PAMPs: pathogen associated molecular patterns

PARP1: (Poly (ADP ribose) polymerase 1

pb: paire de base

PBS : phosphate buffer solution

PCR: polymerase chain reaction.

PECAM-1: platelet endothelial cell adhesion molecule.

PGE2: prostaglandine E2.

P-gp : P-glycoprotein

PI : propidium iodide

PI: Propidium iodide.

PI3K: phospho inositol 3 kinase.

PI3P: phosphatidyl inositol 3 phosphate

PIP3 : phosphoinositide 3-phosphatase **PIP2 :** phosphoinositide di -phosphatase

PMA : phorbol 12-Myristate 13- Acetate.

potentiel mitochondrial ($\Delta\psi_m$)

PRAS40: Proline-rich Akt Substrate of 40 kDa

PRR: pattern recognition receptor

PTEN : Phosphatase and tensin homology deleted on chromosome ten

PUMA: p53 upregulated modulator of apoptosis.

PYGL: glycogen phosphorylase.

Qsp : complété jusqu'à

R

Rad51: RAD51 recombinase

Raf: root abundant factor

RANTES : Regulated on Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted

RE : réticulum endoplasmique.

RHD : Rel homology domain.

RIN : RNA integrity number

RIP1: Receptor interacting protein1

RIP3: Receptor interacting protein 3

RNase: ribonucléase

RNS: reactive nitrogen species.

ROS : reactive oxygen species

RPTOR: Regulatory associated protein of mTOR

RT-PCR: real time polymerase chain reaction

S

SAA : serum amyloide A.

SAA : serum amyloide A.

Sec : seconde

SIMPs : soluble intermembrane mitochondrial protein.

Smac/Diablo: second mitochondria-derived activator of caspase/Direct IAP Binding protein with Low pI

SNAREs: Soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein receptor.

SODD: silencer of death domain

STAT: Signal Transducers and Activators of Transcription

T

TAD : transcription activation domain.

TAK1: TAB transforming growth factor activated kinase

TAMs: tumor associated macrophages

Taq polymérase : Polymérase de *Thermus aquaticus*

TBA : acide thiobarbiturique.

TBARS: acides thiobarbiturique

tBid: Bid tronqué

TEP1: TGFβ- regulated and epithelial cell-enriched phosphatase.

TGFβ : Transforming growth factor beta

Th : T helper

TLR: toll like receptor.

TMB : tetra methyl benzidine

TNFR: tumor necrosis factor receptor.

TNF-R1: tumor necrosis factor receptor 1

TNFR-2: tumor necrosis factor receptor 2

TNF α : tumor necrosis factor α

TP 53: tumor protein P53

TRADD: TNF receptor associated death domain.

TRAF: tumor necrosis factor associated factor

TRAF2: TNF Related Associated Factor 2.

TRAIL : TNF-related apoptosis inducing ligand

Treg: lymphocyte T régulateur.

TRIF: tir domain containing adaptor protein inducing interferon β .

U

UFC/ml : Unités formant colonies par milli- litre.

ULK : UNC-51-like Kinase.

UV : Ultra violet

V

VCAM 1: vascular cell adhesion protein 1

VEGF: vascular endothelial growth factor

VLA-4 : very late antigen-4

Vps15/ Vps34 : Vacuolar protein sorting 15 et 34.

X

XIAP: X-linked IAP.

μ l: microlitre

μ M: micromole

I. INTRODUCTION

Ces dernières années, l'intérêt porté aux molécules bioactives naturelles et leurs propriétés thérapeutiques, a augmenté considérablement. Des recherches scientifiques dans diverses spécialités ont été développées pour l'extraction, l'identification et la quantification de ces composés, à partir de plusieurs organismes naturels à savoir, les plantes médicinales, les produits agroalimentaires (Rajasekaran *et al.*, 2008), les animaux et récemment, de nouvelles sources ont été explorées comme les lichens, les microorganismes et les organismes marins (Holdt & Kraan, 2011).

Les animaux sont utilisés dans la médecine traditionnelle depuis l'antiquité, jusqu'à présent certaines populations, en Brésil, Turquie, Moyen orient, Inde, Chine et Corée utilisent encore les insectes, les gastéropodes, les reptiles, les amphibiens et même les oiseaux et les mammifères pour traiter différentes maladies. Cependant, de nombreuses espèces de mollusques gastéropodes marins ou terrestres sont également utilisées dans la zoothérapie telle que *Theba pisana*, *Helix pomatia* et *Helix aspersa* (Benítez, 2011 ; Barros *et al.*, 2012).

En pharmacologie, le mucus d'escargot sert à la préparation de certains médicaments toujours sur le marché : l'Hélicidine, la Pertussidine et la Pomaticine. L'escargot est utilisé à de multiples fins thérapeutiques : traitement des brûlures, des douleurs de l'estomac, des maladies cardiovasculaires, ainsi que les vertiges et les évanouissements (Bonnemain, 2005). Il constitue une bonne source de protéines, de magnésium, de calcium, de fer et d'oméga 6 (Ozogul *et al.*, 2004 ; Cagiltay *et al.*, 2011). Il contient une lectine marqueur de tissus métastatiques (Walker *et al.*, 1993 ; Rambaruth, *et al.*, 2012), il secrète des molécules à action mycolytique, à activité spasmolytique des voies respiratoires, ainsi que des neurotoxines dont les dérivés sont de puissants analgésiques (Bonnemain, 2005).

Par ailleurs, les cancers sont des maladies qui résultent d'un ensemble de transformations malignes des cellules de l'organisme durant lesquelles, elles présentent certaines propriétés biologiques ; l'activation continue des voies de signalisation responsables de la prolifération cellulaire, l'inactivation des gènes suppresseurs des tumeurs, la résistance à la mort cellulaire et la stimulation de l'angiogénèse (Hanahan & Weinberg, 2000). Récemment, les chercheurs ont aussi rajouté deux autres caractéristiques, la reprogrammation de l'énergie et le métabolisme cellulaire ainsi que l'échappement au système immunitaire. Les transformations malignes sont aussi favorisées par le micro environnement, l'instabilité du génome et l'inflammation (Hanahan & Weinberg, 2011).

Cependant, la plupart des agents anti- cancéreux ont pour but principal d'induire une mort cellulaire programmée dans les cellules tumorales. La mort cellulaire programmée est une réponse cellulaire, cruciale durant le développement qui permet l'élimination des cellules indésirables (Kroemer *et al.*, 2009). L'apoptose est le type de mort cellulaire programmée le plus étudié. La cascade apoptotique est déclenchée par un stress mitochondrial ou par une activation des récepteurs de mort cellulaire comme le TNFR. Ce dernier est capable de déclencher d'autres formes de mort cellulaire programmée, appelées « non apoptotiques » comme la nécrose programmée ou la nécroptose (Christofferson & Yuan., 2010 ; Portt *et al.*, 2011).

Les cellules communiquent entre elles par contact direct ou par l'intermédiaire de molécules informatives comme les cytokines. La liaison d'un ligand avec son récepteur membranaire provoque une modification de sa conformation qui aboutit à la phosphorylation du récepteur lui même ou d'une enzyme qui lui est associée. Cette première phosphorylation entraîne l'activation en cascade d'autres enzymes appelées les protéines kinases qui activent les facteurs de transcription. Ces derniers se fixent sur l'ADN et régulent la synthèse de protéines spécifiques (Hubbard & Till, 2000).

La perturbation d'une ou plusieurs voies de signalisation ou des mutations au niveau des gènes codant pour leurs protéines entraînent l'apparition de nombreuses maladies. En effet, environ 40% des mélanomes contiennent des mutations affectant la structure de la protéine Raf, ce qui induit une activation continue de la voie MAP kinase (Davies *et al.*, 2002). De manière similaire, la mutation de la sous unité catalytique du phospho inositol 3 kinase (PI3K) ou du mTOR provoque une hyperactivité des voies PI3K et l'AKT/PKB entraînant l'apparition des cancers du sein, des ovaires ou du colorectal (Janku *et al.*, 2011 ; Cizkova *et al.*, 2012).

Les études sur les voies de bio-signalisation et leurs perturbations au cours des maladies inflammatoires et auto-immunes ont permis le développement de nouvelles classes thérapeutiques. Plusieurs stratégies de contrôle de la transduction sont possibles : le blocage des voies de signalisation avec des inhibiteurs pharmacologiques ou l'augmentation de l'expression d'un inhibiteur naturel. Les voies TRAF/NF- κ B, MAPK, PI3K/ AKT et JAK/STAT constituent actuellement les cibles thérapeutiques les plus importantes (Ferrajoli *et al.*, 2006 ; Baud & Karin, 2009 ; Courtney *et al.*, 2010 ; Lauring *et al.*, 2013)

En réalité, de nombreux traitements sont utilisés dans les maladies inflammatoires inhibent quelques unes de ces voies. Exemple, les glucocorticoïdes inhibent la voie NF- κ B en augmentant l'expression de l'ARN messager (ARNm) de I κ B ce qui séquestrent le NF- κ B dans le cytosol. La

salazopyrine (utilisée en traitement des colites et la maladie de crohn) inhibe la même voie en agissant sur l'IKK alors que le léflunomide diminue la dégradation de IκB (Stuhlmeier, 2005).

Récemment, de nouvelles approches ont été explorées pour développer de nouveaux agents anti- cancéreux plus sélectifs ciblant les voies de mort cellulaire (Bruin & Medema, 2008). L'apoptose est simulée par des peptides inhibiteurs de la protéine Bcl2 (O'Brien *et al.*, 2007), des activateurs des caspases 3, 6, et 9 et récemment des agents induisant une activation des récepteurs de mort TRAIL (Nagaraj *et al.*, 2006). Les autres types de mort cellulaires programmée nécroptose et autophagie sont ciblées principalement par des agents alkylants de l'ADN et des inhibiteurs des gènes suppresseurs de tumeur TP 53 et PTEN (Zong *et al.*, 2004).

Dans ce contexte, l'objectif de notre étude est de tester les effets d'un extrait aqueux de l'escargot *Helix aspersa*, une espèce très abondante et largement consommée dans la région méditerranéenne, sur la réponse inflammatoire ainsi que sur la prolifération tumorale et quelques voies de bio-signalisation impliquées dans le processus de mort cellulaire.

Dans un premier lieu nous allons tester la capacité de l'extrait à piéger les radicaux libres vu que la plupart des molécules anti tumorales possèdent une certaine capacité anti-oxydante et que les cellules tumorales produisent des taux élevés de ROS (reactive oxygen species) (Schumacker, 2006 ; Lee & Kang, 2013), ce qui a fait du statut redox une de nouvelle cible thérapeutique (Trachootham *et al.*, 2009).

Dans un deuxième temps, nous évaluons l'effet de l'extrait sur la réponse inflammatoire. Cette partie comporte deux aspects, une étude *in vitro* sur l'activité des macrophages, des cellules principales dans la réponse immunitaire inflammatoire et anti-tumorale. Une étude *in vivo* sur la réponse inflammatoire chronique chez les souris. Nous avons choisi un modèle d'inflammation chronique induite par les lipopolysaccharides (LPS) d'*Escherichia coli*. L'effet de l'extrait sera déterminé sur les taux de la cytokine pro-inflammatoire et anti -tumorale TNFα.

Une analyse histologique sera envisagée sur la rate et le foie. La rate est un organe lymphoïde siège de la réponse immunitaire alors que le foie est un organe de métabolisme, indicateur de toxicité et le site principal de la clearance des LPS. Cet organe constitue également un bon site de la réponse inflammatoire, vu que les hépatocytes produisent de nombreux médiateurs inflammatoires.

La dernière partie de notre travail est consacrée à l'étude de l'effet anti tumoral de l'extrait *in vitro* sur une lignée du cancer du sein. Nous procédons à l'étude de la cytotoxicité de l'extrait vis-à-

vis des cellules tumorales. Ensuite nous étudions le mode d'action de l'extrait, en déterminant le type de mort cellulaire qu'il induit.

L'effet de l'extrait a été aussi testé sur quelques voies de signalisation cellulaire. Nous ciblant d'abord l'apoptose et ses voies intrinsèque et extrinsèque, à travers l'étude de l'expression des gènes Bcl2 et TNF α . Les gènes suppresseurs de tumeurs TP53 et PTEN et finalement la voie NF- κ B qui est impliquée dans le contrôle de la prolifération cellulaire et la transduction du signal à travers les récepteurs TNFR (Fig. 1).

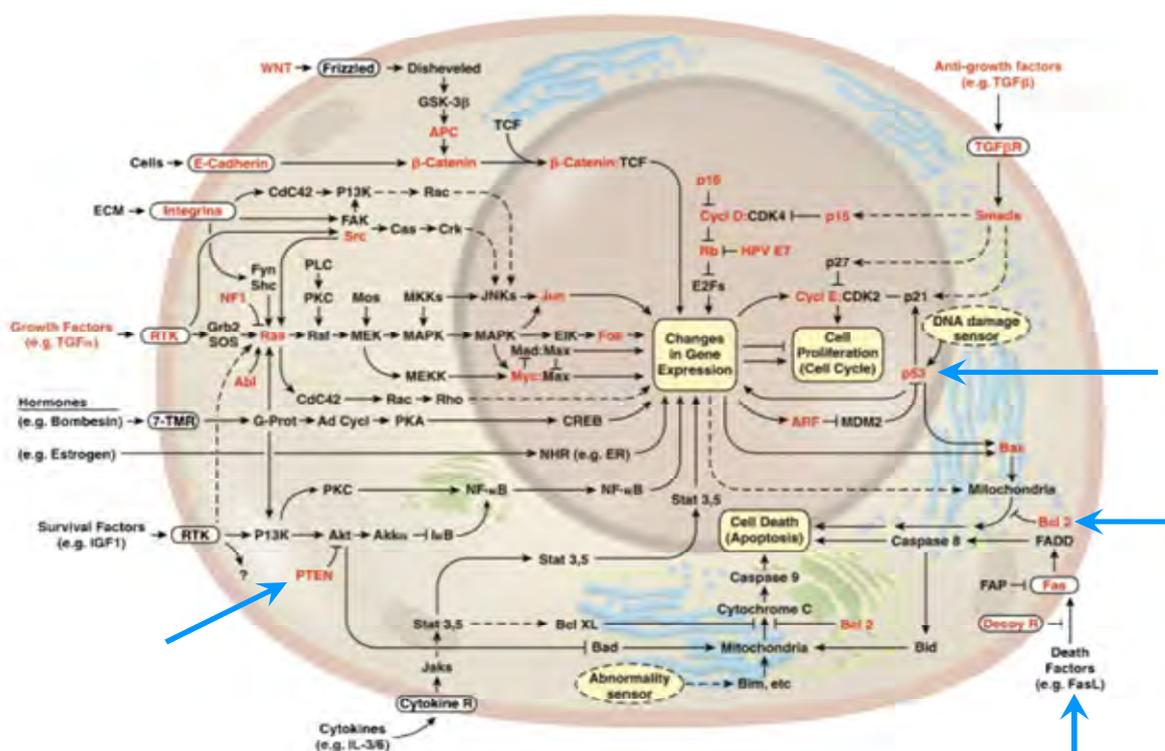


Figure 1 : Schéma représentant les différentes voies de signalisation cellulaire selon Hanahan & Weinberg, 2000. Les flèches en bleu indiquent les voies ciblées dans notre étude.

Partie Bibliographique
Partie Bibliographique

Chapitre 1: Radicaux libres et stress cellulaire

Chapitre 1: Radicaux libres et stress cellulaire

1- Les radicaux libres :

Un radical libre est une espèce chimique possédant un électron célibataire sur sa couche périphérique. La molécule d'oxygène (ou dioxygène, O₂) présente la particularité d'avoir la structure d'un biradical libre, en raison de ses deux électrons célibataires situés sur les deux orbitales de plus grande énergie.

L'oxyde d'azote (NO) est un radical peu réactif, synthétisé à partir d'un atome d'azote et d'une molécule d'oxygène, ne possédant qu'un seul électron sur ses orbitales.

Dans les phénomènes de stress oxydant prenant place dans les milieux biologiques, les radicaux libres qui interviennent, partagent pour caractéristique celle d'avoir un électron célibataire sur un atome d'oxygène ou d'azote. Ceci leur confère la dénomination d'espèces réactives de l'oxygène (ROS ; O₂, O₂⁻, OH, H₂O₂, O₃) ou de l'azote (RNS ; NO₂, ONOO⁻, N₂O₃ et HNO₂).

Les ROS et les RNS sont connues pour jouer un double rôle dans les systèmes biologiques, puisqu'ils peuvent être à la fois nocifs mais aussi bénéfiques, voire indispensables pour les organismes vivants (Valko *et al.*, 2004).

2- Le stress oxydant :

Le stress oxydant est défini comme le résultat d'un déséquilibre entre la production de composés pro-oxydants et leur élimination par les antioxydants. Il résulte de l'action d'un ensemble de facteurs incluant, les agents chimiques carcinogènes (Klaunig *et al.*, 1998), les radiations ionisantes (Azzam *et al.*, 2012) et même le régime alimentaire (un régime riche en pro-oxydant ou pauvre en anti-oxydant comme la vitamine C et E) (Sies *et al.*, 2005). Les cellules altérées par ces facteurs produisent des taux élevés de radicaux libres principalement les ROS (Trachootham *et al.*, 2009) (Fig 2).

Le stress oxydant joue un rôle central dans de nombreuses pathologies telles que l'athérosclérose (Vogiatzi *et al.*, 2009), le diabète de type 2 (Pitocco *et al.*, 2010), les pathologies neurodégénératives (Darvesh *et al.*, 2010), les maladies inflammatoires chroniques (Roessner *et al.*, 2008) ou encore la dégénérescence musculaire (Khandhadia *et al.*, 2010). Il a également été montré que le stress oxydant joue également un rôle central dans l'initiation, la progression et la malignité de nombreux cancers (Sosa *et al.*, 2013). Afin de maintenir l'homéostasie redox de la cellule, il existe de nombreux systèmes de défense antioxydants endogènes ou exogènes, enzymatiques ou non.

Les antioxydants enzymatiques représentent la composante la plus importante des systèmes de défense cellulaires contre les attaques oxydatives. Ces enzymes sont hautement conservées et présentes chez l'ensemble des mammifères (comme la superoxyde dismutase, la catalase, le glutathion peroxydase) (Shinde1 *et al.*, 2012).

Parmi les antioxydants non-enzymatiques, on distingue des composés endogènes (le glutathion, l'acide urique, la bilirubine et l'ubiquinol) et des composés exogènes comme les vitamines C et E et les polyphénols qui sont principalement apportés à l'organisme par l'alimentation (Levine *et al.*, 2011 ; Veres, 2012).

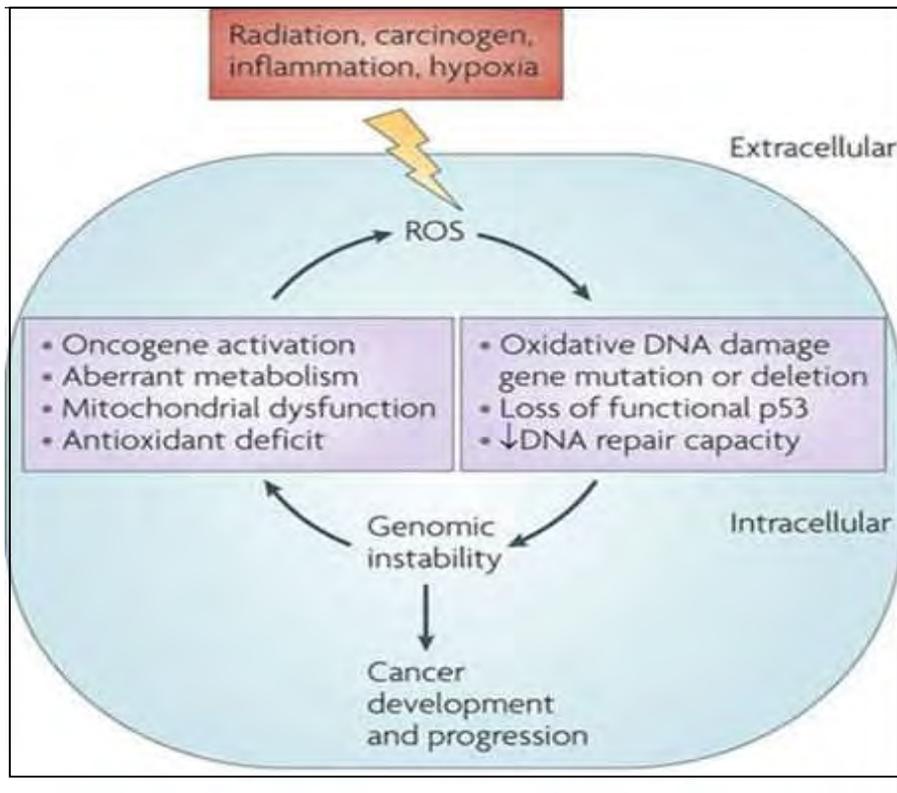


Figure 2: Schéma représentant les différents facteurs induisant la génération des radicaux libres oxygénés et les conséquences de cette production au niveau cellulaire (Trachootham *et al.*, 2009)

3- Les dommages induits par le stress oxydant:

Les dommages induits par le stress oxydant se résument principalement en, une peroxydation des lipides, une oxydation des protéines et des mutations de l'ADN. Ces altérations peuvent conduire à des pertes de fonction et d'intégrité, voire à la mort cellulaire notamment par l'intermédiaire de l'apoptose.

3-1 La peroxydation lipidique :

Les premières cibles des ROS sont les lipides, particulièrement ceux présents dans les membranes cellulaires. Les membranes riches en acides gras polyinsaturés sont très sensibles à l'oxydation en raison de leur degré élevé d'insaturation (Hulbertl, 2005 ; Pamplona *et al*, 2000). L'oxydation des lipides génère des peroxydes lipidiques qui sont eux-mêmes très réactifs. La peroxydation de lipides induit une modification de la fluidité, de la perméabilité et de l'excitabilité des membranes (Hong *et al*, 2004). Elle fournit également une grande variété de produits qui peuvent réagir avec les protéines et l'ADN (Marnett, 1999). Parmi les produits formés lors de la peroxydation lipidique l'isoprostane, le malondialdéhyde (MDA), les acides thiobarbiturique (TBARS) et le 4 hydroxynonenal (4-HNE) qui représentent les marqueurs de la peroxydation lipidique les plus étudiés (Cen & Niki, 2006 ; Janicka *et al.*, 2010) (fig. 3)

3-2 L'oxydation des protéines :

Les modifications oxydatives des protéines par les ROS provoquent l'introduction d'un groupe carbonyle dans la protéine. Les réactions d'oxydation protéiques sont classées en deux catégories. D'une part, celle qui cassent les liaisons peptidiques et modifient les chaînes peptidiques, et d'autre part, les modifications des peptides par addition de produits issus de la peroxydation lipidique comme le 4-HNE. De telles modifications conduisent généralement à une perte de fonctions catalytiques ou structurales des protéines (Bandyopadhyay, 1999) (fig 4).

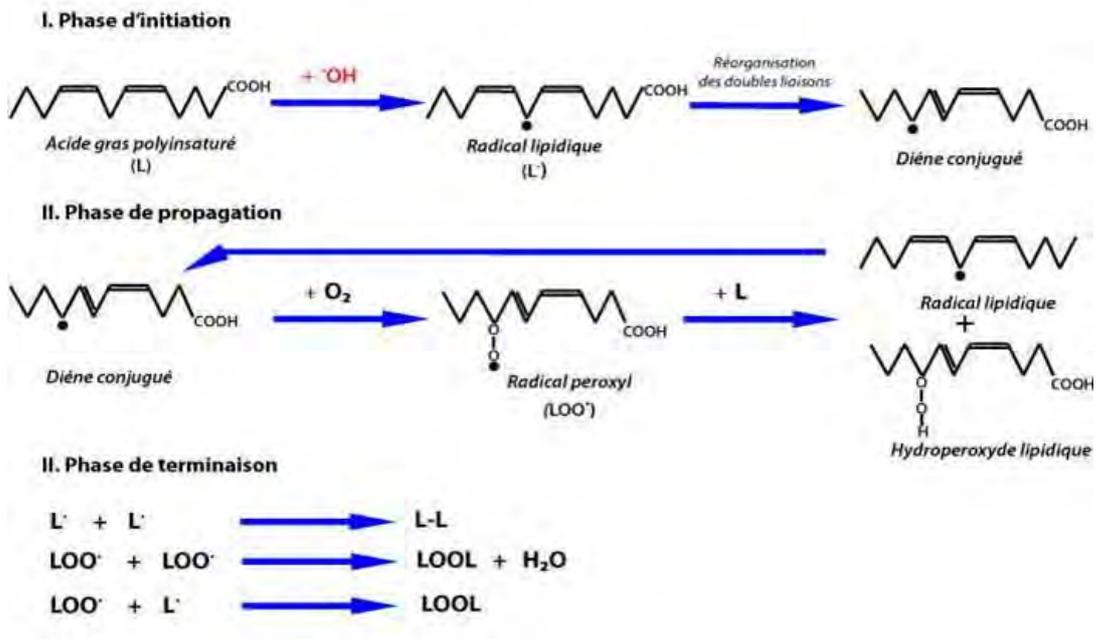


Figure 3: Réactions biochimiques de peroxydation des lipides (selon Mimica-Dukić *et al.*, 2012)

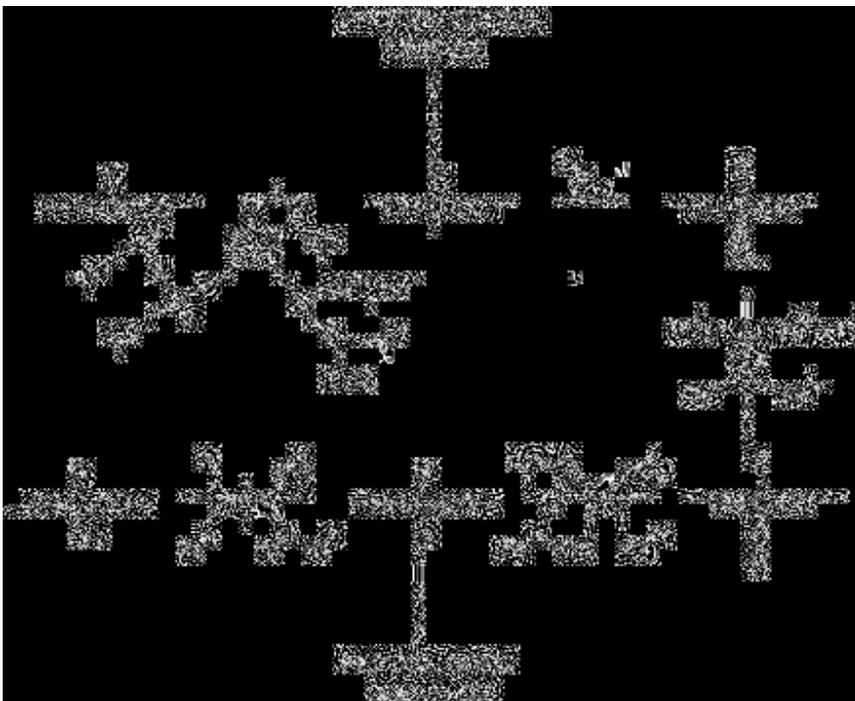


Figure 4: Réactions biochimiques d'oxydation des protéines (selon Berlett & Stadtman, 1997).

3-3 Les altérations de l'ADN :

Le stress oxydant étant principalement d'origine mitochondriale, cet organe constitue la première cible des ROS. En effet, le génome mitochondrial présente une susceptibilité au stress oxydant qui est 10 fois supérieure à celle du génome nucléaire vu que les mécanismes de réparation sont plus faibles que celui de l'ADN nucléaire, l'absence d'histones protectrices autour de l'ADN mitochondrial et sa localisation proche de la membrane interne source principale des ROS (Kazak *et al.*, 2012).

Les radicaux libres semblent diffuser à travers les membranes cellulaires et sont formés surtout au cours des processus d'inflammation. Le peroxyde d'hydrogène H₂O₂ est le radical le plus actif contre l'ADN, il induit une fragmentation des chromosomes et une oxydation de l'ADN. Le peroxyde d'azote, à son tour, possède un double effet, il entraîne une oxydation et une nitration des bases d'ADN. Les produits résultants de la peroxydation lipidique comme le MDA représentent des mutagènes puissants. Le MDA réagit avec les différentes bases pour former le déoxyguanosine, le déoxyadénosine, et le déoxycytidine. Ce genre d'interaction est souvent détecté dans les oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeurs (Marnett, 2002 ; Wang *et al.*, 2004)

4- Stress oxydant, inflammation et cancer

Dans les conditions physiologiques les radicaux libres sont produits par les cellules inflammatoires et les cellules épithéliales. Ils sont essentiels pour l'activité des phagocytes, ils possèdent un rôle anti-bactérien, ils participent dans la transduction du signal et la régulation du cycle cellulaire (Robinson, 2008).

L'effet des radicaux libres sur la tumorigénèse dépend de leurs concentrations, du type cellulaire et du micro- environnement. Les cytokines pro-inflammatoires stimulent l'expression et l'activation de l'oxyde nitrique synthase (NOS) et du cyclooxygénase COX2 qui génèrent les radicaux libres (Yang *et al.*, 2007) (fig.5).

Les cellules cancéreuses présentent des altérations et des dysfonctionnements au niveau des mitochondries, qui représentent le site majeur de la production et de la consommation des ROS. Le stress oxydant provoque des altérations au niveau de l'ADN mitochondrial (comme cité précédemment) et de la chaîne respiratoire (transport des électrons) (Zorov *et al.*, 2006).

Les études épidémiologiques ont montré l'existence d'un stress oxydatif chez les patients atteints de cancer (McEligot *et al.*, 2005; Lu *et al.*, 2007). Plusieurs recherches ont suggéré que les cellules cancéreuses sont sous stress oxydatif continue, elles produisent des taux élevés des ROS (Pervaiz & Clement, 2004; Schumacker *et al.*, 2006; Kryston *et al.*, 2011). Ces radicaux jouent un rôle important dans les différents stades de carcinogénèse (Klaunig & Kamendulis, 2004). Ils stimulent la signalisation de MAPK/AP1 et du NF- κ B (Morgan & Liu, 2011). Ils augmentent l'expression du VEGF et favorisent la production des MMP. L'administration des ROS semble augmenter les métastases alors que l'administration des anti- oxydant les inhibe (Ferraro *et al.*, 2006).

L'oxydation des protéines peut entraîner une altération dans de nombreuses protéines impliqués dans la régulation du cycle cellulaire comme la P53, il a été démontré que le des taux élevés de RNS entraine une modification et une accumulation de la protéine P53 dans le cytoplasme (Hussain *et al.*, 2003).

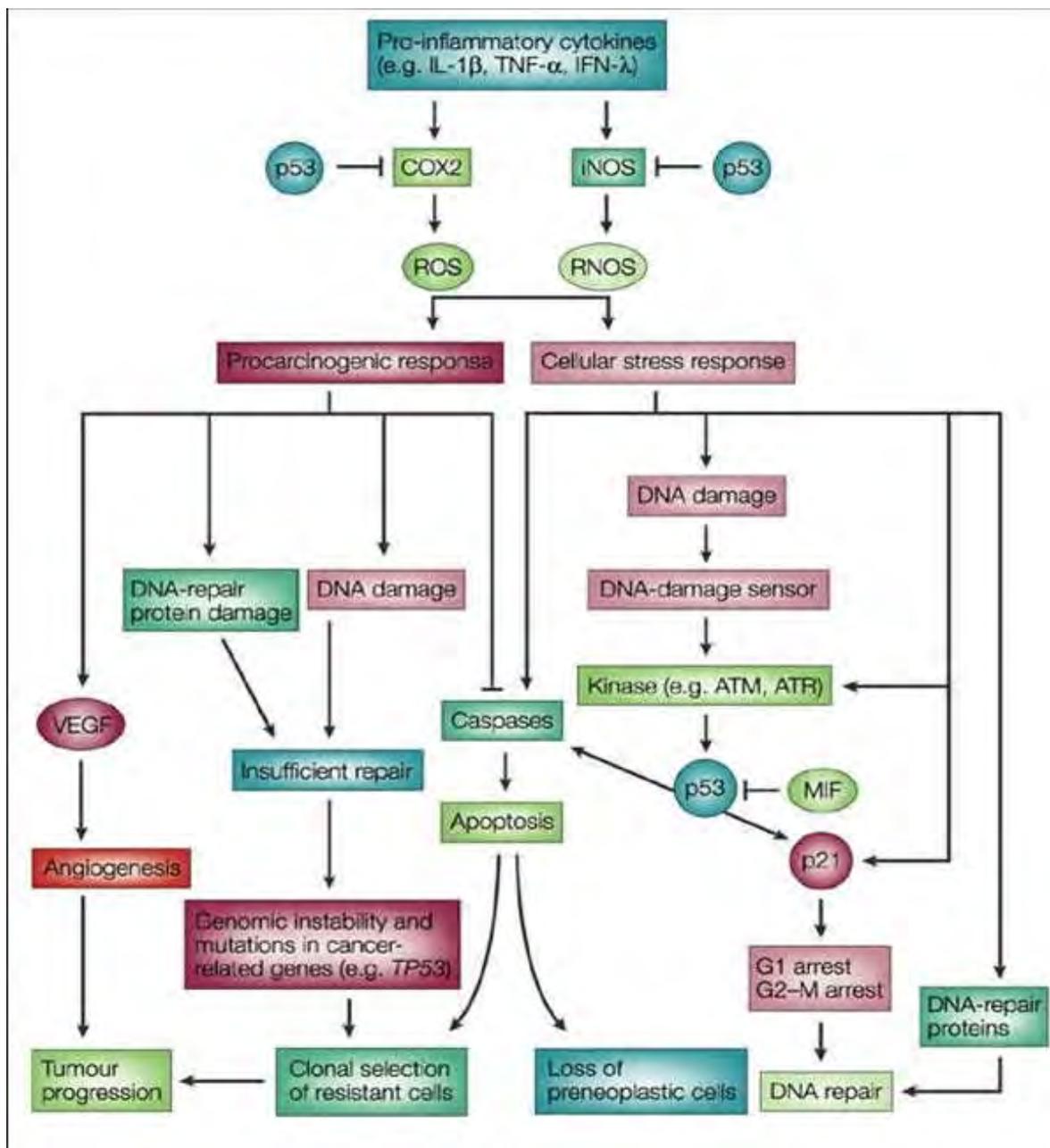


Figure 5: Schéma représentant le rôle des radicaux libres dans l'inflammation et la tumorigénèse (Hussain *et al.*, 2003).

Chapitre 2: L'inflammation
Chapitre 2: L'inflammation

1- L'inflammation

L'inflammation est une réponse immunitaire naturelle qui se développe suite à une lésion tissulaire provoquée par des facteurs physicochimiques (irradiations, brûlures, traumatismes mécaniques...) ou des infections microbiennes (bactériennes, virales ou parasitaires). Elle a pour but d'éliminer l'agent pathogène et réparer les lésions tissulaires. Elle peut être aiguë ou chronique (Medzhitov, 2008).

L'inflammation aiguë est une réponse immédiate, de courte durée (quelques jours), caractérisée par des phénomènes vasculo- exsudatifs intenses. Ce type d'inflammation guérit spontanément ou avec une thérapeutique.

L'inflammation chronique par contre est une réaction généralement, n'ayant aucune tendance à la guérison spontanée et qui évolue en persistant ou en s'aggravant pendant plusieurs mois ou plusieurs années. L'inflammation évolue souvent vers une chronicité selon l'agressivité du pathogène, le siège de l'inflammation ou la présence des anomalies de régulation du processus inflammatoire.

1-2- L'inflammation aiguë

L'inflammation débute par la reconnaissance du microorganisme ou les lésions tissulaires à travers la détection, par les cellules de l'immunité naturelle, des motifs PAMPs (pathogen associated molecular patterns) associés aux micro- organismes ou des DAMPs (damage associated molecular patterns) associés aux cellules endommagées de l'organisme. Ces motifs sont reconnus par des récepteurs spécifiques tels que les TLRs (toll like receptor) et les NLRs ou NOD like receptors (intracellular nucléotide binding domain and leucine repeat containing receptors) (Roach *et al.*, 2005 ; Proell *et al.*, 2008).

Une fois activés les TLRs activent la voie NF- κ B qui va stimuler l'expression des gènes des cytokines inflammatoires (O'Neill *et al.*, 2013); TNF α , IL-6, IL-1 β et les chimiokines. Il est important de signaler que l'IL-1 β est synthétisé d'abord sous forme de zymogène pro- IL-1 β , dont l'expression de son ARNm est TLR dépendante et sa maturation en IL-1 β nécessite un clivage par la caspase 1 et implique un complexe de haut poids moléculaire appelé inflammasome (Ahmed, 2011 ; Latz *et al.*, 2013). (fig 6).

Ces médiateurs favorisent le recrutement des cellules effectrices telles que les neutrophiles, les monocytes et les lymphocytes (phase cellulaire), ainsi que l'activation de l'endothélium vasculaire (phase vasculaire).

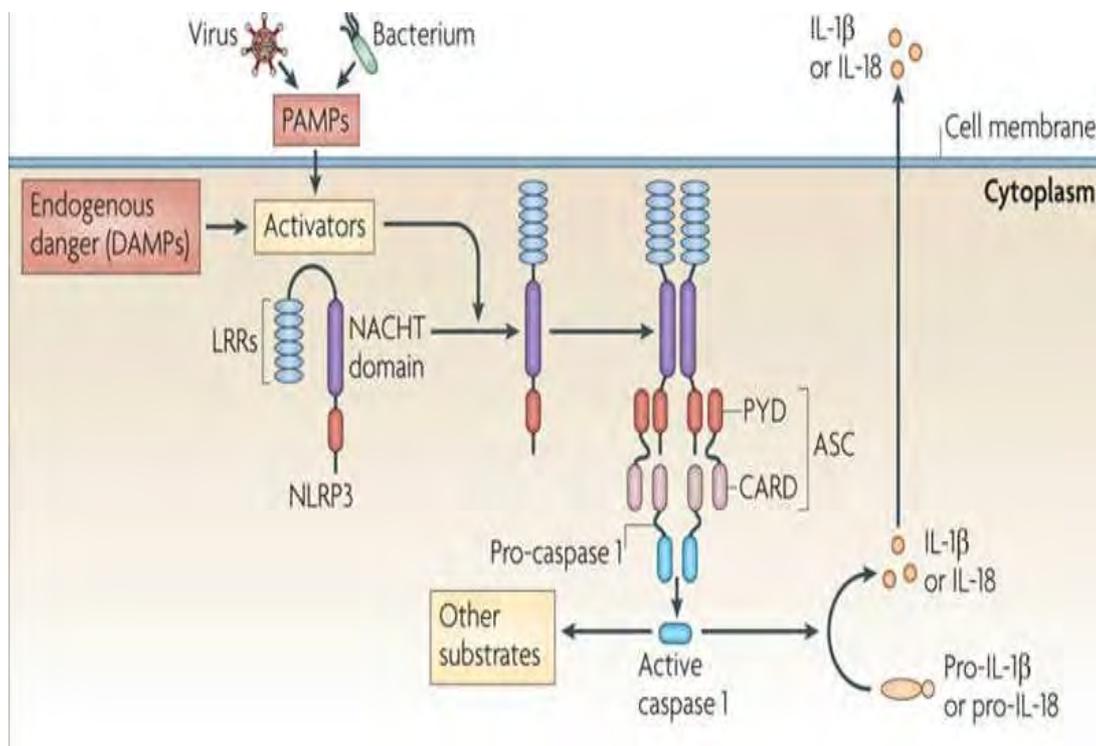


Figure 6: Structure de l'inflammasome (Tschopp & Schroder, 2010)

1-2-1 La phase vasculaire ou vasculo-exudative

Cette phase est définie par les 4 signes cardinaux rougeur, douleur, gonflement et douleur. Elle comporte les phénomènes suivants ; Congestion active, œdème et diapédèse.

La congestion est caractérisée par une vasodilatation et une augmentation de l'apport sanguin. L'œdème inflammatoire résulte de l'augmentation de la perméabilité vasculaire et de l'augmentation de la pression hydrostatique causée par la vasodilatation, de l'apport d'un liquide appelé exsudat constitué d'eau, des protéines plasmatiques, d'anticorps, de facteurs du complément et de coagulation vers le site inflammatoire, entraînant un gonflement interstitiel des tissus qui en comprimant les terminaisons nerveuses provoque la douleur (Nathan, 2002).

La phase suivante permet la migration des leucocytes en dehors de la microcirculation à travers l'endothélium capillaire et leur accumulation au niveau du foyer lésionnel. Elle intéresse d'abord les polynucléaires (pendant les 6 à 24 premières heures), puis un peu plus tard (entre 24 à 48 heures) les monocytes et les lymphocytes.

La diapédèse leucocytaire est donc déterminée par la liaison de molécules complémentaires des leucocytes et des endothéliums. L'adhérence des leucocytes aux cellules endothéliales fait d'abord intervenir des sélectines : E-sélectine et P-sélectine sur les endothéliums et L-sélectine sur les leucocytes. Les sélectines se lient par leur domaine lectine à des formes sialylées d'oligosaccharides Sialyl- Lewis^x. Il en résulte une adhésion brève et faible qui ne permet pas le passage trans-endothélial mais un roulement des leucocytes à la surface endothéliale (Weber *et al.*, 2007 ; Strell & Entschladen, 2008) (fig 7).

Rapidement d'autres molécules sont exprimées et permettent une adhésion solide des leucocytes à la surface de l'endothélium. Il s'agit de l'interaction entre les molécules d'adhérence endothéliales appartenant à la super famille des immunoglobulines (ICAM-1 et VCAM 1) et les intégrines présentes sur les leucocytes activés par des cytokines (exemples : LFA-1 pour les polynucléaires, ICAM1 et VLA-4 pour les lymphocytes et VCAM1 à la surface endothéliale). A la phase de passage trans-endothélial, d'autres molécules d'adhésion interviennent (par exemple PECAM-1 ou CD31) permettant la migration cellulaire à la surface de la matrice extra-cellulaire (Golias *et al.*, 2007 ; Bell, 2009).

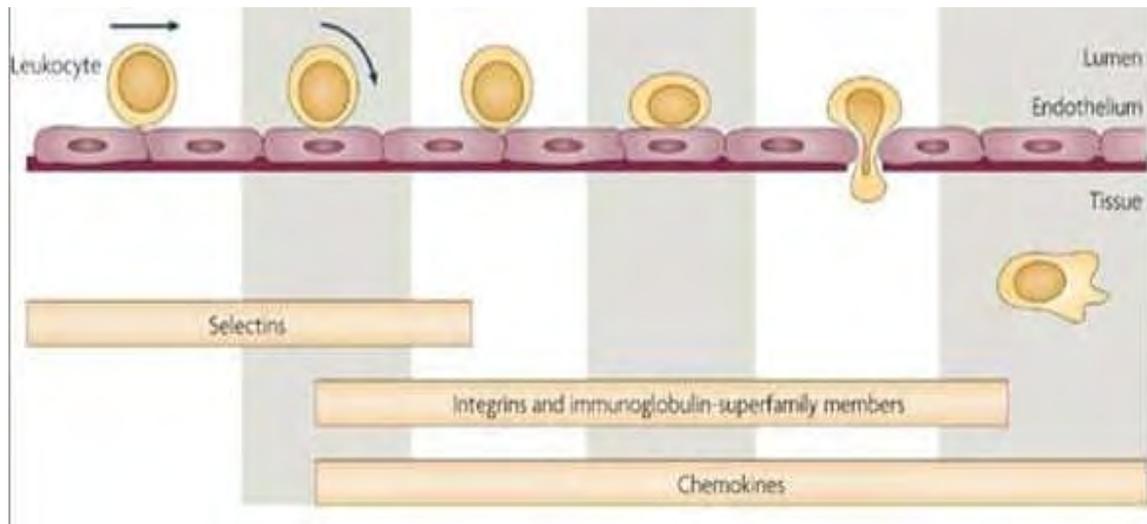


Figure 7: Les différentes étapes de migration des leucocytes vers le site inflammatoire
(Weber *et al.*, 2007)

1-2-2 La phase cellulaire:

Les neutrophiles sont les premiers phagocytes à atteindre le foyer inflammatoire suivis de monocytes qui vont se différencier en macrophages. D'autres types de cellules peuvent également intervenir telle que les mastocytes, les cellules dendritiques, les fibroblastes... etc (Karhausen *et al.*, 2013; Segura & Amigorena, 2013).

Durant cette phase la phagocytose représente le phénomène principal, les neutrophiles sont responsables, également, de la création d'un environnement cytotoxique par les libérations des ROS et des RNS et de nombreuses protéinases. La libération de ces molécules nécessite une consommation élevée d'oxygène et de glucose, ce processus est appelé « le burst respiratoire » (Kolaczowska *et al.*, 2013).

Les cellules inflammatoires secrètent de nombreux médiateurs, des cytokines, des radicaux libres, des eicosanoïdes (prostaglandines et leucotriènes), la sérotonine et les kinines... etc. Ces médiateurs sont responsables du maintien de la réponse inflammatoire et même des dommages tissulaires causés par les inflammations (Wang & Dubois, 2010).

Les macrophages et les cellules dendritiques migrent vers les organes secondaires, activent les lymphocytes T et polarisent la réponse en stimulant la différenciation des Th0 naïfs en Th1, Th2, Th17 ou Treg (Awasthi & Kuchroo, 2009 ; Ashley *et al.*, 2012). (fig.8)

1-2-3 La résolution et la détersion

Elle succède progressivement la phase vasculo-exsudative et elle est contemporaine de la phase cellulaire. La détersion peut être comparée à un nettoyage du foyer lésionnel: c'est l'élimination des tissus nécrosés, des agents pathogènes et du liquide d'exsudat. La détersion prépare obligatoirement la phase terminale de réparation-cicatrisation. Si la détersion est incomplète, l'inflammation aiguë va évoluer en inflammation chronique (Ahmed, 2011).

La phase de résolution est aussi caractérisée par la sécrétion de nombreux médiateurs anti-inflammatoires comme les lipoxines, les resolvines et les protectines, qui ont pour rôle de réduire la perméabilité vasculaire et la diapédèse. Ils stimulent l'apoptose des neutrophiles en bloquant la voie NF- κ B (Janakiram & Rao, 2009 ; Maskrey *et al.*, 2011). En même temps, ils augmentent l'activité phagocytaire des macrophages pour phagocyter les neutrophiles en apoptose.

L'élimination des neutrophiles constitue un élément très important dans la résolution de l'inflammation (El kebir & Filep, 2013 ; Freire & Van Dyke, 2013) (fig. 8).

1-2-4 Réparations et cicatrisation :

La réparation se traduit par la constitution d'un *bourgeon charnu*, c'est un tissu conjonctif transitoire. Il apparaît précocement, 1 à 4 jours après l'agression. Il précède et prépare la régénération épithéliale (Ortega-Gómez *et al.*, 2013).

Le bourgeon charnu est constitué de néovaisseaux, de fibroblastes, d'une matrice extracellulaire. Son remodelage aboutit à la cicatrisation (Velnar *et al.*, 2009).

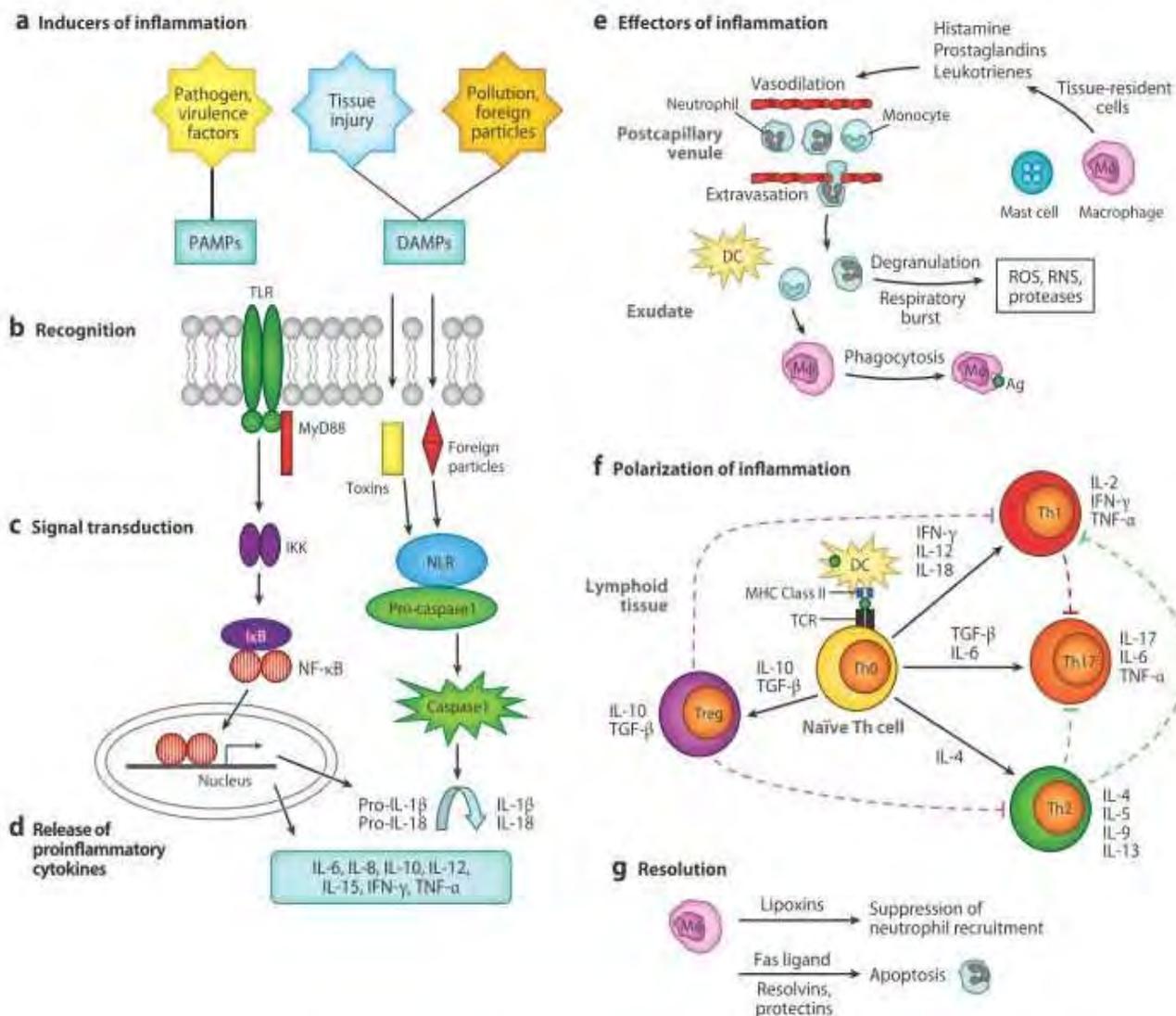


Figure 8: Schéma récapitulatif des différentes phases de l'inflammation aiguë (Ashley *et al.*, 2012)

1-3- L'inflammation chronique

L'inflammation chronique est une réponse inflammatoire prolongée qui se définit histologiquement par la présence continue de macrophages, de lymphocytes et de granulomes au niveau du tissu lésé. La persistance de l'inflammation est à l'origine de nombreuses pathologies comme l'alzheimer, l'athérosclérose, l'asthme, le diabète et le cancer (Iwalewa *et al.*, 2007 ; Vendramini-Costa & Carvalho, 2012).

1-4- Inflammation et cancer.

Les études épidémiologiques ont révélé que 17,8% des cancers dans le monde sont causés par des conditions d'inflammation chronique. Plusieurs observations ont montré l'existence d'une relation étroite entre le cancer colorectal, par exemple, et les inflammations chroniques de l'intestin telles que les colites ulcéreuses et la maladie de Crohn (Freeman, 2008). Des corrélations entre, le développement des carcinomes hépatiques et l'inflammation provoquée par les infections au virus d'hépatites B et C, ou entre les cancers gastriques et l'infection par *Helicobacter pylori* ont été reportées (Wroblewski *et al.*, 2010).

L'inflammation peut être due également à des lésions physico-chimiques. En effet, des corrélations entre le tabagisme et les cancers des bronches, l'asthme chronique et le cancer du poumon ont été aussi prouvées (Melamede, 2005 ; Akinosoglou *et al.*, 2013).

Le processus par lequel l'inflammation provoque la transformation des cellules tissulaires en cellules tumorales est encore mal connu, mais il semble aussi vrai que la tumeur altère la fonction immunitaire et donne à l'inflammation une fonction pro-tumorigénique. (Ganda *et al.*, 2009).

Cependant, les cellules immunitaires infiltrant la tumeur peuvent entraîner la régression de la tumeur comme elles peuvent participer à sa croissance. Au cours de l'inflammation les granulocytes et les macrophages produisent des taux élevés de médiateurs génototoxiques ; les ROS et les RNS qui endommagent l'ADN et augmentent de ce fait la fréquence des mutations (chapitre 1 partie bibliographique) (Grivennikov *et al.*, 2010).

Par ailleurs, les cellules tumorales produisent de nombreux médiateurs pour recruter les cellules immunitaires. Elles secrètent le MCP (macrophage chemotactic protein) qui stimule la

migration des monocytes circulants vers le site de la tumeur où ils vont se différencier en macrophages « tumor associated macrophages TAMs » (Quatromoni & Eruslanov, 2012).

Ces dernières cellules soutiennent la croissance tumorale à travers leur capacité d'intervenir dans le remodelage tissulaire et la production de facteurs de croissance. Ils produisent, des molécules immuno- suppressives comme l'IL-10 et les PGE2 pour protéger la tumeur contre l'action du système immunitaire. Des molécules favorisant la croissance, l'invasion et l'angiogénèse comme le VEGF (vascular endothelial growth factor) et l'endothéline 2 et les protéases MMP2 et MMP9 qui sont responsable de la dégradation de la matrice extra cellulaire. Les TAMs libèrent également l'EGF (epidermal growth Factor) pour stimuler la prolifération des cellules épithéliales.

Les neutrophiles sont aussi recrutés par la tumeur via des chimiokines (CXC), leur apoptose est inhibée par l'intermédiaire des facteurs de croissance hématopoïétiques (G-CSF et GM-CSF) produits par les cellules tumorales. Ces neutrophiles produisent des facteurs de croissance (comme le HGF (hepatocytes growth factor) qui augmentent la capacité de migration et d'invasion locale des cellules tumorales. Ils participent aussi au processus d'angiogénèse par la production de VEGF, d'IL-8 et MMP 9 (Tazzyman *et al.*, 2009).

Les lymphocytes T sont également recrutés dans le foyer tumoral par une série de chimiokines produites par les cellules tumorales ou les macrophages. Ils produisent le MIF (macrophage inhibitory factor) que son action inhibitrice sur l'expression du p53 a été récemment montrée (Jung *et al.*, 2008). Les lymphocytes T immuno-régulateurs CD4⁺CD25⁺ naturels représentent jusqu'à 30% de l'infiltrat leucocytaire intra-tumoral (Tan *et al.*, 2011)

De nombreuses études ont montré également, le rôle des cytokines produites par les TAMs et les cellules tumorales dans le développement des cancers. Les cytokines contribuent au développement tumoral soit par stimulation de la prolifération et la différenciation des cellules ou par inhibition de l'apoptose dans cellules endommagés.

Cependant, des taux élevés de cytokines inflammatoires ont été enregistrés dans différents types de cancer; IL-1 augmente l'expression du VEGF. L'IL-6 stimule la prolifération des cellules épithéliales et l'expression de facteur de transcription STAT3 qui joue un rôle crucial dans la régulation du cycle cellulaire (Li *et al.*, 2011 ; Obeid *et al.*, 2013).

Le TNF α constitue, la cytokine majeure dans la réponse inflammatoire chronique, elle possède un double effet pro et anti cancéreux. Des corrélations entre les cancers hépatiques et

gastriques, le cancer du sein, les lymphomes non hodgkinien et le polymorphisme TNF α ont été largement reportés (Hosgood *et al.*, 2013).

Elle possède également un effet cytotoxique destructif sur la tumeur et sa vascularisation. Paradoxalement, elle endommage l'ADN des cellules épithéliales et inhibe sa réparation. A des doses fortes le TNF α est cytotoxique pour les cellules tumorales, par contre à des doses faibles il stimule leurs progression (Balkwill, 2009). Le TNF α augmente aussi le recrutement des leucocytes, il active les lymphocytes T anti-tumoraux et stimule la voie de signalisation NF- κ B. A travers laquelle, il maintient une réponse inflammatoire prolongée et stimule l'expression de nombreux médiateurs inflammatoires et des molécules d'adhésion (Waters *et al.*, 2013).

Chapitre 3: mort cellulaire programmée
Chapitre 3: mort cellulaire programmée

1- Définition

La mort cellulaire programmée est un processus essentiel dans le développement des organismes. Elle permet le maintien de l'homéostasie tissulaire et l'élimination des cellules indésirables. Il existe plusieurs types de morts cellulaires, définis selon des critères morphologiques, biochimiques et fonctionnels (Bialik *et al.*, 2010).

Actuellement la notion de mort cellulaire programmée ne regroupe pas uniquement l'apoptose qui a été considérée pour longtemps comme étant le seul type de mort cellulaire programmée mais aussi la nécrose programmée et l'autophagie (Ouyang *et al.*, 2012).

2- L'apoptose

Dès 1972, l'équipe de Kerr a montré que, dans plusieurs types cellulaires, la mort est précédée par une condensation du noyau et du cytoplasme, une fragmentation du contenu cellulaire en corps apoptotiques (structure membranaire contenant des débris cytoplasmiques et nucléaires) et l'élimination de ces composants par phagocytose. De plus, ce type de mort cellulaire n'induit aucune réponse inflammatoire. Il ont proposé le terme apoptose, qui en grec, décrit la chute des feuilles en automne, pour identifier ce type de mort cellulaire programmée (Kerr *et al.*, 1972).

2-1- Les voies d'induction de l'apoptose

L'apoptose est la forme de mort cellulaire programmée la plus étudiée chez les animaux. Chez ces organismes, on reconnaît principalement deux voies qui conduisent à l'autodestruction cellulaire : la voie extrinsèque et la voie intrinsèque. Ces deux voies sont complexes et font intervenir un réseau d'interactions protéiques incluant des récepteurs, des protéines régulatrices et des caspases.

L'apoptose peut classiquement être divisée en trois phases : une phase d'induction ou d'initiation, une phase d'exécution et une phase de dégradation. La phase d'initiation de l'apoptose est un phénomène réversible au cours duquel le signal apoptotique (intra- ou extra-cellulaire) est transmis à des caspases initiateuses par des molécules adaptatrices. Ces caspases interviennent dans l'exécution de l'apoptose et conduiront à la dégradation de la cellule (Elmore, 2007).

2-1- 1- La voie extrinsèque ou dépendante des récepteurs de mort cellulaire

L'activation de la voie extrinsèque de l'apoptose se fait en réponse à la fixation de ligands spécifiques de type cytokines sur des récepteurs de surface appelés récepteurs de mort. Ces récepteurs de mort appartiennent à la superfamille des récepteurs tumor necrosis factor (TNFR) et incluent des récepteurs tels que le récepteur Fas, les récepteurs au TNF (TNFR-1, TNFR-2) et les récepteurs TRAIL et DR-5 (Lavrik *et al.*, 2005 ; Pennarun *et al.*, 2010) (fig. 9).

La fixation d'un ligand sur un récepteur de mort conduit à la trimérisation du récepteur qui lui permet d'être actif. La signalisation de ces récepteurs est médiée par leurs domaines de mort Death Domain (DD). L'activation du récepteur conduit au recrutement de protéines adaptatrices Fas associated death domain (FADD) ou TNF receptor associate death domain (TRADD). Ces dernières possèdent leurs propres domaines DD par lesquels elles sont recrutées au niveau des récepteurs activés. Ces protéines adaptatrices possèdent également un second domaine d'interaction protéique appelé death effector domain (DED) qui interagit alors avec le domaine DED de la pro-caspase 8 ou la pro-caspase 10 (Falschlehner *et al.*, 2007 ; Park, 2011). Ces caspases initiatrices sont sous forme de zymogène et sont recrutées par les protéines adaptatrices au niveau des récepteurs de mort et le complexe ainsi formé est appelé death inducing signaling complex (DISC) (Thorburn, 2004 ; Carrington *et al.*, 2006) (fig. 9).

La formation du DISC permet le rapprochement des pro-caspases initiatrices 8 et 10 qui sont alors en mesure de s'activer par autoclivage. La caspase 8 activée active à son tour les caspases effectrices qui sont responsables de la phase d'exécution de l'apoptose (Kumar, 2007, Rajesh *et al.*, 2009).

C'est principalement au niveau de la formation du DISC que la voie extrinsèque est régulée. En effet, il existe une isoforme de la caspase 8 appelée Flice-inhibitory protein (FLIP) (elle contient 2 domaines DED mais pas de site catalytique). Cette protéine agit en compétition avec les caspases 8 et 10 en empêchant leur recrutement au niveau du DISC (Ralph *et al.*, 2006 ; Lavrik & Krammer, 2012) (fig.9).

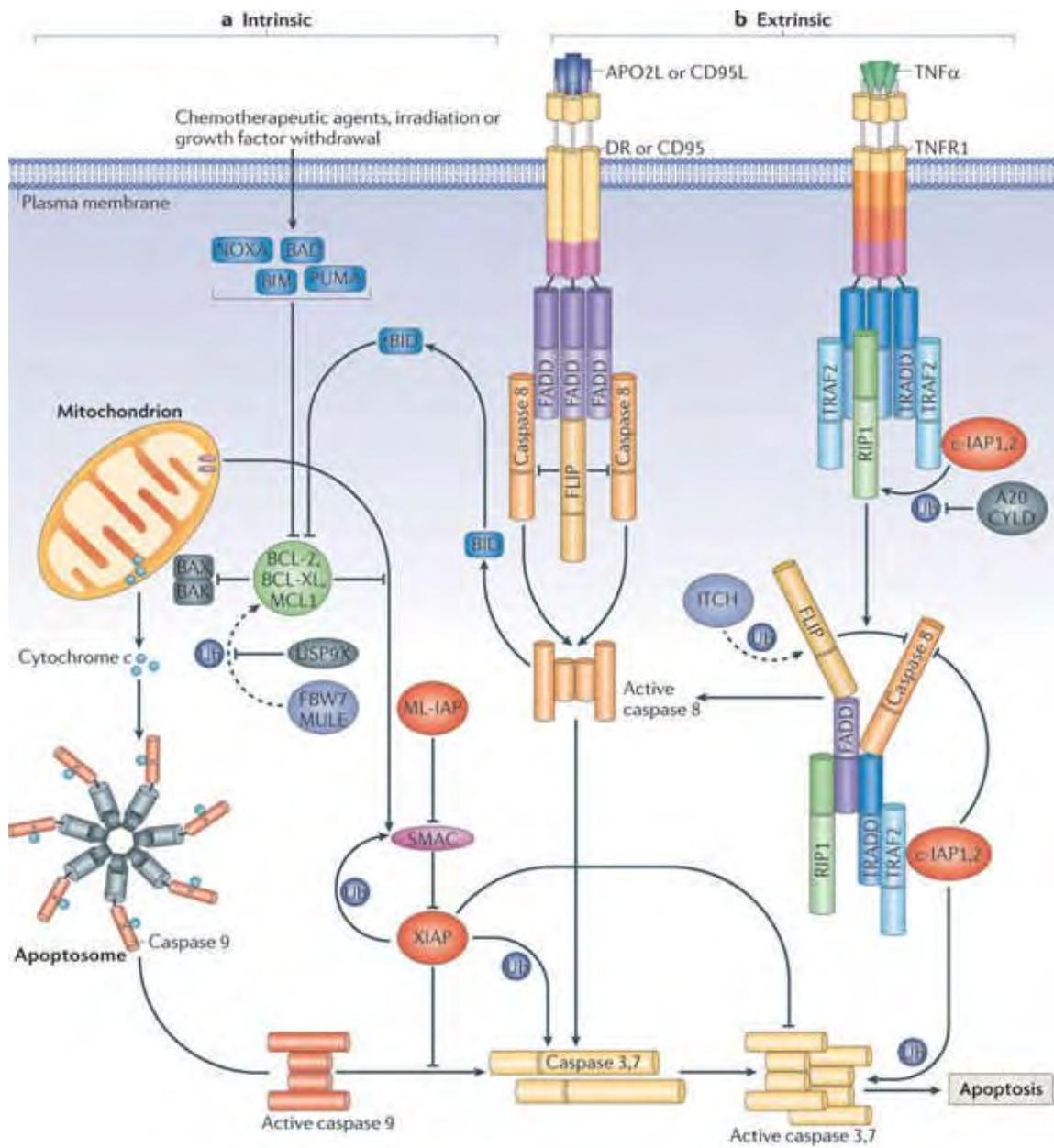


Figure 9 : Schéma représentant les deux voies intrinsèque (a) et extrinsèque (b) de l'apoptose. (Vucic *et al.*, 2011)

L'activation directe des caspases effectrices par les caspases 8 et 10 se fait dans des types cellulaires particuliers tels que les thymocytes. Dans ce type de cellules l'activation de la voie extrinsèque conduit à l'exécution de l'apoptose sans intervention de la mitochondrie dans la signalisation apoptotique (Jost *et al.*, 2009).

Dans les autres types cellulaires, le signal provenant des récepteurs activés n'est pas assez fort pour déclencher la cascade d'activation des caspases. Dans ce cas l'activation des caspases effectrices nécessite une amplification du signal apoptotique via l'activation de la voie intrinsèque ou voie mitochondriale de l'apoptose.

Le lien entre les deux voies d'induction de l'apoptose est assuré dans ces cellules par une petite protéine de la famille des protéines Bcl-2 appelée Bid. En effet, la caspase-8 activée clive Bid au niveau N-terminal de la protéine permettant l'exposition de son domaine BH3. La forme tronquée de Bid appelée tBid est alors rapidement transloquée du cytosol vers la membrane mitochondriale où elle se lie à Bax ou à d'autres protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 et induit l'activation de la voie mitochondriale de l'apoptose (Tait & Green, 2010 ; Beaudouin *et al.*, 2013).

2-1- 2- La voie mitochondriale ou intrinsèque

La mitochondrie est un organite cellulaire qui joue un rôle primordial dans la physiologie de la cellule en générant l'énergie nécessaire à toutes les réactions biochimiques de la cellule. Cette énergie dérive de la production d'ATP. Cependant, en dehors de son rôle métabolique la mitochondrie joue un rôle clé dans l'apoptose (Wallace *et al.*, 2010).

De manière générale, la voie mitochondriale de l'apoptose est induite par des signaux de stress cellulaire tels que l'exposition à des radiations UV, une irradiation γ , des dommages à l'ADN, une déprivation en facteurs de survie ou encore suite à l'action d'oncoprotéines, de protéines suppresseurs de tumeurs comme la protéine p53 ou de protéines de virulence virale et la plupart des agents chimiothérapeutiques (Kroemer, 2003).

Au cours de l'apoptose, l'eau et les différents solutés pénètrent dans la mitochondrie provoquant son gonflement et l'altération de la membrane externe conduisant au relargage dans le cytosol de protéines mitochondriales localisées dans l'espace intermembranaire. L'altération de la membrane externe de la mitochondrie est généralement associée à une modification de la perméabilité de la membrane interne conduisant alors à une variation du potentiel mitochondrial ($\Delta\psi_m$). Ces protéines mitochondriales relarguées dans le cytosol sont regroupées sous le nom « soluble intermembrane mitochondrial protein (SIMPs) » et jouent un rôle dans l'exécution du programme de

l'apoptose. Ce groupe de protéines comprend principalement le cytochrome *c* qui est un des constituants de la chaîne respiratoire, certaines pro-caspases 2, 3, 9 et les protéines Smac/Diablo (Second Mitochondria-derived Activator of Caspase/Direct IAP Binding protein with Low pI), et Omi/HtrA2 (HtrA serine peptidase 2). Toutes ces protéines participent dans la régulation de la voie mitochondriale dépendante des caspases. Les deux autres SIMPs, les AIF (Apoptosis Inducing Factor) et endonucléase G sont capables d'induire l'apoptose de façon indépendante des caspases (Candé *et al.*, 2002).

2-1-2-1- Les caspases

Après la phase d'initiation de l'apoptose caractérisée par l'activation des voies extrinsèque ou intrinsèque, interviennent les phases d'exécution et de dégradation. Ces différentes voies font intervenir dans leur déroulement l'activation d'une famille de protéases appelées les caspases (Cystéine ASPartyl protéASEs). Ces enzymes possèdent un résidu cystéine dans leurs sites actifs et clivent leurs substrats après un résidu aspartate (Lamkanfi *et al.*, 2007). Chez les mammifères, il existe 14 caspases (dont 12 sont présentes chez l'humain) que l'on classe en trois sous-types: les caspases initiatrices (2, 8, 9, 10) et les caspases exécutrices apoptotiques (ou effectrices, caspase 3, 6, 7), ainsi que les caspases inflammatoires (caspases 1, 4, 5, 11 et 12 et 13 jouent un rôle dans l'activation de cytokines pro-inflammatoires comme IL-1 β et IL-18 et ils n'ont pas de rôle dans l'apoptose ; la caspase 14 intervient dans la différenciation des kératinocytes) (Riedl & Shi, 2004, Fink & Cookson, 2005).

Les caspases sont des enzymes synthétisées sous forme de précurseurs inactifs ou zymogènes (pro-caspases). Elles sont formées de 3 parties principales : pro-domaine, de taille et de séquences variables, localisé à l'extrémité amino-terminale de la protéine, une grande sous-unité (environ 20 kDa) qui contient le site catalytique de l'enzyme et qui se situe au milieu de la molécule et une petite sous-unité (environ 10 kDa) localisée dans la partie carboxy-terminale (Fuentes-Prior & Salvesen 2004). Le pro-domaine peut être constitué de deux motifs différents : le motif CARD (caspase recruitment domain) et DED qui permettent une interaction entre les caspases. L'activation des pro-caspases nécessite le clivage du pro-domaine et un clivage entre la grande et la petite sous-unité. Ceci va permettre un réarrangement du site actif de la caspase en conformation active. Le site actif se trouve au niveau de la grande sous-unité mais celle-ci doit rester associée à la petite sous-unité pour exercer sa fonction catalytique (Kumar, 2007 ; Ghavami *et al.*, 2009) (fig.10).

Les caspases fonctionnent classiquement en hétérotétramères suite à la dimérisation de deux hétérodimères. En l'absence de tout stimulus apoptotique, les caspases initiatrices existent sous forme de monomères et les caspases effectrices sous forme de dimères de pro-caspases. (Taylor *et al.*, 2008). Les caspases initiatrices ont comme substrats les caspases exécutrices, alors que les caspases exécutrices possèdent des centaines de substrats qui vont contribuer à la destruction de la cellule apoptotique (Crawford & Wells, 2011). A ce jour, plus de 800 substrats (exemple la protéine Bid de la famille Bcl2, la polymérase ADP ribose, la nucléase DFF40) ont été identifiés et classés en fonction de leur importance dans la physiologie de la cellule (Fischer *et al.*, 2003).

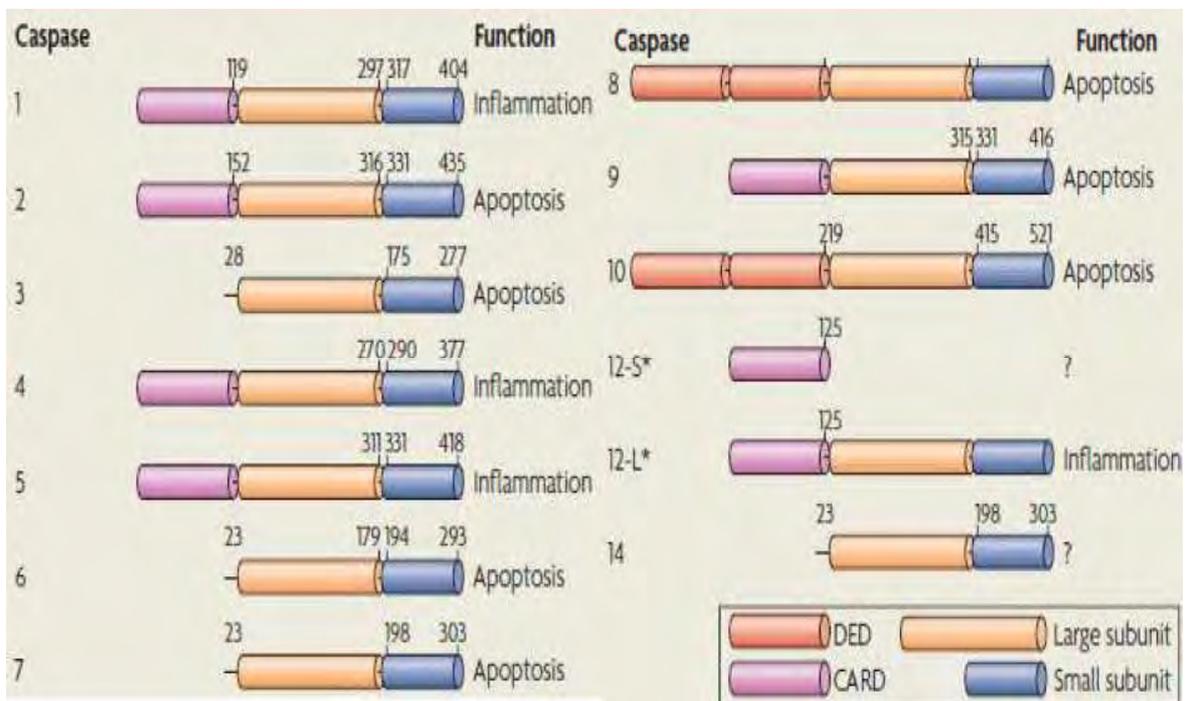


Figure 10: Schéma représentant les différentes structures des caspases et leurs rôles biologiques (Taylor *et al.*, 2008)

2-1- 2- 2 La voie mitochondriale dépendante des caspases

Le déclenchement de la voie mitochondriale dépendante des caspases se fait après relargage du cytochrome c depuis la mitochondrie. Le cytochrome c est synthétisé au niveau du cytoplasme sous forme d'un précurseur, il est ensuite, importé dans la mitochondrie où il subit une maturation et exerce sa fonction physiologique de transport d'électron entre les complexes II et VI de la chaîne respiratoire (Ow *et al.*, 2008). Au cours de l'apoptose seule la fraction soluble (dans l'espace inter-membranaire) du cytochrome c est relâchée dans le cytosol, la partie associée avec la membrane interne de la mitochondrie permettrait à la cellule de continuer à synthétiser de l'ATP, nécessaire à la réalisation de l'apoptose.

Dans le cytosol, le cytochrome c participe à l'activation de la cascade des caspases en activant une caspase initiatrice, la caspase-9. L'activation de la caspase 9 se fait au sein d'un complexe multiprotéique appelé apoptosome. L'apoptosome est formé de l'assemblage de 7 unités et chacune est formée de cytochrome c, de protéines Apaf-1, d'ATP et de pro-caspase 9 (Riedl & Salvesen, 2007).

L'apoptosome actif est alors capable de recruter et d'activer les caspases effectrices 3 et 7. La caspase 9 active peut alors être libérée dans le cytosol et cliver ses substrats. (Crawford & Wells, 2011).

L'activation de la cascade des caspases est quant à elle régulée par les protéines inhibitrices de l'apoptose (IAP, comme XIAP (X-linked IAP), c-IAP-1 ou c-IAP-2) qui se lient directement aux caspases et empêchent le clivage des caspases nécessaires à leur activation (Riedl & Shi, 2004 ; Darding & Meier, 2012).

Au cours de l'activation de la voie mitochondriale dépendante des caspases, parmi les SIMPs relarguées de la mitochondrie se trouvent les protéines Smac/DIABLO et Omi/HtrA2. Ces protéines sont en fait des inhibiteurs des IAP (Vande Walle *et al.*, 2008 ; Kaufmann *et al.*, 2012).

Le facteur AIF a été identifié et cloné il y a plusieurs années. Cette flavoprotéine de 57 kDa est confinée dans l'espace intermembranaire de la mitochondrie en conditions de fonctionnement normal. En effet, le précurseur de l'AIF (67 kDa) est synthétisé dans le cytoplasme puis importé dans la mitochondrie (Joza *et al.*, 2009). Une fois dans l'espace intermembranaire, la protéine est clivée, elle change de conformation et possède alors probablement une activité NADH oxydase (Modjtahedi *et al.*, 2006). Après activation de la voie intrinsèque, l'AIF se transloque de l'espace

intermembranaire vers le cytosol puis vers le noyau. Dans le noyau, l'AIF induit une condensation périphérique de la chromatine ainsi qu'un clivage de l'ADN en fragments d'environ 50 kb, ceci par interaction directe avec l'ADN sans spécificité de séquence (Ye *et al.*, 2002).

De plus, l'AIF amplifierait également ainsi sa propre libération une fois dans le cytosol. Ces actions dépendent directement de l'activité de l'AIF lui-même et sont indépendantes des caspases (Candé *et al.*, 2002).

L'endonucléase G est une nucléase mitochondriale non-spécifique de 30 kDa très conservée chez les eucaryotes (Wang & Youle, 2009). L'activation de la voie intrinsèque de l'apoptose conduit à la libération de l'endonucléase G dans le cytosol puis à sa translocation dans le noyau. Elle digère l'ADN en absence d'activité caspase. L'endonucléase G pourrait agir avec l'exonucléase et la DNase I dans le noyau pour générer les fragments d'ADN de haut poids moléculaire (Widlak *et al.*, 2001) mais elle peut également générer des fragments oligonucléosomiques (Samejima *et al.*, 2001). L'endonucléase G pourrait également coopérer avec l'AIF pour induire une apoptose indépendante des caspases (Norberg *et al.*, 2010).

2-1-3- La voie dépendante du réticulum endoplasmique

Le réticulum endoplasmique (RE) est le site de l'assemblage des protéines, il est également un site de stockage du calcium intracellulaire Ca^{2+} , qui permet de réguler la concentration cytoplasmique en calcium. Depuis quelques années un nouveau rôle dans la réponse au stress cellulaire et l'induction de l'apoptose est apparu concernant le RE (Sankari *et al.*, 2012).

Plusieurs voies apoptotiques peuvent être induites après un stress du RE (accumulation de protéines mal repliées dans le RE). La première est l'induction transcriptionnelle de CHOP (C/EBP homologous protein, nommée également Gadd153), un membre de la famille des facteurs de transcription C/EBP. CHOP est peu ou pas exprimé dans des conditions physiologiques normales et est fortement induit en réponse à un stress du réticulum. Sa surexpression conduit à un arrêt de la croissance cellulaire et à l'apoptose (Chikka *et al.*, 2013).

La seconde voie d'induction de l'apoptose met en jeu la voie de transduction cJun N-terminal kinase (JNK) (Urano *et al.*, 2000).

L'activation de la caspase-12 est la troisième voie apoptotique induite par un stress du RE. La caspase 12 est localisée au niveau de la membrane du RE côté cytosolique. Son activation conduit à l'apoptose (Oyadomari *et al.*, 2002).

2-2- Régulation moléculaire de l'apoptose

Le processus apoptotique est régulé par de nombreux facteurs, nous citons dans ce qui suit quelques facteurs qui portent intérêt à notre travail.

2-2-1 La famille des Bcl2

La famille Bcl2 constitue la famille principale de régulateur de l'apoptose. Elle se compose chez l'humain de sept protéines anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-xl, Bcl-w, Bfl-1, Mcl-1, Bcl2l10 et Bpr), six protéines pro-apoptotiques à multidomains (Bax, Bak, Bok, Bcl-G, Bcl-rambo et Bfk) et de 8 protéines de mort à « BH3-only » (Bid, Bad, Bik, Bim, Bmf, Noxa, Puma et Hrk) (Boumela *et al.*, 2009).

Les membres de la famille Bcl-2 possèdent des séquences hautement conservées appelées domaines BH (Bcl-2 homology). Les membres anti-apoptotiques comme Bcl-2, Bcl-XL possèdent 4 domaines BH (BH1, 2, 3 et 4), les membres pro-apoptotiques à multi-domaines comme Bax, Bak possèdent 3 domaines BH (BH1, 2 et 3). Il existe également des membres pro-apoptotiques avec un seul domaine BH: les « BH3-only » (ex : Bid, Bad). Certaines protéines de la famille Bcl-2 présentent dans leur séquence un domaine transmembranaire en C-terminal qui leur permet de s'insérer dans la membrane externe mitochondriale (Petros *et al.*, 2004) (fig.11).

Les protéines anti-apoptotiques comme Bcl-2 interagissent avec les protéines pro-apoptotiques de type Bax de façon à neutraliser leur activité. Les protéines BH3 only répondent aux signaux de mort en activant les membres pro-apoptotiques de type Bax soit directement soit indirectement en inactivant les protéines de survie de type Bcl-2. L'activation de Bax conduit à la rupture de la perméabilité de la membrane mitochondriale externe, au relargage du cytochrome c dans le cytoplasme et à l'activation des caspases, responsables de la mort cellulaire (Dewson & Kluck, 2009).

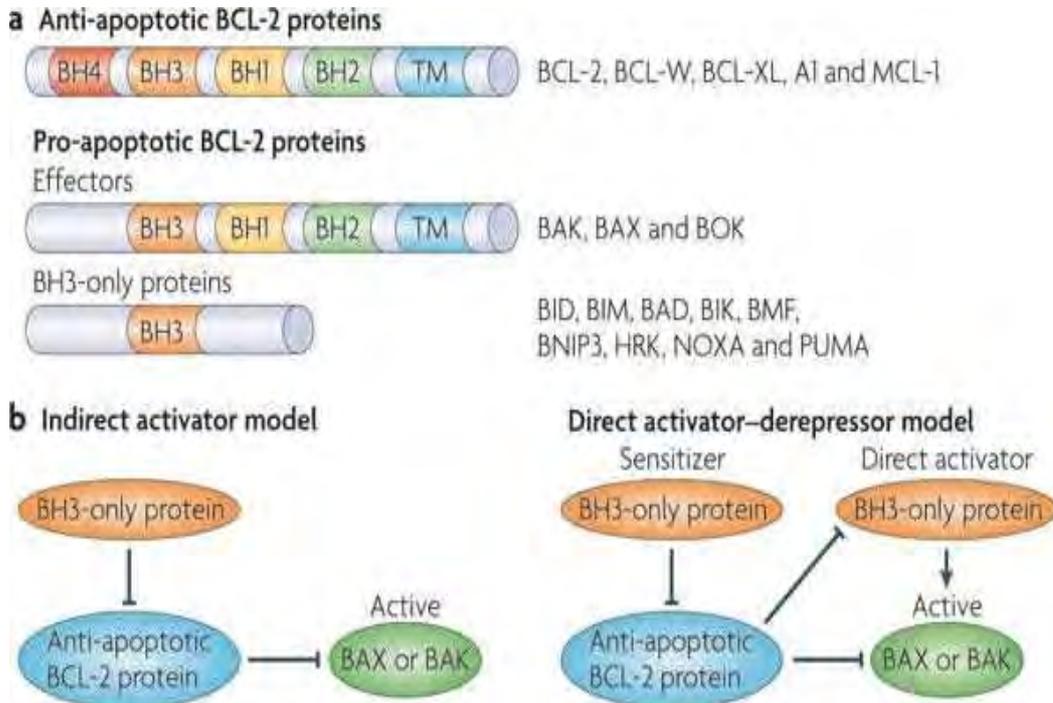


Figure 11: Structure et rôle des protéines de la famille Bcl2. (Tait & Green, 2010)

2-2-2- Le facteur de transcription P53

Le facteur de transcription p53 est un des premiers suppresseurs de tumeur qui a été identifié. Sa fonction majeure est de protéger l'organisme de la progression maligne. Des mutations du gène p53 sont observées dans la majorité des cancers humains et dans les cancers dans lesquels p53 n'est pas mutée, sa voie de signalisation est fréquemment inactivée (Parant & Lozano, 2003, Muller & Vousden, 2013).

Fonction :

Au niveau cellulaire, p53 joue un rôle central dans le maintien de l'intégrité génomique en inhibant la prolifération des cellules en réponse à un stress. Une grande variété de signaux de stress tels qu'un endommagement de l'ADN, l'hypoxie, une privation en nucléotides, un stress oxydatif et l'activation oncogénique conduisent à l'activation fonctionnelle de p53 (Pietsch *et al.*, 2008)

La protéine p53 joue un rôle crucial dans l'apoptose. Elle contribue au déclenchement du processus apoptotique non seulement par son rôle de facteur de transcription, mais également par son activité protéique (Speidel *et al.*, 2006). Tout d'abord, p53 active la transcription de nombreux gènes pro-apoptotiques qui codent pour des protéines de la voie intrinsèque comme Bax et Apaf-1 mais aussi Noxa et PUMA (Gasco *et al.*, 2002).

P53 transcrit également des gènes codant pour des protéines de la voie extrinsèque comme Fas et DR5-Killer, elle reprime aussi, la transcription de gènes anti-apoptotiques tels que Bcl-2. Enfin, la protéine p53 semble être importée dans la mitochondrie où elle agirait comme un stimulateur de l'activité de perméabilisation membranaire de Bax et Bak et renforcerait le relargage de cytochrome c (Fridman & Lowe, 2003). (fig. 12).

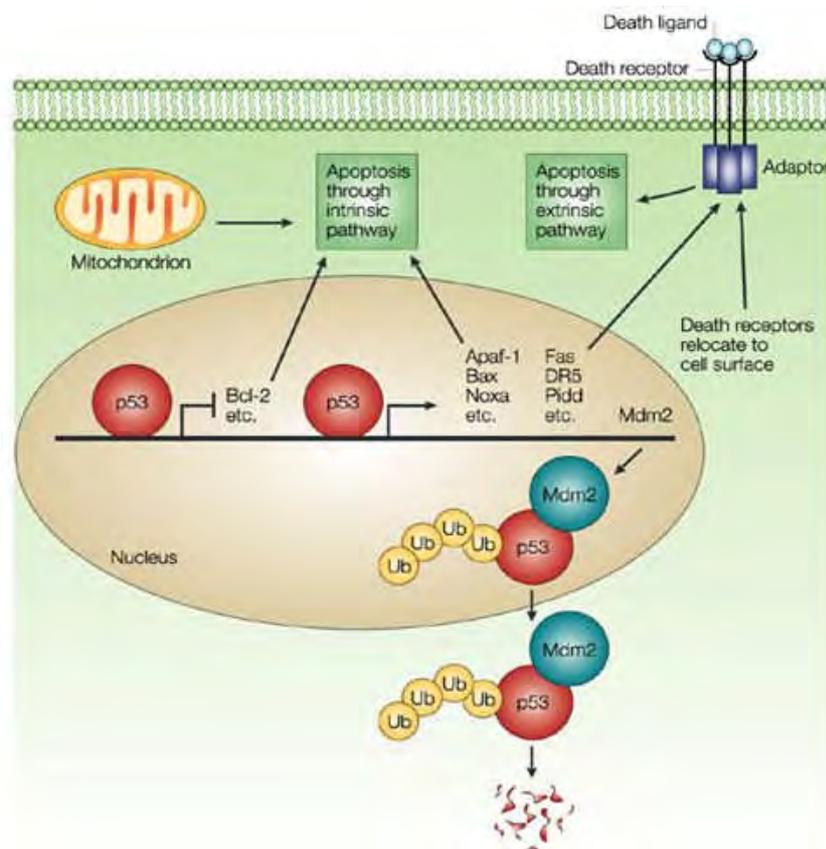


Figure 12: Rôle du P53 dans l'apoptose (Jesenberger & Jentsch, 2002).

2-2-3 Le gène PTEN

PTEN (Phosphatase and tensin homology deleted on chromosome ten) un gène suppresseur de tumeur également appelé MMAC1 (Mutated in multiple advanced cancers) ou encore TEP1 (TGFβ-regulated and epithelial cell-enriched phosphatase). Il a été identifié en 1997 par trois groupes différents: Parson, Sun et Steck (Li & Sun, 1997; Li *et al.*, 1997 ; Steck *et al.*, 1997). L'équipe de Sun l'ont identifié comme une nouvelle phosphatase à double spécificité, sa transcription étant modulée par TGFβ. Les deux autres équipes, l'ont identifié comme un gène fréquemment muté ou délété dans divers cancers.

PTEN est également le gène le plus fréquemment muté dans les cancers après p53. La protéine PTEN appartient au groupe des phosphatases à double spécificité capable de déphosphoryler des résidus phosphosérine et phosphothréonine ou phosphotyrosine, et possède une activité phosphoinositide 3-phosphatase (déphosphoryle le PIP3 en PIP2) (Chalhoub & Baker, 2009).

Fonction

La principale fonction de PTEN est de réguler négativement la voie de signalisation PI3k et en empêchant l'activation/ phosphorylation de la sérine/thréonine kinase Akt. Plus précisément, PTEN convertit le PIP3 en PIP2, sa forme inactive, en déphosphorylant l'anneau inositol en position D3 du PIP3 (Bononi *et al.*, 2011) (fig 13).

PTEN peut aussi induire une diminution de la prolifération par l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 ou l'apoptose via la p27 et la cycline D1 (Uner *et al.*, 2005 ; Diao & Chen. 2007). Différentes études ont démontré que PTEN pouvait, également, inhiber la migration cellulaire via la déphosphorylation de la FAK (focal adhesion kinase) (Zhang *et al.*, 2004), générer ou soutenir la polarité des cellules épithéliales par le biais de la Cdc42 (Martin-Belmonte *et al.*, 2007), augmenter la stabilité chromosomale par son interaction avec la protéine centromérique CENP-C et augmenter la transcription de Rad51 qui participe à la réparation du double brin d'ADN (Shen *et al.*, 2007).

La diminution de l'expression de PTEN ou son inactivation entraînerait une activation / phosphorylation augmentée voire constitutive d'Akt dans les cellules tumorales (Denning *et al.*, 2007; Zhao, 2007). De plus, les mutations/délétions de PTEN combinées à l'activation d'Akt ont été associées avec la résistance aux agents chimiothérapeutiques tels que le cisplatine et la doxorubicine (Lee *et al.*, 2005; Wan *et al.*, 2007). Finalement, des mutations germinales de PTEN sont aussi retrouvées dans des syndromes caractérisés par des déficits neurologiques, une prédisposition pour les cancers du sein, du

colon de la prostate, du poumon et de l'endomètre (Terakawa, 2003; Sardinoux *et al.*, 2010 ; Chloe *et al.*, 2013).

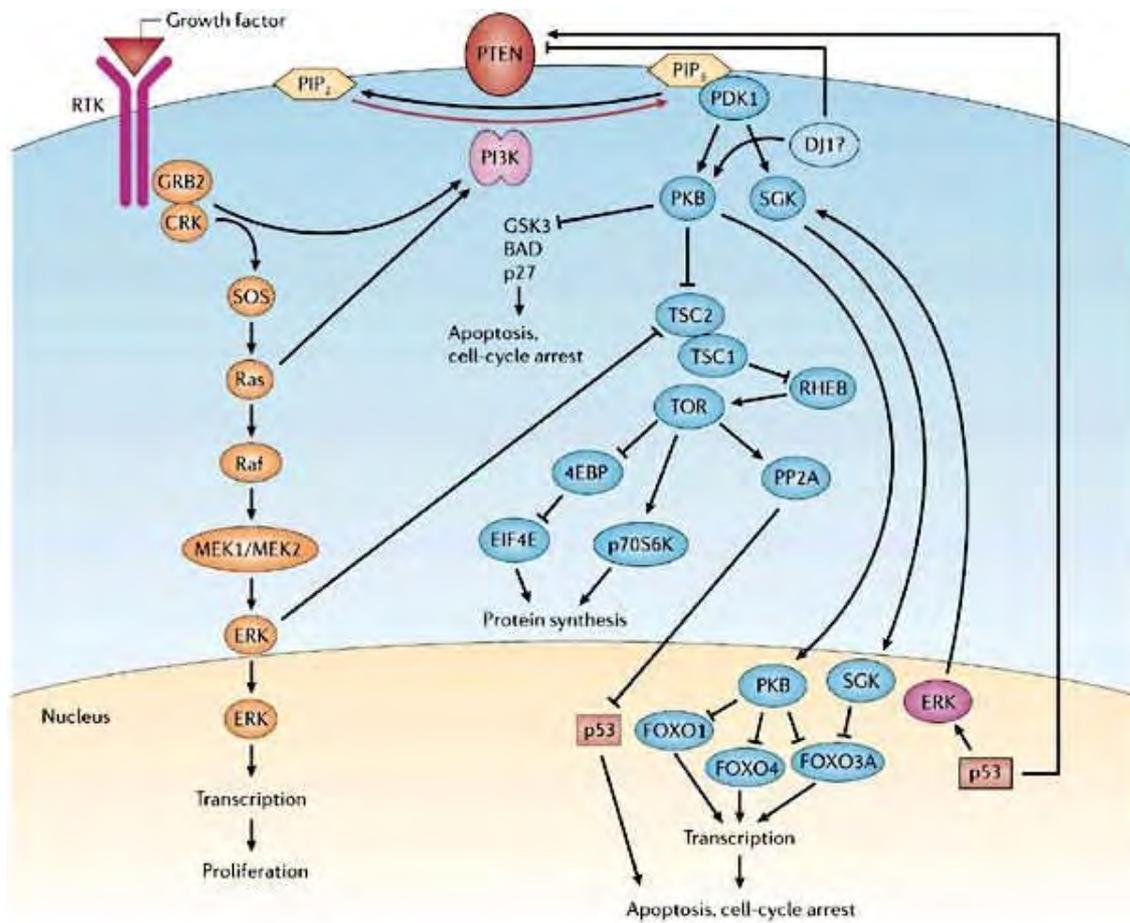


Figure 13 : Schéma représentant la voie de signalisation PI3K-PTEN (selon Cully *et al.*, 2006)

2-2-4- Le facteur de transcription NF- κ B

La voie NF- κ B joue un rôle clé dans le contrôle de l'immunité innée et adaptative. Elle régule la transcription des gènes cibles tels que les cytokines, les protéines de la réponse au stress, les protéines anti apoptotiques. L'activation du NF- κ B a été décrite après stimulation par les cytokines pro inflammatoires TNF α et IL-1, lymphotoxine β , les produits bactériens ou viraux tels que les LPS et les ARN doubles brins, les mitogènes comme le PMA (phorbol 12-Myristate 13- Acetate), les stress physiques et chimique (dommage de l'ADN, stress oxydant, photosensibilisations).

2-2-4-1-Les protéines NF- κ B/Rel

Les protéines NF- κ B/Rel comporte cinq membres chez les mammifères : NF- κ B1/p50 (et son précurseur p105), NF- κ B2/p52 (et son précurseur p100), p65 (RelA), RelB et c-Rel. Le facteur NF- κ B est composé d'homo ou hétéro dimères formés de combinaison variée de ces cinq sous unités.

Chaque membre de la famille NF- κ B/Rel contient, dans sa partie N-terminale, un domaine d'homologie Rel (RHD, Rel homology domain). Ce domaine contient le signal de localisation nucléaire (NLS) est responsable de la liaison à l'ADN, de la dimérisation et de l'association avec I κ B (Hoffmann & Baltimore, 2006).

Dans le complexe NF- κ B, chacune des protéines apporte une partie du site de liaison à l'ADN. La séquence consensus de liaison sur laquelle se lie NF- κ B est constituée de 10 paires de bases 5' NF- κ BGGGRNNYYCC-3' (où R est une purine, Y une pyrimidine et N n'importe quels bases) (Oeckinghaus *et al.*, 2011).

Les protéines NF- κ B/Rel sont groupées en deux classes. La première classe comprend les précurseurs de NF- κ B1 et NF- κ B2 qui sont respectivement p105 et p100. Ils possèdent dans leurs partie C-terminale des répétitions ankyrine (pour former les protéines p50 et p52 les répétitions ankyrine doivent être clivées) responsable de l'inhibition du dimère NF- κ B. Ces protéines appartiennent donc à la famille des inhibiteurs I κ Bs. (Nishikori, 2005)

La seconde classe comprend p65 (RelA), RelB et c-Rel. Les membres de la seconde classe possèdent un domaine transactivateur (TAD, transcription activation domain) situé dans la région C-terminale. Ce domaine est responsable de leur capacité à activer la transcription des gènes.

Les homodimères p50/p50 et p52/p52 sont transcriptionnellement inactifs et peuvent même être répresseurs en empêchant, par compétition, des dimères transcriptionnellement actifs ; p50/p56, p50/c-Rel, p65/p65, ou p52/RelB de se lier à leur site κ B sur l'ADN (Hayden & Ghosh, 2004).

2-2-4-2-Les protéines I κ B

C'est une famille de protéines inhibitrices incluant les protéines I κ B α , I κ B β , I κ B γ , I κ B ϵ , BcL3 et les précurseurs p100 et p105.

Ces molécules sont caractérisées par la présence d'un motif ankyrine responsable de l'interaction avec le RHD du NF- κ B. Cette interaction masque le signal de localisation nucléaire du facteur de transcription, contribuant à sa séquestration dans le cytoplasme. (Hayden & Ghosh, 2008).

Les protéines I κ Bs jouent également un rôle important dans l'arrêt de l'activation du facteur de transcription. En effet, l'expression des I κ Bs (à l'exception d'I κ B β) est sous le contrôle de NF- κ B. Lorsque ce dernier est activé, les I κ Bs sont néosynthétisés. Elles peuvent entrer dans le noyau, décrocher le NF- κ B fixé sur l'ADN et dans le cas d'I κ B α , retourner dans le cytoplasme en l'entraînant avec elle. Ce retrait est possible car l'affinité du NF- κ B est plus grande pour les I κ Bs que pour l'ADN (Hayden & Ghosh, 2004).

2-2-4-3- Complexe IKKs (I κ B kinase)

La dégradation d'I κ B α , nécessaire à l'activation classique du NF- κ B, fait suite à une série d'évènements dont la phosphorylation de deux sérines (32 et 36) situées dans la région N-terminale de l'I κ B α par un complexe multiprotéinique de 700-900 kDa, appelé complexe IKK (I κ B kinase). Ce complexe est principalement constitué de deux sous unités catalytiques IKK α (IKK1) et IKK β (IKK2) et d'une sous unité régulatrice IKK γ (NEMO, NF- κ B Essential Modulatory) (Solt *et al.*, 2009).

L'IKK α possède une activité cruciale en tant que homodimère d'IKK α dans la voie alternative d'activation du NF- κ B. En effet, il est impliqué dans la maturation protéolytique de p100 en p52 (Dejardin, 2006). En outre, IKK α exerce des fonctions nucléaires impliquées dans l'activation de l'expression des gènes dépendant du NF- κ B, confortant la présence d'un NLS dans son domaine kinase. Il est responsable également de la phosphorylation de protéines histoniques et non histoniques (Nowak & Corces, 2004 ; Gloire *et al.*, 2006).

A son tour l'IKK β joue un rôle principal dans la voie de phosphorylation de l'I κ B α , il phosphoryle la protéine p65 sur la sérine 536 afin de favoriser son pouvoir transactivateur nécessaire à la transcription des gènes dépendant du NF- κ B et régule l'activité du complexe NEMO (Dai *et al.*, 2011).

NEMO est indispensable à l'activation du complexe IKK, étant donné qu'en son absence, il n'y a pas d'activation de la voie classique (Scheidereit, 2006). L'oligomérisation de NEMO facilite le positionnement et l'assemblage dynamique de l'hétérodimère IKK α /IKK β ainsi que l'activation du

complexe (Agou *et al.*, 2004; Fontan *et al.*, 2007). En outre, son ubiquitination non dégradative sur la lysine 63 représente un événement critique (Shambharkar *et al.*, 2007). A ce rôle cytoplasmique dans le complexe IKK s'ajoute un rôle nucléaire. En effet, NEMO a la capacité de migrer librement entre le cytoplasme et le noyau où il exerce plusieurs fonctions. Il entre tout d'abord en compétition avec IKK α et p65 pour la liaison au co-activateur transcriptionnel CBP. L'expression des gènes dépendant du NF- κ B est alors réprimée (Verma *et al.*, 2004). Un second rôle nucléaire a été mis en évidence pour NEMO. Suite à des dommages à l'ADN, NEMO subit un bon nombre de modifications post-traductionnelles (phosphorylation, ubiquitination) dans le noyau et interagit avec ATM. Ce complexe NEMO/ATM est alors redirigé vers le cytoplasme où il va permettre l'activation du complexe IKK via l'intervention de ELKS (Sebban *et al.*, 2006; Habraken & Piette, 2006).

2-2-4-4- Activation de la voie NF- κ B

Il existe deux voies d'activation du NF- κ B, selon le stimulateur en cause, La voie classique ou canonique induite par le TNF α , IL-1 β , le LPS ou le PMA. La voie alternative, médiée par la lymphotoxine β , BAFF ou le CD40.

2-2-4-4- 1- La voie classique ou canonique

Dans les cellules non stimulées, l'I κ B α séquestre NF- κ B dans le cytoplasme en masquant la partie NLS. Dans les minutes qui suivent la stimulation, le complexe IKK est activé par phosphorylation de sérines dans les domaines catalytiques de ses sous unités IKK α et IKK β . Il s'en suit une phosphorylation spécifique d'I κ B α sur les sérines 32 et 36 par le complexe IKK qui permet sa polyubiquitination sur les lysines 21 et 22 (Hayden & Ghosh, 2004).

I κ B α est alors dégradé par la sous unité 26S du protéasome. Le NF- κ B libéré se dirige vers le noyau pour activer la transcription des gènes cibles. Parmi ceux-ci on retrouve le gène de l'I κ B α , qui lorsqu'il est nouvellement synthétisé, retourne vers le noyau afin de décrocher le NF- κ B de l'ADN. Ce processus entraîne la terminaison du signal exportant du noyau le complexe I κ B α - NF- κ B (Hayden & Ghosh, 2004) (fig. 14).

2-2-4-4- 2- La voie alternative

Un mécanisme alternatif d'induction de l'activité du NF- κ B a été mis en évidence. Il se base sur la protéolyse de la protéine p100, réalisé de manière dépendante d'IKK α et indépendante d'IKK β et NEMO. Lorsqu'un de des récepteurs de lymphotoxin β , BAFF ou le CD40 est stimulé la voie

alternative est activée. La protéine NIK (NF- κ B inducing kinase) phosphoryle un homodimère d'IKK α . Cet homodimère phosphoryle p100 dans sa partie C-terminale qui comporte des répétitions ankyrines. Une ubiquitination subséquente entraîne p100 vers le protéasome pour une dégradation partielle. Le p52 obtenu après cette maturation est activé et peut migrer vers le noyau pour réguler la transcription des gènes. (Thu & Richmond., 2010) (fig.14).

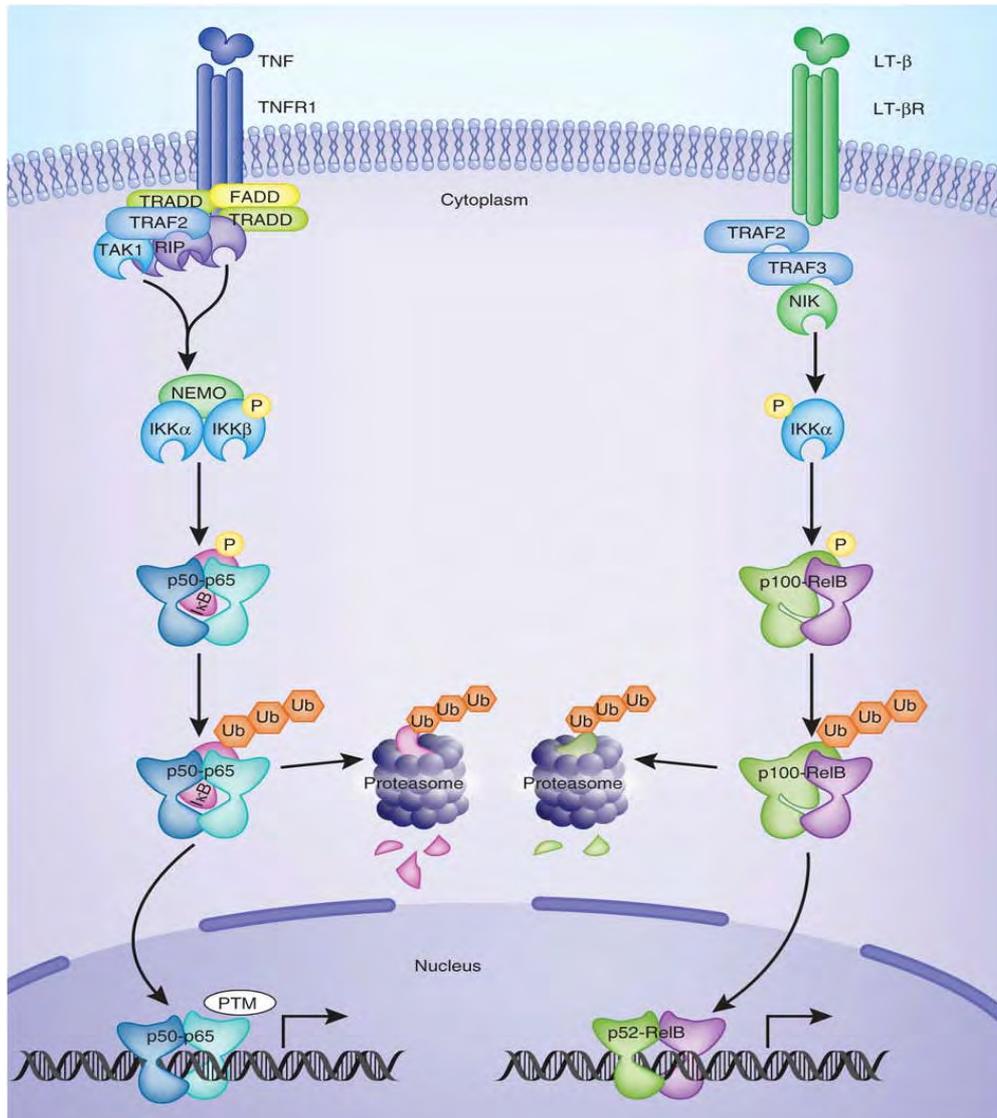


Figure 14: Schéma de représentation des deux voies d'activation canonique et alternative de l'NF- κ B (Oeckinghaus *et al.*, 2011).

3- La nécrose programmée

La nécrose programmée appelée également nécroptose « nécroptosis » est une forme de mort cellulaire induite principalement par les récepteurs de mort cellulaire TNF α , TRAIL et FasR. Morphologiquement, elle est caractérisée par une augmentation du volume de la cellule (oncosis), un gonflement des organelles et une rupture de la membrane plasmique avec perte du contenu intracellulaire dans l'environnement cellulaire (Kroemer *et al.* 2009).

La nécrose a longtemps été considérée comme une forme de mort cellulaire accidentelle et non contrôlée, mais on considère de plus en plus qu'elle serait finement régulée par un ensemble de voies de signalisation et de processus cataboliques (Oyang *et al.*, 2012 ; Chaabane *et al.*, 2013)

3-1- La voie de signalisation nécrotique

Les données de littérature disponibles actuellement sur la voie de signalisation intra cellulaire de la nécroptose provient de l'étude de la signalisation du TNF α .

3-1-1 Initiation de nécroptose

Le TNF α est une cytokine pro-inflammatoire qui joue un rôle dans l'immunité, la prolifération et l'apoptose. Elle exerce ses effets à travers la liaison avec deux récepteurs le TNF-R1 (TNF Receptor type 1) et TNF-R2. (Bremer, 2013).

Les deux récepteurs appartiennent à la superfamille des récepteurs TNF qui regroupe un grand nombre de récepteur tels que : FasR, TRAIL, CD40, BAFF..... etc. (Lavrik *et al.*, 2005).

La liaison du TNF α au TNF-R1, induit la trimérisation du récepteur et la dissociation du domaine SODD (Silencer Of Death Domain) du récepteur, ce qui entraîne le recrutement de plusieurs protéines au niveau du domaine cytoplasmique. La première protéine recrutée par TNF-R1 est TRADD. Cette interaction permet le recrutement d'autres protéines telles que RIP1 (Receptor interacting protein1) et TRAF2 (TNF Related Associated Factor 2), qui se lient aux protéines cIAP1/2 (cellular inhibitor of apoptosis protein 1 et 2), permettant, ainsi le recrutement du complexe LUBAC (linear ubiquitin chain assembly complexe ; l'enzyme LUBAC assure la polyubiquitination du RIP1.) qui joue le rôle d'échafaudage entre TAK1 (TAB trasforming growth factor activated kinase) et la sous unité NEMO du complex IKK. L'ensemble forme le TNFR1 complex I (Bertrand *et al.*, 2008; Haas *et al.*, 2009).

Après déubiquitination par le cylindromatosis (CYLD), la protéine RIP1 recrute encore le TRADD, le FADD et la caspase 8 pour former le TNFR1 complexe II qui est responsable de l'induction de l'apoptose (Cho *et al.*, 2009).

Dans le cas où la protéine RIP3 est associée au complexe II, le nouveau complexe formé est appelé complexe IIb ou « nécrosome » (fig. 15)

Le nécrosome est un grand complexe protéique de 5 MDa, formé de l'association de FADD, caspase 8, RIP1 et RIP3 (Feoktistova *et al.*, 2011 ; Tenev *et al.*, 2011), mais il ne devient actif qu'après inhibition de la caspase 8 et activation du RIP3 (Zong *et al.*, 2004 ; Oberst *et al.*, 2011). Le mécanisme par lequel le nécrosome régule la nécrose reste mal connu. Néanmoins, il a été reporté qu'il augmente le bust respiratoire, l'hyperpolarisation de la membrane mitochondriale, la perméabilisation des membranes lysosomales et cytoplasmique (Wu *et al.*, 2012).

Par ailleurs, Oberst *et al.*, 2011 et Han *et al.*, 2011 ont montré qu'il existe une compétition entre l'apoptose et la nécroptose. L'apoptose peut inhiber la nécroptose à travers le clivage de la RIP3 par la caspase 8, alors que le mécanisme par lequel la RIP3 inhibe l'apoptose est encore mal connu (Kaiser *et al.*, 2011).

3-1-2 Exécution de la nécroptose

L'inhibition des caspases 3 et 7 entraîne l'activation de l'enzyme PARP1 (Poly (ADP ribose) polymerase 1), qui diminue la capacité de la mitochondrie à produire de l'ATP et augmente sa capacité à produire les ROS (Zong *et al.*, 2004 ; Ying *et al.*, 2005).

Dans les conditions normales la production de l'ATP est maintenue par le catabolisme du glucose à travers les deux mécanismes biochimiques, la glycolyse et la phosphorylation oxydative. Il a été prouvé que le blocage de la glycolyse par le 2-deoxyglucose entraîne des nécroses dans les cellules à haut potentiel prolifératif tels que les lymphocytes et les cellules tumorales (Zong & Thompson., 2006).

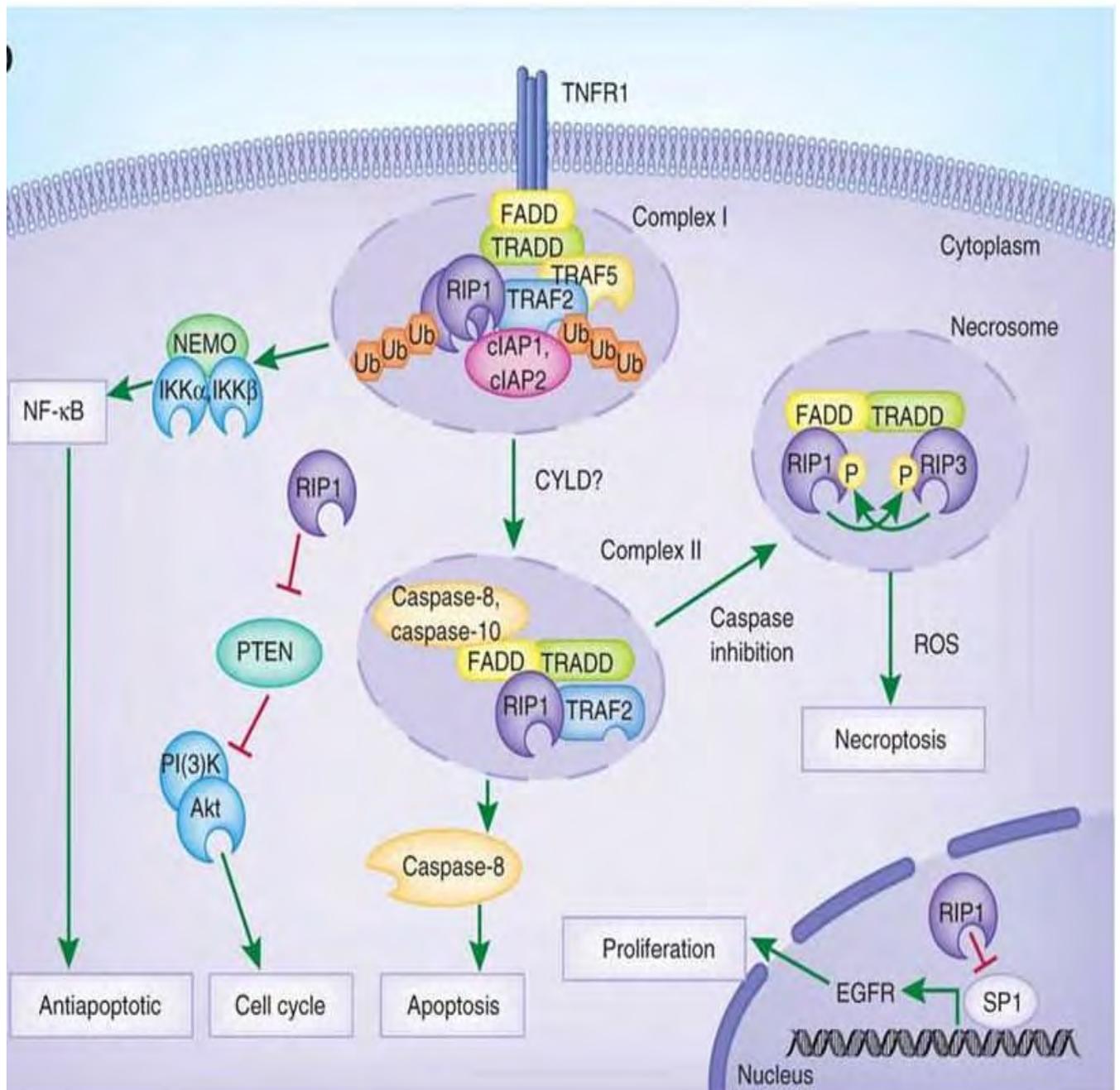


Figure 15 : Voies de signalisations induites par le récepteur TNF-R1.

(Oeckinghaus *et al.*, 2011).

Cependant, un des mécanismes de l'inhibition de la glycolyse au niveau des cellules en nécrose est l'activation de l'enzyme PARP. Il a été démontré que le PARP se lie au fragment d'ADN endommagé et entraîne la dégradation du NAD en polymère de poly (ADP)-ribose et en acide nicotinique mononucléotide (NAM). Les taux cytoplasmiques de NAD diminuent au niveau cytosolique ce qui limite leur transfert vers la membrane mitochondriale. L'inhibition de la glycolyse entraîne une déplétion de la production d'ATP (Du *et al.*, 2003 ; Ying *et al.*, 2003).

En outre, la RIP3 possède la capacité d'activer certaines enzymes du métabolisme cellulaire, telles que la glycogène phosphorylase (PYGL), la glutamine- amonia ligase (GLUL) et la glutamate déhydrogénase 1 (GLUD1), augmentant ainsi le métabolisme de la glutamine et activant la glycolyse pour générer un taux de base d'énergie (Van herreweghe *et al.*, 2010) (fig. 16)

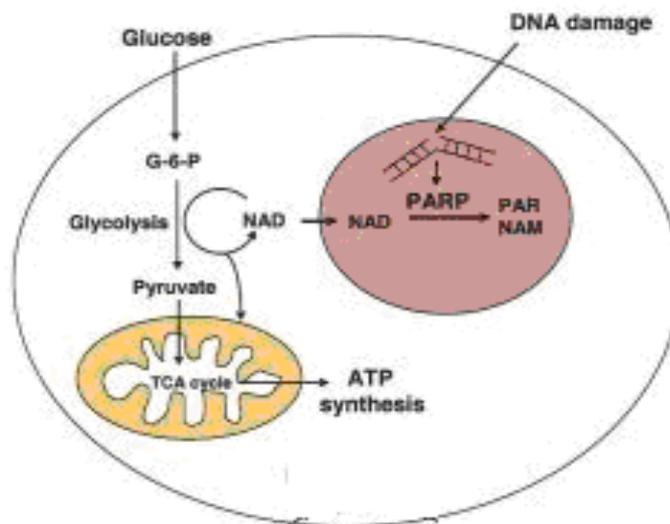


Figure 16: Rôle de l'enzyme PARP dans la nécroptose. L'activation de l'enzyme **PARP** suite à une altération de l'ADN entraîne la dégradation du **NAD** en polymère **PAR** **NAM** (poly (ADP)-ribose et en acide nicotinique mononucléotide). Les taux du **NAD** cellulaire diminuent ainsi que la **glycolyse** et la production de l'**ATP**. (Zong & thompson, 2006)

Par ailleurs, l'excès des ROS constitue un facteur pro-nécrotique. En effet, il provoque une insuffisance d'énergie et une augmentation de perméabilité de la membrane mitochondriale interne (mitochondrial permeability transition). Ce phénomène est irréversible et conduit à la mort de la mitochondrie « mitochondrial apoptosis ou mitoptosis), qui constitue un inducteur de nécrose (Skulachev., 2006 ; Proskuryakov & Gabai., 2010).

L'excès de ROS au niveau cellulaire peut également endommager l'ADN, il provoque le clivage des deux brins et l'oxydation des purines (Marnette, 2002). Les ROS entraînent, aussi, l'oxydation des lipides membranaires, il en résulte la perte de l'intégrité des membranes cellulaires telle que la membrane plasmique, la membrane lysosomale, ainsi que celle du réticulum endoplasmique. La lésion de cette dernière membrane conduit à un afflux du Ca^{++} vers le cytosol, qui constitue, un facteur important dans de la nécrose. (Waring, 2005) (fig. 17).

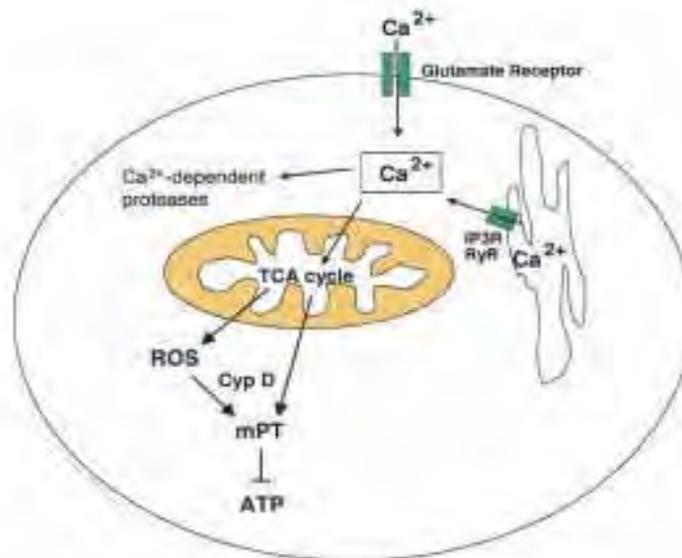


Figure 17 : Rôle des ions calcium dans la nécroptose. Un afflux de calcium vers le cytosol à travers les récepteurs glutamate de la membrane plasmique, ou les canaux Ca^{+2} du RE. L'augmentation des taux du Ca^{+2} stimulent les protéases dépendantes des Ca^{+2} , l'activation du cycle de l'acide tricarboxylique TCA et la production des ROS, il en résulte une augmentation de perméabilité de la membrane mitochondriale interne (mPT) et une diminution de l'ATP. (Zong & thompson, 2006).

4- L'autophagie

Le terme autophagie, est un ensemble de mécanismes cataboliques aboutissant à la dégradation de constituants cellulaires, organites et macromolécules, par le lysosome. Les produits de dégradation formés sont recyclés pour la synthèse de nouvelles protéines et pour la production d'énergie nécessaire à la cellule. (Li *et al.*, 2012).

Le rôle de l'autophagie dans la survie et la mort cellulaire est un sujet complexe et très controversé. Il est bien établi que l'autophagie constitue un mécanisme adaptatif aux stress environnementaux grâce à son activité de recyclage des constituants cellulaires permettant de répondre aux besoins bioénergétiques et de maintenir le métabolisme essentiel à la survie des cellules. L'autophagie pourrait agir comme un mécanisme de mort cellulaire qui dépend de l'espèce, du type cellulaire et de la nature du stimulus. Son mécanisme est cependant mal connu et différentes hypothèses ont été avancées.

Le premier mécanisme repose sur le fait qu'un excès d'autophagie, provoqué par un stress prolongé, peut conduire à un déséquilibre entre la stimulation de l'autophagie et la capacité des cellules à dégrader complètement les constituants cellulaires, ce qui empêche la bonne restitution des composants essentiels aux cellules.

La seconde hypothèse est fondée sur les cibles du processus autophagique. L'autophagie pourrait digérer des organites vitaux ou des protéines essentielles à la viabilité cellulaire.

Le troisième mécanisme serait lié à un excès d'autophagie qui éliminerait une trop grande quantité de cytoplasme et entraînerait alors une mort cellulaire atrophique par autodigestion (Periyasamy-Thandavan *et al.*, 2009). L'autophagie peut être suractivée et une dégradation non spécifique de grande quantité de constituants cytoplasmiques entraîne la mort cellulaire (Patingre *et al.*, 2005)

4-1 Les différentes étapes de l'autophagie

4-1-1 Phase d'initiation

Lors de l'étape initiale du processus d'autophagie, les composants du cytoplasme, incluant protéines et organites intracellulaires, sont enveloppés par une membrane, appelée phagophore. L'origine exacte de cette membrane isolée n'est pas encore totalement identifiée. Du fait de la proximité des autophagosomes et du RE, celui-ci peut être une des sources du phagophore

mais cette membrane peut aussi provenir de la membrane externe mitochondriale ou de la membrane plasmique (Tooze & Yoshimori, 2010).

L'initiation de l'autophagie fait intervenir de nombreux acteurs rassemblés en trois complexes qui interagissent entre eux. Tout d'abord, le complexe mTORC1 (Mechanistic Target Of Rapamycin Complex 1), constitué de la protéine kinase RPTOR (Regulatory associated protein of mTOR), mLST8 (mammalian Lethal with SEC13 Protein 8), Deptor (DEP domain-containing mTOR-interacting protein) et PRAS40 (Proline-rich Akt Substrate of 40 kDa), interagit avec le complexe ULK (UNC-51-like Kinase) composé des protéines ULK1/2, Atg13, FIP200 (FAK (Focal adhesion kinase) family Interacting Protein of 200 kD et Atg101. mTORC1 possède une activité kinase et inhibe par phosphorylation les protéines ULK1/2 et Atg13. A l'inverse, lorsque mTORC1 est inhibé, par une carence en acides aminés par exemple, il se dissocie du complexe ULK. (Lünnemann & Münz. 2009)

La protéine ULK1/2 devient alors active et peut phosphoryler la protéine Ambra1, un des composants du complexe PI3K de classe III. Ce dernier est formé, en plus de Ambra1, de Beclin-1, de Atg14 (aussi appelé Atg14L ou Barkor), de Vps15 et de Vps34 (Vacuolar protein sorting 15 et 34), une PI3K de classe III. La formation de ce complexe est indispensable à l'activation de Vps34 qui permet la production de phosphatidylinositol-3-phosphate (PI3P) et à l'initiation de l'autophagie (Kroemer *et al.*, 2010, Mizushima *et al.*, 2011). PI3P est une molécule lipidique importante dans la formation des autophagosomes car elle contrôle leur biogenèse et leur maturation en recrutant les protéines nécessaires à l'élongation du phagophore (Burman & Ktistakis, 2010).

4-1-2- Phase d'élongation

Une fois l'autophagie initiée, le phagophore s'allonge pour aboutir à la formation d'une vésicule à double membrane, appelée autophagosome, contenant des macromolécules et des organites endommagés (fig. 18)

4-1-3- Maturation et fusion

Une fois formés dans le cytoplasme, les autophagosomes doivent rejoindre les lysosomes avec lesquels ils vont fusionner. Les autophagosomes se déplacent le long des microtubules, de façon bidirectionnelle, vers le centre organisateur des microtubules (MicroTubule-Organizing Center (mTOC)), une zone riche en lysosomes (Jahreiss *et al.*, 2008). Ce transport vers le mTOC nécessite l'intervention de protéines motrices appelées dynéines (Kimura *et al.*, 2008). La dépolymérisation des

microtubules ou l'inhibition du transport dépendant de la dynéine peut donc altérer le processus autophagique.

Les autophagosomes fusionnent d'abord avec les endosomes précoces puis tardifs pour former des amphisomes, nécessitant l'intervention des protéines de la machinerie ESCRT (Endosomal Sorting Complex Required for Transport) (Rusten & Stenmark, 2009), puis avec les lysosomes, grâce notamment aux protéines de la famille SNAREs (Soluble N-ethylmaleimide sensitive factor Attachment protein REceptor), pour former les autolysosomes (Stroupe, 2011) (fig. 18).

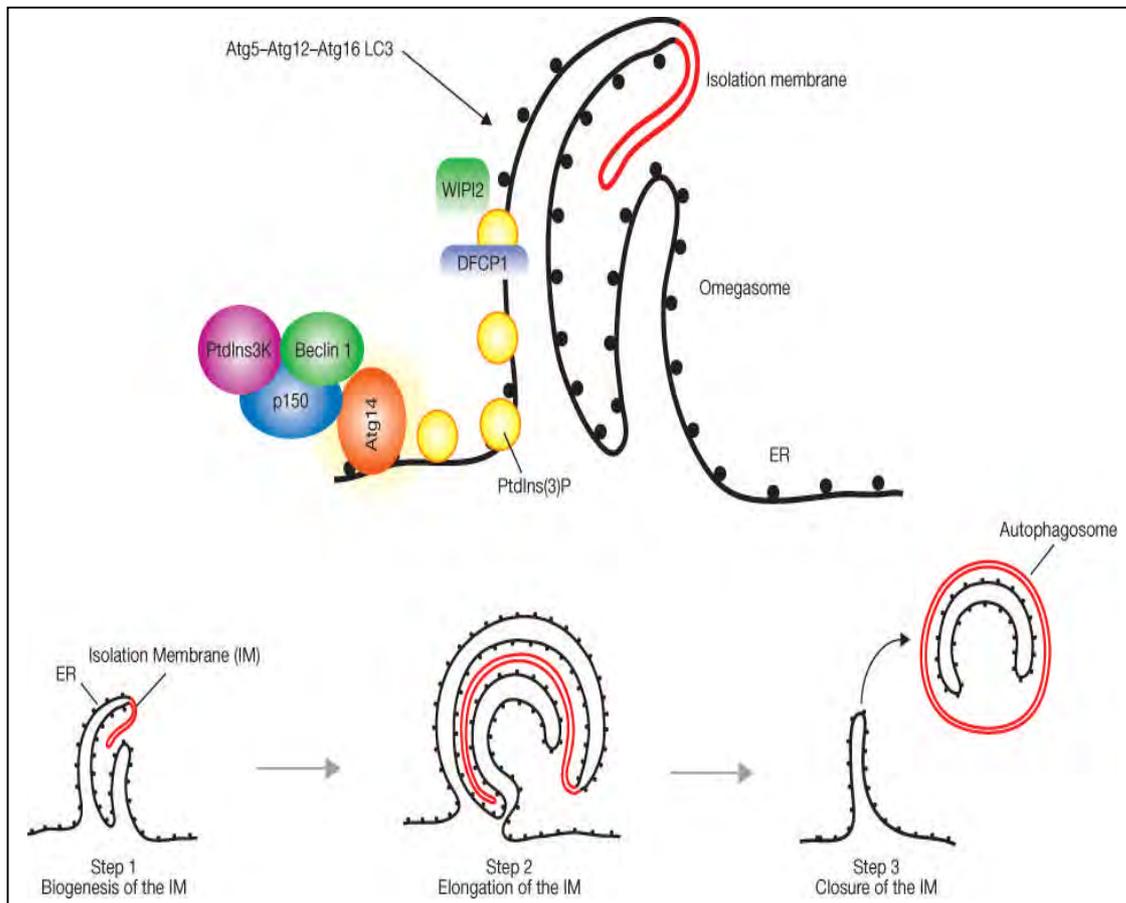


Figure 18: Représentation schématique des étapes de la formation des autophagosomes (Tooze & Yoshimori, 2010)

4-1-4- Dégradation lysosomale

Les enzymes lysosomales, dont les hydrolases, situées à la surface interne des lysosomes dégradent le matériel séquestré puis la membrane des autolysosomes ce qui permet la libération, dans le cytosol, d'acides aminés qui seront recyclés pour la synthèse de macromolécules et la production d'énergie.

5- Mort programmée et pathologie

5-1- Mort cellulaire programmée et pathologie

Le dérèglement des mécanismes de régulation de la mort cellulaire est impliqué dans la physiopathologie de nombreuses maladies. Ces dérèglements peuvent conduire à un excès ou à un défaut de mort cellulaire.

L'excès d'apoptose intervient dans le développement d'anomalies dans certaines maladies neurodégénératives chroniques comme l'amyotrophie spinale, la sclérose latérale amyotrophique, la chorée de Huntington, la maladie d'Alzheimer et la maladie de Parkinson (Gosslau & Chen, 2004).

Au contraire, un défaut d'apoptose a été observé dans les maladies auto-immunes (Rieux-Laucat *et al.*, 2003), les syndromes lymphoprolifératifs et surtout dans les cancers (Testa & Riccioni, 2007).

Dans de nombreux types de cancers les cellules ont développé une résistance au processus apoptotique. Ceci est à travers l'augmentation de l'expression des protéines anti apoptotiques telles que Bcl2, IAPs et FLIP ou la sous expression ou la mutation des protéines pro-apoptotiques comme Bax, Apaf1 et caspase, ou encore à travers l'augmentation de l'activation de l'NF- κ B (Fulda, 2009; Fulda & Vucic, 2012).

La nécroptose à son tour, joue un rôle dans le développement des cellules immunitaires, notamment dans la régulation de la prolifération lymphocytaire et la survie des macrophages (Osborne *et al.*, 2010). Une expression élevée du RIP3 a été retrouvée dans les organes lymphoïdes des souris tel que le thymus et la rate (He *et al.*, 2009). La nécrose programmée participe également dans l'élimination des cellules infectées par les virus lors d'une résistance à l'apoptose (Li & Beg, 2000).

Des déficits en nécroptose ou des mutations des gènes régulateurs de ce processus ont été observée chez des patients atteints de leucémie lymphatique aigue et chronique et de lymphome de Hodgkin (Wu *et al.*, 2012). Des mutations inactivant le gène CYLD entraîne une accélération de la prolifération et migration des cellules du cancer épidermique (Alameda *et al.*, 2010).

Un dysfonctionnement de l'autophagie, avec une accumulation des autophagosomes a été retrouvé dans de nombreuses pathologies, neurodégénératives telle que l'Alzheimer (Ma *et al.*, 2010),

dans des maladies cardiaques comme la cardiomyopathie et l'hypertrophie cardiaque (mutation dans le gène de la protéine LAMP2 (lysosome associated membrane protein) qui assure la fusion de l'autophagosome au lysosome) (Kirshenbaum, 2012).

Un excès d'autophagie est associé aux maladies pulmonaires telle que COPD (chronic obstructive pulmonary disease) (Chen *et al.*, 2008). Aussi, des mutations dans les gènes Atg5 et Atg7 ont été enregistrées dans le cancer de la prostate (Levine & Kroemer, 2008).

5-2 Types de mort cellulaire et cancer

Durant la dernière décennie, les études ont montré qu'il existe une relation entre les trois types de mort cellulaire et le développement tumoral (Proskuryakov & Gabai, 2010). En effet, dans les néoplasies d'origine hématopoïétiques l'apoptose est le type de mort cellulaire le plus répandu *in vivo* et *in vitro*, vu que les lymphocytes et les thymocytes normaux sont sensibles à ce type de mort cellulaire. En outre, le traitement de ces maladies par radiothérapie induit une apoptose dans les cellules tumorales, la nécrose n'est observée que lorsque l'apoptose est bloquée par un inhibiteur des caspases ou anti apoptotique de la famille de la Bcl2 (Gurova *et al.*, 2002)

D'autre part, dans les tumeurs solides d'origine épithéliale telle que les tumeurs du sein et de prostate l'apoptose aura lieu rarement *in vivo* durant le développement tumoral ou même après un traitement. *In vitro* l'induction de l'apoptose dans ce type de cellules nécessite des doses élevées de drogues ou de radiation, ce qui est inapplicable en clinique (Gurova & Gudkov, 2003).

En revanche, la nécrose dans les tumeurs solides est observée durant le développement de la tumeur ou bien après le traitement, elle est généralement le résultat d'un déficit de l'apport en oxygène ou de nutriments. L'apparition de la nécrose après un traitement anti-cancer est souvent le résultat d'une catastrophe mitotique (une altération irréparable de l'ADN durant la division cellulaire) (Jin *et al.*, 2007).

Paradoxalement, un taux élevé de nécrose avec une inhibition de l'apoptose et de l'autophagie peut favoriser la croissance de la tumeur à travers l'induction d'une inflammation chronique au niveau du foyer tumoral et la production des cytokines par les cellules immunitaires infiltrant la tumeur (Vakkila & Lotze, 2004 ; Lin & Karin 2007).

Par ailleurs, il a été démontré que les cellules malignes, dont le processus apoptotique est inhibé, survivent par un mécanisme d'autophagie (par activation du Akt et mTOR). Aussi,

l'autophagie joue un grand rôle dans la prévention de la mort des cellules tumorales par nécrose (Deghenhardt *et al.*, 2006).

III. Partie Expérimentale

III. Partie Expérimentale

Chapitre 1: étude des propriétés anti oxydantes de l'extrait

1. MATERIEL ET METHODES

1-1 Matériel biologique : *Helix aspersa* (Müller 1774), appelée communément "petit gris", est une espèce méditerranéenne d'escargot qui mesure environ 20 à 40 mm de longueur et 25 à 45 mm de diamètre. Il possède une coquille globuleuse, ventrue, très convexe en dessus, bien obliquement bombée en dessous, formée de 4 à 5 tours très convexes à croissance rapide ; solide, un peu mince, de couleur brun, jaunâtre ou grisâtre orné de zigzags plus clairs que le fond, avec 1 à 4 bandes sombres (Fig 19). *Helix aspersa* est une espèce herbivore, qui s'alimente la nuit de végétaux variés. C'est un animal hermaphrodite à reproduction croisée de 5 ans de longévité.

Sa position systématique est la suivante:

Embranchement:	<u>Mollusca</u>
Classe :	Gastropoda
Sous classe :	<u>Orthogastropoda</u>
Super ordre :	<u>Heterobranchia</u>
Ordre :	<u>Pulmonata</u>
Famille :	<u>Helicidae</u>
Genre :	<u>Helix</u>
Espèce :	<i>aspersa</i> (Müller, 1774)

1-2- Préparation de l'extrait aqueux : Les escargots utilisés dans ce travail proviennent de deux régions de l'Est Algérien, la région de mila et la région de Ramdan Djamel de la wilaya de Skikda.

Les escargots sont maintenus à jeûn pendant 15 jours afin de vider complètement leurs intestins et éliminer tout effet direct des composantes végétales et des molécules que les escargots ont consommé auparavant. Les animaux sont ensuite lavés dans une solution NaCl à 10%, disséqués et broyés. 3 volumes d'eau sont ensuite, ajoutés à l'homogénat. Après 24 heures à 4°C l'homogénat est filtré sur papier Whatman puis centrifugé à 5000 tours pendant 10 min.

Le surnageant est prélevé et filtré une deuxième fois sur un filtre millipore 22 µm avant d'être utilisé pour traiter les souris et les cellules (fig 20). La concentration finale de l'extrait est de 0,33g/ ml.



Figure 19: *Helix aspersa* (Müller 1774)



Figure 20: Extrait aqueux d'*H. aspersa*.

1-3- Propriétés antioxydantes de l'extrait :

1-3-1-Test DPPH

1-3-1-1 Principe

Le DPPH (1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle) agit en tant qu'un radical libre stable, réduit par un antioxydant, montrant un spectre d'absorption de couleur violette à 517 nm, la réduction de ce radical donne une coloration jaune (fig 21).

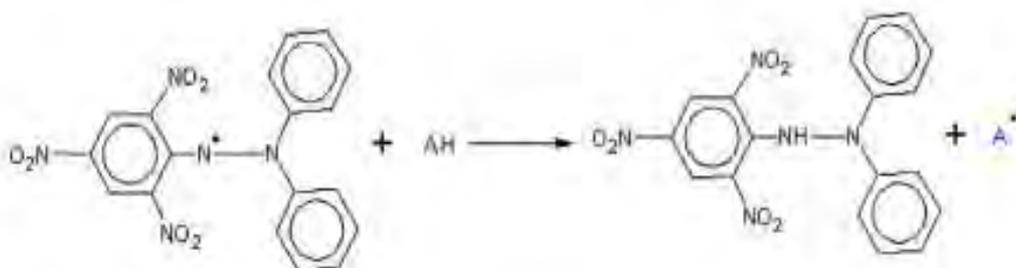


Figure 21: La réaction du DPPH avec un anti oxydant (A) (Musa *et al.*, 2013)

1-3-1-2 - Méthode

Le test consiste à mélanger, dans un tube, 3900 µl de solution DPPH (0,1 mM) avec 100 µl d'extrait aux dilutions 0,1%, 1%, 2,5%, 10%, 25%, 50%, 75%, 100%. Après avoir laissé incuber la réaction à l'obscurité pendant 30 min. L'absorbance est mesurée à 517 nm contre un blanc contenant du méthanol à la place de l'extrait.

La capacité de piégeage du radical libre est ensuite calculée à travers le pourcentage d'inhibition :

$$\text{Le pourcentage d'inhibition} = (A_{\text{blanc}} - A_{\text{extrait}} / A_{\text{blanc}}) \times 100.$$

A_{blanc} : présente l'absorbance de la solution DPPH en présence du méthanol.

A_{extrait} : présente l'absorbance de la solution DPPH en présence de l'extrait.

La valeur EC₅₀ (Efficient concentration 50) présente la concentration d'inhibiteur nécessaire pour balayer 50% des radicaux libres.

1-3-2- Capacité totale de réduction (Test de la réduction du fer FRAP)

1-3-2- 1- Principe

Le pouvoir réducteur du fer (Fe³⁺) dans les extraits est déterminé selon la méthode décrite par Oyaizu, 1986. La méthode est basée sur la réaction de réduction du Fe³⁺ présent dans le complexe ferrocyanure de potassium en Fe²⁺, la réaction est révélée par le virement de couleur jaune du fer ferrique (Fe³⁺) en couleur bleu vert du fer ferreux (Fe²⁺), l'intensité de la coloration est mesuré par spectrophotométrie à 700 nm.

1-3-2-2- Méthode :

2 ml de l'extrait à différentes concentrations sont mélangés avec 2,5 ml d'une solution tampon phosphate 0,2 M (pH 6,6) et 2,5 ml d'une solution de ferricyanure de potassium K₃Fe(CN)₆ à 1%. L'ensemble est incubé au bain-marie à 50°C pendant 20 min ensuite, 2,5 ml d'acide trichloroacétique à 10% sont ajoutés pour stopper la réaction et les tubes sont centrifugés à 3000 rpm pendant 10min. 2,5 ml du surnageant sont additionnés à 2,5 ml d'eau distillée et 0,5 ml d'une solution aqueuse de FeCl₃ à 0,1%.

La lecture de l'absorbance du milieu réactionnel se fait à 700 nm contre un blanc semblablement préparé, en remplaçant l'extrait par de l'eau distillée.

Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard ; l'acide ascorbique dont l'absorbance a été mesuré dans les mêmes conditions que les échantillons. Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés.

1-3-3- Capacité de l'extrait à piéger le peroxyde d'hydrogène

La capacité de l'extrait à piéger l'hydrogène peroxyde a été testé selon la méthode de Ruch *et al.*, 1989. 0,6 ml d'une solution d'hydrogène peroxyde (40 mM) dans du tampon phosphate (pH 7,4)

est ajouté à une fraction de l'extrait. La concentration d' H_2O_2 est déterminée après 20 min par un spectrophotomètre UV à 230 nm.

$$\% \text{ de piégeage } H_2O_2 = [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100$$

A0 est l'absorbance du Contrôle (acide ascorbique).

A1 : absorbance en présence de l'extrait.

1-3-4- Capacité de l'extrait à inhiber la peroxydation des lipides

1-3-4- 1 Principe

Le principe de la technique repose sur la formation en milieu acide et à chaud d'une liaison entre une molécule de MDA et deux molécules d'acide thiobarbiturique (TBA), d'un chromogène rose absorbant à 532 nm

1-3-4- 2 Méthode

Le dosage est réalisé selon la technique de Ruberto *et al.*, 2000 ; modifiée par Banerjee *et al.*, 2005. La technique utilise le jaune d'œuf comme source de lipide, auquel on ajoute 100 µl de l'extrait, 50 µl du $FeSO_4$ (0.075 M), 50 µl d'acide ascorbique (0.1 M), 0,5 ml EDTA (0.1 M) et 1,5ml d'une solution TBA, Après incubation 15 min à 100°C les échantillons sont centrifugés et l'absorbance du surnageant est lue à 532nm.

$$\text{Le pourcentage d'inhibition de la peroxydation des lipides} = [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100$$

A0 : est l'absorbance du Contrôle (acide ascorbique).

A1 : absorbance en présence de l'extrait.

1-4- Analyse quantitatives des composés phénoliques

1-4-1 Principe

Le dosage repose sur la méthode utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu. Ce réactif est constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique

($\text{H}_3\text{PMO}_{12}\text{O}_{40}$). L'oxydation des phénols réduit ce réactif en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène.

L'intensité de la couleur est proportionnelle au taux de composés phénoliques oxydés.

1-4-2 Méthode

La quantification des polyphénols totaux a été faite suivant la méthode de Singleton *et al.*, 1999. Ainsi, 2 ml de l'extrait, 1 ml du réactif Folin-Ciocalteu et 10 ml d'eau sont mis dans une fiole. Après agitation, la solution est complétée jusqu'au 25 ml par une solution de carbonate de sodium 7,5%.

Le blanc est préparé comme précédemment en remplaçant le réactif Folin-Ciocalteu par de l'eau.

La quantité de polyphénols totaux, exprimée en gramme équivalents d'acide gallique.

1-5- Analyse statistique

L'analyse statistique a été réalisée grâce au logiciel « Graph Pad Prism software ». Les résultats obtenus sont exprimés par la moyenne et l'écart type des différents échantillons biologiques.

La comparaison de moyennes a été réalisée avec le test « t » de Student dont le seuil de signification est $p \leq 0,05$.

2- Résultats :

2-1- Propriétés anti-oxydantes de l'extrait :

2-1-2-1 Le test DPPH :

L'extrait d'escargot possède une activité anti-oxydante, qui se traduit par sa capacité à réduire le radical DPPH. Le pourcentage de piégeage de ce radical augmente avec la concentration de l'extrait (fig. 22).

La valeur EC50 correspond à la concentration 10%.

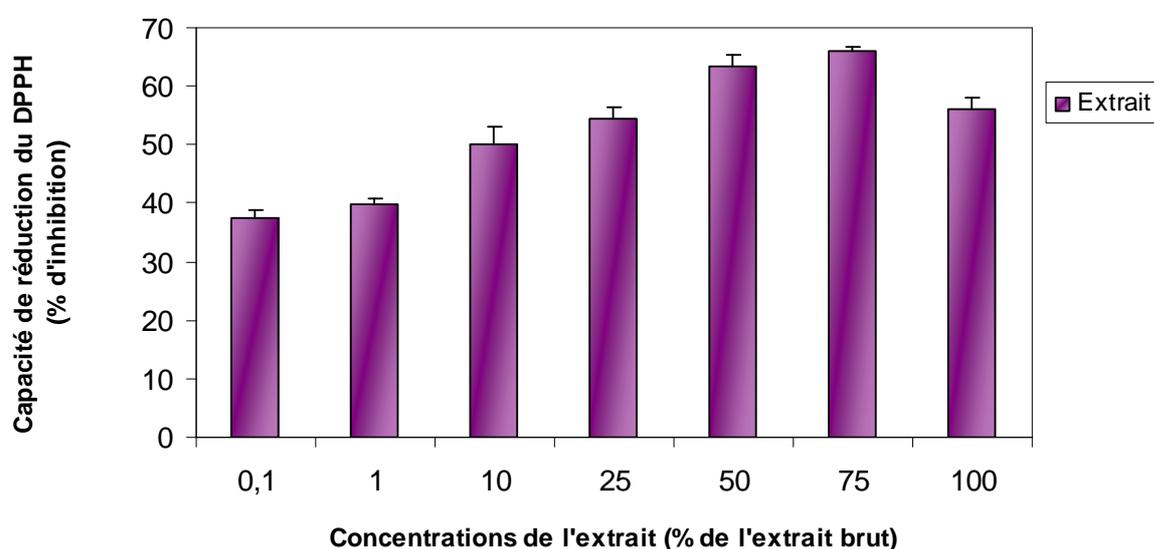


Figure 22: Capacité de l'extrait d'escargot à réduire le DPPH, exprimée en %.

2-1-2-2 La capacité totale de réduction de l'extrait

L'extrait d'escargot possède une grande capacité de réduction des ions Fe^{3+} , qui varie selon sa concentration. La capacité de réduction présente une élévation à la concentration de 1% (comparativement aux dilutions 0,1% 2,5% et 5%).

A partir de la concentration 10% l'extrait possède une très grande capacité de réduction. On note également avec les concentrations 50%, 75% et 100% une saturation avec précipitation de cristaux de bleu de prusse (fig 23).

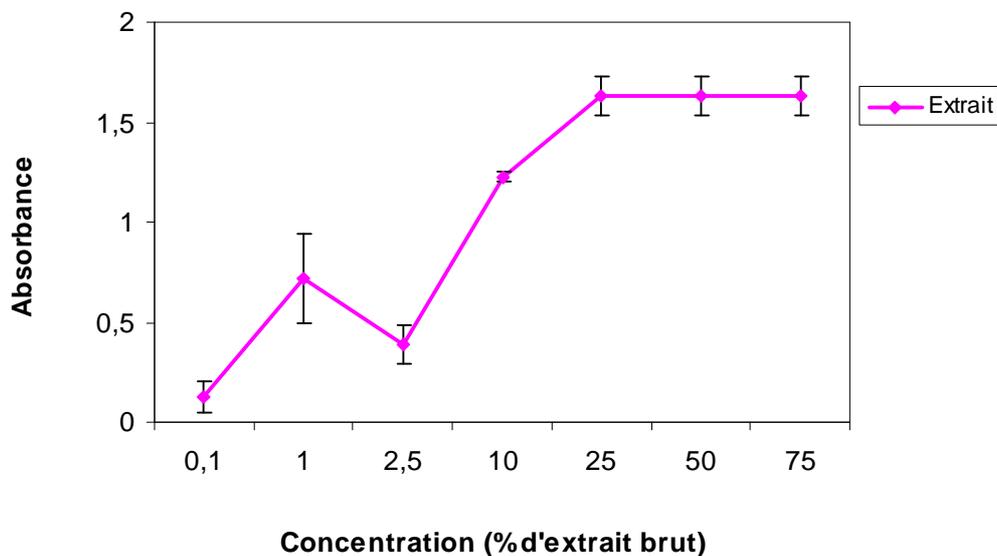


Figure 23: Capacité totale de réduction des ions Fe³⁺ de l'extrait d'escargot.

2-1-2-5 Capacité de l'extrait à piéger le peroxyde d'hydrogène

L'extrait d'escargot possède la capacité de piéger le H₂O₂ uniquement aux fortes concentrations 50 et 75 et 100% (fig. 24).

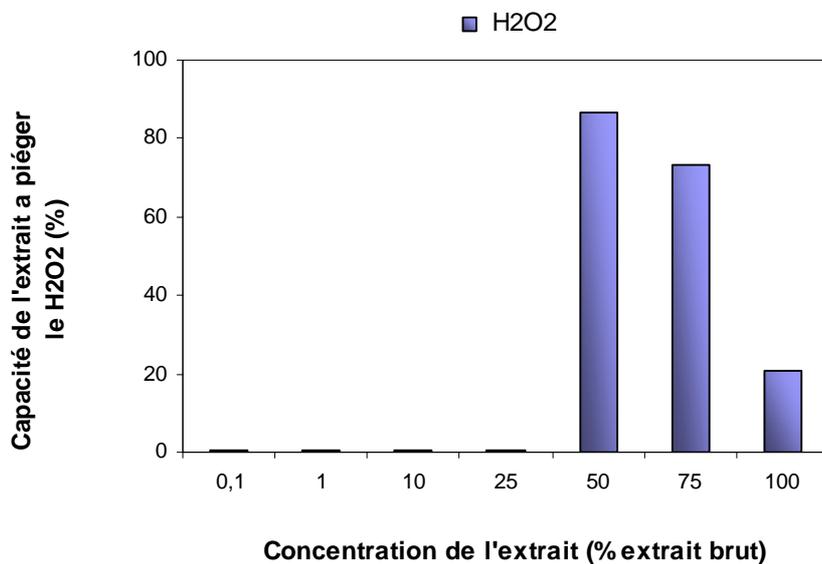


Figure 24 : Capacité de l'extrait à piéger le H₂O₂, exprimée en %.

2-1-2-6 Effet de l'extrait sur peroxydation des lipides

L'extrait d'*H. aspersa* inhibe la peroxydation des lipides surtout lorsqu'il est en concentration élevée (10, 25 50, 75 100%). La dose 1% possède moins d'effet inhibiteur sur peroxydation des lipides avec un pourcentage de 51% (fig 25)

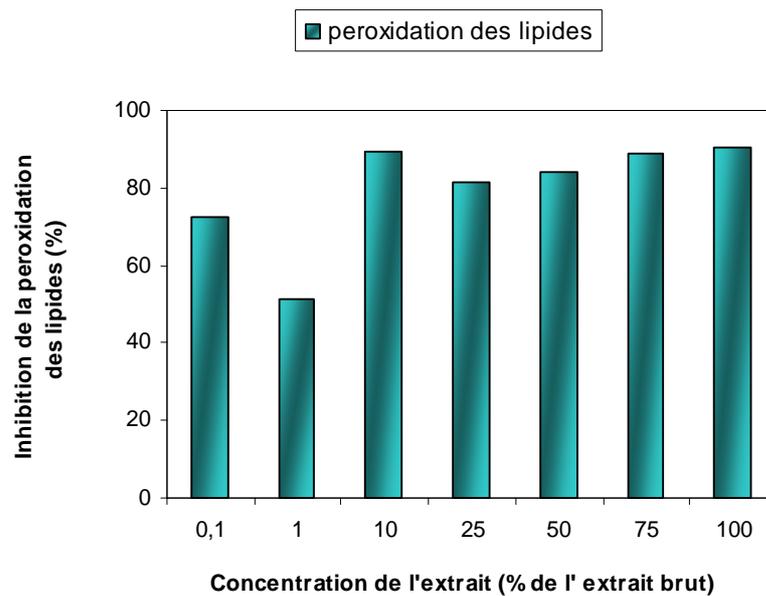


Figure 25 : Capacité de l'extrait à inhiber la peroxydation lipidique exprimée en %.

2-2- Analyse quantitative des polyphénols

La quantité des polyphénols présente dans l'extrait est déterminée à partir d'une droite d'étalonnage tracée avec l'acide gallique

$$y = 0,0527x + 3,6750 \quad (R^2 = 0,999). \quad (\text{fig 69 annexes})$$

L'extrait aqueux d'*H. aspersa* contient une quantité de 64 mg d'équivalent d'acide gallique dans 100g d'escargot (21,3 mg d'équivalent d'acide gallique dans 100 ml d'extrait aqueux).

3. Discussion :

Les radicaux libres sont des espèces chimiques très instables leurs structures comprennent un électron célibataire qu'ils cherchent à appairer en attaquant et en endommageant les molécules voisines (fig 26). Le stress oxydatif apparaît donc quand un déséquilibre se forme dans la balance anti/pro-oxydants. C'est seulement à ce moment que les radicaux libres vont exercer leur action délétère sur l'organisme (Favier, 2003). Les radicaux libres sont responsables de dommages sur toutes les molécules biologiques comme nous avons présenté précédemment.

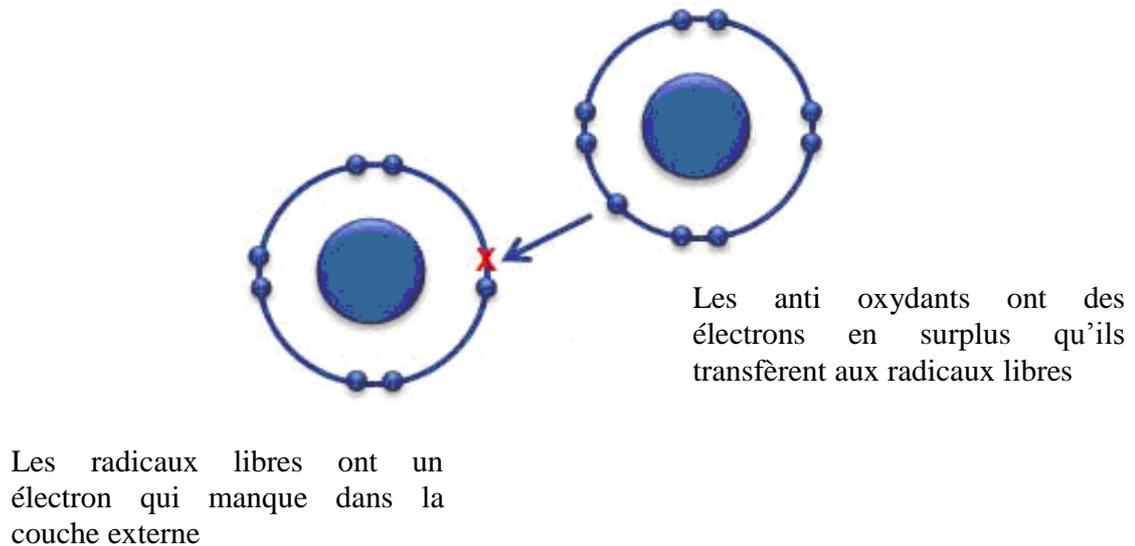


Figure 26: Schéma représentant les échanges d'électrons entre les antioxydants et les radicaux libres.

L'activité anti oxydante d'un composé correspond à sa capacité à résister à l'oxydation. Les antioxydants les plus connus sont le β -carotène (provitamine A), l'acide ascorbique (vitamine C), le tocopherol (vitamine E) ainsi que les composés phénoliques (Apak *et al.*, 2004). En effet, la plupart des antioxydants de synthèse ou d'origine naturelle possèdent des groupes hydroxy-phenoliques dans leurs structures et les propriétés anti oxydantes sont attribuées en partie, à la capacité de ces composés à piéger les radicaux libres (Brewer, 2011)

Avant de tester les activités biologiques de l'extrait nous avons d'abord procédé à l'étude de ces propriétés anti oxydantes totales par des méthodes chimiques. Il a été prouvé qu'il existe une corrélation entre la capacité anti oxydante des aliments et des composés naturelles *in vitro* et leurs effets biologiques *in vivo*. Les testes DPPH et FRAP constituent les principales méthodes.

L'activité anti- radicalaire totale de l'extrait d'*H. aspersa* a été déterminé en premier par la méthode DPPH qui mesure la capacité de l'extrait à réduire ce radical libre. Les résultats montrent que l'extrait possède une activité anti oxydante qui augmente avec sa concentration. La valeur EC50 correspond à la dilution 10% de l'extrait.

D'autre part, le test de réduction total du Fe^{3+} en Fe^{2+} , FRAP a montré que l'extrait possède une grande capacité de réduction (donneur d'électron) avec un effet dose, spécialement à partir de la concentration 25%. La capacité totale de réduction d'un composé est un indicateur de sa capacité anti oxydante (Rabeta & Nur Faraniza, 2013). Cependant, la réduction des ions ferriques est corrélée avec la présence des antioxydants dans l'extrait. En comparaison avec la vitamine C l'extrait possède plus de pouvoir réducteur.

La capacité de l'extrait à inhiber la peroxydation des lipides a été également testé *in vitro*, dans un modèle de peroxydation de lipides induits par les ions Fe^{2+} selon la réaction de Fenton (fig 27). Les résultats ont montré que l'extrait d'*H. aspersa* possèdent un effet protecteur contre la peroxydation des lipides, supérieurs à celui de la vitamine C, surtout à de faible doses.

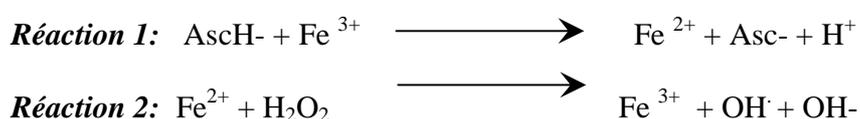


Figure 27 : Génération des radicaux libres oxygénés par la réaction du Fenton. (AscH-) ions d'acide ascorbique (ascorbate) ; (Asc-) radical ascorbate.

Les polyphénols constituent les principaux composés antioxydants naturels. Ils représentent la base de nombreux produits pharmaceutiques, additifs alimentaires et même des pesticides. L'extrait d'escargot contient également des polyphénols dont les taux sont estimés à environ 64 mg/100g (21,3mg/100ml) d'escargot. Ces quantités sont relativement faibles comparativement à ceux obtenues dans des extraits aqueux de raisin rouge ou du thé vert où les quantités des polyphénols sont respectivement d'environ 92,19 mg/100 ml (Kopjar *et al.*, 2009) 1g /100 ml (Owczarek *et al.*, 2004). Les plantes médicinales contiennent des concentrations plus élevées de polyphénols, elles sont de l'ordre de 92,4 mg/g dans *adhatoda vasica* (Maurya & Singh, 2010), et 43.32 mg/g dans *Raphanus raphanistrum* (Küçükboyacı *et al.*, 2012) et 256.36 mg/100 mg dans *Zea mays* (Nurhanan *et al.*, 2012).

Il est important de signaler que les polyphénols sont des métabolites secondaires chez les plantes donc l'existence de ces composés chez l'escargot *H. aspersa* semble être d'origine végétales et proviennent des végétaux que l'escargot a consommés, car de manière similaire des taux faibles de polyphénols ont été aussi retrouvés dans le plasma humain après une consommation d'aliments riches en polyphénols comme le thé ou les noisettes (Torabian *et al.*, 2009 ; Xiao & Kai, 2012). Mais la demi-vie des polyphénols plasmatiques varie entre 11 et 28h (Spencer *et al.*, 2008), alors que les polyphénols dans notre cas d'*H. aspersa* semble persister pour une période plus de 15 jours (les escargots sont maintenus à jeûn plus de 15 jours).

L'effet anti oxydant de l'extrait d' *H. aspersa* augmente avec sa concentration ce qui peut être expliqué par l'augmentation des taux de polyphénols. Néanmoins, cet effet peut aussi être dû à la présence d'autres molécules dans l'extrait comme par exemple la vitamine E (Tab 01) (Cagiltay *et al.*, 2011).

Tableau 01: Teneur de l'escargot *Helix aspersa* en vitamines (selon Cagiltay *et al.*, 2011)

Vitamines	Concentration (mg/100g)
A	5.462
E	0.887
B1	0.154
B2	0.065
B3	3.226
B6	0,288

Les anti- oxydants comme les polyphénols ont généralement des effets immuno-modulateur (cuevas, 2013) pour cette raison nous allons étudier dans le chapitre suivant l'existence d'un éventuel effet anti inflammatoire de l'extrait d'*H. aspersa*.

Chapitre 2: Etude de l'effet de l'extrait sur la réponse inflammatoire

1. Matériels et Méthodes:

1-1- Effet de l'extrait sur les cellules de la lignée THP1:

L'étude a été réalisée sur la lignée THP-1, une lignée de pro monocytes humaines. Elle est issue de sang d'un enfant âgé d'un an atteint de leucémie aigue. Les cellules THP-1 possèdent de nombreuses caractéristiques communes aux monocytes et aux macrophages notamment la capacité de phagocytose. Les cellules THP-1 possèdent à leur surface des récepteurs Fc et C3b, des immunoglobulines cytoplasmiques et les marqueurs CD4 et CD14 (Tsuchiya *et al.*, 1980; Auwerx, 1991). Elles sont capables de produire différentes cytokines inflammatoires et peuvent être différenciées en macrophages avec des esters de phorbol (Hiura *et al.*, 1999).

Dans cette étude, les cellules THP-1 sont utilisées en suspension (phénotype de monocytes) ou après différenciation en macrophages.

1-1-1 Culture cellulaire

Les cellules sont cultivées en suspension dans des flacons de cultures de 75 cm² à raison de 10⁶ cellules/ ml au maximum. Le milieu de culture est un milieu RPMI 1640 (Invitrogen) additionné de 10 % de sérum de veau foetal, de 1 % de pénicilline/streptomycine, 1 % de L-glutamine. Le milieu est renouvelé 3 fois par semaine par centrifugation de la suspension cellulaire à 1000 g pendant 5 min. Le culot cellulaire est remis en suspension dans le milieu de culture de manière à obtenir une concentration de 10⁶ cellules/ml.

Les cellules sont incubées à 37°C en atmosphère enrichie de 5 % CO₂.

1-1-2 Différenciation en macrophages

Les cellules THP-1 bloquées au stade monocyte peuvent être différenciées en macrophages par addition de Phorbol 12-Myristate 13-Acétate (PMA) entraînant leur adhésion au support de culture.

Les cellules sont cultivées pendant 72 heures en présence de PMA à une concentration de 8 nM (Park *et al.*, 2007).

A la fin du temps d'incubation le milieu contenant le PMA est éliminé, les cellules adhérentes sont rincées avec du RPMI 1640 afin d'éliminer les traces du PMA et du milieu complet (RPMI 1640

additionné de 10 % de sérum de veau fœtal, de 1 % de pénicilline/streptomycine, 1 % de L-glutamine) est ajouté pour la suite des expérimentations.

1-1-3- Etude de l'effet de l'extrait sur la viabilité cellulaire

L'effet de l'extrait sur la viabilité des cellules de la lignée THP1 a été testé sur les deux phénotypes de la lignée et grâce à la méthode MTT. Premièrement les cellules en suspension (monocytes) ont été incubées en présence de l'extrait à différentes dilutions 0,1%, 1%, 2,5%, 5% et 10% pendant 24 heures. Ensuite, la même expérimentation a été refaite sur les cellules après leurs différenciations en macrophages.

1- 1-3-1 Principe

Le test est basé sur la transformation des sels de tétrazolium, 3-(4,5-diméthylthiazoly-2)-2,5-diphényltétrazolium bromide (MTT), de couleur jaune en cristaux violet de formazan par la succinate déshydrogénase mitochondriale, uniquement active dans les cellules vivantes.

La formation des cristaux de formazan est donc proportionnelle au nombre de mitochondries fonctionnelles (fig. 28).

1- 1-3-2 Méthode

Les cellules ont été incubées dans des plaques de 96 puits (80 000 cellules/ml de milieu de culture), en présence de différentes dilutions de l'extrait: 0,5%, 0,1%, 1%, 5%, 10%.

Après 24 heures d'incubation le milieu de culture est éliminé. Cette étape est suivie d'un lavage avec du PBS, 100 µl d'une solution MTT (1mg/ml) (1mg de MTT dans une solution de tampon Hank's a 10%) sont ensuite additionnées dans chaque puits.

La plaque est incubée une deuxième fois, après 1 heure de temps on observe l'apparition de cristaux de couleur violet que l'on solubilise par le DMSO. On mesure en fin, l'intensité de la coloration à 492 nm.

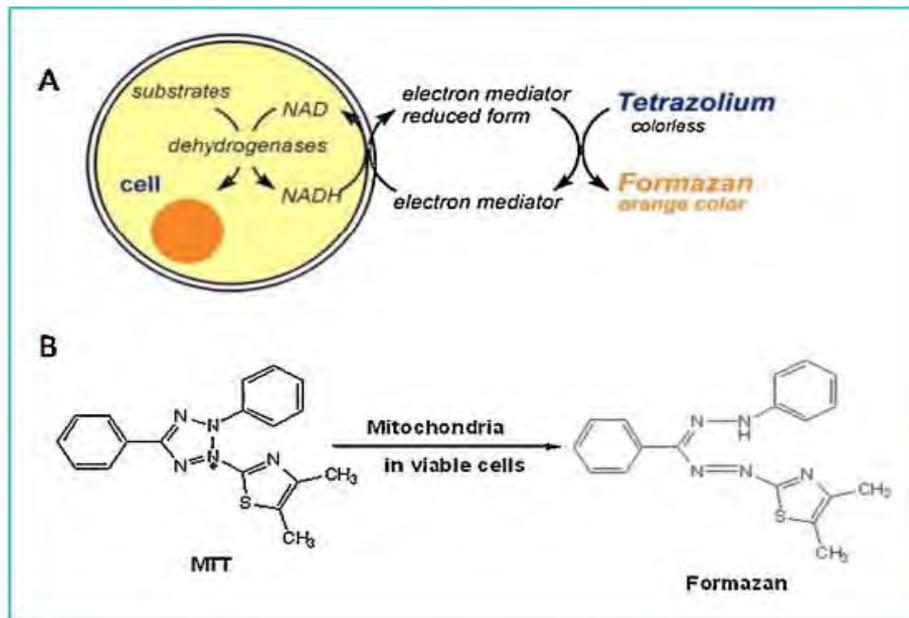


Figure 28: Schéma représentant le principe de test MTT (A) et la structure du MTT et du Formazan (B) (Duval *et al.*, 2012)

1-1-4 Effet de l'extrait sur l'activité des macrophages

1-1-4-1 Effet de l'extrait sur l'activité phagocytaire

Afin d'étudier l'activité phagocytaire des macrophages, les cellules sont incubées en présence de l'extrait à différentes concentrations. Après 24 heures, on change le milieu de culture et on incube les cellules, pendant 1 heure à 37°C, avec le dextran-FITC (1mg/ml). A la fin de l'incubation les cellules sont lavées et fixées au formaldéhyde (3,7%) (Sano *et al.*, 2003).

Finalement, le nombre de macrophages présentant une fluorescence intra cellulaire est comptée sous microscope à fluorescence et l'indice phagocytaire est calculé selon la formule :

$$\text{L'indice phagocytaire} = \frac{\text{PI (test)} - \text{PI (contrôle)}}{\text{PI (contrôle)}} \times 100$$

PI (test) = Nombre de macrophages en états de phagocytose après traitement avec l'extrait

PI (contrôle) = Nombre de macrophages en états de phagocytose en absence de l'extrait

1-1-4-2 Effet de l'extrait sur la production des radicaux libres oxygénés par la mesure de la réduction du bleu de nitrotétrazolium (NBT)

1-1-4-2-1 Principe :

Le « burst oxydatif » ou burst respiratoire correspond à une brusque augmentation de la consommation en oxygène qui a pour finalité la production d'anion superoxyde (O_2^-), de perhydrolyol et l'oxydation du glucose par le shunt des hexoses monophosphates. L'activation d'une enzyme, la NADPH oxydase, est la clé de ce burst : elle permet de catalyser la transformation de l' O_2 en O_2^- en transformant le NADPH en $NADP^+ + H^+$.

Le NBT est un composé dicationique électrophile qui capte facilement les électrons d'un donneur d'électrons et sa réduction complète en diformazan nécessite 2 électrons et 4 protons selon la réaction:



En solution aqueuse, les réactions produisant des ions O_2^- conduisent à la réduction du NBT en monoformazan selon la réaction :



La forme oxydée du NBT est de couleur jaune, sa réduction s'accompagne d'une perte des charges positives conduisant à la diminution de sa solubilité et à une modification de son spectre d'absorption dans le visible, caractérisée par l'apparition d'une couleur bleue (Auclair et Voisin, 1985).

1-1-4-2- 2 Méthode :

Les monocytes THP1 sont traités à la PMA selon la méthode citée précédemment. Après leur différenciation en macrophages les cellules sont décollées à l'aide d'un cell scraper et 20 μ l de la suspension cellulaire (10^6 cellules/ml) sont transférés dans chaque puits d'une plaque de 96 puits.

Les cellules sont ensuite incubées avec différentes concentrations de l'extrait d'escargot. Après 24 heures le milieu est changé et les cellules sont mises en culture avec des levures du genre *Candida glabrata* (ATCC2001 à une concentration de 1 000 000 UFC/ml), comme exemple de micro-

organisme activateur de macrophages. 20 µl d'une solution de NBT (1,5 mg/ml) est additionnée aussi dans le milieu. Après incubation 1 heure à 37°C, on procède au lavage des cellules avec du méthanol. Après aspiration complète du méthanol 120 µl de KOH 2M plus 140 µl de DMSO sont rajoutés dans chaque puits.

La précipitation intracellulaire du formazan induite par la réduction du NBT (de couleur bleu) est mesurée directement dans les cellules, sans solubilisation, à l'aide d'un lecteur de microplaques à la longueur d'onde 620 nm (Choi *et al.*, 2006).

Les résultats sont exprimés en pourcentage de réduction du NBT selon la formule:

$$\text{NBT reduction (\%)} = \frac{\text{DO échantillon} - \text{DO contrôle négatif}}{\text{DO contrôle négatif}} \times 100$$

DO : densité optique.

Contrôle négatif: macrophage incubé en présence de la levure.

1-1-4-3 Effet de l'extrait sur la production du TNF α par les macrophages :

Les monocytes THP- 1 sont cultivées en présence de la PMA dans des plaques de 96 puits (200 000 cellules par/puits). Après leurs différenciations en macrophages. Les cellules sont stimulées par des Lipopolysaccharides d'*Escherichia coli* (B4 :0111 à 100 ng/ml), en présence ou en absence de l'extrait à différentes concentrations. Les cellules sont incubées pendant 24 heures, à 37°C et 5% CO₂. Le surnageant de culture est prélevé et servira pour le dosage du TNF α selon la méthode ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)

1-1-4-3-1 Principe:

La méthode est basée sur la réaction spécifique entre antigène- anticorps. La totalité de l'antigène à doser se lie à l'anticorps fixé. Il est ensuite révélé par un second anticorps marqué. On

mesure la fraction liée qui augmente avec la concentration en antigène à doser (linéairement pour de faibles concentrations). (fig. 29)

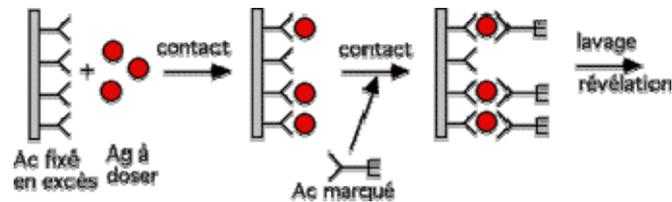


Figure 29: Schéma représente le principe du dosage ELISA sandwich.

1-1-4-3-2- Méthode

Le dosage a été réalisé sur les surnageants de culture des cellules contrôles et traitées, et grâce au kit « TNF α human Boster immunoleader ELISA kit ». Selon les étapes suivantes :

1- Préparation de la gamme d'étalonnage : la gamme d'étalonnage a été réalisée à partir d'un TNF α recombinant à une concentration initiale de 10 ng/ml. Les concentrations utilisées seront de l'ordre de: 500 pg, 250 pg, 125 pg, 62,5 pg, 31,2 pg et 15,6 pg.

2- Préparation des échantillons : les échantillons sont dilués (1v :1v) dans un tampon PBS (sample dilution buffer).

3- Distribution des différents éléments dans la plaque

- On met 100 μ l de tampon de dilution dans le premier puits (le blanc).
- On distribue 100 μ l du standard TNF α selon les différentes concentrations (en duplicate).
- On met ensuite 100 μ l de chaque échantillon dans les différents puits de la plaque.

On incube la plaque à 37° C pendant 90 minutes, ensuite on rajoute 100 μ l de l'anticorps anti TNF α - biotynilé et on incube la plaque encore une fois à 37° C.

Après 60 minutes on procède au lavage de la plaque avec une solution PBS (0,01M) et à l'aide d'un laveur MINDRAY.

L'étape suivante consiste à une incubation de la plaque à 37° C en présence d'une solution Avidin-Biotin- Peroxydase. Après 30 minutes, la plaque est lavée avec du PBS et 99 μ l du révélateur TMB (tetra methyl benzidine) sont rajoutés dans chaque puits.

Après 15 minutes à l'obscurité on voit l'apparition d'une couleur bleu. La réaction est finalement stoppée à l'aide d'une solution à base d'acide sulfurique « TMB stop solution » la couleur change du bleu en jaune.

La lecture de la plaque se fait avec un lecteur microplaque MINDRAY MR-96A à une longueur d'onde de 450 nm.

1-1-4-4 Etude de l'effet de l'extrait sur la production d'oxyde nitrique NO:

Les mêmes surnageants qui ont servi au dosage du TNF α seront utilisés pour déterminer la concentration du NO produit par les macrophages.

1-1-4-4 -1 Principe :

Le dosage du NO est réalisé selon la méthode de Griess et grâce au kit « Griess Reagent Kit for Nitrite Determination G-7921 » du life technologies. La technique repose sur la conversion, dans un milieu acide et en présence du nitrite, de l'acide sulfanilique en sels de diazonium. Ce dernier sera couplé au N-(1-naphtyl) éthylènediamine pour révéler un chromogène rose mesurable à 548 nm. (fig. 30)

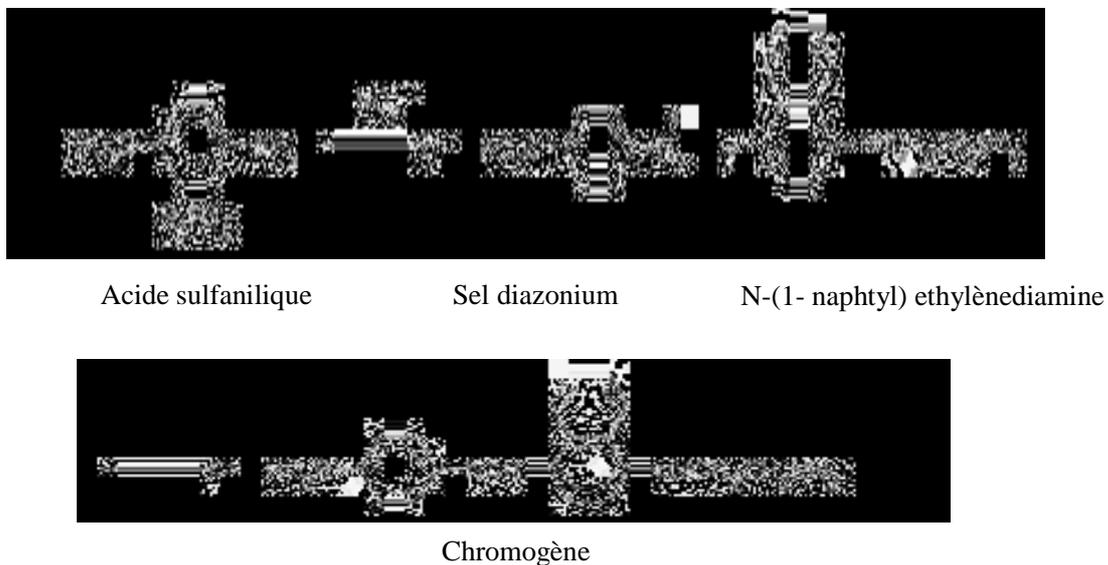


Figure 30: Principe de la réaction de Griess (selon le prospectus Griess Reagent Kit for Nitrite Determination G-7921).

1-1-4-4 -2 Méthode

Le kit contient deux solutions une solution d'acide sulfanilique et une solution du N-(1-naphtyl) ethylènediamine dihydrochloride, le réactif de Griess est préparé en mélangeant 1V/1V de chaque solution

Dans une plaque de 96 puits on transfère 150 µl de surnageant de culture (des cellules témoins et traitées avec l'extrait d'escargot) auxquels on rajoute 130 µl d'eau distillée et 20 µl de réactif de Griess.

Après incubation 30 minutes à température ambiante, La lecture se fait à 548 nm contre un blanc contenant 20 µl de réactif plus 280 µl d'eau distillée.

La gamme d'étalonnage est réalisée à partir d'une solution standard de NaNO₂ (1mM)

1-2 l'effet de l'extrait sur la réponse inflammatoire in vivo chez les souris :

1-2-1- Elevage et traitement des souris:

L'étude a été effectuée sur un groupe de souris (*Mus musculus*) mâles, âgés de 2,5 à 3 mois, ayant un poids entre 24 et 30 g. L'élevage des souris a été réalisé dans des cages en plastique, dans une température ambiante, un rythme nyctémérale 12h jour/12h nuit et un régime alimentaire standard.

Les souris sont réparties en 4 lots (chaque lot comprenant 10 souris) le traitement se fait un jour sur deux par injection intra péritonéale pendant une période de 28 jours :

- **1^{er} lot** : lot contrôle qui reçoit un volume de 0,5 ml du NaCl à 0,9%.
- **2^{ème} lot** : traité avec 0,5 ml de l'extrait.
- **3^{ème} lot** : traité avec les lipopolysaccharides d'*E. coli* (B4 :0111) et avec les doses suivantes : 32 µg/souris (l'équivalent de 1,4 mg/kg) pendant une semaine, une dose transitoire de 55 µg/souris (l'équivalent de 1,96 mg/kg) pendant 3 jours et finalement pour le reste de la période du traitement les souris reçoivent une dose de 75 µg (l'équivalent de 2,7 mg/kg).
- **4^{ème} lot** : les souris sont traitées avec les LPS + l'extrait. LPS est administré en premier suivi de l'extrait après 24 heures. Les doses utilisées sont les mêmes que les traitements simples (le LPS est administré aux doses 32, 55, 75 µg successivement, alors que l'extrait est administré avec un volume de 0,5 ml)

1-2-2- Prélèvement du sanguin et des organes

Chaque semaine le sang est prélevé sur un anti coagulant EDTA, le plasma est conservé à -20° C pour le dosage du TNF α et les animaux sont disséqués. Leurs rates et foies sont conservés dans du formol.

1-2-3 Préparation des coupes histologiques

Les coupes histologiques ont été réalisées selon la technique Martoja & Martoja, 1967. Les organes sont conservés dans du formol à 10 %, qui a pour rôle de fixer les pièces. Ils sont ensuite déshydratés dans trois bains successifs d'éthanol à différentes concentrations 50%, 60% et 90% (la durée de chaque bain est de 3 min X3).

L'étape suivante est l'inclusion des échantillons dans la paraffine. Les échantillons sont coupés, sous forme de ruban de paraffine (4-5 μ m d'épaisseur), à l'aide du microtome et étalés sur des lames en verre. Afin de fixer les rubans de paraffine, les lames seront chauffées à 45°C, puis 56 °C pendant 2 heures pour le séchage.

On procède ensuite au déparaffinage qui consiste à faire passer les échantillons dans le xylène puis dans deux bains successifs d'alcool à concentrations décroissantes 100%, 70%. Les lames sont encore, réhydratées dans un bain d'eau.

Après réhydratation, les coupes sont colorées. Elles sont d'abord plongées dans l'hématoxyline pendant 5 à 10 minutes puis rincées par trois bains successifs d'eau. Elles seront ensuite recouvertes de gouttes d'éosine. Après deux minutes de coloration, les coupes sont rincées par l'eau distillée.

Finalement, l'observation des lames a été faite sur un microscope OPTECH OPTICAL TECHNOLOGY®.

1-2-4- Dosage des taux plasmatiques du TNF α

Le dosage est effectué par la technique ELISA et à l'aide d'un kit « TNF α mouse Boster Immunoleader » spécifique aux souris. Selon la méthode cite dans la page 67.

1-3 Analyse statistique :

L'analyse statistique a été réalisée selon les méthodes citées dans le chapitre 1 de la partie expérimentale (page 55)

2. Résultats

2-1- Effet de l'extrait sur l'activité des macrophages

2-1-1 Etude de la cytotoxicité de l'extrait sur la lignée THP1

2-1-1-1 Effet de l'extrait sur la viabilité des monocytes

Les cellules de la lignée THP1 se présentent sous forme de monocytes non adhérents qui se différencient en macrophages adhérents sous l'effet de la PMA. L'incubation des monocytes THP1 en présence de différentes concentrations de l'extrait montre que l'extrait n'affecte pas la viabilité des monocytes. Au contraire, le nombre de cellules vivantes augmente progressivement avec les différentes concentrations de l'extrait, indiquant qu'il existe une prolifération cellulaire.

Le nombre de cellules augmente significativement avec les dilutions 2,5% ($p < 0,05$), 5% ($p < 0,001$) et 10% ($p < 0,001$). (fig. 31)

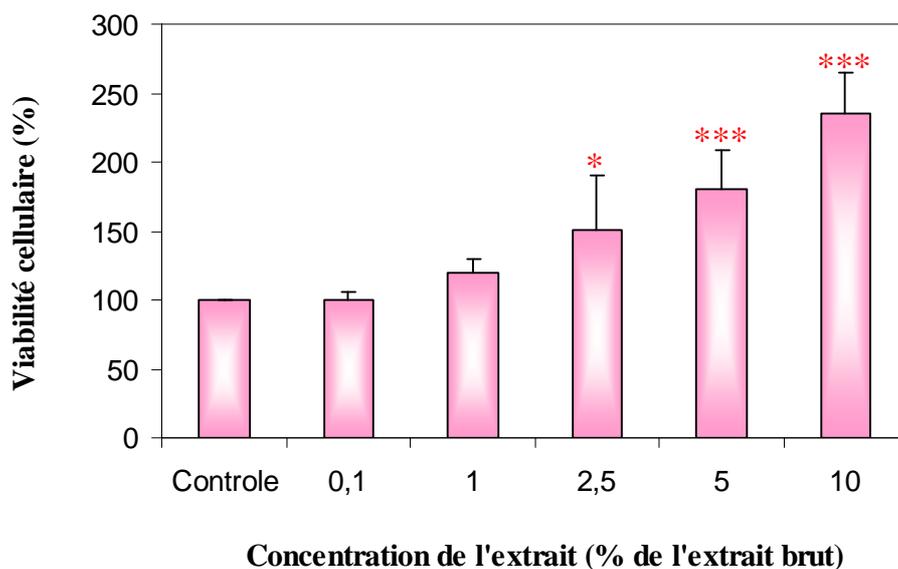


Figure 31 : Effet de l'extrait d'*H. aspersa* sur la viabilité des monocytes de la lignée THP1 après 24 heures de traitement : résultats exprimés en pourcentage par rapport au contrôle (* significatif $p < 0,05$; *** hautement significatif $p < 0,001$).

2-1-1-2 Etude de l'effet de l'extrait sur la viabilité des macrophages

La viabilité cellulaire des macrophages (fig. 32), traités avec les dilutions 0,1% et 10% est comparative avec celle des cellules contrôles. Par contre, la viabilité des macrophages traités avec les dilutions 1%, 2,5% et 5% a été diminuée de manière très hautement significative ($p < 0,001$).

L'extrait d'escargot aux dilutions 1%, 2,5% et 5% présente donc un effet cytotoxique sur les macrophages. La valeur $IC_{50} = 2,5\%$.

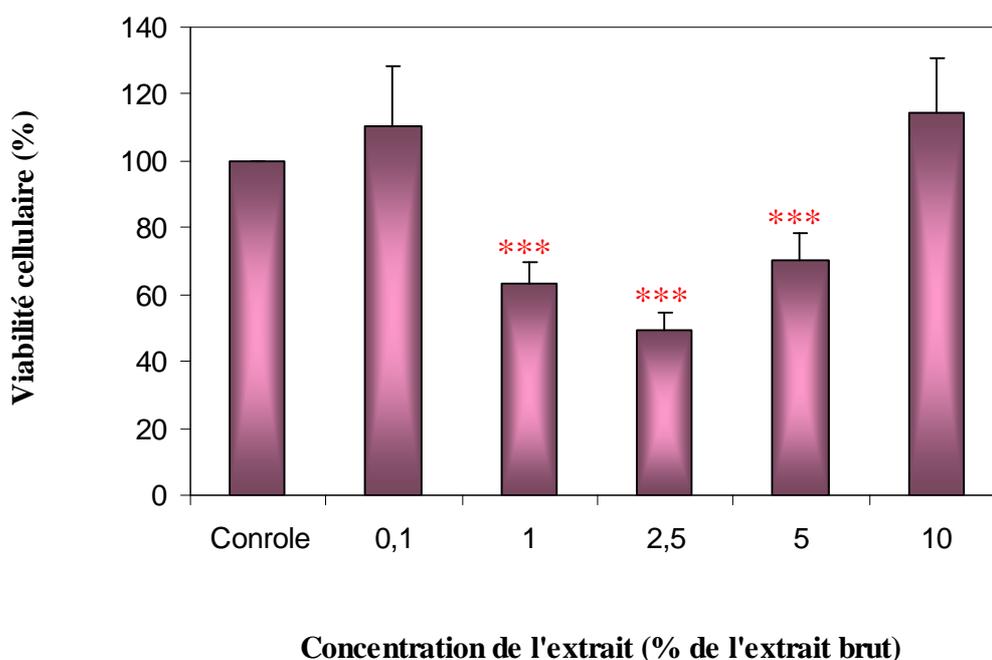


Figure 32: Effet de l'extrait d'*H. aspersa* sur la viabilité des macrophages de la lignée THP1 après 24 heures de traitement : résultats exprimés en pourcentage par rapport au contrôle (***) hautement significatif $p < 0,001$).

2-1-2 Effet de l'extrait sur la morphologie des macrophages

L'étude de l'effet de l'extrait sur la viabilité cellulaire par le test MTT nous a permis de choisir les dilutions qui possèdent un effet marqué sur les macrophages. De ce fait on a choisi 3 dilutions pour étudier l'effet de l'extrait sur l'activité des macrophages. Les dilutions 0,1% et 10% vu qu'elles n'affectent pas la viabilité, elles représentent aussi, les deux extrémités inférieure et supérieure de l'intervalle des doses cytotoxiques et la dose 1% qui est une dose cytotoxique et proche de l'IC₅₀ (IC₅₀= 2,5).

Les macrophages THP1 sont incubés pendant 24 heures en présence de l'extrait aux dilutions 0,1%, 1% et 10%. L'analyse sous microscope inversé (fig. 33) montre que les cellules dans les puits contrôles se présentent sous forme d'amas cellulaires (formés d'un grand nombre de cellules). Le traitement avec l'extrait montre qu'il n'existe aucune altération morphologique sur les cellules. Néanmoins, avec la dilution 0,1% on observe une augmentation de la granulation cytoplasmique alors qu'avec la dilution 10% on note qu'il existe peu d'amas cellulaires, aussi le nombre de cellules formant ces amas est très réduit. Les cellules sont libres, séparées et dispersées dans le milieu de culture.

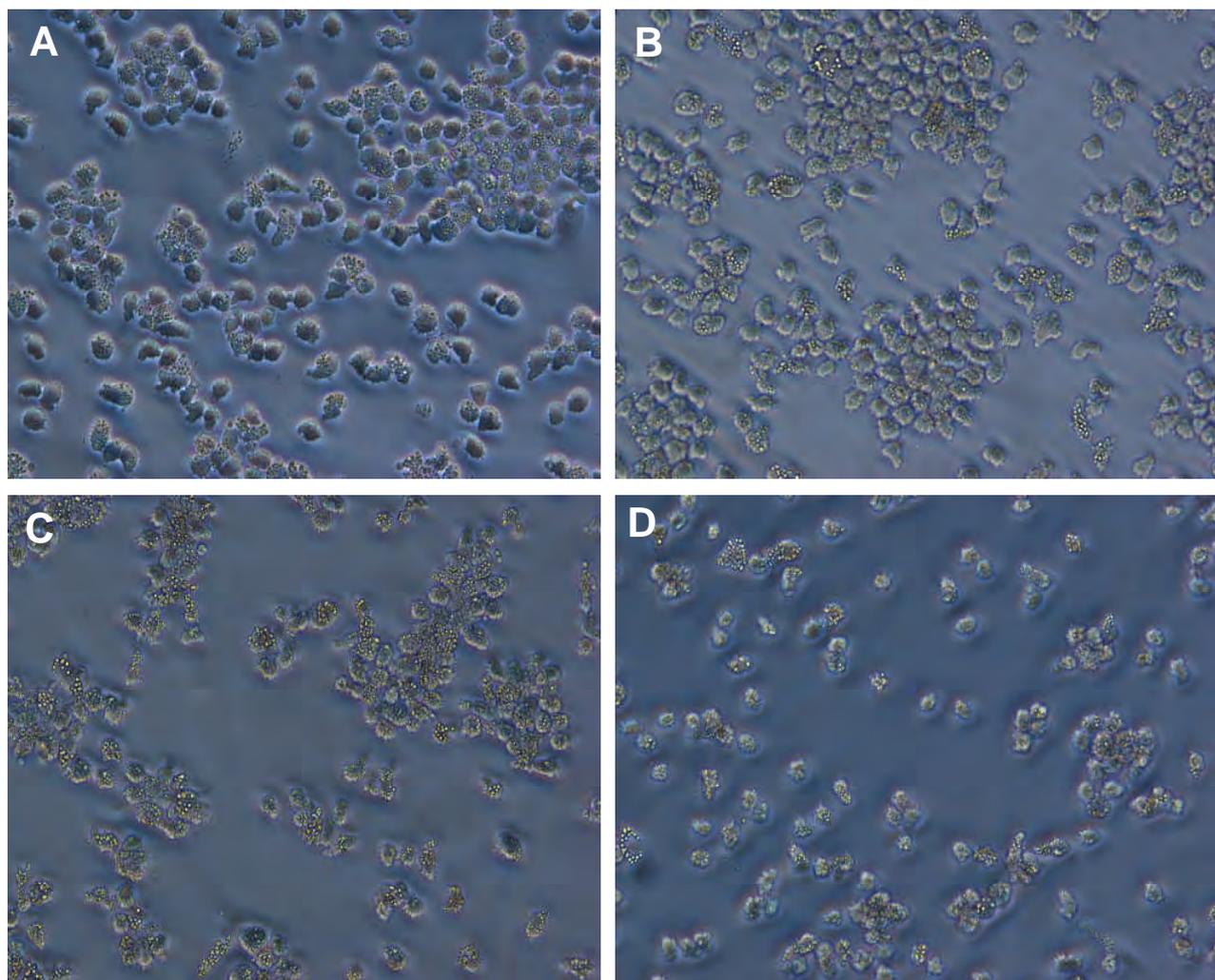


Figure 33: Variations morphologiques observées au niveau des cellules THP1 (objectif X20) après 24 heures de traitement avec l'extrait. (A) Cellules non traitées (Contrôle). (B) Cellules traitées par la dilution 1%. (C) Cellules traitées par la dilution 0,1%. (D) Cellules traitées avec la dilution 10%.

2-1-3 Effet de l'extrait sur l'activité phagocytaire

Le traitement des macrophages avec les dilutions 0,1% et 1% de l'extrait d'escargot n'a pas d'effet sur l'activité phagocytaire. La dilution 10% par contre, entraîne une augmentation de la capacité des macrophages à phagocyter les particules du Dextran. On note une augmentation significative de l'indice phagocytaire ($p < 0,05$) (fig. 34)

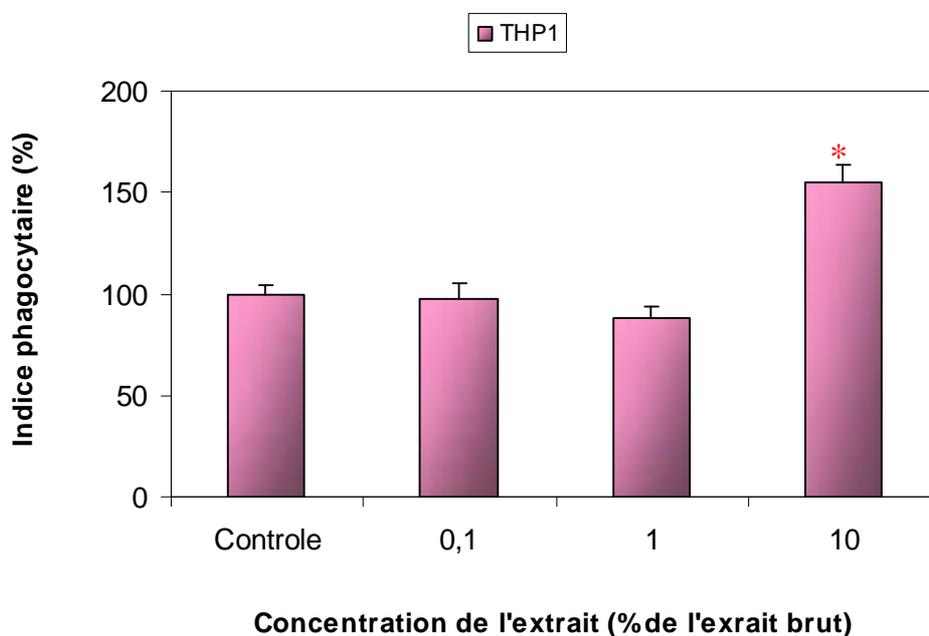


Figure 34: Effet de l'extrait d'*H. aspersa* sur l'activité phagocytaire des macrophages de la lignée THP1 après 24 heures de traitement (* significatif $p < 0,05$).

2-1-4 Effet de l'extrait sur la production des radicaux libres oxygénés

Le burst oxydatif (burst respiratoire) et la production des radicaux libres oxygénés ont été mesurés par la réduction du NBT. Cependant, le traitement des macrophages avec l'extrait d'escargot aux concentrations 0,1% et 10% entraîne une augmentation du burst respiratoire des macrophages. La dilution 10% semble avoir plus d'effet ($p < 0,05$).

Cependant, la dilution 1% diminue la production des radicaux libres oxygénés de manière non significative (fig.35)

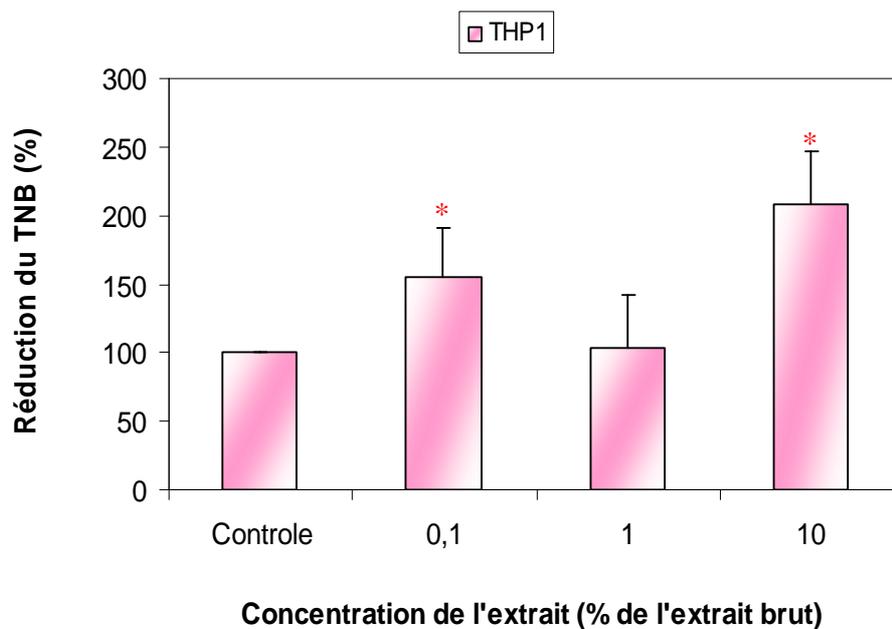


Figure 35: Effet de l'extrait d'escargots sur la production des radicaux libres oxygénés mesurée par la méthode de réduction intracellulaire du NBT : résultats exprimés en pourcentage par rapport au contrôle (* significatif $p < 0,05$).

2-1-5 Effet de l'extrait sur la production du TNF α par les macrophages

La figure 36 montre l'effet de l'extrait d'*H. aspersa* aux dilutions 0,1%, 1% et 10% sur la sécrétion du TNF α par les macrophages THP1. Les résultats montrent que les taux de la cytokine augmentent de manière très significative lors de la stimulation des macrophages avec la dilution 1 % ($p < 0,05$) de l'extrait. Les dilutions 0,1% et 10% n'ont pas d'effet marquant sur les concentrations de la cytokine dans le milieu de culture. Toutefois, la dilution 10% entraîne une faible augmentation mais statistiquement elle reste non significative.

La stimulation des macrophages par les LPS d'*E. coli* entraîne une augmentation très significative des taux du TNF α ($p < 0,01$) comparativement au contrôle.

L'introduction de l'extrait en combinaison avec le LPS dans le milieu de culture entraîne une augmentation des taux de la cytokine avec les 3 dilutions. Comparativement au contrôle, l'augmentation est significative avec la dilution 1% ($p < 0,05$) et très significative avec les dilutions 0,1% et 10% ($p < 0,01$).

Si on compare statistiquement, l'effet de l'extrait d'escargot, sur la sécrétion du TNF α , par rapport à celui du LPS (fig. 36 astérisques bleus), on note que l'extrait introduit aux dilutions 0,1 % ($p < 0,01$) et 10% possèdent moins d'effet stimulateur que les LPS alors que la dose 1% possède un effet stimulateur très élevé comparativement aux LPS.

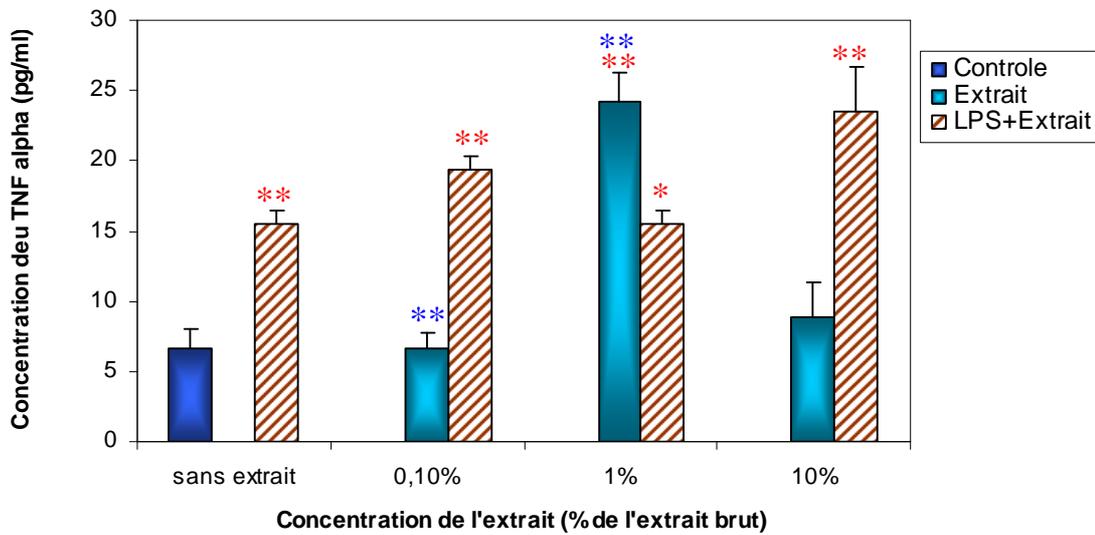


Figure 36: Effet de l'extrait d'escargot sur les taux du TNF α sécrétés par les macrophages THP1 dans le milieu de culture après 24 heures de traitement. (* comparaison par rapport au contrôle, * comparaison par rapport au LPS, * significatif $p < 0,05$; ** très significatif $p < 0,01$)

2-1-6 Effet de l'extrait sur la production du NO par les macrophages

Les résultats montrent que le traitement par les LPS augmente les taux du NO dans le milieu de culture. L'extrait d'escargot administré à la dilution 1% entraîne une stimulation hautement significative ($p < 0,001$) de la production du NO par les macrophages. Les dilutions 0,1% et 10% par contre n'ont pas d'effet significatif sur la production du NO.

En combinaison avec les LPS, l'extrait à la concentration 1% stimule très fortement la production du NO ($p < 0,001$).

En comparant l'effet de l'extrait à celui du LPS, on note que ; la concentration 1% entraîne une production très élevée du NO ($p < 0,001$). Au contraire, les concentrations 0,1 % et 10% possèdent un effet inhibiteur sur la production du NO (fig.37).

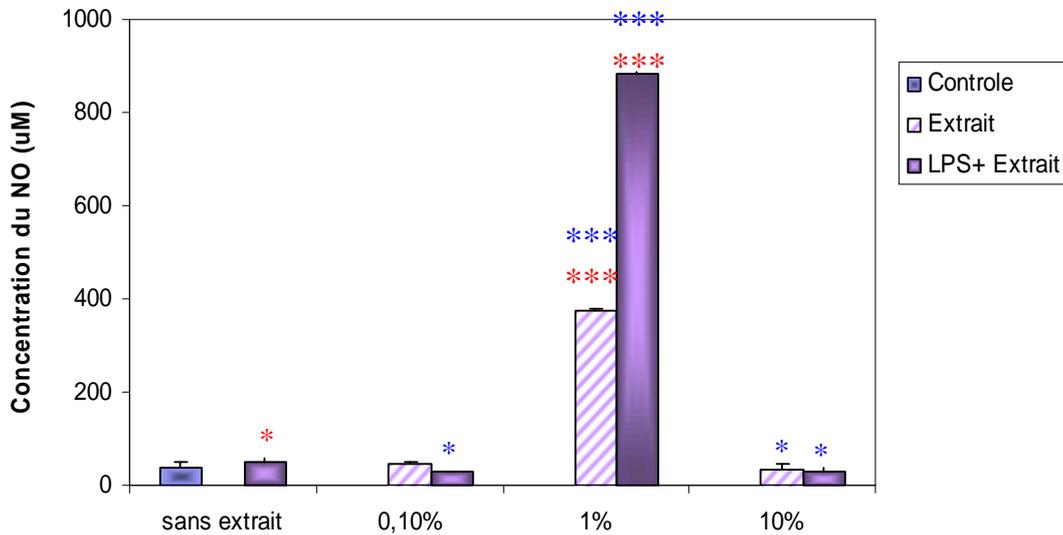


Figure 37: Effet de l'extrait d'escargot sur la concentration du NO sécrété par les macrophages THP1 dans le milieu de culture après 24 heures de traitement à l'extrait d'escargot (* comparaison par rapport au contrôle, * comparaison par rapport au LPS, * significatif $p < 0,05$; *** hautement significatif $p < 0,001$)

2-2- Effet de l'extrait d'*H. aspersa* sur la réponse inflammatoire *in vivo*.

2-2-1 Effet de l'extrait sur les taux plasmatiques du $TNF\alpha$

Les taux plasmatiques de $TNF\alpha$ chez souris contrôles sont évalués à environ 400 pg/ml. Le traitement des souris avec l'extrait entraîne une diminution progressive des taux de la cytokine après 15, 21 et 28 jours.

L'analyse statistique montre que l'extrait inhibe la sécrétion du $TNF\alpha$ dans le plasma de manière significative à 15 jours ($p < 0,05$) et très significative à 28 jours ($p < 0,01$) comparativement au contrôle.

Le traitement avec le LPS entraîne une augmentation des taux de la cytokine après 7, 15 et 21 jours de traitement. Une diminution est observée après 28 jours.

La comparaison avec les valeurs contrôles et traité montre que l'augmentation est très significative (très significatif $p < 0,01$).

Le traitement des souris avec la combinaison LPS+ extrait n'a pas d'effet sur les taux plasmatiques de la cytokine après 7 et 15 jours de traitement. Les taux de la cytokine diminuent ensuite après 21 et 28 jours de traitement.

La comparaison avec le contrôle et le traitement avec le LPS montre que le traitement combiné inhibe la sécrétion de la cytokine dans le plasma. L'extrait d'escargot possède apparemment un effet anti TNF *in vivo* (fig. 38)

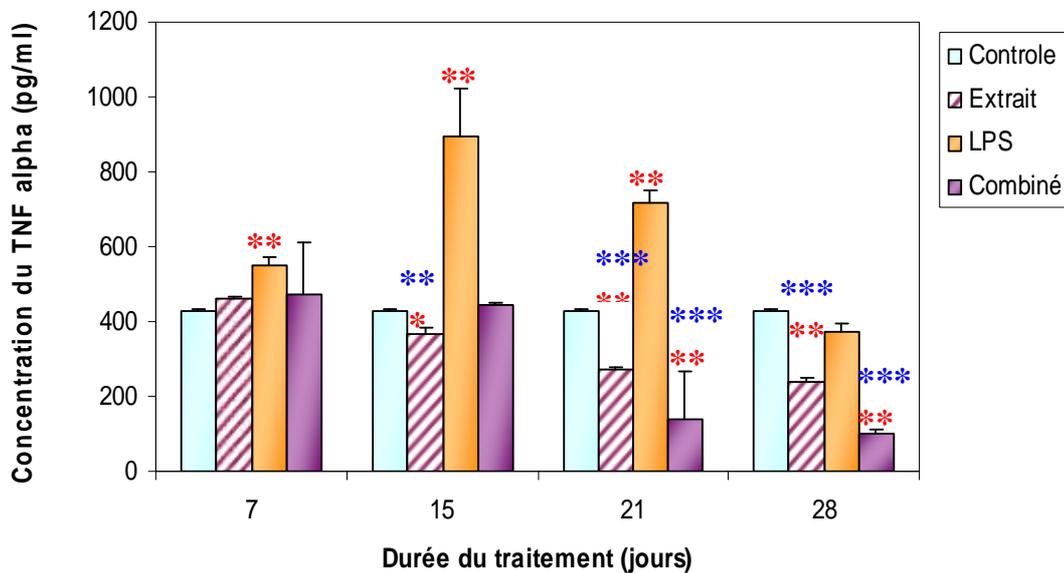


Figure 38: Effet de l'extrait d'escargots sur les taux plasmatiques du TNF α chez les souris ($n=3$,

* significatif $p < 0,05$, ** très significatif $p < 0,01$, *** hautement significatif $p < 0,001$).

2-2-2 - Etude de l'effet de l'extrait d'escargots sur la réponse inflammatoire au niveau du foie

2-2-2 -1 Effet de l'extrait d'escargot sur la structure histologique du foie.

La figure 39 représente la structure histologique du foie d'une souris contrôle. L'analyse microscopique montre qu'il n'existe aucune altération tissulaire. On voit sur la figure la veine porte et les hépatocytes de morphologie normale.

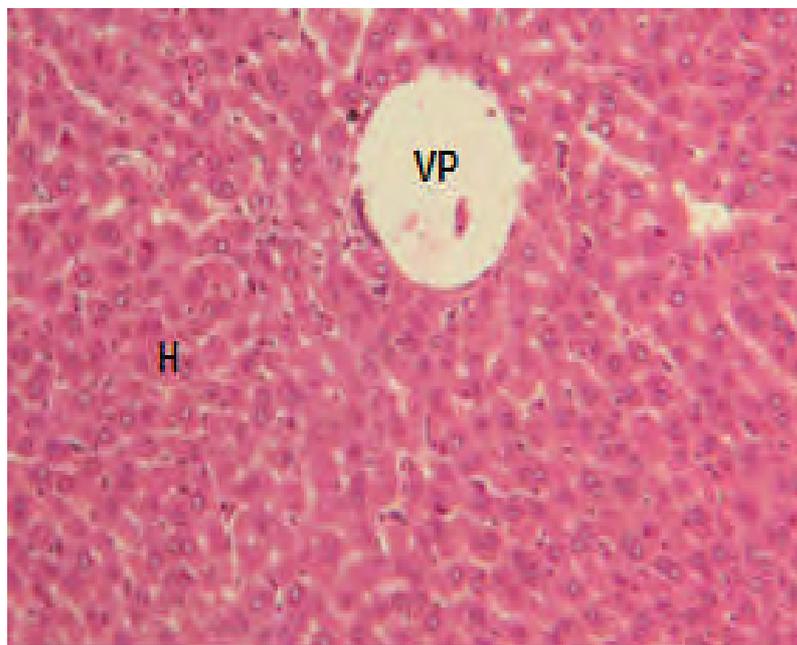


Figure 39 : Coupe histologique du foie, colorée à l'hématoxyline-eosine, des souris contrôle Gx100.

(VP) : Veine porte hépatique ; (H) : hépatocytes.

Sur la figure suivante (fig. 40A) on ne voit aucune altération de la structure tissulaire. Il semble que l'extrait d'escargot n'a pas d'effet sur la structure histologique du foie durant les premiers 15 jours du traitement. On voit sur la figure 40B, les artères hépatiques et les sinusoides, entourés par les cellules de kuppfer.

A partir de 21 jours (fig. 40C), l'étude histologique montre que l'extrait induit des lésions hépatiques. Ces lésions sont plus importantes après 28 jours de traitement (fig. 40D).

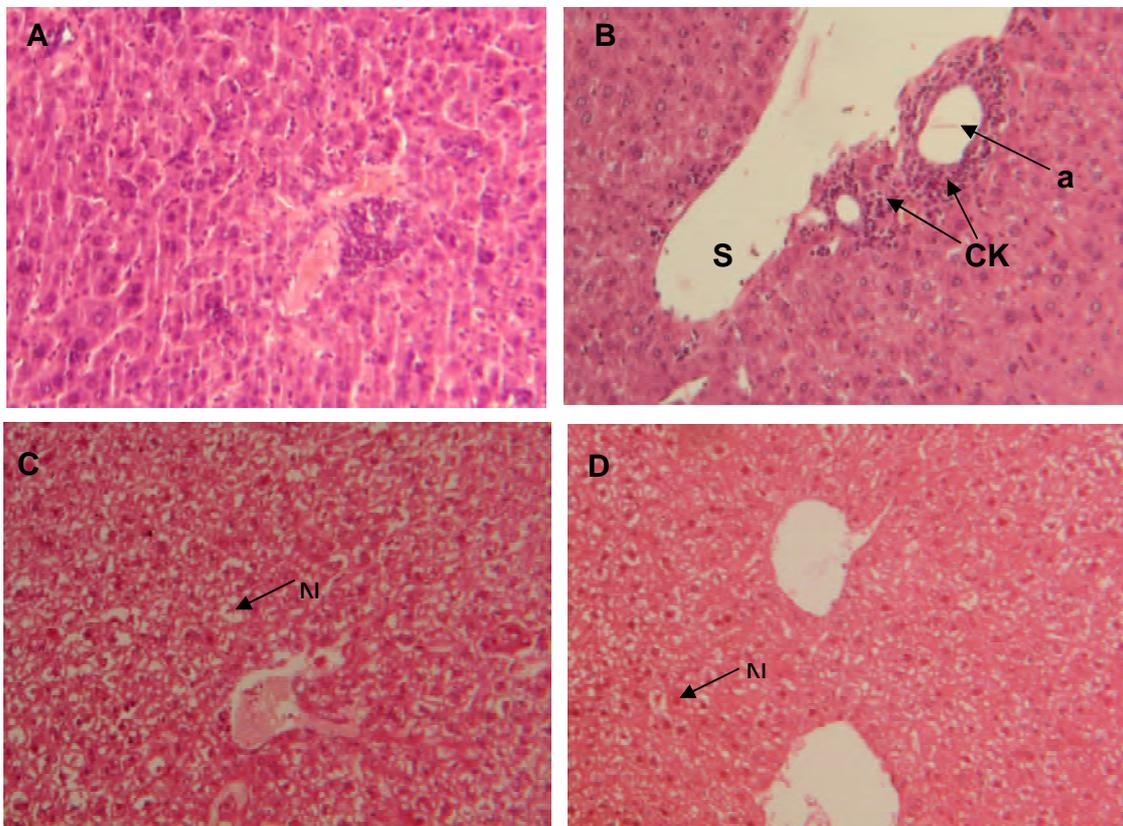


Figure 40: Coupe histologique du foie, colorée à l'hématoxyline-eosine, des souris traitées avec l'extrait d'escargot *H. aspersa*, pour une période de 7 (A), 15 (B), 21 (C) et 28 (D) jours GX100. (VCL) : Veinecentrolobulaire. (a) : artère hépatique. (CK) : cellules de Kupffer. (S) : sinusöide. (N) : nécrose.

2-2-2 -2 Effet du LPS sur la structure histologique du foie

Le LPS administré pendant 7, 15, 21 et 28 jours chez les souris entraîne, l'apparition d'un grand nombre de cellules avec un cytoplasme non coloré, ce sont des cellules en nécroses. Le LPS provoque donc une lésion du tissu hépatique qui se traduit par la nécrose des hépatocytes. On note que l'altération du tissu et le nombre de cellules en nécrose augmente avec la durée du traitement (fig. 41).

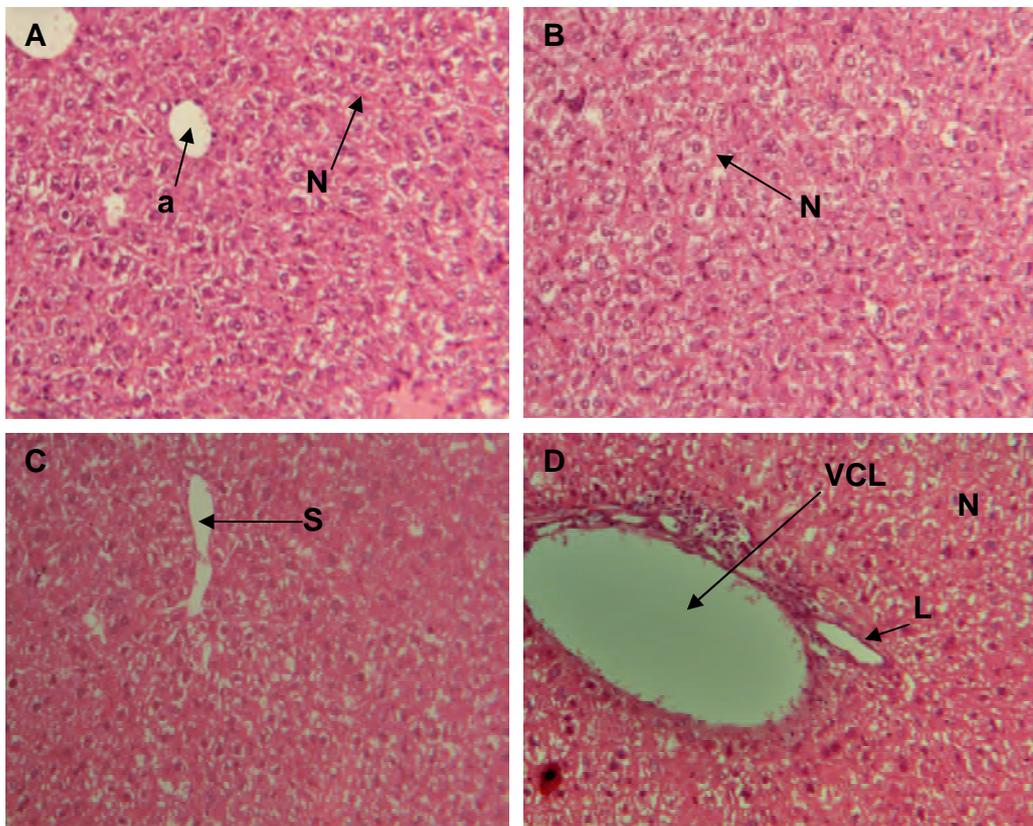


Figure 41 : Coupe histologique du foie, colorée à l'hématoxyline-eosine, des souris traitées avec les LPS, pour une période de 7 (A), 15 (B), 21 (C) et 28 (D) jours GX100. (a) : artère hépatique. (N) : nécrose (S): sinusöide. (VCL) : Veinecentrolobulaire... (L) : lymphatique.

2-2-2 -3 Effet du traitement combiné sur la structure histologique du foie

La figure 42 représente le foie des souris traitées avec une combinaison LPS+Extrait, pendant 7, 15, 21 et 28 jours. On voit sur la figure des cellules hépatiques en nécrose et un grand nombre de cellules immunitaires autour des veines et des artères (fig. 42A).

Après 15 jours de traitement (fig. 42B), on note l'apparition de granulomes, dont la figure 42E représente sa structure histologique qui est formé principalement de macrophages.

Chez les souris traitées pour une période de 21 et 28 jours l'étude histologique montre une diminution de la nécrose au niveau des cellules hépatiques et une résolution des granulomes.

Apparemment, l'extrait d'escargot possède un effet réparateur sur le foie, ce qui est vraiment confirmé après 28 jours du traitement.

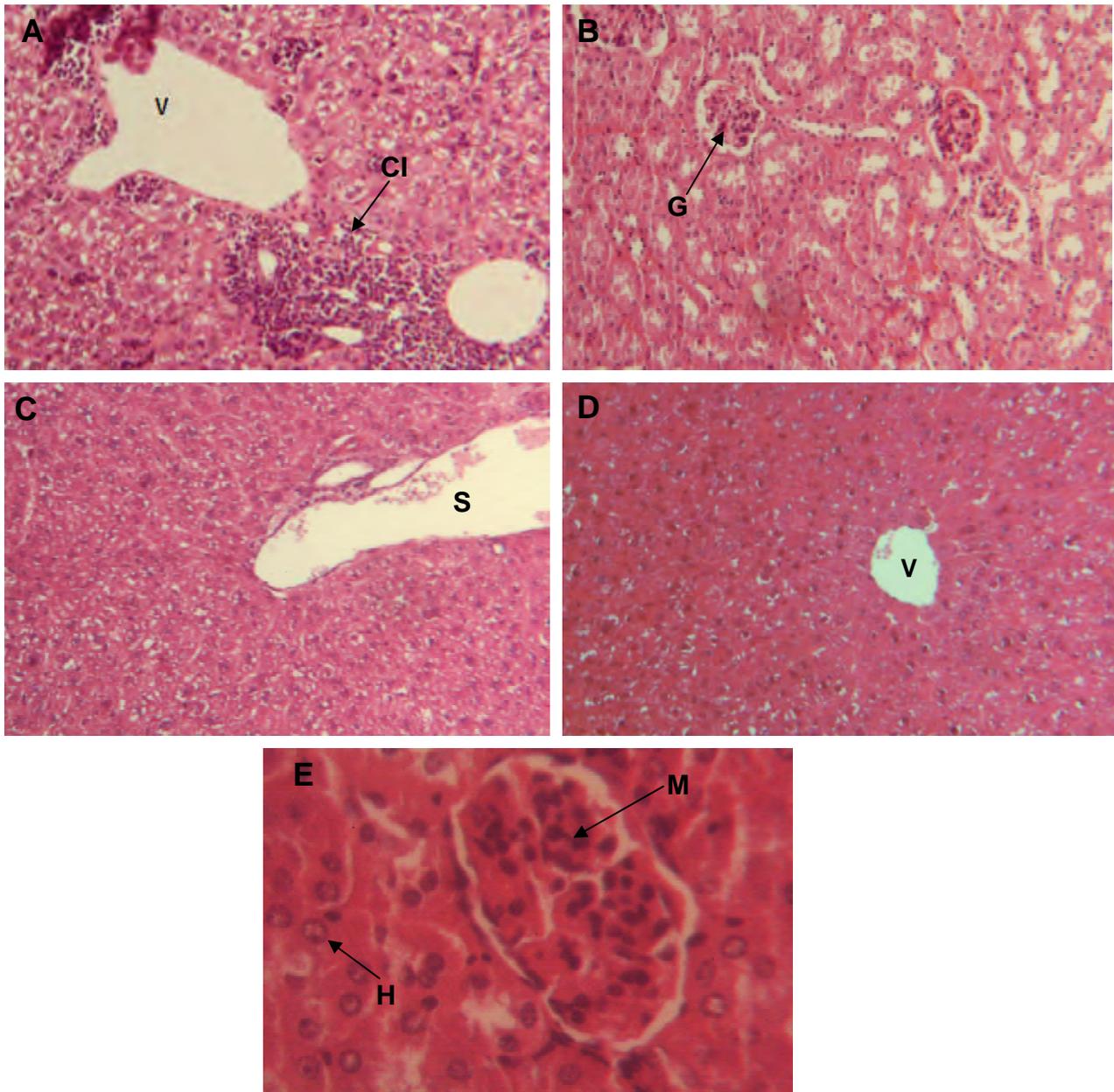


Figure 42: Coupe histologique du foie, colorée à l'hématoxyline-eosine, des souris traitées avec la combinaison LPS+ Extrait d'escargot, pour une période de 7 (A), 15 (B), 21 (C) et 28 (D) jours GX100, (E) agrandissement GX1000 d'un granulome. (V) : veine. (CI) cellules immunitaires. (G) granulome. (S) sinusoïde. (M) macrophages. (H) hépatocyte.

2-2-3 - Etude de l'effet de l'extrait d'escargots sur la réponse inflammatoire au niveau de la rate

2-2-3 -1- Effet de l'extrait sur la structure de la rate

Les coupes histologiques suivantes (fig. 43) montrent la structure de la rate chez les souris contrôles, en état de repos du système immunitaire. On voit sur la coupe la pulpe rouge (PR) et la pulpe blanche (PB). Cette dernière, se présente sous forme d'une zone sombre entourée d'une zone claire, la zone marginale qui constitue la jonction entre la pulpe rouge et la pulpe blanche.

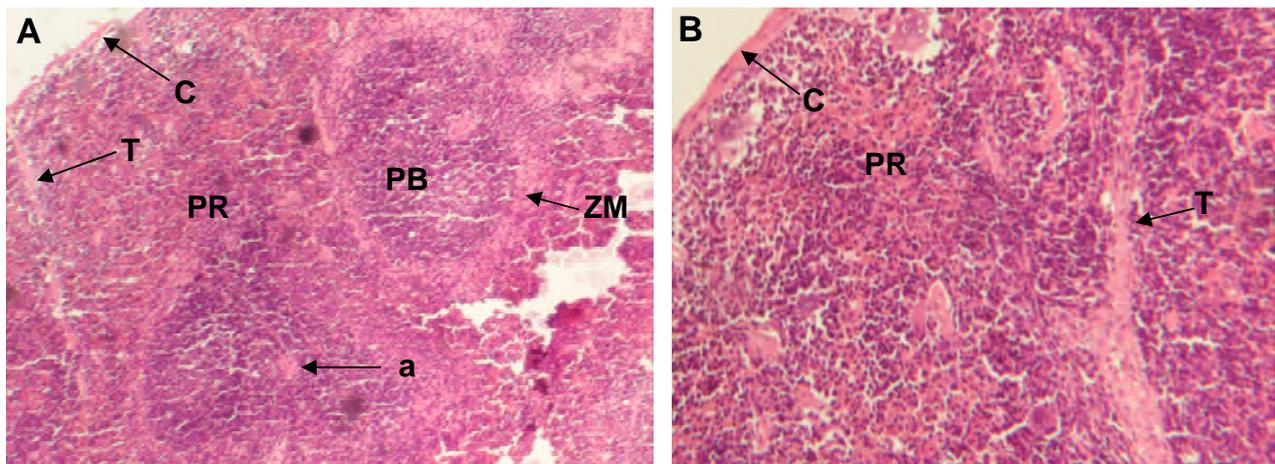


Figure 43: Coupe histologique de la rate, colorée par hématoxyline-éosine, des souris contrôle (A) GX40 et (B) GX100. (**PB**): pulpe blanche, (**PR**) pulpe rouge, (**a**) artériole. (**c**): capsule externe fibro-élastique. (**T**): travée, (**ZM**): zone marginale.

La figure 44 montre que l'extrait n'a pas d'effet sur la structure histologique de la rate après 7 (A) et 15 (B) jours. Après 21 (C) et 28 (D) jours on remarque la présence des aires circulaires claires, le plus souvent periartériolaires. Ce sont des dépôts de protéines amyloïdes.

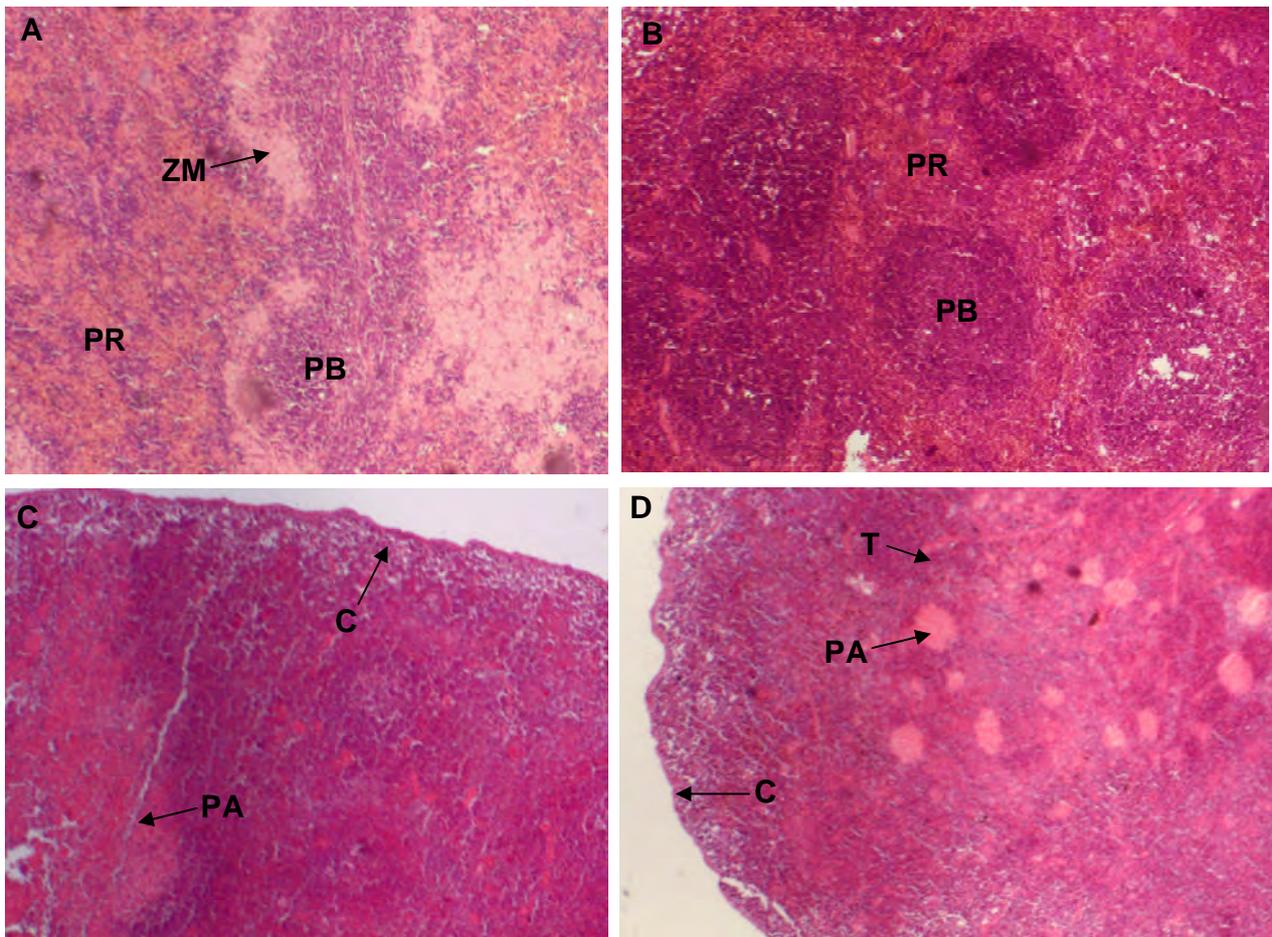


Figure 44: Coupe histologique de la rate, colorée par hématoxyline-éosine, des souris traitées avec l'extrait d'escargot pour une période de 7 (A), 15 (B), 21 (C) et 28 (D) jours GX40. (**PB**): pulpe blanche, (**PR**): pulpe rouge, (**ZM**) zone marginale, (**c**): capsule externe fibro-élastique. (**PA**) protéines amyloïdes, (**T**): travée.

2-2-3 -2- Effet du LPS sur la structure histologique de la rate

Après 7 jours du traitement avec le LPS, la structure de la rate garde ces compartiments bien distincts, la pulpe rouge et la pulpe blanche (fig. 45A).

Chez les souris traitées avec le LPS pendant 15 jours on observe un changement de la structure. La zone marginale est plus large et la pulpe blanche se présente sous forme de compartiments clairs vides contenant peu de cellules (fig. 45B). A partir de 21 jours on note l'apparition d'amylose.

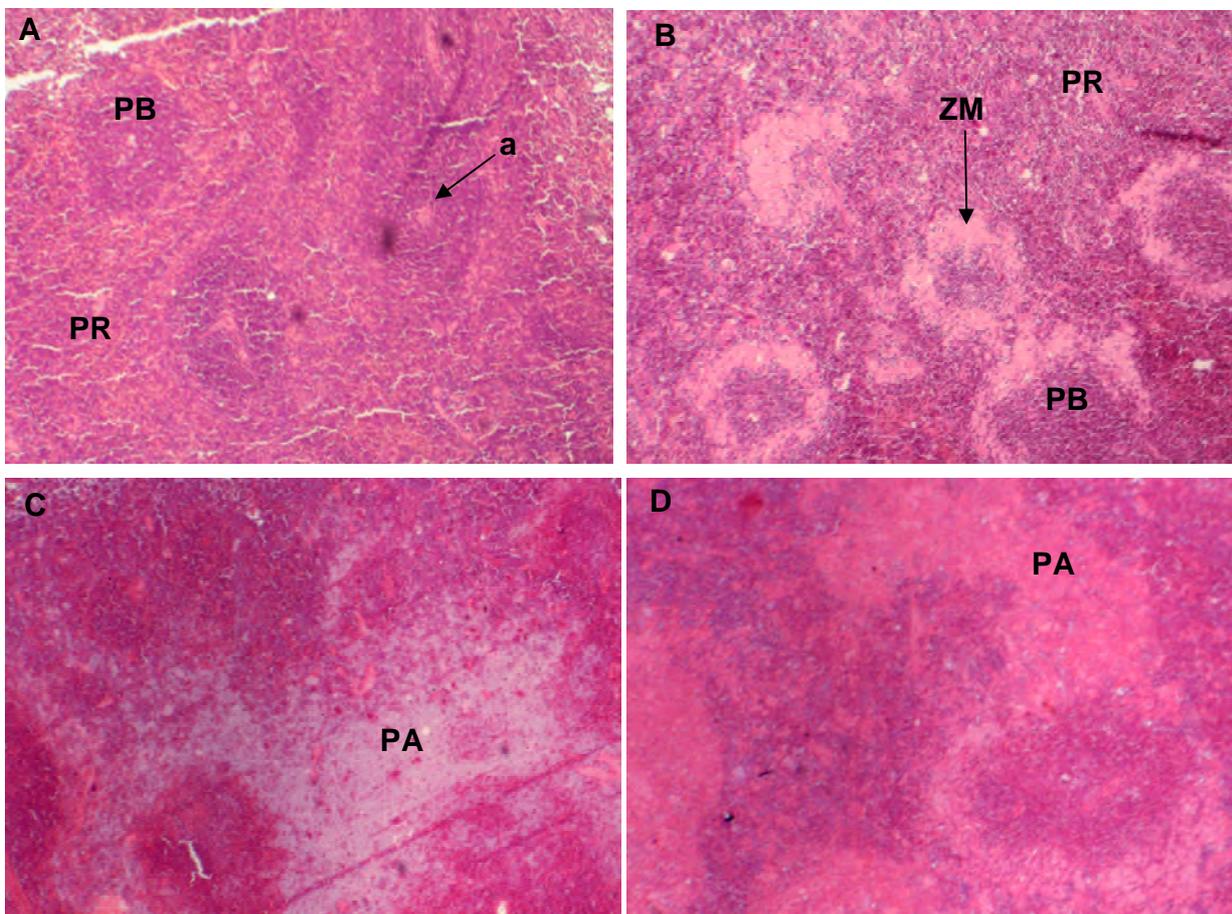


Figure 45: Coupe histologique de la rate, colorée par hématoxyline-éosine, des souris traitées avec le LPS pour une période de 7 (A), 15 (B), 21 (C) et 28 (D) jours GX40. (**PB**): pulpe blanche, (**PR**): pulpe rouge, (**a**): artère, (**ZM**) zone marginale, (**PA**) protéines amyloïdes.

2-2-3 -3- Effet du traitement combiné sur la structure histologique de la rate

Après 7 jours de traitement avec la combinaison LPS+ extrait on ne voit aucune altération dans l'histologie de la rate (fig. 46A).

Après 15 jours, on observe une modification de la structure de la rate (fig. 46B). Les aires des pulpes rouge et blanche ne sont pas bien séparées. On note également, l'apparition de cellules de grande taille (fig. 46E), avec un contour irrégulier et des noyaux multiples dispersés dans le cytoplasme. Ce sont des macrophages fusionnés « foreign body giant cell » (fig. 46F).

Aux 21 et 28^{ème} jours, on ne voit plus les compartiments de rate, mais on observe la présence des dépôts des protéines amyloïdes (fig. 46C et D).

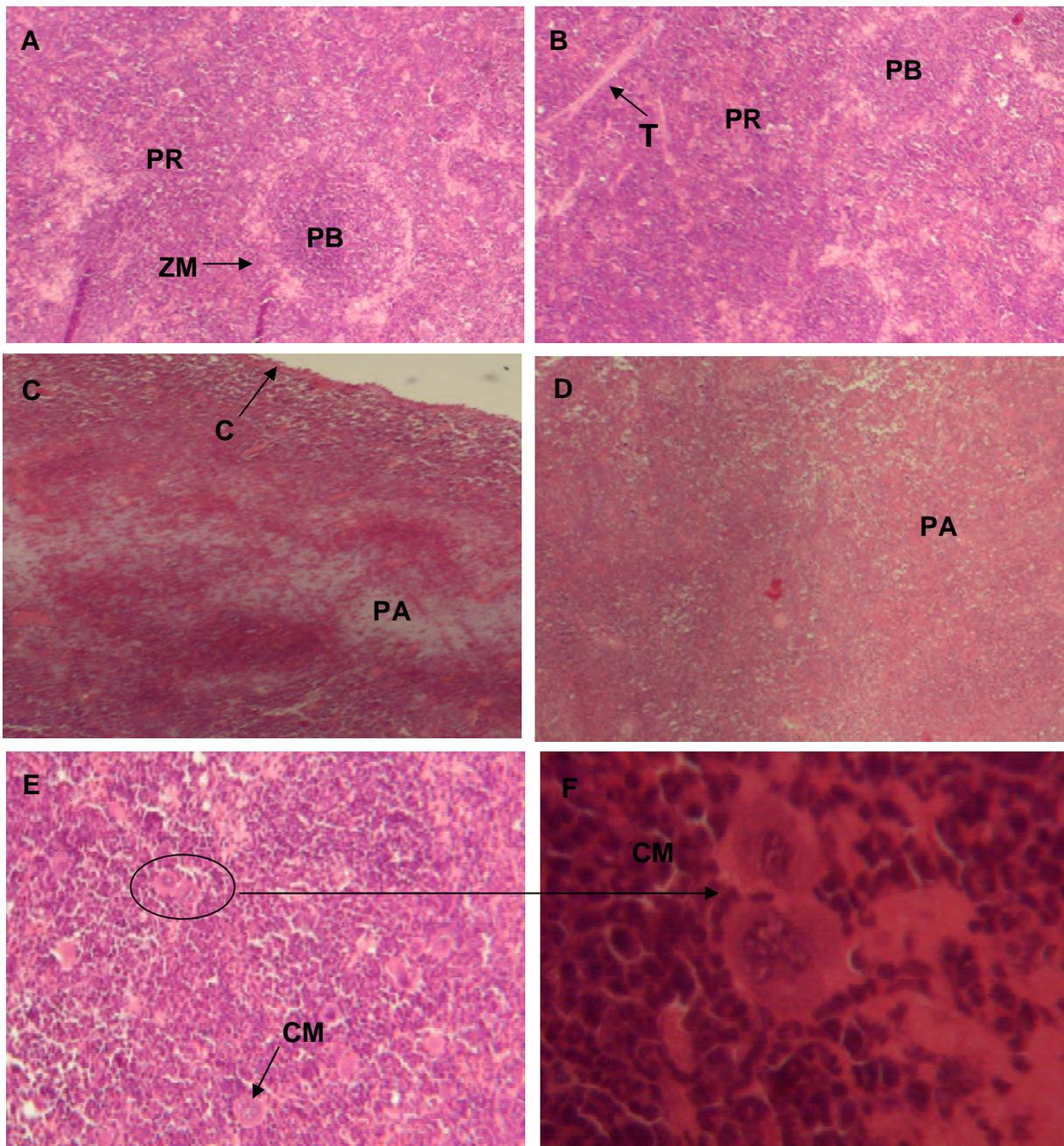


Figure 46: Coupe histologique de la rate, colorée par hématoxyline-éosine, des souris traitées avec la combinaison LPS+ Extrait pour une période de 7 (A), 15 (B), 21 (C) et 28 (D) jours GX400. (E) structure histologique de la rate après 15 jours GX400. (F) structure histologique des cellules de Muller (GX1000). (**PB**): pulpe blanche, (**PR**): pulpe rouge, (**ZM**) zone marginale, (**T**): travée, (**PA**) protéines amyloïdes, (**c**): capsule externe fibro-élastique, (**CM**) : cellule de Muller.

3. Discussion

3-1 Effet de l'extrait d'*H. aspersa* sur l'activité des macrophages *in vitro*.

Les macrophages sont des cellules du système immunitaire inné qui jouent un rôle principal dans la réponse anti infectieuse et anti tumorale. Ils sont activés principalement par l'IFN γ et le TNF α mais aussi par toutes molécules stimulatrices de TNF α comme les LPS (Mosser, 2003).

Le macrophage reconnaît les pathogènes grâce aux récepteurs de l'immunité naturelle appelés « pattern recognition receptor PRR » qui regroupent : le récepteur mannose, les récepteurs scagenvers, les récepteurs Toll et le CD14 (Kawai & Akira, 2010).

L'effet de l'extrait sur l'activité des macrophages a été testé sur la lignée THP1. La réponse proliférative des cellules de cette lignée montre qu'il stimule la prolifération des monocytes par contre il réduit le nombre des macrophages lorsqu'il est administré a des concentrations intermédiaires (entre 5% et 1%). En revanche, des concentrations fortes (10%) ou très faibles (0,1%) de l'extrait n'ont pas d'effet sur le nombre de macrophages en culture.

En général, les monocytes sont des cellules non-prolifératives, néanmoins, il a été démontré *in vitro* qu'un faible pourcentage de monocytes peut entrer en phase de divisions sous l'effet des cytokines comme le M-CSF et le GM-CSF, ces cellules sont désignées par « *immature subpopulation proliférative monocyte* » (Finnin *et al.*, 1999 ; Clanchy *et al.*, 2006) et vu que la lignée THP1 est une lignée de pro-monocytes qui a encore la capacité de prolifération et de différenciation en monocytes matures (Auwerx, 1991), il semble que l'extrait a simulé la sécrétion de certaines de ces cytokines soit directement ou via la stimulation de certains récepteurs comme les récepteurs Toll qui possèdent la capacité de réguler l'expression des cytokines.

L'effet de l'extrait sur l'activité phagocytaire montre que la dose 10% augmente l'activité phagocytaire des macrophages. Cette activité est corrélée avec le processus de dégranulation et de libération des enzymes lysosomales comme les phosphatases acides (Quinn *et al.*, 2006) (fig 47). Ceci explique l'existence de peu de granulation dans les cellules traitées avec la dose 10%.

Le test NBT permet de mesurer la capacité des macrophages à produire l'anion superoxyde O $_2^-$ (Choi *et al.*, 2006), des pourcentages élevés de la réduction du NBT représente une activité élevée des oxydases ce qui témoigne l'existence d'une activité de dégradation intra cellulaire (Rainard, 1986).

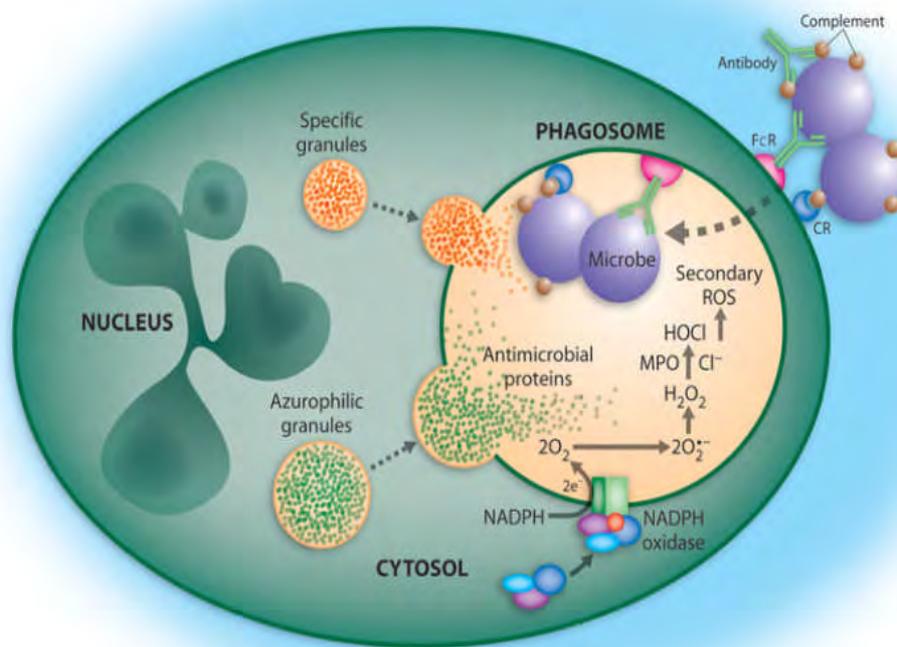


Figure 47 : Dégranulation lysosomiale et production des radicaux libres au cours de la phagocytose (Quinn *et al.*, 2006)

Avec cette même dose on a observé une diminution de l'agrégation cellulaire, l'extrait entraîne apparemment une diminution des molécules d'adhésion à la surface des macrophages.

La dose 0,1% n'a pas d'effet sur l'activité phagocytaire, elle entraîne une augmentation de la granulation et une augmentation de la production des anions O₂⁻. En tenant compte des résultats obtenus dans le premier chapitre (la dose 0,1% n'a pas d'effet anti-oxydant, n'a pas la capacité de piéger le H₂O₂), on peut conclure que cette dose possède un effet pro-oxydant, elle entraîne une synthèse des radicaux libres au niveau des macrophages précisément une génération des ROS et qui est à l'origine de l'augmentation de la réduction du NBT.

Aussi, il semble que l'extrait contient une molécule stimulatrice de la phagocytose et qui doit être administrée en dose plus élevée.

La dose 1% constitue une dose cytotoxique pour la lignée THP1 comme pour la lignée Hs578T. L'utilisation de cette dose provoque dans ce cas également une production élevée du TNF α et du NO, qui sont apparemment les deux médiateurs cytotoxiques, responsables du déclenchement de la mort cellulaire des macrophages (Park & Pyo, 2013).

Dans la deuxième partie de notre étude sur les macrophages THP1 nous avons stimulé les macrophages avec des LPS d'*E. coli*. Les LPS représentent le composant majeur de la surface externe des bactéries gram négatives (fig 48). Sur les macrophages, ils se lient au récepteur TLR4 (Itoh *et al.*, 2003) (fig. 48) et entraîne l'activation de deux voies de signalisation ; la voie MyD88 et la voie TRIF. La signalisation MyD88 stimule l'expression des cytokines inflammatoires ; le TNF α , IL-6, IL-12, IL-1. La voie TRIF par contre entraîne l'expression des interférons de type I (Akira *et al.*, 2006).

Le but de l'utilisation des LPS dans notre expérimentation est de comparer d'une part l'effet stimulateur de l'extrait par rapport à celui des LPS et d'autre part, tester l'existence d'un effet anti inflammatoire chez les macrophages activés par les LPS.

Cependant, les résultats montrent une réponse des macrophages vis-à-vis des LPS se traduisant par une augmentation de la production du TNF α ; différentes études ont reporté ce résultat (Lichtman *et al.*, 1998 ; Ignácio *et al.*, 2001 ; Qureshi *et al.*, 2012). Comparativement au contrôle les concentrations 0,1 et 10% de l'extrait n'ont pas d'effet sur les taux de la cytokine. La dose 1% stimule le TNF α si elle est appliquée seule sur les macrophages, par contre elle possède un effet inhibiteur sur la cytokine, si elle est introduite en combinaison avec les LPS.

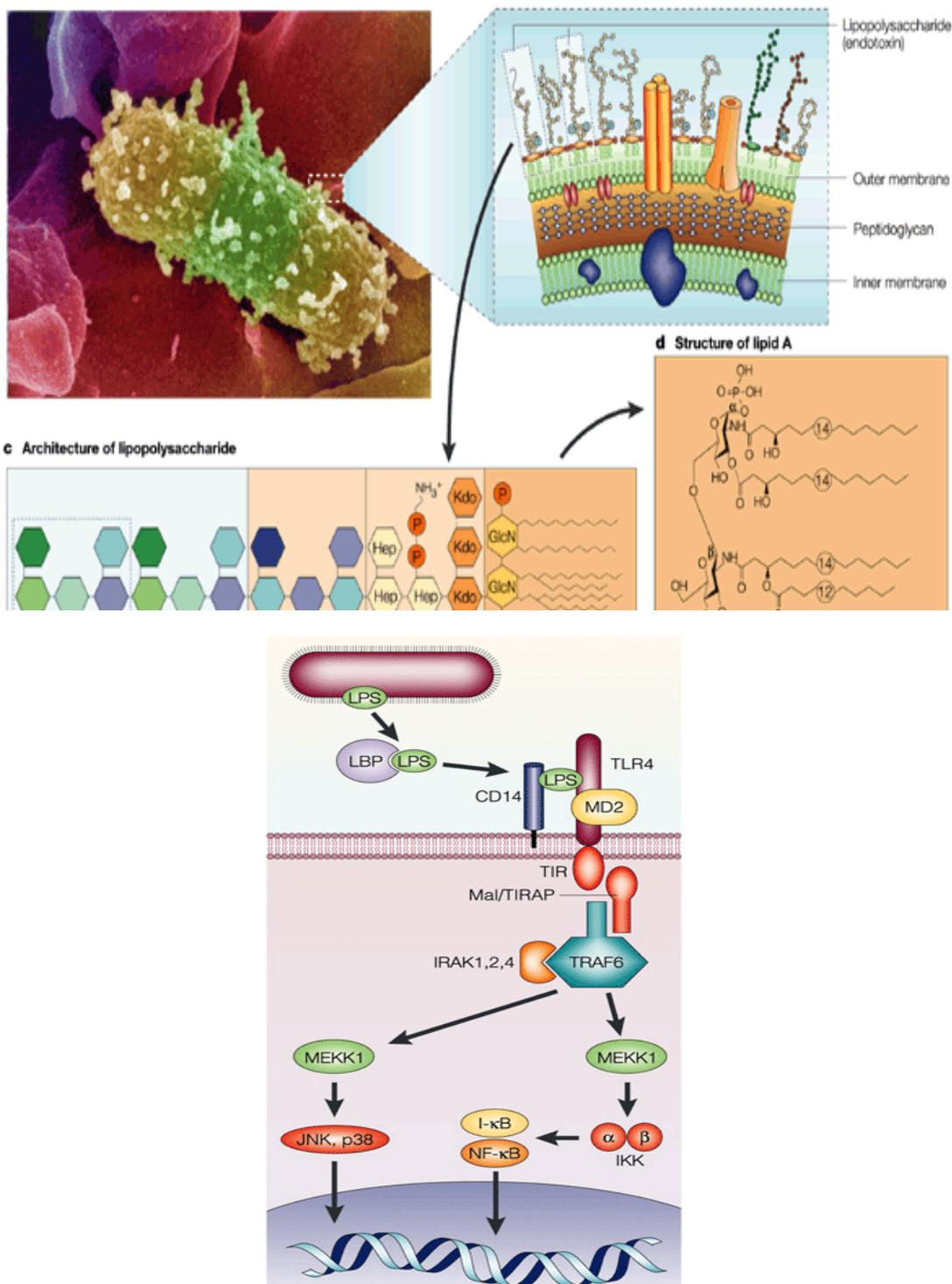


Figure 48 : Structure (Beutler & Rietschel, 2003) et voies de signalisation stimulée par les LPS d'*E.coli* (Finlay & Hancock, 2004)

Le NO est un médiateur anti bactérien synthétisé par les cellules inflammatoires ou tissulaires sous l'effet d'une stimulation par les LPS, les ARN doubles brins ou bien les cytokines IL-1 et TNF α en synergie avec l'IFN γ . Il est synthétisé grâce à l'enzyme NO synthase (NOS), à partir du précurseur L-arginine. Au niveau des macrophages activés par les LPS la production du NO est indépendante du TNF α . En effet, les macrophages de phénotype TNF α R $^-$ (qui manque de récepteur TNFR) présentent des taux d'expression de iNOS et de production du NO similaire aux macrophages contrôles. TNF α R $^+$ (Xaus *et al.*, 2000).

Les taux du NO apparaissent généralement dans le milieu de culture après 12 et 24 heures, l'étude de Xaus *et al.*, 2000 a montré qu'une forte stimulation par les LPS peut déclencher l'apoptose des macrophages à travers deux voies soit à travers une action autocrine du TNF α et son récepteur TNFR 1 ou bien à travers l'effet cytotoxique du NO. L'apoptose dépendant de NO fait intervenir l'expression du p53 et Bax. Les altérations de l'ADN induite par le NO stimulent l'expression du p53, qui active les protéines pro- apoptotique. Ce qui provoque le relargage du cytochrome C de la mitochondrie et l'apoptose du macrophage. Une autre étude récente a reporté que le NO produit par les macrophages peut stimuler aussi leur autophagie (Park & Pyo, 2013).

3-2- Effet de l'extrait d'*H. aspersa* sur la réponse inflammatoire *in vivo*.

L'effet de l'extrait sur la réponse inflammatoire *in vivo* a été testé sur un modèle d'inflammation chronique, induite par les LPS d'*E. coli*. Nous avons choisi d'étudier l'effet sur deux organes le foie et la rate.

3-2-1 Effet de l'extrait sur les taux plasmatiques du TNF α :

Le dosage du TNF α plasmatique montre que le taux de la cytokine augmente chez les souris traitées aux LPS, avec un pic vers le 15^{ème} jour. L'élévation des taux de TNF α après une immunisation par les LPS a été largement reportée (Blanqué *et al.*, 1998; Copeland *et al.*, 2005; Hong *et al.*, 2012). Les taux diminuent ensuite après 21 et 28 jours. La diminution des taux de la cytokine semble résulte d'une forme de régulation, une stimulation avec de fortes doses de LPS entraîne une polarisation des lymphocytes T en T régulateurs « Tr1 » produisant des taux élevés d'IFN γ et IL-10 (Sato *et al.*, 1997).

L'administration de l'extrait d'escargot diminue les taux plasmatiques de la cytokine. L'extrait possède donc un effet inhibiteur sur la production du TNF α . Ces résultats sont en

accordance avec ceux obtenus dans l'étude *in vitro*. Apparemment l'extrait possède un effet anti inflammatoire.

3-2-2 Effet de l'extrait sur structure histologique du foie :

Le foie est le siège de la production de nombreuses molécules inflammatoires comme, les protéines de la phase aigue la CRP (C- reactive protéine), la LBP (Lipopolysaccharide binding protein) et les protéines du complément qui ont pour rôle de neutraliser les LPS. Ces derniers se lient à la protéine LBP et activent les cellules de kuppfer. (Knapp *et al.*, 2006, Huang *et al.*, 2007) qui a leur tour vont produire des cytokines inflammatoires (Hamann, 2005).

Nos résultats montrent que les LPS d'*E. coli* entraînent des lésions hépatiques dès la première semaine du traitement. Ceci coïncide avec l'augmentation des concentrations plasmatiques du TNF α qui est la cytokine principale responsable de l'altération du tissu hépatique. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Tukov *et al.*, 2007, qui ont reporté que l'injection du LPS entraîne une augmentation des taux plasmatiques du TNF α et les lésions hépatiques qui en résultent sont dues a des mécanismes complexes impliquant non seulement le TNF α mais aussi les cellules de kuppfer. Aussi, le traitement des souris avec un anti TNF α réduit considérablement les lésions hépatiques (Ganey & Roth, 2001). Kobayashi *et al.*, 2002 ont prouvé que les LPS, déclenchent un processus apoptotique au niveau des hépatocytes dans un premier temps qui sera suivi par une nécrose.

Par ailleurs, des études réalisées sur des souris ont montré que lors d'une infection virale les souris deviennent sensibles á de très faibles doses du LPS et cela est corrélé avec la production des taux élevés de TNF α , d'IFN γ et l'IFN β par les macrophages (Jirillo *et al.*, 2002).

Le TNF α stimule l'expression de plusieurs autres cytokines comme IL-1b, IL-6, IL-8 et le MIP2 qui peuvent aussi endommager le foie (Locksley *et al.*, 2001). Les polynucleaires s'accumulent dans les sinusoides et libèrent des médiateurs provoquant des lésions hépatiques (Jaeschke, 2006).

En revanche, l'administration du LPS en association avec l'extrait d'escargot entraîne une réparation ou une régénération du tissu hépatique après 21 et 28 jours de traitement. Ce qui confirme que notre extrait possède effectivement un effet anti- inflammatoire. Il est important de signaler que la combinaison entraîne après 15 jours la formation de granulomes et leurs résolution après 21 jours. Cette structure est maintenue par les cytokines de type 1 principalement IFN γ , IL-12 et le TNF α . Dans des modèles murins d'inflammations granulomateuses, l'IFN γ est produit d'abord par les cellules NK ensuite par les Th1. L'IFN γ a pour rôle d'augmenter l'activité bactéricide des

macrophages, stimuler la sécrétion du TNF α et la migration des lymphocytes TCD4 vers le site inflammatoire.

En effet, des souris IFN γ -/- infectées par des mycobactéries ne développent plus de granulomes ni aucune autre réponse protectrice contre ces bactéries, en raison de la pénétration des neutrophiles qui provoque une nécrose tissulaire (Sneller, 2002). La résolution du granulome se fait au bout de 7 jours en présence de l'extrait d'*H. aspersa*.

D'autre part, le TNF α joue un rôle régulateur dans la formation de granulome. Des études réalisées sur des souris immunisées par *Corynebacterium parvum* ont montré que les souris normales développent des granulomes au bout d'une période de 10 à 14 jours et la résolution au bout de 40 jours au contraire les souris TNF α -/- traitées avec la même bactérie entraîne la formation d'un nombre réduit de granulomes et une résolution au bout de 40 à 80 jours. Le TNF α semble posséder un rôle pro granulomateux durant les premières phases de l'inflammation et anti inflammatoire lorsque l'antigène est isolé dans le granulome (Sneller, 2002).

Dans notre cas, la formation de granulome est médié par l'IFN γ puisque l'extrait inhibe la sécrétion du TNF α *in vivo*, mais aussi il faut noter que les formes membranaires du TNF α exprimés à la surface des macrophages jouent aussi un rôle dans la formation du granulome, des taux élevés de la forme membranaire de cette cytokine ont été retrouvés dans des macrophages formant des granulomes hépatiques (Sato *et al.*, 1997).

Le traitement des souris avec l'extrait d'escargot *H. aspersa* seul pour une période de 15 jours n'a pas d'effet sur la structure histologique du foie mais à partir de 21 jours on note la présence de lésions.

L'extrait possède donc un effet hépatotoxique à long terme. Il semble que cet effet est du à l'action des lectines présentes dans l'extrait car des lésions similaires ont été enregistrées dans des modèles d'inflammations induites par la Concanavalin A (Con A). Cette lectine stimule l'infiltration des lymphocytes dans le foie ce qui peut entraîner la formation des cellules plastoïdes et la libération des différents types de cytokines qui peuvent endommager le foie (Bradham *et al.*, 1998).

3-2-3 Effet de l'extrait sur la structure histologique de la rate :

Les résultats du traitement des souris avec les LPS montrent que la zone marginale, qui est spécifique aux lymphocytes B, contient peu de cellules. Ceci est en accord avec différentes études qui ont montré que les LPS stimulent la migration des lymphocytes B de la zone marginale vers les

centres germinatifs (Groeneveld & Kraal, 1985, Michie *et al.*, 1988, Hwang *et al.*, 2009). Ces antigènes agissent par stimulation polyclonale des lymphocytes B (Von Andrian & Sallusto, 2007), dont la prolifération est dose dépendante à partir de 48 heures. Il a été prouvé également que des doses entre 1 et 10 ng entraînent une réponse Thymoindépendante alors que des doses entre 100 et 10000 ng entraînent une polarisation Th2 (Sato *et al.*, 1997) .

A partir de 21 jours ont noté que les trois types de traitement entraînent une apparition d'un dépôt de protéines amyloïdes principalement dans la pulpe rouge lors du traitement avec le LPS ou traitement combiné et juste autour des artères lors du traitement avec l'extrait d'escargot seul.

La réponse naturelle aux infections débute par une phase de réponse aiguë qui se caractérise par une production des cytokines par les macrophages. Suite à une stimulation cytokinique, les hépatocytes produisent de nombreuses protéines anti-inflammatoires appelées protéines de la phase aiguë, parmi lesquelles on cite la CRP, le fibrinogène, la protéine serum amyloïde A (SAA) et l'heptoglobuline (Gruys *et al.*, 2005).

Par ailleurs, la production continue de ces protéines entraîne leur dépôt (amylose ou *amyloidosis*) au niveau de divers organes comme le foie, la rate et les reins (Hosaka *et al.*, 2003). Progressivement les protéines amyloïdes compressent et remplacent le tissu normal. Les amyloses sont classées selon la nature de la protéine qui se dépose en deux types ; amyloses primaires (ou AL amyloidosis) la protéine en cause est la chaîne légère des immunoglobulines ce type d'amylose est observé dans les myélomes et les amyloses secondaires et qui résultent du dépôt de la protéine sérum amyloïde A (AA amyloidosis), qui est observé lors des infections chroniques (Monzawa *et al.*, 2003).

Les protéines comme la SAA et la CRP sont mesurables dans le sérum après 4 à 5 heures de la stimulation, ils persistent jusqu'à 24 heures. Werling *et al.*, 1996 ont montré que lors d'une stimulation chronique par des endotoxines bactériennes les taux de la protéine SAA présentent un plateau après 48 heures, mais ils restent élevés comparativement au contrôle.

Les protéines amyloïdes au niveau splénique peuvent se déposer dans 3 sites ; la pulpe rouge, la pulpe blanche, et autour des vaisseaux sanguins. Une étude menée par Ohyama *et al.*, 1990 sur des amyloses spléniques humaines a montré que les protéines amyloïdes déposées au niveau de la pulpe rouge sont de nature (AL), au niveau de la pulpe blanche 70% sont AL et 30% sont SAA. Au niveau des artères ils ont reporté une prédominance de la protéine SAA.

En se basant sur cette étude on déduit que le traitement des souris par les LPS entraîne un dépôt de chaînes légères d'immunoglobulines au niveau de la pulpe rouge. Ceci est possible puisque

les LPS sont de puissants stimulateurs de la réponse humorale. Dans le cas de l'extrait d'escargot le dépôt était observé au tour des artères, et donc il est le résultat du dépôt de la protéine SAA. L'extrait d'escargot entraîne une activation de cellules inflammatoires comme les macrophages (résultats de l'étude *in vitro*), qui stimulent à leur tour la production de la SAA par les hépatocytes.

Aussi l'incidence de l'apparition des amyloses dépend des modèles animaux et des souches de souris, elles ne sont plus observées chez les rats, rare chez les souris B6C3F1 et plus fréquentes chez les souris C57BL. Les amyloses peuvent être sévères et conduisent à l'atrophie de la pulpe blanche (Suttie, 2006), chose qu'on a observé après 28 jours du traitement combiné. En plus, la protéine SAA est éliminée principalement par les macrophages, Ham *et al.*, 1997 ont montré que l'activation des macrophages par des LPS plus IFN γ bloque leur capacité à éliminer la protéine SAA en culture.

Par ailleurs, le traitement combiné entraîne une apparition des macrophages fusionnés « foreign body giant cell » ce type de cellules caractérisent les inflammations chroniques. Les mécanismes moléculaires et les voies de signalisation induisant la différenciation de ces cellules sont encore mal connus. Il a été reporté que la fusion dépend de la taille et la dose de l'antigène, elle se fait en présence de l'IL-4, IL-13 et après l'activation du récepteur mannose (Jay *et al.*, 2010 ; McNally & Anderson, 2011).

Chapitre 3: Etude de l'effet anti tumoral de l'extrait

Chapitre 3: Etude de l'effet anti tumoral de l'extrait

1. Matériels et méthode :

1-1 Lignée et culture cellulaire

L'activité anti tumorale de l'extrait a été testé sur la lignée Hs578T. C'est une lignée cellulaire triple négative du cancer du sein, qui dérive de carcinome de femme caucasienne âgée de 74 ans.

Les cellules sont cultivées dans un milieu Dulbecco's Modified Eagle's Medium high glucose a 37°C et 5% CO₂. Le milieu est additionné de 1% des acides aminés non essentiels, 1% de L- glutamine (200mM), 1% gentamicine (10mg/ml), 1% insuline et 10% de sérum de veau fœtal.

Le rouge de phénol est présent dans le milieu et sert d'indicateur de pH. Il est rouge a pH physiologique 7,4 et devient jaune lors d'une acidose ou violacé lors d'une alcalose.

1-2 Etude de la cytotoxicité de l'extrait vis-à-vis des cellules tumorales

Les cellules de la lignée Hs578T sont incubées dans des plaques de 96 puits (80 000 cellules/ml), en présence de différentes dilutions de l'extrait : 10%, 5%, 1%, 0,5%, 0,1% et 0,01%. La cytotoxicité de l'extrait d'escargot est évaluée, après 24 heures, par le test colorimétrique MTT selon la méthode de Mosman, 1983. (Cité dans le chapitre 2 de la partie expérimentale).

1-3- Détermination du mode d'action de l'extrait

Afin de déterminer le mode d'action de l'extrait on procède à l'étude de type de mort cellulaire par l'utilisation des probes fluorescents.

1- 3-1- Analyse quantitative de l'apoptose

1-1- 3-1- Principe : L'analyse de l'apoptose a été réalisée par un double marquage Annexin/PI et grâce au kit « Cell apoptosis kit » obtenue de « Agilent Cell Reagents code 5067-1519 »

L'annexine V: est une protéine intra cellulaire qui se lie au phosphatidylsérine en présence du calcium. La phosphatidyl- sérine est une enzyme liée au feuillet interne de la membrane plasmique des cellules vivantes, mais au cours de l'apoptose elle est délocalisée et distribuée entre les deux feuillets de la membrane. L'annexine V (conjugée au fluorochrome) ayant une forte affinité pour ces phosphatidylsérines va marquer donc, les cellules apoptotiques. Il faut noter que les cellules mortes par nécrose seront aussi marquées par l'annexine. Toutefois, il est possible de discriminer par double marquage les cellules apoptotiques en rajoutant du Propidium iodide (fig.49)

Propidium iodide (PI): une molécule fluorescente qui traverse les membranes plasmiques endommagées, elle intercale avec les acides nucléiques doubles brins et émet une fluorescence rouge (excitation à 535 nm and emission à 617 nm) (fig.49 ; 50).

L'IP est exclue des cellules vivantes et apoptotique. Les cellules apoptotiques seront donc Ann+IP-. Les cellules en nécrose sont par contre perméable à l'IP et sont Ann+ PI+

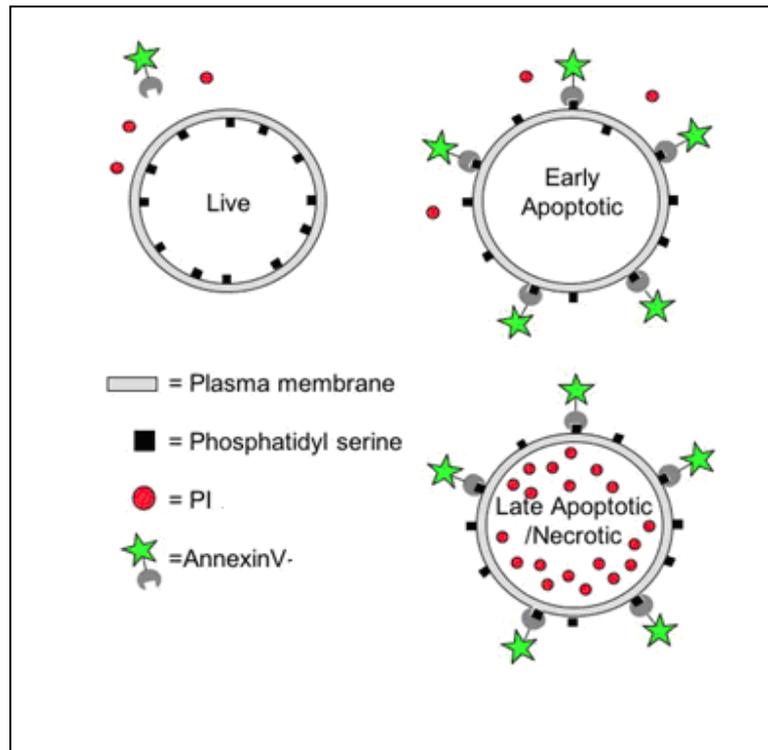


Figure 49: Principe du marquage Annexine-PI (selon le prospectus de kit)

1-1- 3-2- Méthode

Les cellules ont été incubées dans des plaques de 24 puits (80 000 cellules/ml de milieu de culture), en présence de différentes dilutions de l'extrait. Après 24 heures de traitement les cellules sont trypsinisées, transférées dans des tubes dans lesquels elles seront centrifugées à 1000 g pendant 5 min, les surnageants sont éliminés et remplacés, selon les indications du fabricant du kit, par 100 µl d'une solution « Annexin binding buffer ». Les tubes sont ensuite vortexés et 5 µl d'Annexine- Cy-5 sont rajoutés dans la suspension cellulaire. On incube la suspension à l'obscurité à 4°C. Après 15 min on rajoute 5 µl de PI et on incube les tubes de nouveau (à l'obscurité, à 4°C et pendant 15 min). A la fin

de l'incubation on ajoute 400 µl de la solution « Annexin binding buffer ». Finalement le nombre des cellules marquées est évalué par FACS.

1- 3-2- Détermination des différentes formes de mort cellulaire par microscopie à fluorescence

1- 3-2- -1 Double Marquage des cellules Hs578T par Calcéine AM/PI

1-3-2-1-1 Principe

La calceine AM (Calcein acetoxyethyl ester) est une molécule hydrophobe non fluorescente substrat de la P-glycoprotéine (P-gp). Elle pénètre dans la membrane plasmique des cellules vivantes (exprimant la P-glycoprotéine) ou elle sera hydrolysée par les estérases intra cellulaires en calceine, une molécule fluorescente stable, détectée à une longueur d'onde d'excitation 494 nm et d'émission 520 nm.

L'intensité de la fluorescence est proportionnelle au nombre des cellules vivantes (fig. 50).

1-3-2-1-2 Méthode

Les cellules sont incubées, dans des plaques de 6 puits (80 000 cellules/ml), en présence de l'extrait. Après 24 heures, les cellules sont lavées avec du PBS puis marquées avec un mélange de Calcéine AM (1 mg/1 ml) et PI (2 mg/ml). Après 20 min les cellules sont fixées avec du paraformaldéhyde (1% dans du PBS) et analysées sous microscope inversé à fluorescence *Leica*.

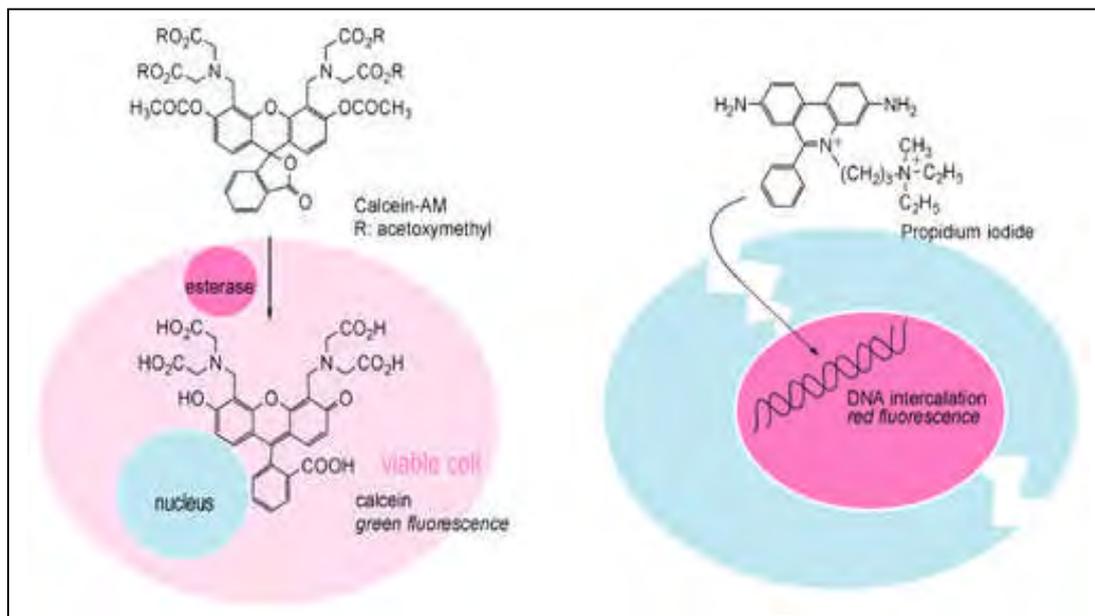


Figure 50: Structure et mode d'action de la Calcéine et la PI (Neri *et al.*, 2001)

1- 3-2- 2 -Double marquage à l'Acridine orange (AO)/Bromure d'ethidium (EB)

1-3-2-2-1 Principe

La méthode consiste à réaliser un double marquage avec une combinaison de deux molécules fluorescentes. L'acridine orange (3,6-bis (diméthylamino acridine), une molécule cationique fluorescente qui pénètre à travers la membrane cellulaire, intercale soit avec les acides nucléiques et émet une couleur verte, soit elle pénètre dans les compartiments acides comme les lysosomes et émet une couleur orange. La deuxième molécule est le bromure d'ethidium, un composé aromatique avec un noyau phenanthridine, il émet une fluorescence jaune- orange lorsqu'il est lié aux acides nucléiques ADN et ARN (excitation entre 300 et 360 nm, émission 590 nm).

1-3-2-2-1 Méthode

Les cellules sont incubées, dans des plaques de 24 puits (80 000 cellules/ml), en présence de l'extrait. Après 24 heures, les cellules sont lavées avec du PBS, fixée avec le paraformaldehyde, un mélange de 100 µl/ml AO et 100 µl/ml EB dans du PBS (pH=7) est ensuite rajouté dans chaque puits.

Après 10 min les cellules sont lavées une fois avec du PBS afin d'éliminer les molécules fluorescentes non pénétrantes (Ribble *et al.*, 2005). Les cellules sont enfin analysées sous microscope inversé à fluorescence *Leica*.

1-4- Analyse de l'expression des gènes:

Dans le but de déterminer le mode d'action de l'extrait au niveau moléculaire les cellules de la lignée Hs578T ont été traitées avec l'extrait d'escargot pour différents temps 4, 8 et 24 heures de traitement. On a étudié l'expression de 4 gènes, par la méthode RT-PCR, un gène régulateur de la voie intrinsèque de l'apoptose Bcl2, un gène stimulateur de la voie extrinsèque le TNF α , des gènes suppresseurs des tumeurs TP53 et PTEN et un gène impliqué dans la prolifération, la mort cellulaire et la signalisation du TNF α , le NF- κ B.

1-4-1- Principe de la RT-PCR

La réaction PCR (Polymerase Chain Reaction) est une technique qui permet d'amplifier *in vitro* une région spécifique d'un acide nucléique donné afin d'en obtenir une quantité suffisante pour la détecter et l'étudier. Pour se faire, une série de réactions permettant la réplication d'une matrice d'ADN

double brin est répétée en boucle. Ainsi, au cours de la réaction PCR, les produits obtenus à la fin de chaque cycle servent de matrice pour le cycle suivant, l'amplification est donc exponentielle.

La RT-PCR est une PCR réalisée après une transcription inverse d'un acide ribonucléique (ARN) en ADN complémentaire (ADNc). En réalité, il s'agit d'une PCR "classique" réalisée sur un ADNc (qui est une copie d'un ARN obtenue par une transcription inverse).

La RT-PCR a été mise au point pour utiliser les ARN comme matrice d'amplification de la PCR. Elle est actuellement la méthode la plus sensible pour détecter (et éventuellement quantifier), les ARN messagers au niveau d'un organe, d'un tissu ou d'une cellule.

1-4-2- Méthode

1-4-2-1- Extraction des ARN totaux

Les ARN totaux sont extraits selon une méthode dérivée de celle de Chomczynski *et al.*, 1987 ; 1993 à l'aide du réactif Tri Reagent™ (Sigma) qui est un mélange de guanidine, de thiocyanate et de phénol. Les cellules sont traitées pendant 5 min à température ambiante par 1 ml de réactif Tri Reagent™ froid afin de bien lyser les cellules, puis par 200 µL de chloroforme froid. Après plusieurs homogénéisations, les échantillons sont centrifugés à 12 000 g pendant 15 min à 4°C. La phase aqueuse supérieure contenant les ARN est récoltée et additionnée d'un volume d'isopropanol froid. Après agitation par inversion et incubation de 5 min à température ambiante, les précipités d'ARN sont récupérés après centrifugation à 12 000 g pendant 10 min à 4°C. Les culots d'ARN ainsi obtenus sont lavés par de l'éthanol à 75 %, puis séchés après une centrifugation à 12000 g (5 min à 4°C). Ils sont ensuite dissous dans 50 µl d'eau exempte de DNase et de RNase et conservés à -20°C jusqu'à leur utilisation.

1-4-2-2- Transcription inverse

1- 4-2-2-1-Principe

Cette technique permet de synthétiser le brin d'ADN complémentaire (cDNA) sur un brin d'ARN avec des désoxyribonucléotides en utilisant une ADN polymérase ARN dépendante (transcriptase inverse).

1-4-2-2- 2- Méthode

Les ADNc ont été synthétisés suivant le protocole du Kit « Random Hexamer Transcriptase First Strand cDNA Synthesis » (Roche) dans un mélange réactionnel contenant 11 µl d'ARN plus 2 µl de Random Hexamer primer mix (1 µl de mix dNTP (10 mM/nucléotide) et 1 µl d'oligo dT (0,5 µg/µl), qsp 12 µl avec de l'eau distillée ultra pure).

Ce premier mélange a été incubé à 65°C pendant 5 minutes avant d'être complété d'un second mélange de 7 µl dont les différents constituants sont représentés dans le tableau 02.

Ce nouveau mélange a été incubé 10 minutes à 25°C puis 50 minutes à 37 °C et enfin l'enzyme a été inactivée par une incubation de 5 minutes à 85°C.

Tableau 02: Différents constituants de la solution Random Hexamère Master mix (Roche)

Constituant	Quantité en µl
Transcriptase Reverse Transcriptase Reaction Buffer (8 mM MgCl ₂)	4
Protector RNase Inhibitor (40U/µl)	0,5
Deoxynucleotide Mix (10 mM chacune)	2
Transcriptase Reverse Transcriptase (20U/ µl)	0,5

1-4-2-3- Analyse de la qualité de l'ARN :

1-4-2-3-1 Principe

Les quantités d'ARN dans les échantillons sont évaluées premièrement par le nanodrope. On a choisi des quantités entre 500 et 1000 ug/µl. La qualité de l'ARN est ensuite évaluée selon la technique « Agilent » qui utilise les puces « Nano Chips » (fig 51).

La technologie Agilent permet de déterminer la qualité et la quantité d'ARN à partir de faibles quantités d'échantillons (1µl) en un temps très court.

Cette technique remplace les 2 manipulations traditionnelles qui étaient la mesure de l'absorbance à 260 et 280 nm pour avoir une idée de la pureté de l'échantillon et

l'électrophorèse sur gel d'agarose en condition dénaturante suivie de révélation au bromure d'éthidium pour mettre en évidence une éventuelle dégradation des acides nucléiques.

L'analyse est réalisée à l'aide du Kit « Agilent RNA 6000 Nano Kit Quick Start ». Le kit contient un standard RNA «RNA 6000 ladder », un concentré de probe « RNA Nano Dye Concentrate », un marqueur « un Agilent RNA 6000 Nano Marker » et un gel « Agilent RNA 6000 Nano Gel Matrix ».

1-4-2-3-2 Méthode

La puce nano Chip est une petite plaque formée de 16 puits (fig. 51A), qui est remplie selon les indications du fabricant.

*** Préparation du gel :**

500 µl du gel « Agilent RNA 6000 Nano Gel Matrix » sont filtrée et centrifugée à 1500 trs pendant 10 min. Une aliquote de 65 µl est additionnée de 1 µl du probe « RNA Nano Dye Concentrate », le mélange (gel-dye mix) est ensuite centrifugé encore une fois, pendant 10 min à 15000 trs avant l'utilisation (fig. 51B).

*** Remplissage de la puce « Nano Chip » :**

- 9 µl de gel dye- mix sont mis dans les puits marqués dans la fig. 51C à l'aide d'une seringue spécifique au kit.
- Dans les puits restants on met 5 µl du marqueur « RNA 6000 Nano marker ». (fig. 51D)
- 1 µl du ladder est ajouté dans le puits de la figure 51E. Dans les 12 puits réservés aux échantillons (figure 51F), on met 1 µl de l'échantillon au quel on ajoute 1 µl du marqueur.
- Les puits non utilisés seront remplis par 5 µl du marqueur.

Après avoir remplie tous les puits, la puce est vortexée pendant 1 min à 2400 trs et placée ensuite dans le bioanalyseur « Agilent 2100 » pour la lecture.

Le logiciel « Agilent 2100 » permet de visualiser les résultats sous forme de gels ou d'électrophorégramme (fig. 51G)

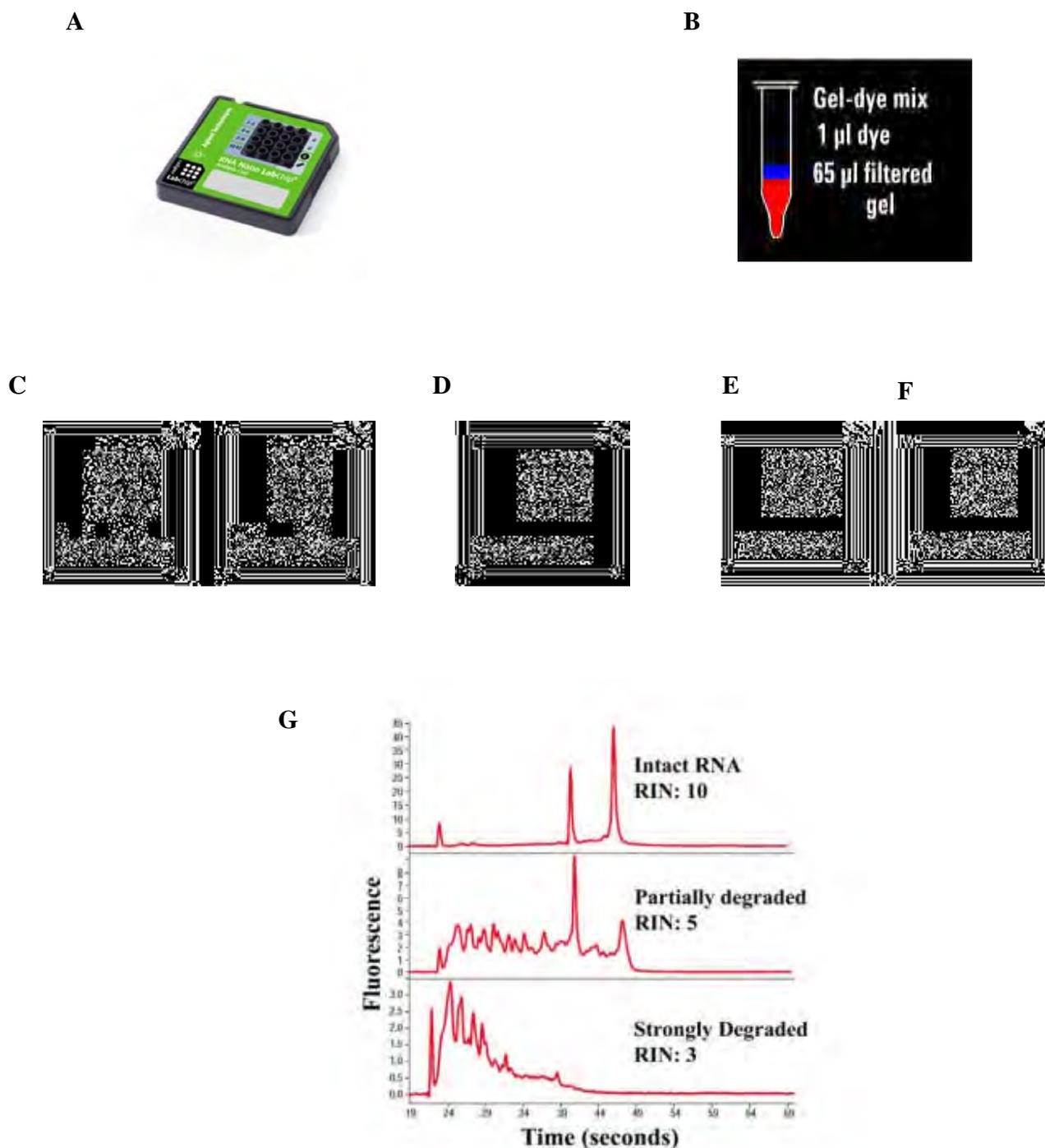


Figure 51 : Schéma représentant les différentes étapes du contrôle de la qualité des ARN. (Selon le prospectus du kit Agilent RNA 6000 Nano Kit Quick Start)

Remarque : la valeur RIN (RNA integrity number) représente le degré de dégradation de l'ARN sur une échelle de 10.

1-4-2-4- Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)**1-4-2-4-1 Principe**

La réaction de PCR a pour but d'amplifier un fragment d'ADNc en utilisant une paire d'amorces spécifiques de la séquence considérée. La PCR en temps réel, contrairement à la PCR classique, permet la détection des produits de PCR en temps réel et leur quantification.

1-4-2-4-2 Méthode

Le mélange PCR utilisé est celui préconisé par le fabricant : Light Cycler ®TaqMan® Master prêt à l'emploi. Il contient outre les tampons et l'ADN Taq polymérase, des sondes fluorescentes permettant de suivre l'évolution de la fluorescence en fonction de la quantité d'ADN synthétisée à chaque cycle de PCR

La technologie Roche utilise des capillaires dans lesquels sont introduit 5 µl d'ADNc (provenant de la réaction de transcription inverse) et 15 µl de mélange PCR (1 µl de l'amorce sens, 1 µl de l'amorce anti sens, 0,15 µl de probe et 4 µl du tampon Mater Mix) contenant les amorces spécifiques dont les séquences sont données ci-dessous (Tab 03).

Tableau 03: Les amorces utilisées pour la PCR.

Gène	Primer sens (right)	Primer anti sens (left)	Référence
B-actin	5'AGGAATGGAAGCTTGCGGTA	5'AATTTTCATGGTGGATGGTGC	(TibMolBiol, code 881493; 881492)
BcL2	5'ATCTTTATTTTCATGAGGCACGTT	5'TTGACAGAGGATCATGCTGTACTT	(TibMolBiol code 934115; 934116)
TNFα	5' CAGCCTCTTCTCCTTCCTGAT	5' GCCAGAGGGCTGATTAGAGA	(TibMolBiol code 794483; 794484)
PTEN	5'TCCAGATGATTCTTTAACAGGTAGC	5' GGGGAAGTAAGGACCAGAGAC	(TibMolBiol code: 9341131, 9341132)
PT53	5' CCCTTTTTGGACTTCAGGTG	5' AGGCCTTGGA ACTCAAGGAT	TibMolBiol code 934134; 934133)
NF-κB	5' GGCTGGCAGCTCTTCTCA	5' TCCAGGTCATAGAGAGGCTCA	(TibMolBiol code 934127; 934128)

La PCR s'effectue en 40 cycles chaque cycle se fait en 3 étapes: La première étape est une dénaturation de l'ADN bicaténaire en deux brins monocaténaire à la température de 95°C pendant 10 sec. La deuxième étape consiste en une phase d'hybridation qui permet aux amorces de s'hybrider aux brins d'ADN grâce à une température de 55°C pendant 20 sec. L'amorce « sens » (forward), dont la séquence a été choisie sur le brin 5'...3', ira se fixer par complémentarité de bases sur le brin 3'...5' d'ADNc. Quant à l'amorce « anti-sens » (reverse), dont la séquence complémentaire de brin 5'... 3' d'ADNc, a été choisie sur le brin 3'...5'. Enfin après fixation des amorces, la troisième étape est une phase d'élongation qui permet à la polymérase de synthétiser le brin complémentaire de l'ADN en allongeant le brin amorce (à une température de 72°C pendant 1 sec). Ce brin est fabriqué à partir de désoxyribonucleotides (dNTPs) libres présents dans le milieu réactionnel. A cette température la majorité des enzymes sont dénaturées. C'est pourquoi nous utilisons une ADN polymérase qui reste active même à une température élevée: La taq polymérase extraite de *Thermophilus aquaticus* (microorganisme vivant dans des sources hydrothermales) (Bustin, 2000) (fig. 52).

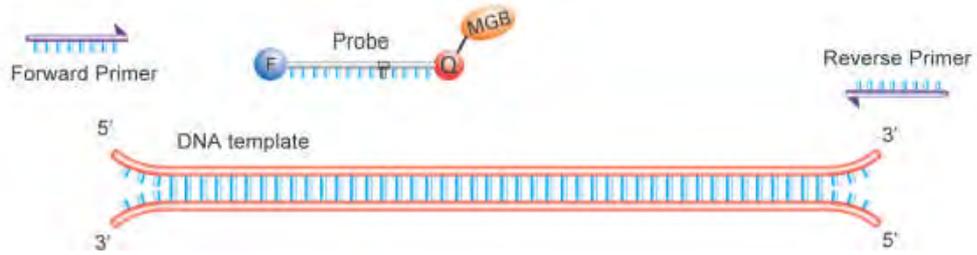
1-4-3- Quantification des ARN et analyse des données :

1-4-3-1 Principe

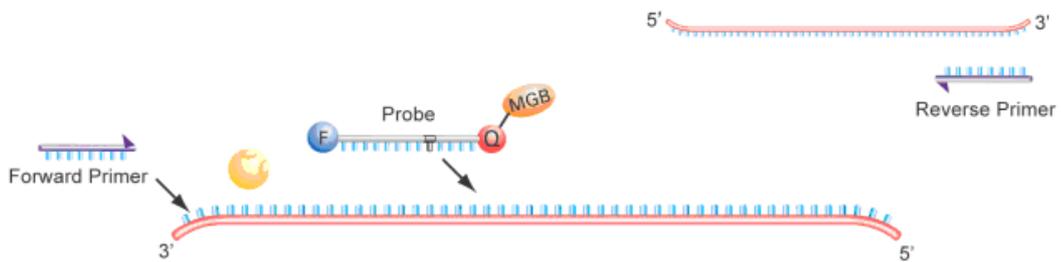
Le principe de la PCR quantitative consiste à détecter et quantifier un rapporteur fluorescent dont l'émission est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générés durant la réaction de PCR.

La technologie TaqMan utilise des sondes marquées à leurs extrémités 5' par un fluorochrome émetteur (reporter) et à leurs extrémités 3' par un fluorochrome suppresseur (quencher) fluorescent ou non qui inhibe l'émission du reporter lorsqu'ils sont à proximité (fig.52). Au cours de la PCR, si la sonde est hybridée sur sa cible, elle est hydrolysée par l'ADN polymérase. Le reporter ainsi séparé du quencher émet un signal proportionnel au nombre de sondes hydrolysées, mesurable au moment de l'élongation. La spécificité de la réaction est liée à la fois à celle des amorces et à celle de la sonde réduisant significativement l'émission de fluorescence non spécifique due à des mésappariements ou des dimères d'amorces.

1^{ère} étape : dénaturation de l'ADN bicaténaire



2^{ème} étape : phase d'hybridation



3^{ème} étape : phase d'élongation

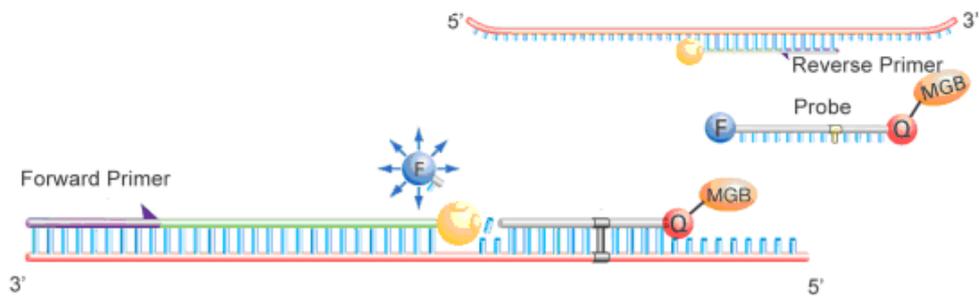
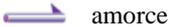


Figure 52 : Les différentes étapes de la RT- PCR (selon le prospectus du kit Taq Man life technologie)

- | | | | |
|---|--|---|------------------------|
|  | Fluorochrome émetteur (Reporter) |  | Sonde |
|  | Fluorochrome suppresseur (Quencher) |  | amorce |
|  | Molécule lié fluorochrome suppresseur au « Minor groove binder » |  | ADN simple brin |
|  | Taq polymérase |  | Elongation de l'amorce |

La mesure de la fluorescence est effectuée en fin de la phase d'élongation quand la totalité de l'ADN synthétisé est sous forme de double brin. Le cycle seuil C_t (Threshold cycle) correspond au nombre de cycles de PCR nécessaires pour que le signal mesuré dépasse le bruit de fond (fig.53).

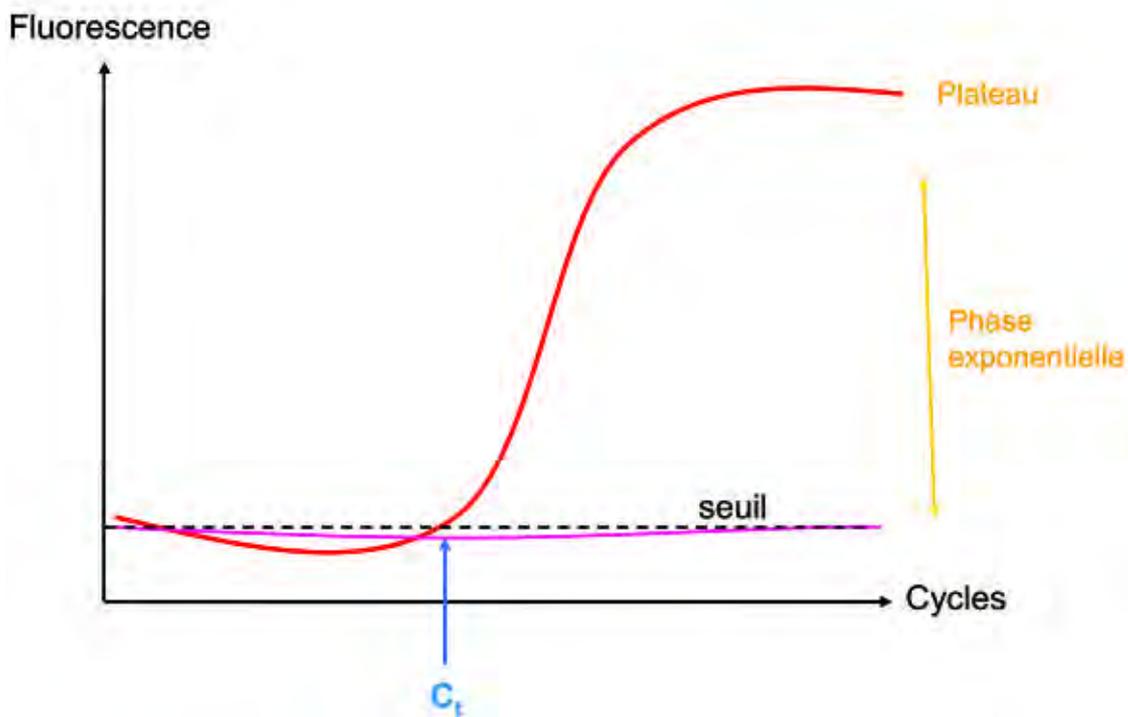


Figure 53 : Représentation graphique de l'intensité de fluorescence en fonction du nombre de cycles pour deux amplifications à partir d'ADNc d'un échantillon (en rouge) ou sans ADNc contrôle (en rose).

1-4-3-2 Méthode

L'analyse des données a été réalisée grâce au Software du LightCycler Agilent, les données de fluorescence sont analysées de façon simple et rapide. Elles sont immédiatement tracées sur l'écran de l'ordinateur permettant une analyse en temps réel.

La quantification relative, basée sur la différence des Ct (ΔCt) permet d'évaluer l'influence des différentes molécules a testées sur les niveaux d'ARN (Livak & Schmittgen, 2001). La première étape consiste á utiliser le Ct d'un gène de référence. Ainsi, en calculant :

$$\Delta Ct = \Delta Ct_{(\text{gène cible})} - \Delta Ct_{(\text{gène de référence})}.$$

La comparaison des ΔCt entre les cellules traitées et les cellules témoins permet de déterminer le $\Delta\Delta Ct$.

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{(\text{cellules traitées})} - \Delta Ct_{(\text{cellules témoins})}$$

Le rapport du taux d'ARN (Q) entre les cellules traitées et les cellules témoins est donné par la formule :

$$Q = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Si le traitement provoque une surexpression du gène par rapport a la condition contrôle, alors Q a une valeur supérieur á 1. A l'inverse lorsqu'il y a sous expression Q est inférieur á 1.

1-5- Dosage du taux TNF α par ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)

Le dosage est effectué par la technique ELISA et á l'aide d'un kit « TNF α human Boster Immunoleader ». Selon la méthode citée dans la page 67.

1- 6- Analyse statistique

L'analyse statistique a été réalisée selon les méthodes citées dans le chapitre 1 de la partie expérimentale (page 55)

2. Résultats.

2- 1- Evaluation de l'activité cytotoxique de l'extrait sur les cellules tumorales.

L'incubation des cellules Hs578T avec l'extrait d'*H. aspersa*, pendant 24 heures, montre que les doses 5 et 10% ont une cytotoxicité élevée. La valeur IC₅₀ a été estimée à 0,9118% (fig 54).

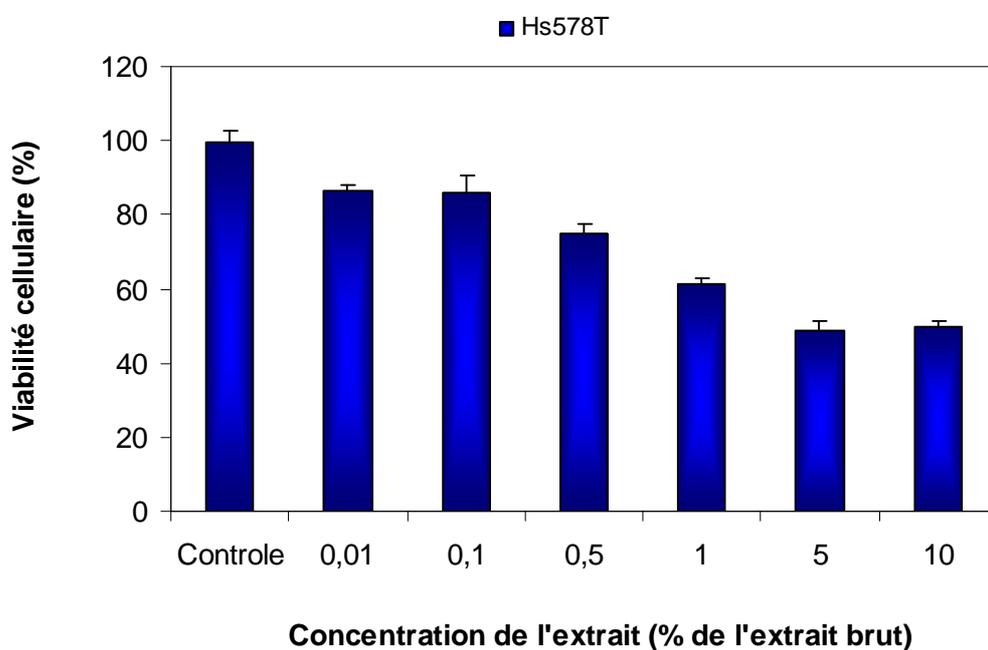


Figure 54: Effet de l'extrait d'*H. aspersa* sur la viabilité des de la lignée Hs758T cellules (exprimée en % par rapport au contrôle) après 24 heures de traitement.

2-3- Etude du mode d'action de l'extrait Hs578T.

En se basant sur les résultats du test MTT on a choisi pour l'étude du mode d'action de l'extrait deux dilutions 1% qui est presque égale à l'IC₅₀ et la dilution 0,1% qui correspond à la 10^{ème} dilution de la première.

2-3-1 - Effet de l'extrait sur la morphologie des cellules Hs578T :

Les cellules traitées par l'extrait montrent des altérations morphologiques, Elles apparaissent rétractées, rondes et de petite taille, elles présentent une forme irrégulière due à l'altération de la membrane plasmique.

L'analyse sous microscope montre aussi que la dose 1% a plus d'effet (fig. 55)

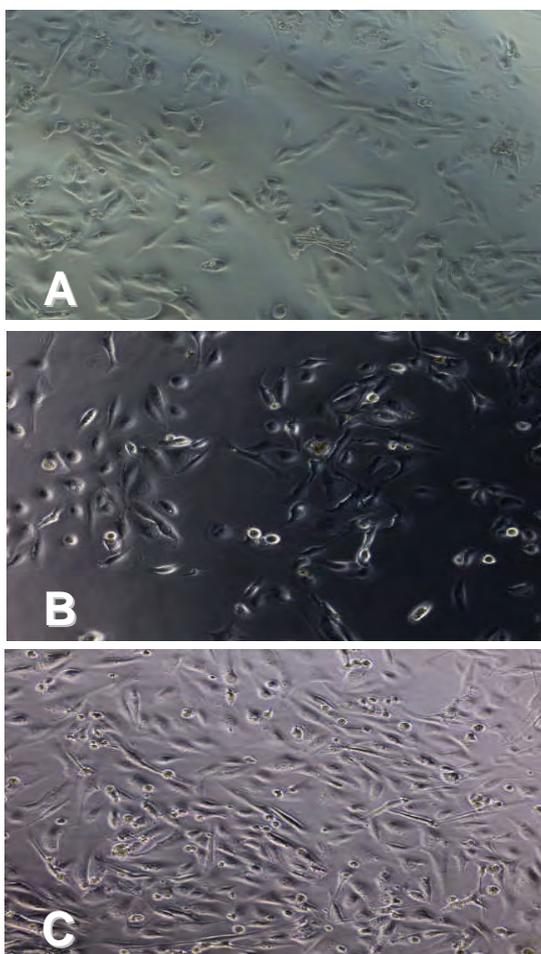


Figure 55: Altérations morphologiques (GX100) observées au niveau des cellules Hs578T après 24 heures de traitement avec l'extrait. (A) Cellules non traitées (Contrôle). (B) Cellules traitées avec la dose 0,1%. (C) Cellules traitées avec la dose 1%.

2-3 -2- Etude de l'apoptose.

Dans le but d'identifier le mode d'action de l'extrait on a procédé premièrement à l'étude de l'apoptose par la méthode Annexine/PI.

Les résultats de la cytométrie montrent que le taux d'apoptose au niveau des cellules Hs578T contrôle est évaluée a 16%. Dans cette lignée les cellules traitées avec l'extrait montrent un taux d'apoptose entre 24 et 20% avec les doses 0,1 et 1% respectivement (fig.56).

L'analyse statistique montre qu'il n'existe aucune différence significative entre le taux d'apoptose dans les cellules traitées et non traitées.

L'extrait d'escargot ne provoque donc pas une apoptose au niveau des cellules tumorales.

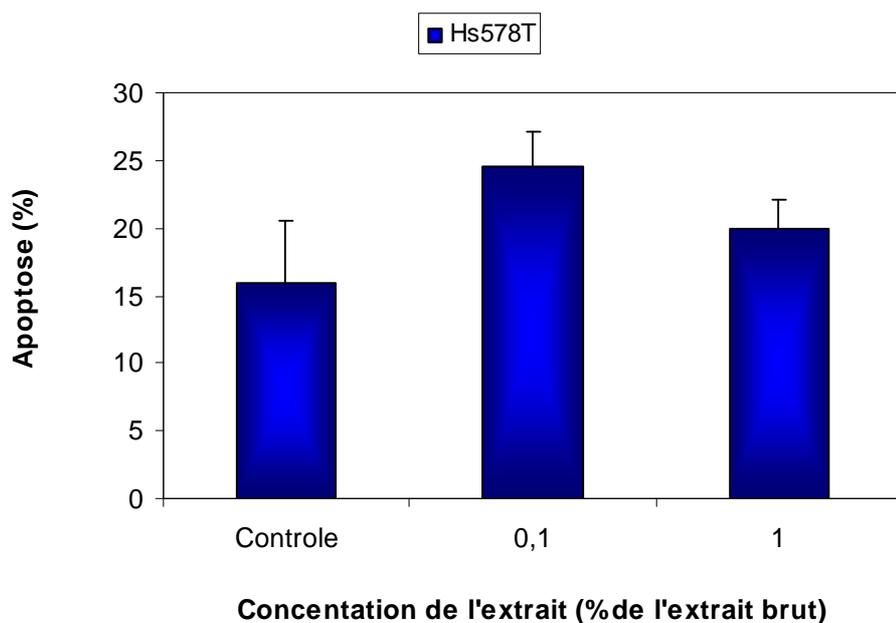


Figure 56: Analyse quantitative de l'apoptose: Taux d'apoptose exprimés en %

2-3 -3- Détermination de la nécrose

Afin de prouver que l'extrait induit une nécrose on a procédé au marquage des cellules par deux méthodes la Calcéine AM/PI et AO/EB.

Double marquage par CalcéineAM/PI:

La Calcéine marque uniquement les cellules vivantes et donne au corps cellulaire une couleur fluorescente verte. En même temps, le PI pénètre dans les cellules endommagées, intercale avec l'ADN double brin et émet une fluorescence rouge. Observée sous microscope à fluorescence, les cellules dont la membrane plasmique est endommagée envoient une fluorescence rouge de leur noyau (fig 57 B et C).

La figure 57 montre que le nombre des cellules mortes, marquées en rouge, est très réduit dans le puits contrôle (fig 57A). Dans les puits traités avec l'extrait l'analyse microscopique montre que le nombre total des cellules a été fortement diminué. La diminution est plus marquée dans les puits traités avec la dose la plus forte 1% (fig 57C).

On observe également la présence de fluorescence rouge marquant des cellules en nécrose.

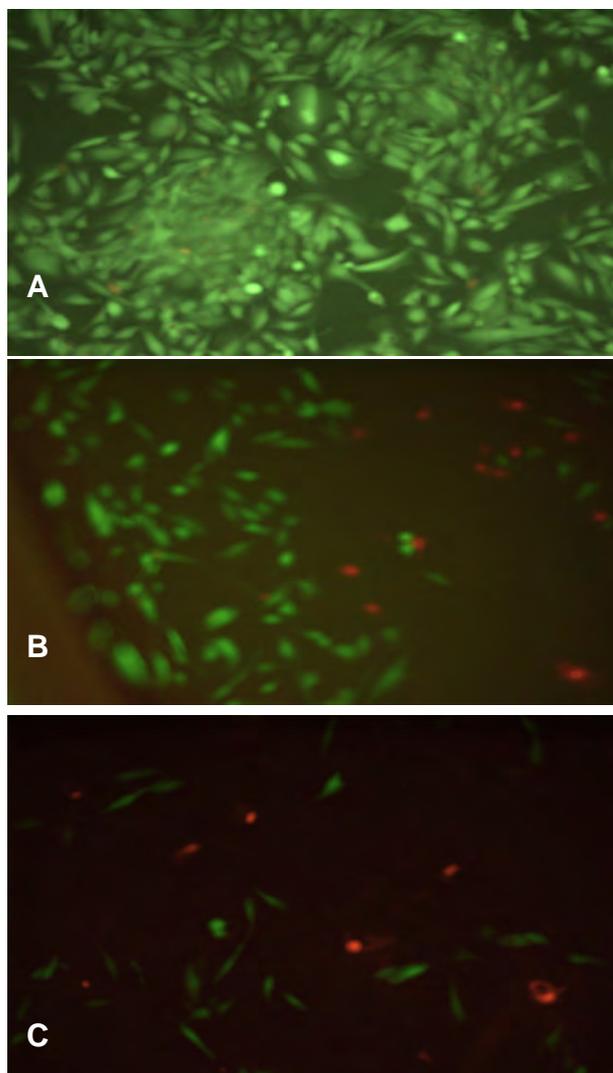


Figure 57: Analyse morphologique des cellules de la lignée Hs578T traitées avec l'extrait d'*H. aspersa* (GX100): Photo prise au microscope, a fluorescence *Leica*, des cellules marquées par les fluorochromes calein AM/PI ; le cellules vivantes sont de couleur verte et les cellules mortes en rouge. (A) : Contrôle (B) cellules traitées à la dose 0,1% de l'extrait. (C) : cellules traitées à la dose 1% de l'extrait.

Double marquage à l'AO/EB:

Dans le but de confirmer que l'extrait induit une nécrose, on a utilisé la méthode AO/EB qui nous permet de localiser les différentes formes de mot cellulaire dans le milieu de culture (les cellules vivantes, les cellules en apoptose et les cellules en nécrose). En effet, l'AO pénètre dans toutes les cellules et envoie une fluorescence verte, EB pénètre uniquement dans les cellules où la membrane plasmique est endommagée, et marque le noyau en rouge. De ce fait, les cellules vivantes émettent une fluorescence verte de leur noyau (fig. 58, flèche a), les cellules en apoptose émettent une couleur verte brillante avec une chromatine condensée ou fragmentée (fig. 58, flèches c), les cellules mortes par nécrose envoient une fluorescence orange/jaune à partir de leur noyau (fig. 58, flèches b)

L'analyse de la fluorescence et la comparaison entre les deux doses indique que l'extrait induit une nécrose. Avec la dose 1% on note la présence de corps apoptotique. Aussi le nombre total de cellules a été fortement diminué.

En conclusion, après la comparaison entre les différentes méthodes de marquage, l'extrait aqueux d'*H. aspersa* induit une nécrose dans les cellules Hs578T.

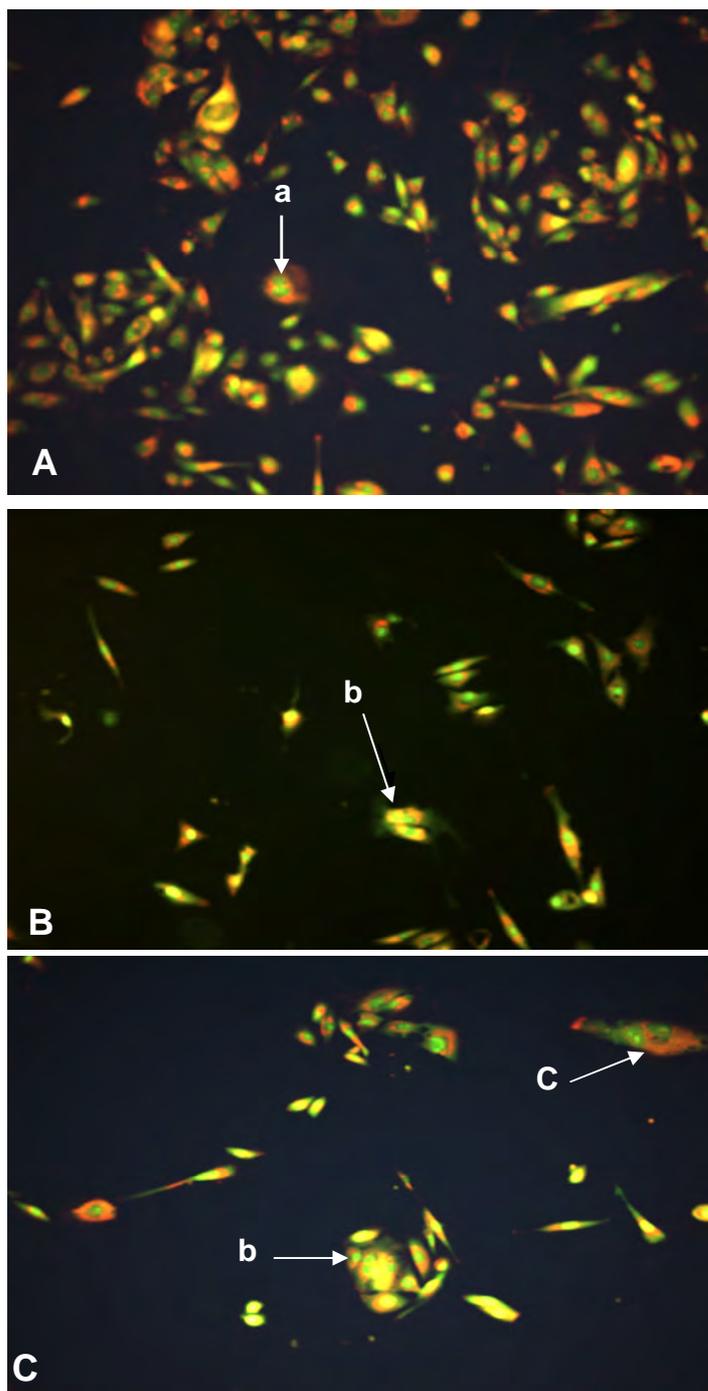


Figure 58: Analyse morphologique des cellules de la lignée Hs578T traitées avec l'extrait d'*H. aspersa* (GX100): Photo prise au microscope, a fluorescence *Leica*, des cellules marquées par les fluorochromes AO/EB. (A) *Contrôle*. (B) *Cellules traitées à la dose 0,1%*. (C) *Cellules traitées à la dose 1%*.

2-3 -4- Effet de l'extrait sur l'expression du gène BcL2 :

L'extrait d'escargot testé à 0,1% semble ne pas avoir d'effet sur l'expression du gène BcL2. La comparaison entre témoins et traités montre que l'expression du gène BcL2 diminue significativement après 8 heures ($p<0,05$) et 24 heures ($p<0,05$) de traitement avec la dose la plus élevée (fig.59).

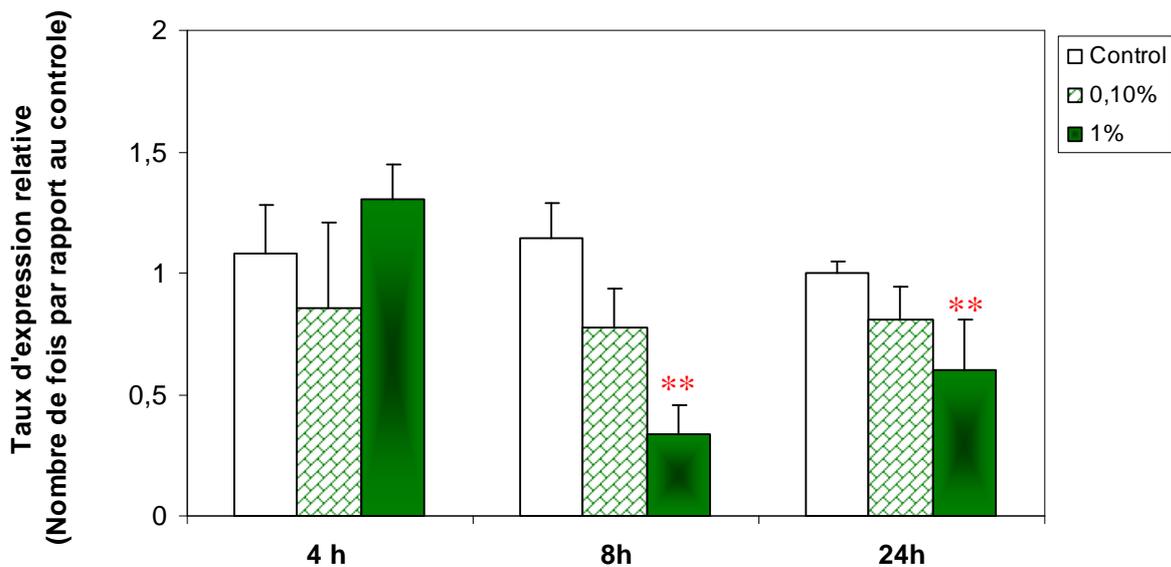


Figure 59: Effet de l'extrait d'*H. aspersa* sur l'expression du gène BcL2 au niveau des cellules Hs578T. ($n=3$; ** significatif $p<0,01$)

2-3 -5- Effet de l'extrait sur l'expression du gène TNF α :

Le traitement des cellules de la lignée Hs578T avec l'extrait d'escargot induit une stimulation de l'expression du TNF α . Les taux d'expression du gène augmentent de manière hautement significative ($p<0,001$) après 4 heures de traitement.

L'expression du TNF α est stimulée 20 fois plus avec la dose 0,1% et 10 fois plus avec la dose 1% comparativement au contrôle.

Après 8 heures de traitement, l'expression du TNF α diminue, mais elle reste significativement élevée avec la dose 1% ($p<0,05$) (le gène est exprimé 2 fois par rapport au contrôle).

A 24 heures les taux d'ARNm du TNF α , diminuent avec les deux doses ($p<0,05$). (fig. 60)

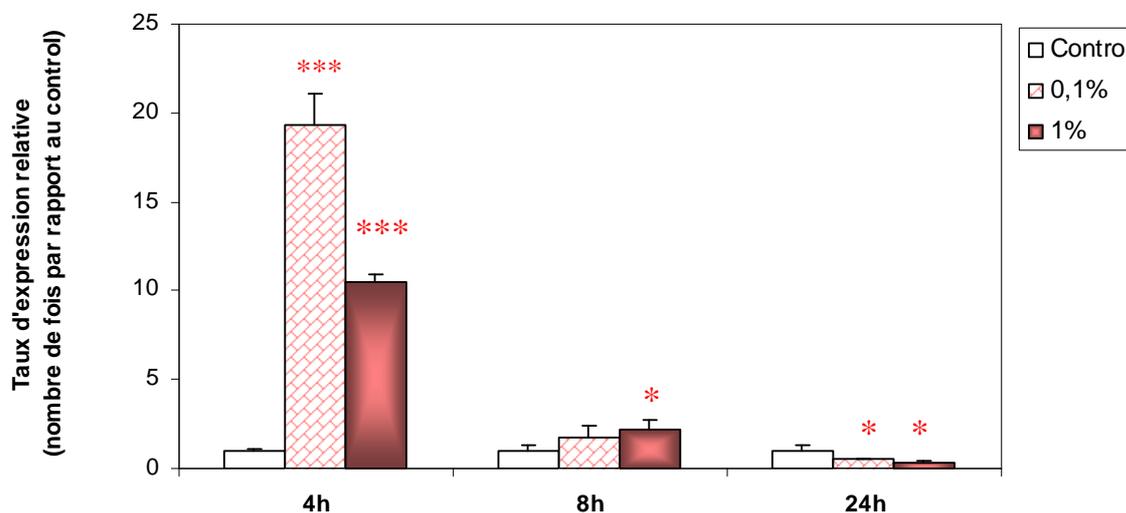


Figure 60: Effet de l'extrait d'*H. aspersa* sur l'expression du gène TNF α au niveau des cellules Hs578T. ($n=3$; * significatif $p<0,05$; *** hautement significatif $p<0,001$).

2-3 -6- Effet de l'extrait sur l'expression du gène NF- κ B:

Les résultats obtenus sur l'effet de l'extrait sur l'expression du gène NF- κ B, montre que la dose 0,1% de l'extrait entraine une faible diminution à 4, 8 et 24 heures mais cet effet reste statistiquement non significatif.

L'effet de la dose 1% commence après 8 heures de traitement. Les taux d'expression restent constants entre 8 et 24 heures.

L'extrait d'*H. aspersa* à 1% entraine une diminution hautement significative de l'expression du gène NF- κ B comparativement au contrôle ($p<0,001$ à 8 et 24 heures). (fig.61)

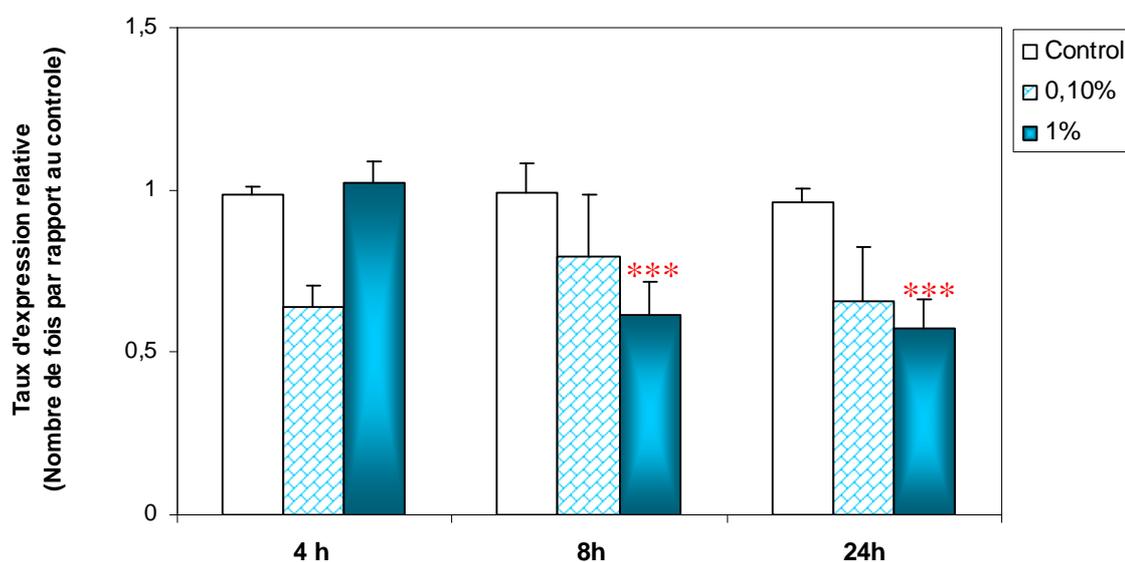


Figure 61: Effet de l'extrait d'*H. aspersa* sur l'expression du gène NF- κ B au niveau des cellules Hs578T. ($n=3$ *** hautement significatif $p<0,001$).

2-3 -7- Effet de l'extrait sur l'expression du gène PTEN:

L'expression des ARNm du gène PTEN au niveau des cellules Hs578T, augmente après 4 heures de traitement avec la dose 0,1% de l'extrait comparativement au contrôle.

Ensuite, elle diminue de manière non significative après 8 et 24 heures de traitement avec la dose la plus faible de l'extrait.

La dose la plus forte inhibe par contre l'expression du gène à 4, 8 et 24 heures ($p<0,05$). Aussi, il est à noter qu'avec cette dose les taux d'expression du gène restent constants à 4, 8 et 24 heures. (fig.62)

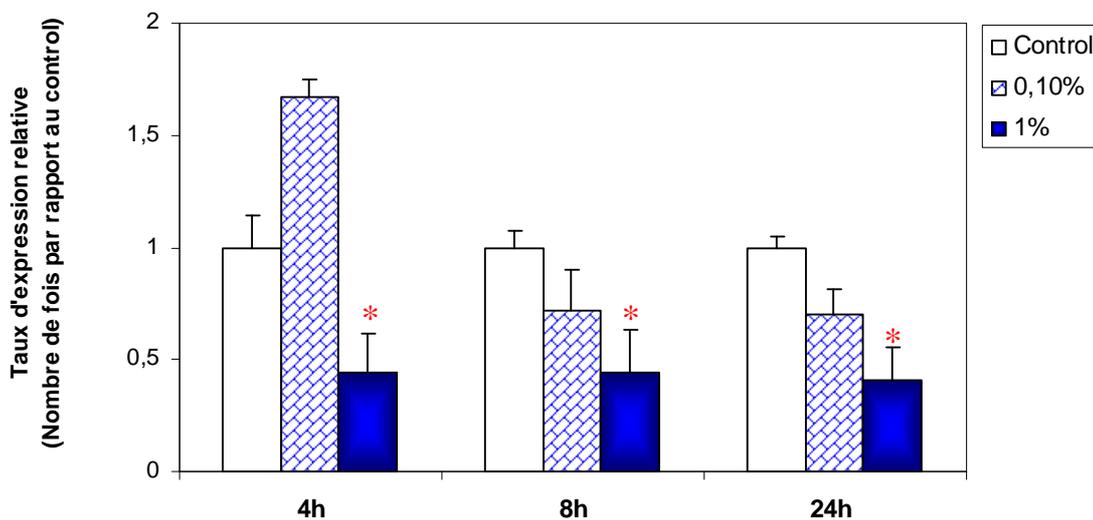


Figure 62: Effet de l'extrait d'*H. aspersa* sur l'expression du gène PTEN au niveau des cellules Hs578T. ($n=3$; * significatif $p<0,05$, *** hautement significatif $p<0,001$).

2-3 -8- Effet de l'extrait sur l'expression du gène P53:

L'étude de l'effet de l'extrait sur l'expression du gène TP 53 révèle qu'après 4 heures de traitement les taux d'expression augmentent de manière non significative ; A 8 et 24 heures les taux d'expression diminuent avec les deux doses.

La dose 1% semble avoir plus d'effet après 8 heures ($p<0,05$) et après 24 heures ($p<0,001$).
(fig. 63)

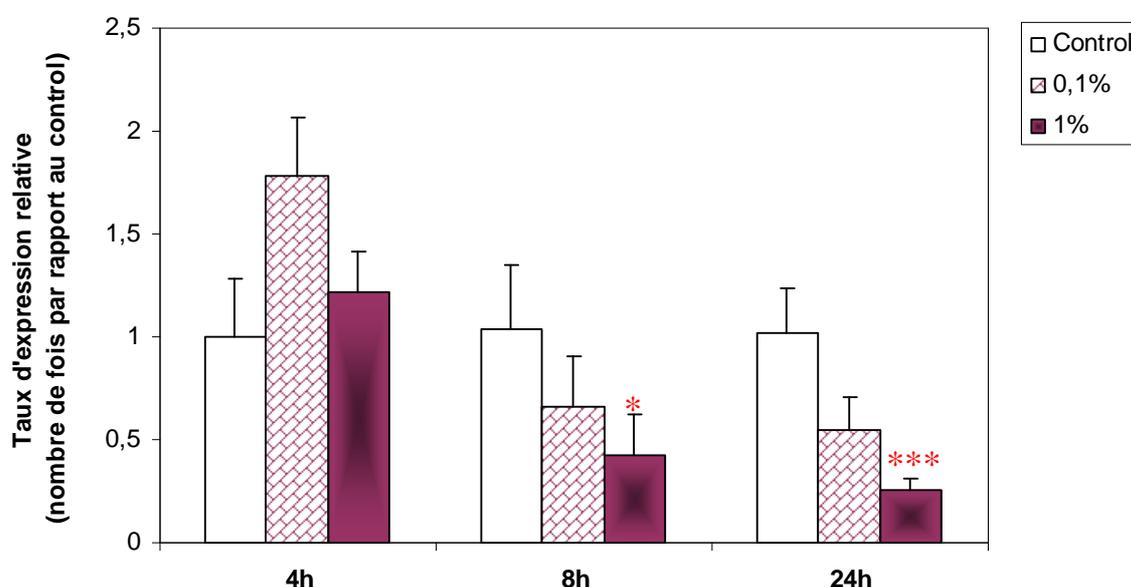


Figure 63: Effet de l'extrait d'*H. aspersa* sur l'expression du gène TP53 au niveau des cellules Hs578T. ($n=3$; * significatif $p<0,05$; *** hautement significatif $p<0,001$).

Remarque : les courbes d'amplification des gènes sont représentées dans les annexes figure 72,73,74 pages 142, 143.

2-4- Effet de l'extrait sur la production du TNF α par les cellules tumorales :

Le dosage du TNF α dans le surnageant de culture montre que la concentration de la cytokine dans les cellules contrôles reste stable entre 4, 8 et 24 heures. Les cellules traitées à la dose 0,1% montre une augmentation de la sécrétion de la cytokine à 8 heures, cette concentration diminue ensuite à 24 heures.

Le traitement des cellules avec l'extrait à la dose 1% entraîne une augmentation de la concentration de la cytokine après 4 et 8 heures de traitement. Cependant, une diminution est enregistrée après 24 heures de traitement.

La comparaison entre la concentration du TNF α dans le milieu de culture des cellules contrôles et traitées montre une augmentation significative de la sécrétion de la cytokine après 8 heures de traitement avec les deux doses 0,1% ($p<0,001$) et 1% ($p<0,01$). (fig.64)

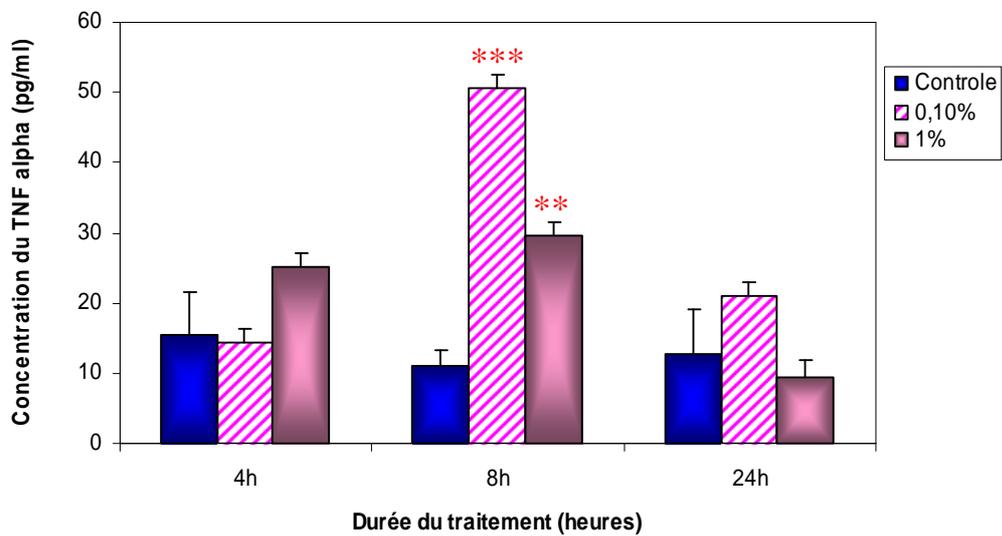


Figure 64: Effet de l'extrait aqueux d'*H. aspersa* sur les concentrations du TNF α dans le milieu de culture ($n=3$; ** très significatif $p<0,05$).

3- Discussion:

3- 1- Etude de la cytotoxicité de l'extrait vis- vis des cellules tumorales:

L'activité anti tumorale de l'extrait d'*H. aspersa* a été testé sur la lignée cellulaire Hs578T une lignée du cancer du sein triple négative. La première étape dans l'étude de l'activité anti tumorale d'une molécule ou d'un extrait biologique est le test de cytotoxicité MTT. Nos résultats montrent que l'extrait d'*H. aspersa* possède une cytotoxicité élevée vis-à-vis des cellules de la lignée Hs578T et a de faibles doses ; la valeur IC₅₀ est d'environ 1%.

Par comparaison de ces résultats avec ceux obtenus par les tests anti oxydants du chapitre 1. On note que cette dose possède un faible pouvoir de réduction des ions Fe³⁺ mais elle n'a pas la capacité de réduire le radical DPPH. Apparemment cette dose possède un pouvoir pro-oxydant, elle entraîne la formation des ROS ce qui a déclenché la mort cellulaire.

3-2 Etude du mode d'action l'extrait:

La microscopie à fluorescence et les différentes méthodes de marquage ont montré que la nécrose est le type de mort cellulaire induit par notre extrait.

3-2-1 Effet de l'extrait sur le TNF α :

Nos résultats montrent que l'extrait d'*H. aspersa* stimule la surexpression et la production de la cytokine TNF α . La comparaison entre les données obtenues à partir de l'expression du gène TNF α par RT-PCR et ceux du test ELISA semblent être en accordance, après quatre heures du pic d'expression du ARNm TNF α on note une élévation des taux de la cytokine dans le milieu de culture. De ce fait, l'extrait a stimulé la production de la cytokine. Cette dernière a provoqué l'activation du récepteur TNFR par un mode autocrine.

L'augmentation du TNF α semble être l'effet des lectines présentes dans l'extrait. Une augmentation significative des ARNm de la cytokine a été enregistrée dans des monocytes lors du traitement avec des lectines extraites du champignons *Viscum album* (Mannel *et al.*, 1991).

3-2-2 Effet de l'extrait sur le NF- κ B :

Une activation continue de la voie NF- κ B a été enregistrée dans de nombreux types de cancers. Les mécanismes moléculaires par lesquels la voie est activée restent obscurs. Des amplifications de gènes, des mutations, des délétions ou des translocations chromosomiques dans les gènes codant pour les protéines activatrices ou inhibitrices de la famille NF- κ B ont été identifiées (Tab 04).

D'après nos résultats, l'extrait d'*H. aspersa* est un inhibiteur de la voie NF- κ B surtout lorsqu'il est administré à la dose 1%. Une étude récente a montré que l'inhibition du NF- κ B seul ou en combinaison avec une thérapie entraîne une mort des cellules tumorales et une inhibition de la croissance (Madonna *et al.*, 2012) ce qui fait de cette voie une bonne cible pour la thérapie anti tumorale. Selon Golan-Goldhirsh & Gopas, 2014, les molécules bioactives régulent l'activité de la voie NF- κ B au niveau d'une des étapes suivantes : des protéines kinases, des phosphatases, de l'acétylation, la méthylation, translocation et la liaison avec l'ADN (fig. 65).

L'inhibition de la voie NF- κ B par de nombreuses classes de composés naturels a été largement reportée. Plus de 700 molécules naturelles, principalement d'origine végétale, ont été identifiées comme modulatrices de cette voie. Ces composés peuvent être des métabolites secondaires polyphénols, terpenoïdes, quinones ou alcaloïdes, mais aussi des anti-oxydants et des peptides (Gupta *et al.*, 2010). En effet, le picéatannole, xanthohumole et l'acide impressique modulent l'activité de l'IKK à travers la liaison à la cystéine 179. L'acide carnosique, le resveratrole et la quercétine agissent par phosphorylation de l'I κ B et acétylation du NF- κ B. L'acide maslinique un terpenoïde végétal supprime l'activation du NF- κ B induite par le TNF α , il entraîne la dégradation de I κ B α et inhibe la phosphorylation du p65 et la translocation du NF- κ B du cytoplasme vers le noyau (Li *et al.*, 2010).

De ce fait l'extrait d'escargots contient des polyphénols qui peuvent être à l'origine de l'inhibition de la voie NF- κ B.

Table 04: Altérations de la voie NF- κ B dans le cancer (selon Xiao & Fu, 2011)

Gènes	Locus	Altération	Exemple de type de cancer
rela	11q13	Amplification Rearrangement hyperactivité	Lymphomes, Cancer du sein, de l'estomac, de poumon, Myélome multiple.
relb	19q13.32	rearrangement	Leucémie
c-rel	2p13-p12	amplification rearrangement	Lymphome diffus á grands lymphocytes B, Lymphomes folliculaires
NF-kb1	4q24	Réarrangement surexpression	Cancer du cerveau de sein, de prostate, du colon, carcinome pulmonaire a petites cellules leucémie lymphoblastique aigue.
NF-kb2	10q24	Réarrangement surexpression	Lymphome cutané a lymphocytes T. Lymphome non hodgkinien á cellules B Leucémie chronique a Lymphocyte B Myélome multiple Cancer du sein Carcinome du colon
bcl3	19q13.1-q13.2	Réarrangement Surexpression	Leucémie chronique a Lymphocyte B. Lymphome non hodgkinien á cellules B.
Ikbα	14q13	Mutation	Lymphoma de Hodgkin
Ikbϵ	6p11	Mutation	Lymphoma de Hodgkin

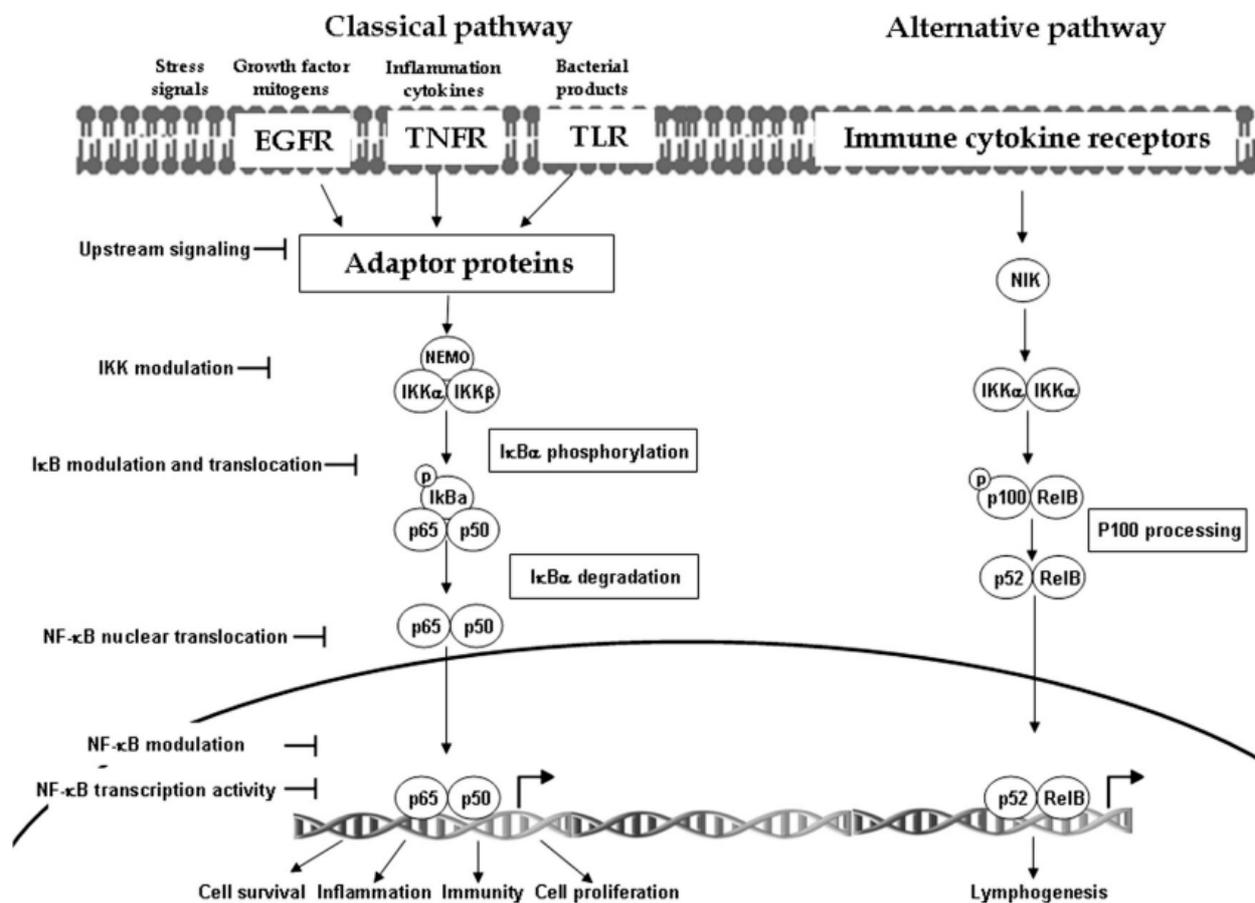


Figure 65 : Cibles et niveau d'action des molécules bioactives dans la voie NF- κB (Golan-Goldhirsh & Gopas, 2014)

3-2-3 Effet de l'extrait sur la Bcl2 :

L'augmentation de l'expression de la Bcl2 est généralement associée à une diminution de l'apoptose et une augmentation de la résistance à la chimiothérapie dans les cellules tumorales. Cette augmentation de l'expression est observée dans de nombreux types de cancers : le nasopharynx, le coloréctal, la prostate et le sein (Krajewski *et al.*, 1994; Olopade *et al.*, 1997; Schlotter *et al.*, 2008). Nos résultats montrent que l'extrait d'*H. aspersa* réduit l'expression de la Bcl2 ce qui a rendu les cellules plus sensible à la mort cellulaire. Cette inhibition de la Bcl2 résulte de l'effet du TNF α sur la Bcl2, vu que l'inhibition apparaît après 8 heures du traitement et coïncide avec l'apparition du TNF α dans le milieu de culture. Une étude réalisée par Lyu *et al.*, 2002 a reporté que la léctine ML-1 stimule la production du TNF α , qui a son tour provoque une déphosphorylation et une sous expression de la Bcl2. Ce qui déclenche une apoptose indépendante de la Bcl2.

3-2-4 Effet de l'extrait sur les gènes suppresseurs de tumeur P53 et PTEN :

La diminution du TP53 et du PTEN induite par l'extrait d'*H. aspersa* résulte de la surexpression du TNF α . Différents effets contradictoires ont été reportés sur l'effet du TNF α sur l'expression du TP53. L'expression du P53 diminue dans la lignée HT29 du colon et augmente dans la lignée HCT116 du col de l'utérus suite au traitement par le TNF α (Pator *et al.*, 2010).

Aussi, différentes études ont reporté l'effet TNF α sur le PTEN. Le TNF α augmente l'expression du PTEN dans la lignée HT29 à travers l'activation de la voie NF- κ B, alors qu'il provoque une diminution de ce gène dans les cellules leucémiques humaines HL-60 (Lee *et al.*, 2007). Vu que la voie NF- κ B est inhibée dans notre cas, l'expression du PTEN a été également inhibée. Une autre explication possible pour nos résultats est que l'extrait d'*H. aspersa* a inhibé le PTEN qui a son tour désactive la voie PI-3 kinase/AKT/ NF- κ B, ceci est envisageable puisque l'inhibition a lieu avant l'augmentation des taux du TNF α dans le milieu de culture et seulement avec la dose la plus élevée. Une étude réalisée par Gustin *et al.*, 2001 a montré que le l'utilisation d'un inhibiteur pharmacologique du PTEN, provoque une inhibition de l'activation de la voie NF- κ B induite par le TNF α .

Il est important de signaler qu'il existe une corrélation entre ces deux gènes suppresseurs de tumeurs. En effet, le P53 régule l'activité du PTEN au niveau transcriptionnel et au niveau protéique alors que le PTEN assure la stabilité de la protéine P53 (Okumura *et al.*, 2011).

3-2-5 Type de mort cellulaire induit par l'extrait :

Le TNF α est une cytokine qui peut stimuler l'apoptose comme elle peut provoquer la nécrose en fonction du type cellulaire et de la nature du stimulus (Galluzi *et al.*, 2009). La nécrose induite par le TNF α (*TNF α induced necrosis* ou néroptose) est une nécrose programmée ; qui résulte d'une incomplète exécution de l'apoptose dans laquelle NF- κ B et Bcl2 sont inhibés et ces caractéristiques sont en accord avec nos résultats. L'extrait d'*H. aspersa* semble bloquer le processus apoptotique et l'apoptose complète n'apparaît que dans quelques cas (fig. 58).

La néroptose est aussi associée avec une augmentation des ROS au niveau intra cellulaire, cette élévation des ROS provient dans notre cas de différentes sources ; d'une part de l'effet pro-oxydant direct des doses 0,1 et 1% et d'autre part de l'effet indirect de l'extrait à travers la stimulation du TNF α .

Cependant, des taux élevés de ROS entraînent une peroxydation des lipides, une altération de la membrane plasmique, une inactivation des caspases et une nécrose (Kannan & Jain 2000). Au contraire des taux faibles de ROS entraînent une apoptose. Sakon *et al.*, 2003 ont montré qu'une forte stimulation par le TNF α entraîne une accumulation des ROS, qui entraîne une activation prolongée des MAPK et une activation de la mort programmée.

De manière générale les molécules de super famille du TNF comme FasL, TRAIL et TNF α entraînent la génération des ROS (Kim *et al.*, 2010 ; Shen & Pervaiz, 2006). Ces derniers déclenchent la nécrose programmée via l'activation du récepteur TNF-R1 (Organ *et al.*, 2008) qui stimule la production du superoxyde à travers l'activation du NADPH oxydase (Reinehr *et al.*, 2005). Le traitement des cellules de lignée L929 de fibrosarcome par le TNF α , entraîne une activation de la NADPH oxydase Nox1, une production élevée de superoxyde et une néroptose. L'enzyme Nox1 représente la première source des ROS au cours de la néroptose (Kim *et al.*, 2007).

Aussi il a été montré que les ROS entraînent une diminution de l'expression de la Bcl2 (Hockenbery *et al.*, 1993; Hildeman *et al.*, 2003). Li *et al.*, 2003 ont reporté que l'activité du NF- κ B est complètement inhibé à travers la dégradation de l'I κ B α et les taux de Bcl2 ont été diminués lors d'une élévation des ROS, qui inhibent également les phosphatases à double spécificité comme le PTEN (Morgan *et al.*, 2008).

Par ailleurs, les virus et les cellules tumorales ont développé des mécanismes de résistance parmi lesquels l'inhibition de la caspase 8. Les recherches ont montré que la nécrose programmée est

une forme de mort alternative de l'apoptose en cas d'une inhibition de la caspase 8 (Han *et al.*, 2011). De ce fait on peut supposer que notre extrait contient une molécule inhibitrice de la caspase 8.

Les drogues anti cancer appliquées actuellement ont été développées dans le but d'induire l'apoptose dans les cellules tumorales. Ces dernières ont aussi développé des mécanismes de résistance, la nécrose programmée représente donc, une voie alternative avec peu de mécanismes de résistances comparativement à l'apoptose. La nécroptose possède une grande utilité clinique car elle garde la même spécificité et les mêmes cibles thérapeutiques que l'apoptose mais elle dépasse ses mécanismes de résistance (Chaabane *et al.*, 2013). Aussi Olofsson *et al.*, 2007 ont montré que la chimiothérapie induit plus de nécrose que d'apoptose et qu'il existe une corrélation entre la nécrose et la survie du patient.

Il est connu que la nécrose stimule la réponse inflammatoire mais il a été démontré récemment que dans certaines situation les macrophages phagocytent les débris cellulaires résultant de la nécroptose sans induction d'une réponse inflammatoire ce qui démontre la complexité de la réponse du système immunitaire envers ce processus (Brouckaert *et al.*, 2004 ; Han *et al.*, 2011)

L'induction de la nécroptose par l'extrait d'*H. aspersa* semble une bonne caractéristique qu'il faut développer.

VI. Hypothèse sur le mode d'action de l'extrait d'*H. aspersa*

IV- Hypothèse sur le mode d'action de l'extrait aqueux d'*H. aspersa*.

En comparant, les effets *in vivo* et *in vitro* de l'extrait aqueux d'*H. aspersa* avec ceux reportés en bibliographie sur les différentes molécules bioactives on suppose que la molécule bioactive majeure dans notre extrait est une lectine (fig 66).

Différents effets de lectines ont été reportés sur les cellules tumorales et les cellules immunitaires. En effet, les lectines de type ML-I et II (Mistletoe lectin 1) extraites à partir des plantes ont montré une capacité de stimuler la mort cellulaire induite par le TNF α (Fu *et al.*, 2011), elles activent la caspase 8 et la voie extrinsèque de l'apoptose dans les cellules Jurkat (lignée de leucémie à lymphocytes T), elles altèrent le potentiel membranaire de la mitochondrie, ce qui entraîne la libération du cytochrome c, et l'augmentation des ROS dans les cellules d'hépatocarcinomes (Lyu *et al.*, 2002). Ces lectines stimulent la production du TNF α et inhibent l'expression des facteurs ; NF- κ B, XIAP et AKT/protéines kinase B (Khil *et al.*, 2007).

D'autre part, l'Abrin une lectine de la famille des Ricine-B peut déclencher une apoptose dans plusieurs lignées de cellules tumorales comme Jurkat, MOLT-4 (leucémie aigue a cellule T humaine), Ball-1 (lymphome à cellules B) (Ramnath *et al.*, 2009) mais aussi une nécroptose dans la lignée U266B1 du myélome. L'abrin augmente les taux de ROS intra cellulaire et perméabilise la membrane lysosomale ce qui entraîne la libération des cathépsines (Bora *et al.*, 2010).

Par ailleurs, il a été montré que les lectines entraînent également un changement de la glycosylation à la surface des cellules tumorales. Une étude réalisée sur une lectine extraite de l'escargot *H. pomatia*, une espèce très proche de *H. aspersa*, a montré que la lectine reconnaît spécifiquement divers épitopes sur les cellules tumorales du sein et du colon. comme l'O-linked α -N-acetylgalactosamine de l'épitope Tn (Walker, 1993; Lescar *et al.*, 2007), l'intégrin α 6, la HnRNPs (transcription factors heterogeneous nuclear ribo-nuclear protein), la Hsp27 (heat shock protein 27) et l' ENO1 (enolase 1). La lectine pénètre aussi dans les cellules tumorales des lignées T47D et MCF7 et se fixe sur l'appareil de golgi (Rambaruth *et al.*, 2012).

Aussi il a été démontré que différentes lectines purifiées à partir des plantes stimulent la production du NO par les macrophages péritonéaux. En effet, les lectines purifiées de la plante *Pisum arvense* simule une production du NO comparable à celle du LPS plus l'IFN γ (Andrade *et al.*, 1999), une autre lectine de *Abrus precatorius* stimule la production du NO, du peroxyde d'hydrogène et augmente l'activité bactéricide et phagocytaire des macrophages (Maiti & Tripathi, 2003).

Les lectines peuvent agir à travers la stimulation des récepteurs de mort comme le TNFR et le Fas (flèche verte) ou directement à travers l'endocytose (flèche bleue), les récepteurs TNFR (flèche rouge) dans la lignée Hs578T stimule la voie de signalisation RIP3 qui déclenche la nécroptose. Sur les macrophages les lectines se lient à des récepteurs spécifiques appelés les C-type lectine, qui stimule la génération des ROS et la libération du TNF α et du NO (fig. 67).

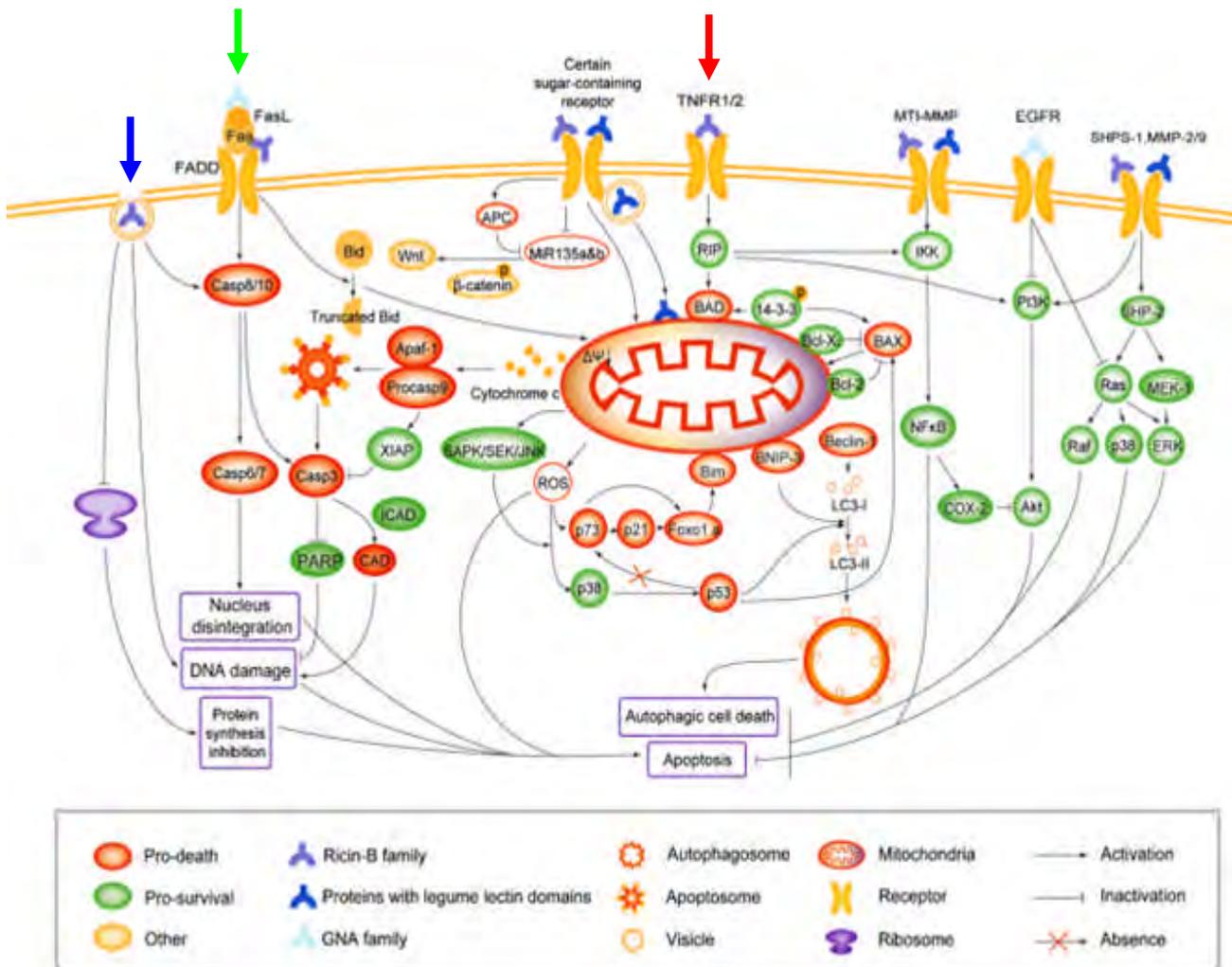


Figure 66: Schéma représentant les voies de signalisation induites par les lectines (selon Fu *et al.*, 2011) et expliquant notre hypothèse sur le mode d'action.

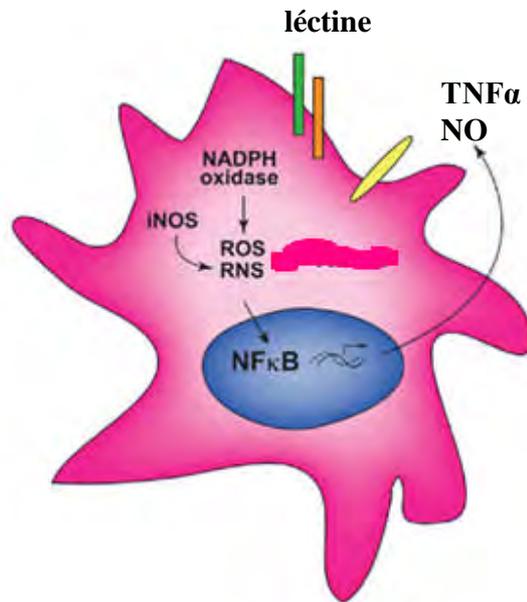


Figure 67: Schéma expliquant notre hypothèse sur la stimulation de la production du TNF α et du NO par les lectines.

V. Conclusion et Perspectives

V- Conclusion et perspectives

Nos expérimentations ont été menées dans le but de tester l'existence d'un effet thérapeutique d'un extrait aqueux d'*H. aspersa*. Les résultats ont montré que l'extrait possède un effet anti- oxydant, anti tumoral et immuno-modulateur.

L'analyse de l'activité anti oxydante de l'extrait, par des méthodes chimiques, montre que l'extrait à de fortes concentrations possède des propriétés anti- oxydantes, se traduisant par sa capacité à réduire les radicaux libres comme le DPPH et le piégeage du peroxyde d'hydrogène. Il possède également la capacité d'inhiber la peroxydation des lipides.

L'extrait aqueux d'*H. aspersa* stimule la prolifération des monocytes, il possède par contre un effet cytotoxique sur les macrophages matures lorsqu'il est administré à des concentrations variant entre 1% et 5%.

L'effet de l'extrait sur l'activité des macrophages dépend de sa concentration. L'étude a montré que les concentrations les plus faibles comme 0,1% stimulent la production des anions superoxyde O₂⁻ et n'a pas d'effet sur l'activité phagocytaire ni même sur la sécrétion de l'oxyde nitrique et de la cytokine inflammatoires TNF α . La dose 1%, est une dose cytotoxique pour les macrophages comme pour la lignée Hs578T. Cette dose provoque une production élevée du TNF α et du NO, qui sont les deux médiateurs, responsables de la cytotoxicité de l'extrait vis à vis des macrophages. L'extrait administré à la dose 10%, stimule l'activité phagocytaire des macrophages, ainsi que la production des anions O₂⁻.

Les résultats de l'étude de l'extrait *in vivo* sur un modèle d'inflammation chronique indiquent que l'extrait possède un effet anti inflammatoire, il réduit les taux plasmatiques du TNF α , il stimule la pénétration des cellules immunitaires dans le foie, en même temps, il possède un effet réparateur pour les lésions hépatiques induites par les LPS d'*E. coli*.

L'étude de l'effet de l'extrait d'*H. aspersa* sur la rate montre un effet immunomodulateur, il induit une activation des lymphocytes et des macrophages qui se fusionnent en cellules géantes.

D'autre part, l'étude montre que l'extrait possède un effet anti tumoral vis-à-vis des cellules de la lignée Hs578T. L'IC₅₀ est d'environ 1%.

L'extrait provoque une nécroptose modulée par le TNF α dans les cellules de cette lignée. L'analyse de l'expression des gènes impliqués dans ce processus a montré que l'extrait stimule l'expression du TNF α mais il inhibe celle du facteur NF- κ B. Il réduit l'expression du gène de la

protéine anti- apoptique Bcl2 et les gènes suppresseurs des tumeurs P53 et PTEN. L'extrait à une concentration de 0,1% semble avoir plus d'effet.

L'analyse des effets de l'extrait montre que la molécule bioactive majeure est une lectine, néanmoins les propriétés anti-oxydantes résultent de la présence d'un autre anti -oxydant comme les polypénols.

Afin de compléter cette étude il serait intéressant dans l'avenir de :

- Purifier d'abord des lectines à partir de l'extrait d'escargot *H. aspersa* et tester l'effet de ces molécules sur des cellules tumorales et sur d'autres voies de signalisation impliquées dans la nécroptose, afin de bien visualiser le mode d'action de l'extrait et précisé les cibles thérapeutiques.

- Tester l'effet de l'extrait sur d'autres lignées cellulaires notamment celles présentant une surexpression de la Bcl2 et du NF- κ B pour bien confirmer l'effet inhibiteur sur ces deux voies qui sont responsables du développement de nombreux types de cancer.

- Etudier, l'effet anti tumoral de l'extrait, *in vivo*, sur un modèle animal de tumeur.

- Etudier l'effet de ces molécules sur d'autres cellules immunitaires, comme les lymphocytes B, ainsi que sur d'autres cytokines comme l'INF γ .

Aussi, il est intéressant d'élaborer les propriétés anti-oxydantes de l'extrait en étudiant ses effets sur quelques enzymes anti- oxydantes surtout au niveau hépatique et sur d'autres organes comme les reins.

VI. Annexes

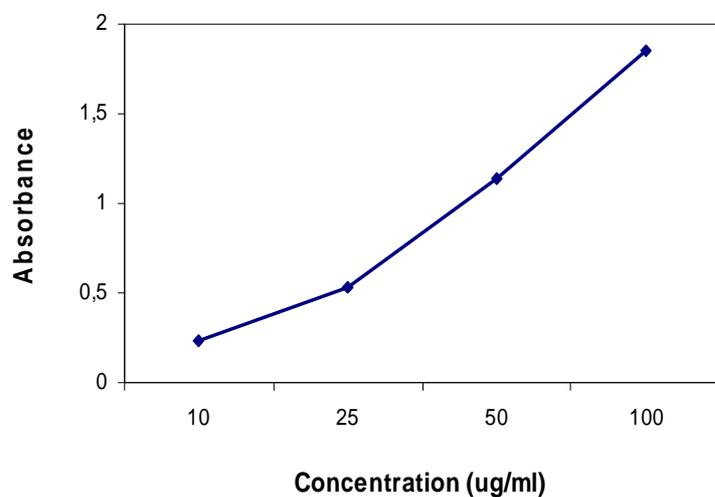


Figure 68: Capacité total de l'acide ascorbique à réduire les ions fer³⁺ par le test FRAP

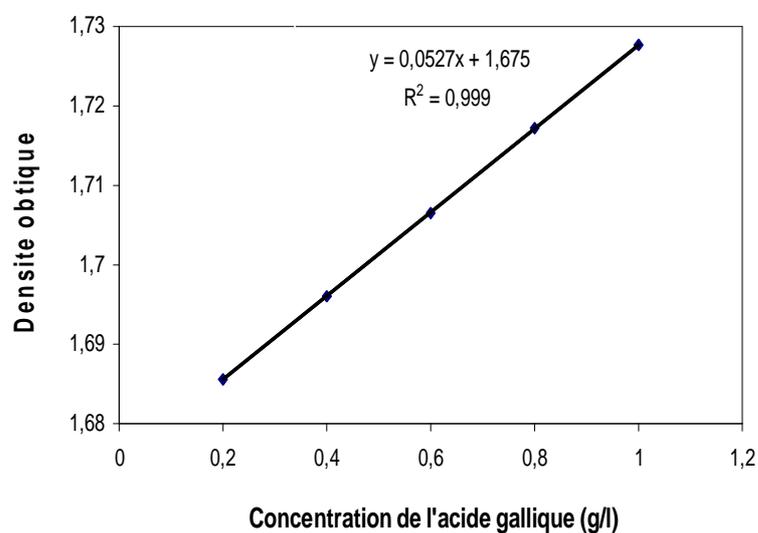


Figure 69: Gamme d'étalonnage des polyphénols réalisées avec l'acide gallique.

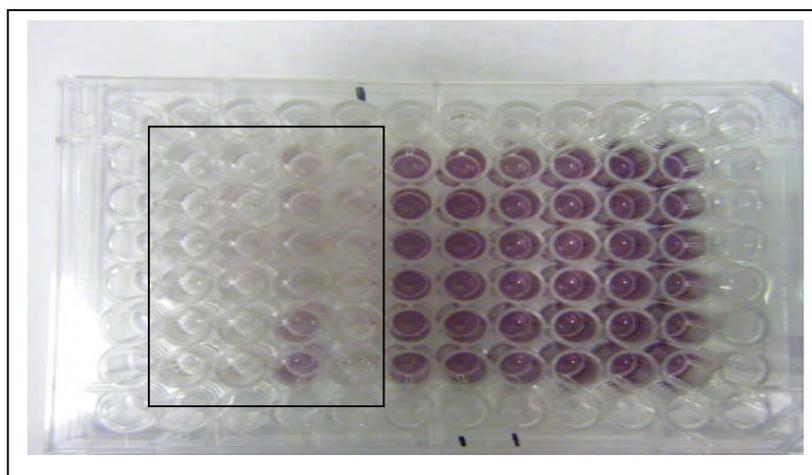


Figure 70 : illustration d'une plaque 96 puits dans laquelle le test MTT a été réalisé. Les puits encadrés montrent une cytotoxicité élevée.

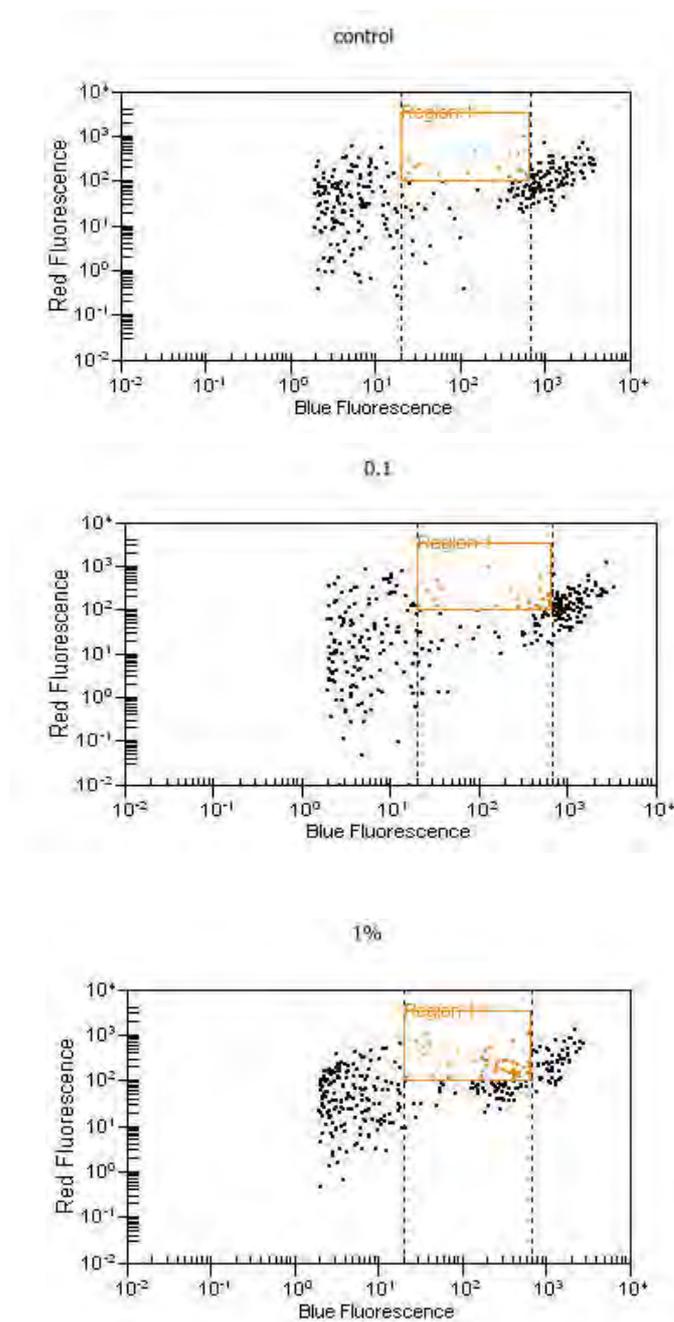


Figure 71 : Etude de l'apoptose : représentation graphique en nuage de point de la fluorescence. Les cellules marquées par l'annexine sont encadré en rouge.

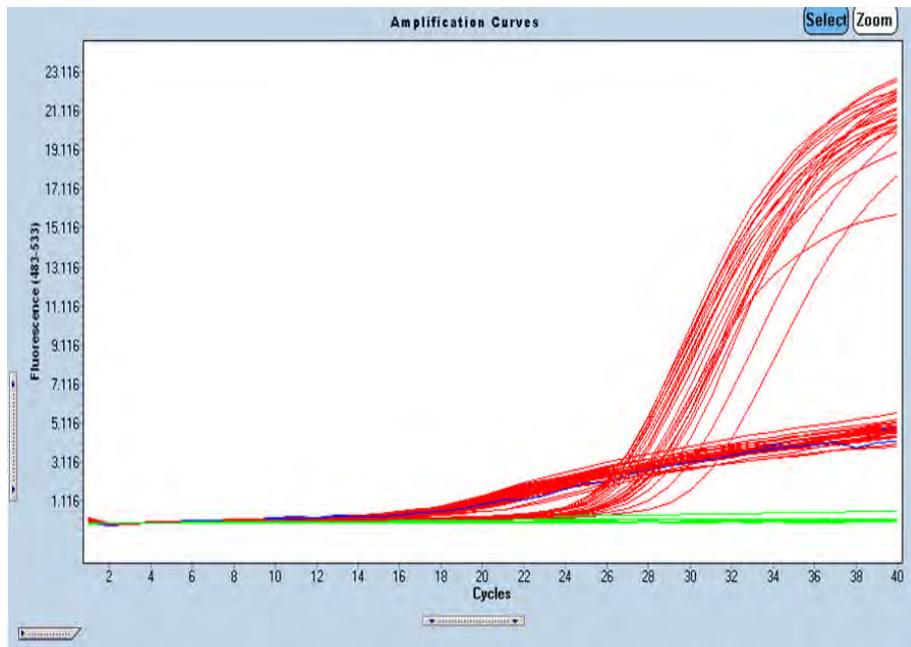


Figure 72 : Courbes d'amplification des gènes β actine et du NF- κ B, obtenues du light cycler (chaque courbe correspond à un cycle d'amplification).

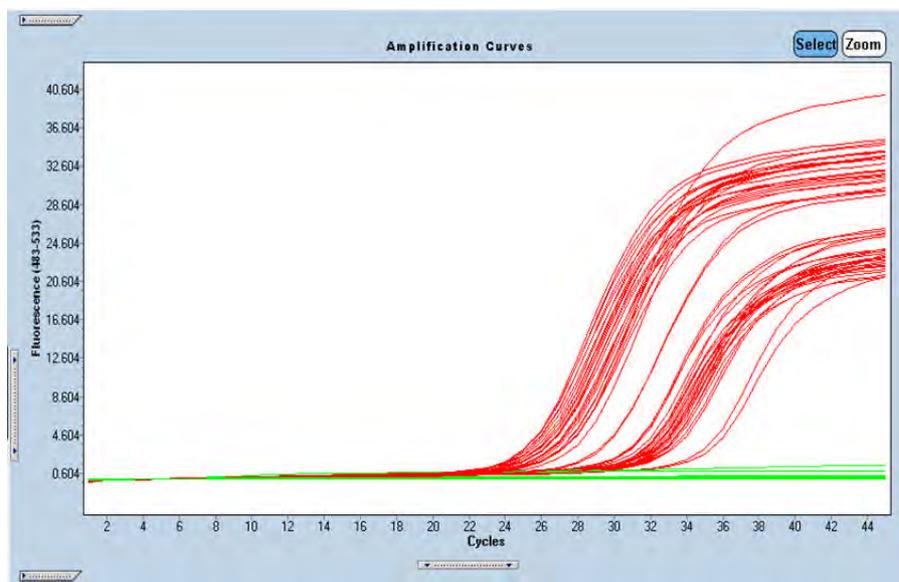


Figure 73 : Courbes d'amplification des gènes Bcl2 et PTEN, obtenues à partir du light cycler.

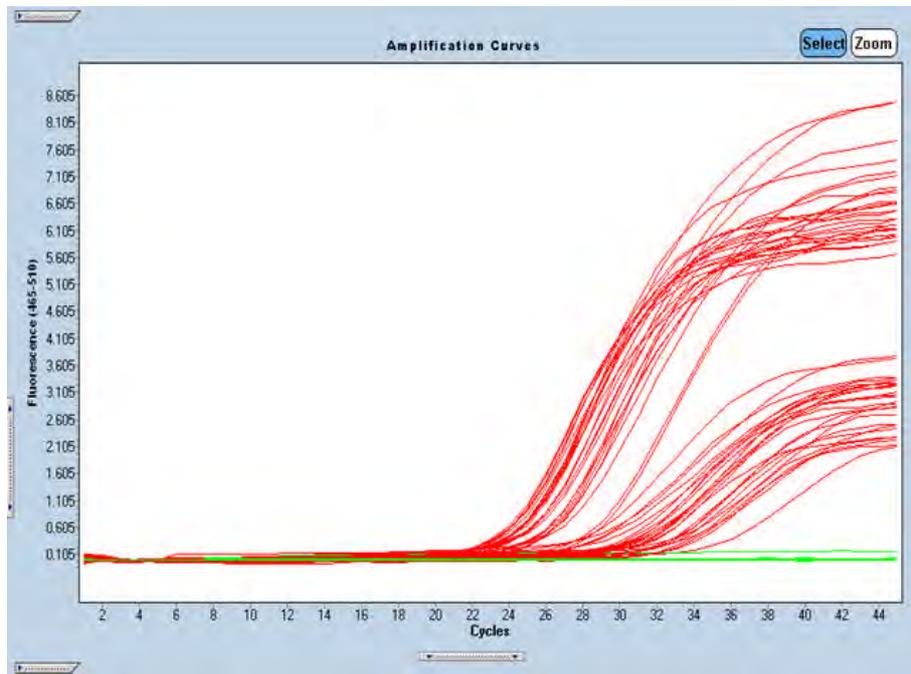


Figure 74 : Courbes d'amplification des gènes TNF et P53, obtenues à partir du light cycler.

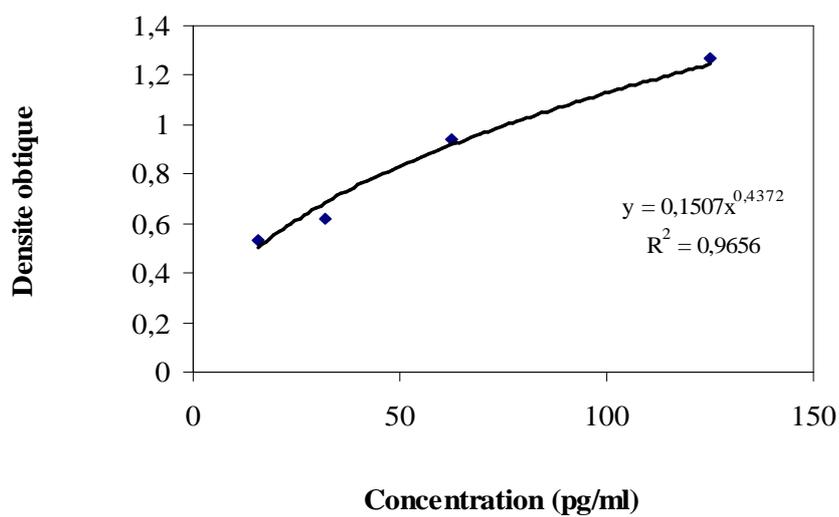


Figure 75: Gamme d'étalonnage réalisée par TNF α recombinant humain

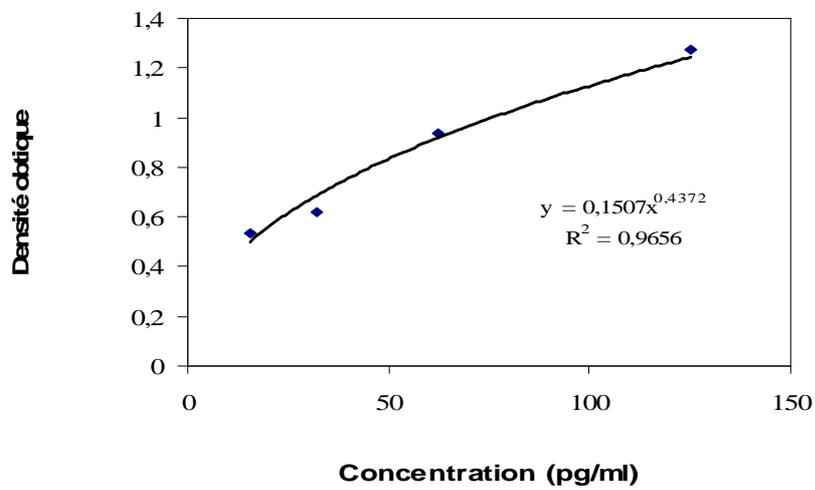


Figure 76: Gamme d'étalonnage réalisée par TNF α recombinant de souris

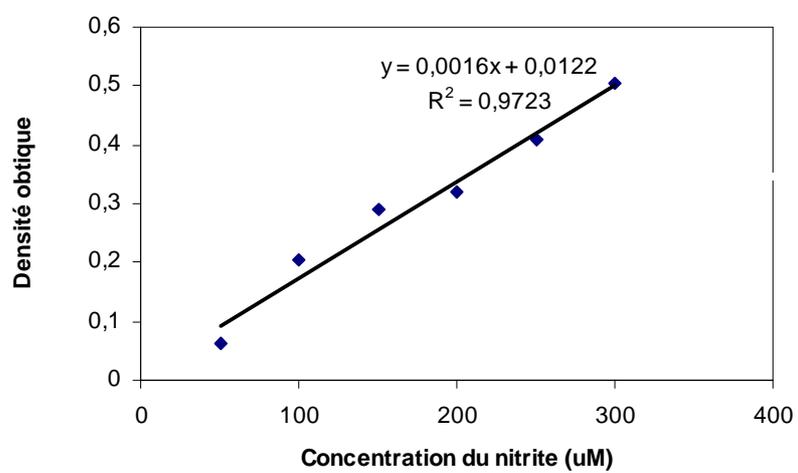


Figure 77: Gamme d'étalonnage NO réalisée par le NaNO₂

VI. Références Bibliographiques

A

- Afanas'ev, I. B., Dorozhko, A. I., Brodskii, A. V., Kostyuk, V. A., & Potapovitch, A. I. 1989.** Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. *Biochemical Pharmacology*, 38: 1763–1769.
- Agou F., Traincard F., Vinolo E., Courtois G., Yamaoka S., Israël A & Véron M. 2004.** The trimerization domain of NEMO is composed of the interacting C-terminal CC2 and LZ coiled-coil subdomains. *J Biol Chem*, 279, 27861-27869.
- Ahmed AU. 2011.** An overview of inflammation: mechanism and consequences. *Front. Biol.* 6(4): 274–281
- Akinosoglou KS., Karkoulias K & Marangos M. 2013.** Infectious complications in patients with lung cancer. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 17(1):8-18.
- Akira S., Uematsu S & Takeuchi O. 2006.** Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, 124: 783–801
- Alameda JP., Moreno-Maldonado R., Navarro M. 2010.** An inactivating CYLD mutation promotes skin tumor progression by conferring enhanced proliferative, survival and angiogenic properties to epidermal cancer cell. *Oncog.* 29: 6522-6532.
- Andrade JL., Arruda S., Barbosa T., Paim L., MV Ramos., Cavada BS & Netto MB. 1999.** Lectin-Induced Nitric Oxide Production. *Cellular Immunology*, 194: 98-102
- Ashley NT., Weil ZM & Nelson RJ. 2012.** Inflammation: mechanisms, costs, and natural variation. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 43:385–406
- Apak R., Güçlü K., Ozyürek M., Karademir SE. 2004.** Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *Agric Food Chem.* 52(26):7970-81.
- Auwerx J. 1991.** The human leukemia cell line, THP-1: a multifaceted model for the study of monocyte-macrophage differentiation. *Experientia.* 15: 47(1):22-31.
- Awasthi A & Kuchroo VK. 2009.** Th17 cells: from precursors to players in inflammation and infection. *Inter Immunol*, 21(5): 489–498.

Azzam EI., Jay-Gerin JP., Pain D. 2012. Ionizing radiation induced metabolic oxidative stress and prolonged cell injury. *Cancer letters*. 327(1): 48-60.

B

Rabeta, M.S & Nur Faraniza, R. 2013. Total phenolic content and ferric reducing antioxidant power of the leaves and fruits of *Garcinia atrovirdis* and *Cynometra cauliflora*. *International Food Research Journal* 20(4): 1691-1696.

Balkwill F. 2009 Tumour necrosis factor and cancer. *Nat Rev Cancer*. 9:361–371.

Bandyopadhyay U., Dipak D & Banerjee RK. 1999. Reactive oxygen species: Oxidative damage and pathogenesis. *Current science*. 77(5): 10: 658-666

Banerjee, A., Dasgupta, N & De, B. 2005. In vitro study of antioxidant activity of *syzygium cumini* fruit. *Food Chemistry*, 90, 727–733.

Barros FB., Varela SAM Pereira HM & Vicente L. 2012. Medicinal use of fauna by a traditional community in the Brazilian Amazonia. *Journal of Ethnobiology & Ethnomedicine*. 8 (37):1-20.

Baud V & Karin M. 2009. Is NF- κ B a good target for cancer therapy? Hopes and pitfalls. *Nat Rev Drug Discov*. 8(1): 33-40

Beaudouin J., Liesche C., Aschenbrenner S., Hörner M & Eils R. 2013. Caspase-8 cleaves its substrates from the plasma membrane upon CD95-induced apoptosis. *Cell Death & Differ*. 20: 599-610

Bell E. 2009. Innate immunity: Endothelial cells as sentinels. *Nat Rev Immunol*. 9, 532-533.

Benítez G. 2011. Animals used for medicinal and magico-religious purposes in western Granada Province, Andalusia (Spain). *Journal of Ethnopharmacology*. 137: 1113–1123

Berlett BS & Stadtman, 1997. Protein oxidation in aging disease and oxidative stress. *JBC*. 272(33): 20313-20316

Bertrand MJ., Milutinovic S., Dickson KM., Ho WC., Boudreault A., Durkin J., Gillard J.W., Jaquith JB., Morris SJ & Barker PA. 2008. cIAP1 and cIAP2 facilitate cancer cell survival by functioning as E3 ligases that promote RIP1 ubiquitination. *Mol Cell*. 30, 689–700.

- Beutler B & Rietschel, 2003.** Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin. *Nature Reviews Immunology*. 3: 169-176 .
- Bewer MS. 2011.** Natural Antioxidants: Sources, Compounds, Mechanisms of Action, and Potential Applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 10(4): 221-247.
- Bialik S, Zalckvar E, Ber Y, Rubinstein AD & Kimchi A. 2010.** Systems biology analysis of programmed cell death. *Trends Bio-chem. Sci.* 35, 556–564.
- Blanqué R., Mekin C., Millet S & Gardner C.R. 1998.** Selective Enhancement of LPS-Induced Serum TNF- α Production by Carrageenan Pretreatment in Mice. *General Pharmacology: The Vascular System*. 31(2): 301-306.
- Bonnemain B. 2005** Helix and drugs: Snails for western health care from antiquity to the present, *eCAM*, 2(1) 25-28.
- Bononi A, Agnoletto C, De Marchi E, Marchi S, Patergnani S, Bonora M, Giorgi C, Missiroli S, Poletti F, Rimessi A & Pinton P. 2011.** Protein kinases and phosphatases in the control of cell fate. *Enzyme Res.* 1-26. Article ID 329098.
- Bora N., Gadadhar S & Karande AA. 2010.** Signaling different pathways of cell death: abrin induced programmed necrosis in U266B1 cells. *Int J Biochem Cell Biol.* 42: 1993-2003.
- Bradham CA., Plümpe J., Manns MP., Brenner DA & Trautwein C.** Mechanisms of hepatic toxicity. I. TNF-induced liver injury. *Am J Physiol.* 275(3):387-392.
- Brouckaert G., Michael Kalai M., Krysko DV., Saelens X., Vercammen D., Ndlovu M., Haegeman G., D'Herde K & Vandenabeele P. 2004.** Phagocytosis of necrotic cells by macrophages is phosphatidylserine dependent and does not induce inflammatory cytokine production. *Mol. Biol. Cell.* 15, 1089–1100.
- Boumela I., Guillemin Y., Guérin JF & Aouacheria A. 2009.** Les régulateurs d'apoptose de la famille Bcl-2 dans les gamètes et lors du développement embryonnaire précoce. *Gynécologie Obstétrique & Fertilité.* 37 : 720–732.
- Bremer E. 2013.** Targeting of the Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily for Cancer immunotherapy. *ISRN Oncology*. Article ID 371854, 25 pages
- Bruin EC & Medema JP. 2008.** Apoptosis and non-apoptotic deaths in cancer development and treatment response. *Cancer Treat. Rev.* 34: 737– 749

Burman C & Ktistakis NT. 2010. Regulation of autophagy by phosphatidylinositol 3-phosphate. *FEBS Lett* .584, 1302-1312.

Bustin SA. 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol*, 2000. 25(2): p. 169-93.

C

Cagiltay F., Erkan N., Tosun D. & Selcuk A. 2001. Amino acid, Fatty acid, vitamin and mineral contents of Edible garden snail (*Helix aspersa*). *Journal of Fisheries Sciences*, 5(4), 354-363.

Candé C, Cohen I, Daugas E, Ravagnan L, Larochette N, Zamzami N & Kroemer G. 2002. Apoptosis-inducing factor (AIF): a novel caspase-independent death effector released from mitochondria. *Biochimie*. 84(2-3):215-22

Candé C., Cohen I., Daugas E., Ravagnan L., Larochette N., Zamzami N., Kroemer G. 2002. Apoptosis-inducing factor (AIF): a novel caspase-independent death effector released from mitochondria. *Biochimie*. 84(2-3): 215-222.

Carrington PE, Sandu C, Wei Y, Hill JM, Morisawa G, Huang T, Gavathiotis E, Wei Y & Werner MH. 2006. The structure of FADD and its mode of interaction with procaspase-8. *Mol Cell*. 9;22 (5):599-610

Cen ZH & Niki E. 2006. 4-Hydroxynonenal (4-HNE) has been widely accepted as an inducer of oxidative stress. Is this the whole truth about it or can 4-HNE also exert protective effects? *IUBMB Life*, 58(5 – 6): 372 – 373

Chaabane W., User SD., EL- Gazzah M., Jaksik R., Sajjadi E., Rzeszowska Wolny J & Los MJ. 2013. Autophagy, Apoptosis, Mitoptosis and Necrosis : interdependence between those pathways and effects on cancer. *Arch. Immunol. Ther*. 61: 43-58.

Chalhoub N & Baker SJ . 2009. PTEN and the PI3-Kinase Pathway in Cancer. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis*. 4:127–50

Chen ZH, Kim HP, Scirba FC, Lee SJ, Feghali-Bostwick C, Stolz DB, Dhir R, Landreneau RJ, Schuchert MJ, Yousem SA, Nakahira K, Pilewski JM, Lee JS, Zhang Y, Ryter SW, Choi AM. 2008. Egr-1 regulates autophagy in cigarette smok induced chronic obstructive pulmonary disease. *PLoS One*. 3(10): e3316- 1-13.

- Chikka MR, McCabe DD, Tyra HM & Rutkowski DT. 2013.** C/EBP homologous protein (CHOP) contributes to suppression of metabolic genes during endoplasmic reticulum stress in the liver. *J Biol Chem.* 288(6):4405-15.
- Chloe E. Atreya CE., Sangale Z., Xu N., Matli MR., Tikishvili E., Welbourn W., Stone S., Shokat KM & Warren RS. 2013.** PTEN expression is consistent in colorectal cancer primaries and metastases and associates with patient survival. *Cancer Med.* 2(4): 496-506
- Cho YS., Challa S., Moquin D., Genga R., Ray T.D., Guildford M., & Chan FK. 2009.** Phosphorylation-driven assembly of the RIP1-RIP3 complex regulates programmed necrosis and virus-induced inflammation. *Cell.* 137: 1112–1123.
- Choi HS., Kim JW., Cha YM & Kim C. 2006.** A Quantitative nitroblue tetrazolium assay for Determining Intracellular Superoxide anion production in phagocytic cells. *Journal of Immunoassay & Immunochemistry.* 27: 31–44.
- Chomczynski P & Sacchi N. 1987.** Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162: 156.
- Chomczynski, P. 1993.** A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *BioTechniques,* 15: 532-537.
- Christofferson DE & Yuan J. 2010.** Necroptosis as an alternative form of programmed cell death. *Curr. Opin. Cell Biol.* 22: 263–268.
- Cizkova M., Susini A., Vacher S., Cizeron- Clairac C., Andrieu C., Driouch K., Fourme E., Lidereau R & Bièche I. 2012.** *PIK3CA* mutation impact on survival in breast cancer patients and in ER α , PR and ERBB2-based subgroups. *Breast Cancer Research,* 14:R28: 1-9
- Courtney KD., Corcoran RB & Engelman. 2010.** The PI3K pathway as drug target in human cancer. *Journal of clinical oncology.* 28(6): 1075-1083.
- Crawford ED & Wells JA. 2011.** Caspase Substrates and Cellular Remodeling. *Ann Rev Biochem.* 80: 1055-1087
- Cuevas A, Saavedra N, Salazar LA and Abdalla DSP. 2013.** Modulation of Immune Function by Polyphenols: Possible Contribution of Epigenetic Factors. *Nutrients.* 5: 2314-2332.

Cully M., Han Y., Levine AJ & Mak TW. 2006. Beyond PTEN mutations: the PI3K pathway as an integrator of multiple inputs during tumorigenesis. *Nat. Review Cancer*. 6: 184-192.

D

Dai Y., Chen S., Wang L., Pei XY., Funk VL., Kramer LB., Dent P & Grant S. 2011. Disruption of IkappaB kinase (IKK)-mediated RelA serine 536 phosphorylation sensitizes human multiple myeloma cells to histone deacetylase (HDAC) inhibitors. *J. Biol Chem*. 30: 286(39):34036-50.

Darding M & Meier P. 2012. IAPs: Guardians of RIPK1. *Cell Death and Differ*. 19, 58–66.

Darvesh AS., Carroll RT., Bishayee A., Geldenhuys WJ., Van der Schyf CJ. 2010. Oxidative stress and Alzheimer's disease: dietary polyphenols as potential therapeutic agents. *Expert Rev Neurother*.10(5):729-45.

Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, Teague J, Woffendin H, Garnett MJ, Bottomley W, Davis N, Dicks E, Ewing R, Floyd Y, Gray K, Hall S, Hawes R, Hughes J, Kosmidou V, Menzies A, Mould C, Parker A, Stevens C, Watt S, Hooper S, Wilson R, Jayatilake H, Gusterson BA, Cooper C, Shipley J, Hargrave D, Pritchard-Jones K, Maitland N, Chenevix-Trench G, Riggins GJ, Bigner DD, Palmieri G, Cossu A, Flanagan A, Nicholson A, Ho JW, Leung SY, Yuen ST, Weber BL, Seigler HF, Darrow TL, Paterson H, Marais R, Marshall CJ, Wooster R, Stratton MR, Futreal PA. 2002. Mutation of the BRAF gene in human cancer. *Nat*. 417 (6892): 949-954.

Degenhardt K., Marthew R., Beaudoin B., Bray K., Anderson D., Chen G., Mukherjee C, Shi Y, Gélinas C, Fan Y, Nelson DA, Jin S & White E. 2006. Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation and tumorigenesis. *Cancer cell*. 10(1):51-64.

Dejardin E. 2006. The alternative NF- κ B pathway from biochemistry to biology: pitfalls and promises for future drug development. *Biochemical Pharmacology*, 72, 1161-1179.

- Denning G, Jean-Joseph B, Prince C, Durden DL & Vogt PK. 2007.** A short N-terminal sequence of PTEN controls cytoplasmic localization and is required for suppression of cell growth. *Oncog.* 26: 3930-3940.
- Dewson G & Kluck RM. 2009.** Mechanisms by which Bak and Bax permeabilise mitochondria during apoptosis. *J Cell Sci.* 122 (16): 2801-2808
- Diao L & Chen YG. 2007.** PTEN, a general negative regulator of cyclin D expression. *Cell Res.* 17: 291-292.
- Du L., Zhang X., Han YY., Burke NA., Kochanek PM., Watkins SC., Graham SH., Carcillo JA., Szabo C & Clark RS. 2003.** Intra mitochondrial poly (ADP- riosylation) contributes to NAD⁺ depletion and cell death induced by oxidative stress. *J. Biol. Chem.* 278: 18426-18433.
- Duval RE., Clarot I., Dumarçay-Charbonnier F., Fontanay S & Marsura A. 2012.** Interest of designed cyclodextrin tools in gene delivery. *Annales Pharmaceutiques Françaises.* 70(6): 360-369.

E

- Edinger AL & Thompson C. 2004.** Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Curr opinion cell biol.* 16: 663- 669
- El Kebir D & Filep JG. 2013.** Modulation of neutrophil apoptosis and the resolution of inflammation through $\beta 2$ Integrins. *Front Immunol.* 4: 60-75.
- Elmore S. 2007.** Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology*, 35:495-516

F

- Falschlehner C., Emmerich C.H., Gerlach B & Walczak H. 2007.** TRAIL signalling: Decisions between life and death. *Intern J Biochem & Cell Biol.* 39: 1462-1475
- Favier, A. 2003.** Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité Chimique.* 108-115.
- Feoktistova, M., Geserick, P., Kellert, B., Dimitrova, D.P., Langlais, C., Hupe, M., Cain, K., MacFarlane, M., Hacker, G & Leverkus, M. 2011.** cIAPs block Ripoptosome formation, a

RIP1/caspase-8 containing intracellular cell death complex differentially regulated by cFLIP isoforms. *Mol Cell*. 43, 449–463.

Ferrajoli A., Faderl S., Ravandi F & Estrov Z. 2006. The JAK-STAT pathway: a therapeutic target in hematological malignancies. *Curr Cancer Drug Targets*. 6(8):671-679.

Ferraro D., Corso S., Fasano E., Panieri E., Santangelo R., Borrello S., Giordano S., Pani G & Galeotti T. 2006. Pro-metastatic signaling by c-Met through RAC- 1 and reactive oxygen species (ROS). *Oncogene*. 25: 3689-3698.

Fink AL & Cookson BT. 2005. Apoptosis, Pyroptosis, and Necrosis: Mechanistic Description of Dead and Dying Eukaryotic Cells. *Infection and immunity*. 73(4): 1907–1916.

Finlay B & Hancock R. 2004. Can innate immunity be enhanced to treat microbial infection? *Nature Reviews Microbiology*. 2: 497-504

Finnin M., Hamilton JA & Moss ST. 1999. Characterization of a CSF-induced proliferating subpopulation of human peripheral blood monocytes by surface marker expression and cytokine production. *J. Leukoc. Biol*. 66: 953–960.

Fischer U, Janicke RU & Schulze-Osthoff K. 2003. Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death Differ*. 10:76-100.

Fontan E., Traincard F., Levy S. G., Yamaoka S., Véron M & Agou F. 2007. NEMO oligomerization in the dynamic assembly of the I κ B kinase core complex. *FEBS J*. 274, 2540-2551.

Freeman HJ. 2008. Colorectal cancer risk in crohn's disease. *World J Gastroenterol*. 14(12): 1810-1811

Freire MO & Van Dyke TE. 2013. Natural resolution of inflammation. *Periodontol*. 63(1):149-64.

Fridman JS & Lowe SW. 2003. Control of apoptosis by 53. *Oncog*. 22: 9030-9040

Fu LL., Zhou CC., Yao S., Yu JY., Liu B & Bao JK. 2011. Plant lectins: Targeting programmed cell death pathways as antitumor agents. *The International journal of Biochemistry and cell biology*. 43: 1442-1449.

Fuentes-Prior P & Salvesen GS. 2004. The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition. *Biochem J.* 384:201-32.

Fulda S & Vucic D. 2012. Targeting IAP proteins for therapeutic intervention in cancer. *Nat Rev Drug discov.* 11(2):109-124

Fulda S. 2009. Caspase-8 in cancer biology and therapy. *Cancer Lett.* 28: 281(2):128-33

G

Galluzi L, Kepp O & Kromer G. 2009. RIP kinases initiate programmed necrosis. *J Mol Cell Biol.* 1: 8-10.

Ganey PE & Roth, RA. 2001. Concurrent inflammation as a determinant of susceptibility to toxicity from xenobiotic agents. *Toxicology.* 169, 195–208.

Garside H., Stevens A., Farrow S., Normand C., Houle B., Berry A., Maschera B & Ray D. 2004. Glucocorticoid ligands specify different interactions withNF-KB by allosteric effects on the glucocorticoid receptor DNA binding domain. *The journal of Biol chem.* 279(48): 50050–50059

Gasco M., Shauni & Crook T. 2002. The P53 pathway in breast cancer. *Breast Cancer Res.* 4: 70-76.

Ghavami S., Hashemi M., Ande SR., Yeganeh B., Xiao W., Eshraghi M., Bus C J., Kadkhoda K., Wiechec E., Halayko AJ & Los M. 2009. Apoptosis and cancer: mutations within caspase genes. *J Med Genet.* 46 :497–510

Gloire G., Dejardin E. & Piette J. 2006. Extending the nuclear roles of IκB kinase subunits. *Biochemical Pharmacology,* 72, 1081-1089.

Golan-Goldhirsh A & Copas. 2014. Plant derived inhibitors of NF-κB. *Phytochem Rev.* 13:107–121

Golias C., Tsoutsi E., Matziridis A., Makridis P., Batistatou A., Charalabopoulos K. 2007. Review. Leukocyte and endothelial cell adhesion molecules in inflammation focusing on inflammatory heart disease. *In Vivo.* 21(5):757-69.

- Gonda TA., Tu S., Wang TC. 2009.** Chronic inflammation, the tumor microenvironment and carcinogenesis. *Cell Cycle*. 1(8): 2005-2013
- Gossiau A & Chen K Y. 2004.** Nutraceuticals, apoptosis and disease prevention. *Nutr.* 20: 95-102.
- Grivennikov SI., Greten FR & Karin M. 2010.** Immunity, inflammation and cancer. *Cell*, 140(6): 883-899.
- Groeneveld PH., Erich T & Kraal G. 1986.** The differential effects of bacterial lipopolysaccharide (LPS) on splenic non-lymphoid cells demonstrated by monoclonal antibodies. *Immunology*.58(2):285–290.
- Gruys E, Toussaint MJ., Niewold TA & Koopmans SJ. 2005.** Acute phase reaction and acute phase proteins. *J Zhejiang Univ Sci B*.11:1045-1056.
- Gupta SC, Sundaram C, Reuter S & Aggarwal BB. 2010.** Inhibiting NF- κ B activation by small molecules as therapeutic strategy. *Biochim Biophys Acta*. 1799:775–787
- Gurova KV & Gudkov AV. 2003.** Paradoxical role of apoptosis in tumor progression. *J Cell Biochem*. 88(1): 128-137.
- Gurova KV, Kwek SS, Koman IE, Komarov AP, Kandel E, Nikiforov MA & Gudkov AV. 2002.** Apoptosis inhibitor as suppressor of tumor progression: expression of Bcl2 eliminates selective advantages for p53 deficient cells in the tumor. *Cancer Biol Ther*. 1(1): 39-44.
- Gustin JA., Maehama T., Dixon JE & Donner DB. 2001.** The PTEN tumor suppressor protein inhibits TNF induced NF-KB activity. *J. Biol. Chem*. 276. 27740- 27744.

H

- Haas TL., Emmerich CH., Gerlach B., Schmukle AC., Cordier SM., Rieser E., Feltham R., Vince J., Warnken U & Wenger T. 2009.** Recruitment of the linear ubiquitin chain assembly complex stabilizes the TNF-R1 signaling complex and is required for TNF-mediated gene induction. *Mol Cell*.36, 831–844.
- Habraken Y & Piette J. 2006.** NF- κ B activation by double-strand breaks. *Biochem Pharmacol*, 72, 1132-1141
- Ham D., Caouras V., Radzioch D & F. Gervais F. 1997.** Degradation of amyloid A precursor protein SAA by macrophage cell lines obtained from amyloid resistant and susceptible of mice. *Scand. J. Immunol*. 45, 354-360.

- Hamann L., Alexander C., Stamme C., Zähringer U., Schumann RR. 2005.** Acute- phase concentrations of lipopolysaccharide (LPS)-binding protein inhibit innate immune cell activation by different LPS chemotypes via different mechanisms. *Infection and Immunity*, 73, 193–200.
- Han J., Zhong CQ & Zhang DW. 2011.** Programmed necrosis: backup to and competitor with apoptosis in the immune system. *Nat Immunol.* 12: 1143–1149.
- Hanahan D & Weinberg RA. 2000.** The Hallmarks of Cancer. *Cell*, 100: 57–70
- Hanahan D., Robert A & Weinberg RA. 2011.** Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144: 246-274
- Hayden MS & Ghosh S. 2004.** Signaling to NF- κ B. *Genes & Dev.* (18): 2195-2224.
- Hayden MS & Ghosh S. 2008.** Shared principles in NF-KB signaling. *Cell.*132(3):344-362.
- He S., Wang L., Miao L., Wang T., Du F., Zhao L & Wang X. 2009.** Receptor interacting protein kinase -3 determines cellular necrotic response to TNF α . *Cell.* 137: 1100-1111.
- Hildeman DA., Mitchell T., Aronow B., Wojciechowski S & Kappler J. 2003.** Control of BCL2 expression by reactive oxygen species. *PNAS.* 100 (25): 15035-1504
- Hiura TS, Kaszubowski MP, Li N & Nel AE. 1999.** Chemicals in diesel exhaust particles generate reactive oxygen radicals and induce apoptosis in macrophages. *J Immunol.*163, 5582-5591.
- Hockenbery, DM., Oltvai, ZN., Yin, XM., Milliman, CL. & Korsmeyer, SJ. 1993.** BCL2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell*, (75): 241–251.
- Hoffmann A & Baltimore D. 2006.** Circuitry of nuclear factor kappa B. *Immunol Rev.* 210: 171-186
- Holdt SL & Kraan S. 2011.** Bioactive compounds in seaweed: functional food applications and legislation. *J Appl Phycol.* 23:543–597
- Hong JH., Kim MJ., Park MR., Kwag OG., Lee IS., Byun BH., Lee SC., Lee KB & Rhee SJ. 2004.** Effects of vitamin E on oxidative stress and membrane fluidity in brain of streptozotocin-induced diabetic rats. *Clin Chim Acta.* 340: 107-115.
- Hong JW, Yang GE, Kim YB, Eom SH, Lew JH & Kang H. 2012.** Anti-inflammatory activity of cinnamon water extract in vivo and in vitro LPS-induced models. *BMC Complement Altern Med.* 28;212:237

- Hosaka N., Ito M., Taki Y., Iwai H., Toki J., Ikehara S. 2003.** Amyloid A gastrointestinal amyloidosis associated with idiopathic retroperitoneal fibrosis. *Am J Pathol Lab Med*, 127: 735-738.
- Hosgood HD, Au WY, Kim HN, Liu J, Hu W, Tse J, Song B, Wong KF, Lee JJ, Chanock SJ, Siu LP, Purdue MP, Shin MH, Yu J, Liang R, Kim HJ, Rothman N, Lan Q. 2013.** IL10 and TNF variants and risk of non-Hodgkin lymphoma among three Asian populations. *Int J Hematol.* 97(9): 793-799.
- Hubbard SR & Till JH. 2000.** Protein tyrosine kinase structure and function. *Annu. Rev. Biochem.* 69:373–398
- Hulbert AJ. 2005.** On the importance of fatty acid composition of membranes for aging. *J Theor Biol.* 234, 277-288.
- Hussain S.P, Hofseth LJ & Curtis C. Harris CC. 2003.** Radical causes of cancer. *Nat. Rev. Cancer.* 3: 276-285.
- Hwang IY., Pak C., Harisson K & Kehl. 2009.** TLR4 signaling augments B lymphocyte migration and overcomes the restriction that limits access to germinal center dark zones. *J. Exp. Med.* 206: 2641–2657

I

- Ignácio SR., Ferreira JL., Almeida MB & Kubelka CF. 2001.** Nitric oxide production by murine peritoneal macrophages in vitro and in vivo treated with *Phyllanthus tenellus* extracts. *J Ethnopharmacol.* 74(2):181-7.
- Itoh K., Udagawa N., Kobayashi K., Suda K., Li X., Takami M., Okahashi N., Nishihara T., Takahashi N. 2003.** Lipopolysaccharide promotes the survival of osteoclasts via Toll-like receptor 4, but cytokine production of osteoclasts in response to lipopolysaccharide is different from that of macrophages. *J. Immunol.*, 170 : 3688–3695

Iwalewa EO., McGaw LJ., Naidoo V & Eloff JN. 2007. Inflammation: the foundation of diseases and disorders. A review of phytochemicals of South African origin used to treat pain and inflammatory conditions. *Afr. J. Biotechnol.* 6 (25): 2868-2885

J

Jaeschke H. 2006. Mechanisms of liver injury: Mechanisms of neutrophil-induced liver cell injury during hepatic ischemia-reperfusion and other acute inflammatory conditions. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 290, G1083–G1088.

Jahreiss L, Menzies FM & Rubinsztein DC. 2008. The itinerary of autophagosomes: from peripheral formation to kiss-and-run fusion with lysosomes. *Traffic.* 9: 574-587.

Janakiram NB & Rao CV. 2009. Role of lipoxins and resolvins as anti inflammatory and proresolving mediators in colon cancer. *Curr Mol Med.* 9(5):565-79.

Janicka M., Kot Wasik., Kot J., Namieśnik J. 2010. Isoprostanes-biomarkers of lipid peroxidation: their utility in evaluating oxidative stress and analysis. *Int. J. Mol. Sci.* 11: 4631-4659

Janku F., Tsimberidou AM., Garrido-Laguna I., Wang X, Luthra R., Hong DS., Naing A, Falchook GS, John W. Moroney JW., Piha-Paul SA, Wheler JJ, Moulder SL., Fu S. & Kurzrock R. 2011. PIK3CA mutations in patients with advanced cancers treated with PI3K/AKT/mTOR Axis Inhibitors. *Mol Cancer Ther.* 10 (3); 558–565.

Jay SM., Skokos EA., Zeng J., Knox K & Kyriakides TR. 2010. Macrophage fusion leading to foreign body giant cell formation persists under phagocytic stimulation by microspheres in *in vitro* and *in vivo* in mouse models. *J Biomed Mater Res.* 93(1): 189–199.

Jesenberger V & Jentsch S. 2002. Deadly encounter: ubiquitin meets apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 3: 112-121

Jin S., Dipaola RS., Mathew R & White E. 2007. Metabolic catastrophe as a means to cancer cell death. *J cell Sci.* 120(3): 379-383.

- Jirillo E., Caccavo D., Magrone T., Piccigallo E., Amati L., Lembo A., Kalis C., Gumenscheimer M. 2002.** The role of the liver in the response to LPS: experimental and clinical findings. *J Endotoxin Res.* 8(5):319-27.
- Jost PJ., Grabow S., Gray D., McKenzie MD., Nachbur U., Huang DC. 2009.** XIAP discriminates between type I and type II FAS-induced apoptosis. *Nat.* 460: 1035–1039.
- Joza N., Pospisilik JA., Hangen E., Hanada T., Modjtahedi N., Penninger JM & Kroemer G. 2009.** AIF: not just an apoptosis-inducing factor. *Ann N Y Acad Sci.* 1171:2-11
- Jung H., Seong HA & Ha H. 2008.** Critical role of cysteine residue 81 of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in induced inhibition of P53. *J. Biochem. Chem.* 283: 20383-20396.

K

- Kaiser WJ., Upton JW., Long AB., Livingston-Rosanoff D., Daley-Bauer LP., Hakem R., Caspary T & Mocarski ES. 2011.** RIP3 mediates the embryonic lethality of caspase-8-deficient mice. *Nat.* 471: 368–372.
- Kannan, K & Jain, S. K. 2000.** Oxidative stress and apoptosis. *Pathophysiology.* 7, 153–163.
- Karhausen J., Qing M., Gibson A., Moeser AJ., Griefingholt H., Hale LP., Abraham SN & Mackensen GB. 2013.** Intestinal mast cells mediate gut injury and systemic inflammation in a rat model of deep hypothermic circulatory arrest. *Crit Care Med.* 41(9): 200-210.
- Kaufmann T., Strasser A & Jost PJ. 2012. Fas death receptor signalling: roles of Bid and XIAP. *Cell Death and Differ.* 19, 42–50. Kawai T & Akira S. 2010. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol.* 11(5):373-84
- Kazak L., Reyes A & Holt IJ. 2012.** Minimizing the damage: repair pathways keep mitochondrial DNA intact. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 13: 659-671
- Kerr J.F., Wyllie AH. & Currie AR. 1972.** Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer,* 26, 239-57.

- Khandhadia S & Lotery A. 2010.** Oxidation and age-related macular degeneration: insights from molecular biology. *Expert Rev Mol Med.* 20: 12-34.
- Khil LY., Kim W., Lyu S., Park WB., Yoom JW & Jun HS. 2007.** Mechanism involved in Korean mistletoe lectin- induced apoptosis of cancer cells. *World Gastroenterol.* 13: 2811-2818.
- Kim JJ., Lee SB, Park JK & Yoo YD. 2010.** TNF- α -induced ROS production triggering apoptosis is directly linked to Romo1 and Bcl-X_L. *Cell Death and Differentiation.* 17, 1420–1434.
- Kim YS, Morgan MJ, Choksi S & Liu ZG. 2007.** TNF-induced activation of the Nox1 NADPH oxidase and its role in the induction of necrotic cell death. *Mol Cell.* 26:675–687.
- Kimberly MC. 2010.** Genetic control of necrosis – another type of programmed cell Death. *Curr Opin Cell Biol.* 22(6): 882–888.
- Kimura S., Noda T & Yoshimori T. 2008.** Dynein-dependent movement of autophagosomes mediates efficient encounters with lysosomes. *Cell Struct Funct.* 33: 109- 122.
- Kirshenbaum LA. 2012** Regulation of autophagy in the heart in health and disease. *J. Cardiovasc Pharmacol.* 60:109
- Klaunig JE., Xu Y., Isenberg JS., Bachowski S., Kolaja KL., Jiang J., Stevenson DE & Walborg EF. 1998.** The role of oxidative stress in chemical carcinogenesis. *Environ Health Perspect.* 106 (Suppl 1): 289–295.
- Klaunig JE & Kamendulis LM. 2004.** The role of oxidative stress in carcinogenesis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 44: 239-267.
- Knapp S., Florquin S., Golenbock DT., Van der Poll T. 2006.** Pulmonary lipopolysaccharide (LPS)-binding protein inhibits the LPS-induced lung inflammation *in vivo*. *Journal of Immunology* 176: 3189–3195.
- Kobayashi M., Tsujitani S., Kurisu Y & Kaibara N. 2002.** Bcl-2 and Bax expression for hepatocellular apoptosis in a murine endotoxin shock model. *Hepatogastroenterology* 49:1602–1606

- Kolaczowska E, Kubes P. 2013.** Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol.* 13(3):159-75
- Kopjar, M., Piližota, V., Hribar, J., Simčič, M. 2009.** Total phenol content and antioxidant activity of water solutions of plant extracts, *Croat. J. Food Sci. Technol.* 1 (1): 1-7.
- Krajewski S., Krajwska M., Shabaik A., Wang HG., Irie S., Fong L. & Reed JC. 1994.** Immunohistochemical analysis of in vivo patterns of BCLX expression. *Cancer Res*, (54): 5501-5507.
- Kroemer G & Wu H. 2002.** DNA binding is required for the apoptogenic action of apoptosis inducing factor. *Nat Struct Biol.* 9 (9): 680-4.
- Kroemer G, Marino G & Levine B. 2010.** Autophagy and the integrated stress response. *Mol Cell* 40 : 280-293.
- Kroemer G., Galluzzi L., Vandenabeele P., Abrams J., Alnemri ES., Baehrecke EH., Blagosklonny MV., El-Deiry WS., Golstein P., Green DR., Hengartner M., Knight RA., Kumar S., Lipton SA., Malorni W., Nunez G., Peter ME., Tschopp J., Yuan J., Piacentini M., Zhivotovsky B & Melino. 2009.** Classification of cell death. *Cell Death Differ*, 16(1): 3–11.
- Kroemer, G. 2003.** Mitochondrial control of apoptosis: an introduction. *Biochem Biophys Res Commun.* 304 (3): 433-5.
- Kryston T.B., Georgiev AB., Pissis P & Georgakilas AG. 2011.** Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis. *Mutat Res.* 3:(711): 193-201.
- Kumar S. 2007.** Caspase function in programmed cell death. *Cell Death and Differ.* 14: 32-43.
- Küçükboyacı N., Güvenç N., Turan NN., Aydın A. 2012.** Antioxidant activity and total phenolic content of aqueous extract from raphanus raphanistrum. *Turk J. Pharm. Sci.* 9 (1), 93-100,201.
- Kobayashi M., Tsuijitan S., Kurisu Y & Kaibara N. 2002.** Bcl-2 and Bax expression for hepatocellular apoptosis in a murine endotoxin shock model. *Hepatogastroenterology* 49:1602–1606

L

- Lamkanfi M., Festjens N., Declercq W., Vanden Berghe T & Vandenamee P. 2007.** Caspases in cell survival, proliferation and differentiation. *Cell Death and Differ.* 14, 44–55.
- Latz E., Xiao TS & Stutz. 2013.** Activation and regulation of the inflammasome. *Nat Rev Immunol.* 13: 397-411.
- Lauring J., Park BH & Wolff AC. 2013.** The phosphoinositide-3-kinase-Akt-mTOR pathway as a therapeutic target in breast cancer. *J Natl Compr Canc Netw.* 1;11(6):670-678.
- Lavrik I., Golks A & Krammer P. 2005.** Death receptor signaling. *Journal of cell science.* 118: 265-267.
- Lavrik IN & Krammer PH. 2012.** Regulation of CD95/Fas signaling at the DISC. *Cell Death Differ.* 19, 36–41
- Lavrik IN., Golks A., Krammer PH. 2005.** Death receptor signaling. *J Cell Sci.* 118: 265-267
- Lee DJ & Kang SW. 2013.** Reactive oxygen species and tumor metastasis. *Mol. Cells,* 35(2): 93-98.
- Lee S, Choi E J, Jin C & Kim D H. 2005.** Activation of PI3K/Akt pathway by PTEN reduction and PIK3CA mRNA amplification contributes to cisplatin resistance in an ovarian cancer cell line. *Gynecol Oncol.* 97: 26-34.
- Lee YR., Yu HN., Noh EM., Youn HJ., Song EK., Han MK., Park CS., Kim BS., Park YS., Park BK., Lee SH., Kim JS. 2007.** TNF-alpha upregulates PTEN via NF-kappaB signaling pathways in human leukemic cells. *Exp Mol Med.* 28; 39(1):121-
- Li, H. L., Chen, D. D., Li, X. H., Zhang, H. W., Lü, Y. Q., Ye, C. L., and Ren, X. D. 2003.** Changes of NF-kB, p53, Bcl-2 and caspase in apoptosis induced by JTE-522 in human gastric adenocarcinoma cell line AGS cells: role of reactive oxygen species. *World j of Gastroentrol.* 8(3), 431-5.
- Levine B. 2005.** Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin1-dependent autophagy. *Cell.* 122: 927-939.

- Levine B & Kroemer G. 2008.** Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell*.132:27-42.
- Levine M., Padayatty SJ & Graham Espey M. 2011.** Vitamin C: A Concentration function approach yields pharmacology and therapeutic discoveries. *Adv. Nutr.* 2: 78–88
- Li C, Yang Z, Zhai C, Qiu W, Li D, Yi Z, Wang L, Tang J, Qian M, Luo J & Liu M. 2010.** Maslinic acid potentiates the anti-tumor activity of tumor necrosis factor α by inhibiting NF- κ B signaling pathway. *Mol Cancer*, 9:73.
- Li J, Yen C, Liaw D, Podsypanina K, Bose S, Wang SI, Puc J, Miliarensis C, Rodgers L, McCombie R, Bigner SH, Giovanella BC, Ittmann M, Tycko B, Hibshoosh H, Wigler MH, Parsons R. 1997.** PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Sci.* 28;275 (5308):1943-7
- Li M & Beg AA. 2000.** Induction of necrotic like cell death by tumor necrosis factor α and caspase inhibitors: novel mechanism for killing virus infected cells. *J virol.* 74: 7470-7477.
- Li N., Grivennikov SI & Karin M. 2011.** The unholy trinity: inflammation, cytokines, and STAT3 shape the cancer microenvironment. *Cancer Cell*.19:429–31.
- Li WW., Li J & Bao JK. 2012.** Microautophagy: lesser-known self-eating. *Cell Mol Life Sci.* 69: 1125-1136.
- Li, D. M. & H. Sun,1997.**TEP1, encoded by a candidate tumor suppressor locus, is a novel protein tyrosine phosphatase regulated by transforming growth factor beta. *Cancer Res.* 57(11): 2124-9.
- Li, H. L., Chen, D. D., Li, X. H., Zhang, H. W., Lü, Y. Q., Ye, C. L & Ren, X. D. 2003.** Changes of NF- κ B, p53, Bcl-2 and caspase in apoptosis induced by JTE-522 in human gastric adenocarcinoma cell line AGS cells: role of reactive oxygen species. *World j of Gastroentrol.* 8(3), 431-5.
- Lichtman SN., Wang J & Lemasters JJ. 1998.** Lipopolysaccharide-stimulated TNF- α release from cultured rat Kupffer cells: sequence of intracellular signaling pathways. *J Leukoc Biol.* 64(3):368-72
- Lin WW & Karin M. 2007.** A cytokine mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. *J clin invest.* 117(5): 1175-1183.

- Locksley RM., Killeen N & Lenardo M.J. 2001.** The TNF and TNF receptor superfamilies: Integrating mammalian biology. *Cell*, 104, 487–501.
- Logue SE. & Martin SJ., 2008.** Caspase activation cascades in apoptosis. *Biochem. Soc. Trans.* 36: 1–9.
- Lu W., Ogasawara, MA & Huang P. 2007.** Models of reactive oxygen species in cancer. *Drug Discov.* 4: 67–73.
- Lünemann JD & Münz C. 2009.** Autophagy in CD4⁺ T-cell immunity and tolerance. *Cell Death Differ.* 16, 79–86.
- Lyu SY., Choi SH., ParK WB. 2002.** Korean mistletoe lectin induced apoptosis in hepatocarcinoma cells is associated with inhibition telomerase via mitochondrial controlled pathway independent of P53. *Arch. Pharm. Res.* 25: 93-101.

M

- Ma JF, Huang Y, Chen SD, Halliday G. 2010.** Immunohistochemical evidence for macroautophagy in neurones and endothelial cells in Alzheimer's disease. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 36:312-319.
- Madonna G, Ullman D, Gentilcore G, Palmieri G & Ascierto PA. 2012.** NF-κB as potencial target in the treatmnt of melanoma. *J Transl Med.* 10:53
- Maiti TK & Tripathi S. 2003.** Stimulation of murine macrophages by native and heat denaturated lectin from *Abrus precatorius*. *International Immunopharmacology.* 3(3): 375-381.
- Mannel DN, Becker H, Gundlt A, Kist A & Franz H. 1991.** Induction of tumor necrosis factor expression by a lectin from *Viscum album*. *Cancer Immunol Immunother:* 33: 177-182.
- Mantovani A., Allavena P., Sica A & Balkwill F. 2008.** Cancer related inflammation. *Nat*, 454 (7203): 436-444.
- Marnett LI., 2002.** Oxy radicals, lipid peroxidation and DNA damage. *Toxicology.* 182: 219- 222
- Marnett LJ. 1999.** Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. *Mutat Res.* 424, 83-95.
- Martin-Belmonte F, Gassama A, Datta A, Yu W, Rescher U, Gerke V & Mostov K. 2007.** PTEN-mediated apical segregation of phosphoinositides controls epithelial morphogenesis through Cdc42. *Cell.* (128): 383-397.

- Martoja R & Martoja Pierson M. 1967.** Initiation aux techniques de l'histologie. Elsevier Masson édition.
- Maskrey BH., Megson IL., Whitfield PD & Rossi AG. 2011.** Mechanisms of resolution of inflammation. A focus on cardiovascular disease. *Arterioscler, Thromb, Vasc Biol.* 31: 1001-1006.
- Maurya S & Singh D.** In vitro callus culture of adhatoda vasica: a medicinal plant. *Annals of Biological Research*, 2010, 1 (4): 57-60.
- McEligot AJ., Yang S & Meyskens F. 2005.** Redox regulation by intrinsic species and extrinsic nutrients in normal and cancer cells. *Annu. Rev. Nutr.* 25: 261–295.
- McNally AK & Anderson JM. 2011.** Macrophage fusion and multinucleated giant cells of inflammation. *Advances in Experimental Medicine and Biology.* 713: 97-111
- Medzhitov R. 2008.** Origin and physiological roles of inflammation. *Nat.* 454: 428–435.
- Melamede R. 2005.** Cannabis and tobacco smoke are not equally carcinogenic. *Harm Reduction Journal* 2005, 2:21
- Michie HR., Manogue KR., Spriggs DR., Revhaug A., O'Dwyer S., Dinarello CA., Cerami A., Wolff SM & Wilmore DW. 1988.** Detection of circulating tumor necrosis factor after endotoxin administration. *N Engl J Med.* 318(23):1481-6
- Mimica-Dukić N., Simin N., Svirčev E., Orčić D., Beara I., Lesjak M & Božin B. 2012.** The effect of plant secondary metabolites on lipid peroxidation and eicosanoid pathway. In "*Lipid Peroxidation*", book edited by *Angel Catala*, ISBN 978-953-51-0716-3
- Mizushima N, Yoshimori T & Ohsumi Y. 2011.** The role of Atg proteins in autophagosome formation. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 27, 107-32
- Modjtahedi N., Giordanetto F., Madeo F & Kroemer G. 2006.** Apoptosis-inducing factor: vital and lethal. *Trends Cell Biol.* 16(5): 264-72.
- Monzawa S, Tsukamoto T, Omata K, Hosoda K, Araki T, Sugimura K. 2002.** A case with primary amyloidosis of the liver and spleen: radiologic findings. *Eur J Radiol*, 41: 237-241.
- Morgan MJ & Liu ZG. 2011.** Crosstalk of reactive oxygen species and NF-κB signaling. *Cell Res.* 21(1): 103–115.

- Morgan MJ, Kim YS & Liu ZG. 2008.** TNF alpha and reactive oxygen species in necrotic cell death. *Cell Res.*18: 343–349.
- Mosman T. 1983.** Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application for proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*, (65):55-63.
- Mosser DM. 2003.** The many faces of macrophage activation. *Journal of Leukocyte Biology*. 73, 209–212.
- Muller P A. & Vousden KH. 2013.** P53 mutation in cancer. *Nat cell biol.* 15: 2-8.
- Musa KH., Abdullah A., Kuswandi B & Amrun Hidayat M. 2013.** A novel high throughput method based on the DPPH dry reagent array for determination of antioxidant activity. *Food.chem.* 441: 4102-4106.

N

- Nagaraj NS, Vigneswaran N, Zacharias W. 2006.** Cathepsin B mediates TRAIL induced apoptosis in oral cancer cells. *J Cancer Res Clin Oncol*, 132:171-83.
- Nathan, C. 2002.** Points of control in inflammation. *Nat*, 420: 846–852.
- Neri S., Mariani E., Meneghetti A., Cattini L & Facchini A. 2001.** Calcein acetyoxymethyl cytotoxicity assay: standardization of a method allowing additional analyses on recovered effector cells and supernatants. *Clin Diagn Lab Immunol.* 8(6): 1131–1135.
- Nishikori M. 2005.** Classical and alternative NF-KB activation pathways and their role in lymphoid malignancies. *J.Clin.Exp.Hematopathol.* 45(1):15-24
- Norberg E, Orrenius S & Zhivotovsky B. 2010.** Mitochondrial regulation of cell death: processing of apoptosis-inducing factor (AIF). *Biochem Biophys Res Commun.* 21: 396(1):95-100.
- Nowak SJ & Corces, VG. 2004.** Phosphorylation of histone H3: a balancing act between chromosome condensation and transcriptional activation. *Trends Genet.* 20:214–220

O

- Obeid E., Nanda R., Fu YX., Olopade OI. 2013.** The role of tumor-associated macrophages in breast cancer progression (review). *Int J Oncol.* 43(1):5-12.

- Oberst A., Dillon CP., Weinlich R., McCormick LL., Fitzgerald P., Pop C., Hakem, R., Salvesen GS & Green DR. 2011.** Catalytic activity of the caspase-8-FLIP (L) complex inhibits RIPK3-dependent necrosis. *Nat.* 471: 363–367.
- O'Brien S, Moore JO, Boyd TE, Larratt LM, Skotnicki A, Koziner B, , Chanan-Khan AA, Seymour JF, Bociak RG, Pavletic S, Rai KR. 2007.** Randomized phase III trial of fludarabine plus cyclophosphamide with or without oblimersen sodium (Bcl-2 antisense) in patients with relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol*, 25:1114–20.
- Oeckinghaus A., Hayden MS & Ghosh S. 2011.** Crosstalk in NF- κ B signaling pathways. *Nat. Immunol.* 12, 695–708
- Ohyama T., Shimokama T., Yoshikawa Y & Watanabe T. 1990.** Splenic amyloidosis: correlations between chemical types of amyloid protein and morphological features. *Mod Pathol.* 3(4):419-22.
- Okumura N., Yoshida H., Y Kitagishi., Y Nishimura & S Matsuda. 2011.** Alternative splicings on p53, BRCA1 and PTEN genes involved in breast cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 413: 395–399.
- Olofsson M.H, Ueno T & Pan Y. 2007.** Cytokeratin-18 is a useful serum biomarker for early determination of response of breast carcinomas to chemotherapy. *Clin Cancer Res.* 13: 3198–3206.
- Olopade OI., Adeyanju MO., Safa AR., Hogos F., Mivk R., Thompson CB. & Recant WM. 1997.** Overexpression of BCLX protein in primary breast cancer is associated with high tumor grade and nodal metastases. *Cancer J. Sc. Am.* (3): 230-237.
- O'Neill L .A.J., Golenbock D & Bowie AG. 2013.** The history of Toll-like receptors - redefining innate immunity. *Nat Rev Immunol.* 13: 453-460
- Oosten MV., Bilt EV., Berkel TJC & Kuiper J. 1998.** New Scavenger Receptor-Like Receptors for the Binding of Lipopolysaccharide to Liver Endothelial and Kupffer Cells. *Infect. Immun.* 66 (11): 5107-5112.
- Organ MJ., Kim YS & Liu ZG. 2008.** TNF alpha and reactive oxygen species in necrotic cell death. *Cell Res.* 18: 343–349.

- Ortega-Gómez A., Perretti M & Soehnlein O. 2013.** Resolution of inflammation: an integrated view. *EMBO Mol Med.* 5(5): 661-674.
- Osborn SL., Diehl G., Han SJ., Xue L., Kurd N., Hsieh K., Cado D., Robey EA & Winoto A. 2010.** Fas associated death domain (FADD) is a negative regulator of T cell receptor mediated necroptosis. *Proc Natl Acad Sci.* 107: 13034-13039.
- Ouyang L., Shi Z., Zhao S., Wang FT., Zhou T., Liu B & Bao JK. 2012.** Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. *Cell Prolif.* 45: 487-498
- Ow YP., Green DR., Hao Z & Mak TW. 2008.** Cytochrome c: functions beyond respiration. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 532-542.
- Owczarek L., Jasińska U., Osińska M., Skpska S. 2004.** Uices and beverages with a controlled phenolic content and antioxidant capacity . *Pol. J. Food Nutr. Sci.* 54 (3):261 268.
- Oyadomari S, Araki E & Mori M. 2002.** Endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis in pancreatic beta-cells. *Apoptosis.* 7:335-45.
- Oyaizu M. 1986.** Studies on products of browning reaction: Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Jpn J Nutr,*44: 307 – 315.
- Ozogul y., Ozygul F. & Olgunoglu A. 2004.** Fatty acid profile and mineral content of wild snail *Helix pomatia* from the region of south of the turkey. *Eur. Food. Res.Technol.* (221): 547-549.

P

- Pamplona R., Portero-Otin M., Ruiz C., Gredilla R., Herrero A & Barja G. 2000.** Double bond content of phospholipids and lipid peroxidation negatively correlate with maximum longevity in the heart of mammals. *Mech Ageing Dev.* 112:169-183.
- Parant J.M & Lozano G. 2003.** Disrupting TP53 in mouse models of human cancers. *Hum Mutat.* 21, 321-326.
- Park EK, Jung HS, Yang HI, Yoo MC, Kim C & Kim KS. 2007.** Optimized THP-1 differentiation is required for the detection of responses to weak stimuli. *Inflamm Res.* 56(1):45-50
- Park HH. 2001.** Structural analyses of death domains and their interactions. *Apoptosis.* 16:209-220

- Park HJ & Pyo S. 2013.** LPS-induced autophagy is mediated by nitric oxide in macrophages (P1285). *The Journal of Immunology*. 190: 56.25.
- Pator DM, Irby RB & Poritz LS. 2010.** Tumor necrosis factor alpha induces p53 up regulated of apoptosis expression in colorectal cancer cell lines. *Dis Colon Rectum*. 53 (3): 257-263
- Pattingre S, Tassa A, Qu X, Garuti R, Liang XH, Mizushima N, Packer M, Schneider MD & Levine. 2005.** Bcl2 anti apoptotic proteins inhibit Beclin 1- dependent autophagy. *Cell*. 23:122(6): 927-939.
- Pennarun B., Meijer A., De Vries E G E., Kleibeuker JH., Kruyt F., De Jong S. 2010.** Playing the DISC: Turning on TRAIL death receptor-mediated apoptosis in cancer. *Biochim et Biophys Acta*. 1805 (2): 123-140
- Periyasamy-Thandavan S., Jiang M., Schoenlein P & Dong Z. 2009.** Autophagy: molecular machinery, regulation, and implications for renal pathophysiology. *Am J Physiol Renal Physiol*. 297: 244- 256.
- Pervaiz S & Clement, M V. 2004.** Tumor intracellular redox status and drug resistance serendipity or a causal relationship? *Curr. Pharm. Des.* 10:1969–1977.
- Petros AM., Olejniczak ET. & Fesik SW. 2004.** Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. *Biochim Biophys Acta*. 1;1644(2-3):83-94
- Pietsch E C., Sykes S M , McMahon S B & Murphy M E. 2008.** The p53 family and programmed cell death. *Oncog.* 27: 6507–6521
- Pitocco D., Zaccardi F., Di Stasio E., Romitelli F., Santini SA., Zuppi C., Ghirlanda G. 2010.** Oxidative stress, nitric oxide, and diabetes. *Rev Diabet Stud*: 7(1):15-25.
- Portt L., Norman G., Clapp C., Greenwood M & Greenwood MT. 2011.** Anti-apoptosis and cell survival: A review. *Biochimica et Biophysica Acta* .1813: 238–259
- Proell M., Riedel SJ , Fritz JH , Rojas AM., Schwarzenbacher R. 2008.** The Nod-like receptor (NLR) family: a tale of similarities and differences. *PLoS One* .3:e2199
- Proskuryakov SY & Gabai VL. 2010.** Mechanism of tumor necrosis. *Curr pharm design*. 16:56-68.

Q

- Quatromoni JG & Eruslanov E. 2012.** Tumor-associated macrophages: function, phenotype, and link to prognosis in human lung cancer. *Am J Transl Res.* 4(4): 376–389.
- Quinin MT., Ammons MCB & Delleo FR. 2006.** The expanding role of NADPH oxidases in health and disease: no longer just agents of death and destruction *Clinical Science.* 111: 1–20.
- Qureshi AA., Guan XQ., Reis JC., Papasian CJ., Jabre S., Morrison DC & Qureshi N. 2012.** Inhibition of nitric oxide and inflammatory cytokines in LPS-stimulated murine macrophages by resveratrol, a potent proteasome inhibitor. *Lipids Health Dis.* 10:11:76.

R

- Rainard, P., 1986.** A colorimetric microassay for opsonins by reduction of NBT in phagocytosing bovine polymorphs. *Journal of Immunological. Methods.* 90: 197–201
- Rajasekaran A., Sivagnanam G & Xavier R. 2008.** Nutraceuticals as therapeutic agents *Research J. Pharm. and Tech.* 1(4): 328-340.
- Rajesh P., Rastogi R and Rajeshwar P.S. 2009.** Apoptosis: Molecular mechanisms and pathogenicity. *Experimental and clinical sciences journal.* 8: 155-181.
- Ralph C. Budd, Wen-Chen Yeh & Jürg Tschopp. 2006.** cFLIP regulation of lymphocyte activation and development. *Nature Reviews Immunology* 6, 196-204.
- Rambaruth NDS, Greenwell P & Dwek, MV. 2012.** The lectin Helix pomatia agglutinin recognizes O-GlcNAc containing glycoproteins in human breast cancer. *Glycobiology.* 22: 839–848.
- Ramnath V., Rekha P., Kuttan G & Kuttan R. 2009.** Regulation of caspase 3 and Bcl2 expression in Dalton's lymphoma ascites cells by abrin. *Evid Based Complement Alternat Med.* 6: 233-8.
- Reinehr R, Becker S, Eberle A, Grether-Beck S & Haussinger D. 2005.** Involvement of NADPH oxidase isoforms and Src family kinases in CD95-dependent hepatocyte apoptosis. *J Biol Chem.* 280: 27179–27194

- Ribble D., Goldstein NB., Norris DA & Shellman YG. 2005.** A simple technique for quantifying apoptosis in 96-well plates. *BMC Biotechnology*. 5(12): 1-7
- Riedl SJ & Shi Y. 2004.** Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Mol cell biol*. 5: 897-907.
- Riedl SJ & Salvesen GS. 2007.** The apoptosome: signalling platform of cell death. *Mol Cell Biol*. 8: 405-413
- Rieux-Laucat, F., Fischer A & Deist FL. 2003.** Cell-death signaling and human disease. *Curr Opin Immunol*. 15(3): 325-31.
- Roach JC., Glusman G., Rowen L., Kaur A., Purcell MK., Smith KD., Hood LE & Aderem A. 2005.** The evolution of vertebrate Toll-like receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102:9577–82
- Robinson JM. 2008.** Reactive oxygen species in phagocytic leukocytes. *Histochem Cell Biol*. 130(2): 281–297.
- Roessner A., Kuester D., Malfertheiner P & Schneider-Stock R. 2008.** Oxidative stress in ulcerative colitis-associated carcinogenesis. *Pathol Res Pract*: 204(7):511-24
- Ruberto G., Baratta MT., Deans SG & Dorman H J. 2000.** Antioxidant and antimicrobial activity of foeniculum vulgare and crithmum maritimum essential oils. *Planta Medica*, 66(8), 687–693.
- Ruch RJ., Cheng SJ & Klaunig J.E. 1989.** Prevention of cytotoxicity and inhibition of intercellular communication by antioxidant catechins isolated from Chinese green tea. *Carcinogenesis*, 1989, 10, 1003 – 1008.
- Rusten TE & Stenmark H. 2009.** How do ESCRT proteins control autophagy? *J Cell Sci*. 122: 2179-2183.

S

- Samejima, K., Tone S. & Earnshaw WC. 2001.** CAD/DFP40 nuclease is dispensable for high molecular weight DNA cleavage and stage I chromatin condensation in apoptosis. *J Biol Chem*. 276(48): 45427-45432.

- Sankari SL., Masthan KMK., Babu NA., Bhattacharjee T & Elumalai M. 2012.** Apoptosis in Cancer - An Update. *Asian Pacific J Cancer Prev*, 13 (10), 4873-4878.
- Sakon S, Xue X, Takekawa M, Sasazui T, Okazaki Kajima Y, Piao JH., Yagita, H., Okummura, K., Doi, T & Nakano, H. 2003.** NF-KB inhibits TNF induced accumulation of ROS that mediate prolonged MAPK activation and necrotic cell death. *EMBO journal*. 22(15): 3838-3909.
- Sano H., Hsu DK., Apagar JR., Yu L., Sharma BB., Kuwabara I., Izui S & Liu FT. 2003.** Critical role of galectin 3 in phagocytosis by macrophages. *J clin invest*. 112(3): 389-397.
- Sardinoux M., Raingeard I., Bessis D., Coupier I., Renard E., Bringer J. 2010.** Le syndrome de Cowden ou syndrome des hamartomes multiples en endocrinologie clinique. *Annal endocrino*. 4: 264-273.
- Sato SIS., Masuda., Satoh T & Suzuki K. 1997.** Immunohistochemical study of tumor necrosis factor-alpha in acute liver injury induced by *Propionibacterium acnes* and lipopolysaccharide in rats. *International Hepatology Communications*. 6(3-4): 197-190
- Scheidereit C. 2006.** IKappaB kinase complexes: gateways to NF-kappaB activation and transcription. *Oncogene*. 30: 25(51):6685-705.
- Schlotter C., Vogt U., Allgayer H. & Brandt B. 2008.** Molecular targeted therapies for breast cancer treatment. *Breast cancer research*, 10:211.
- Schumacker PT. 2006.** Reactive oxygen species in cancer cells: Live by the sword, die by the sword. *Cancer cell*, 10(3): 175-176.
- Sebban H., Yamaoka S. & Courtois G. 2006.** Posttranslational modifications of NEMO and its partners in NF-κB signaling. *Trends Cell Biol*. 16: 569-577.
- Segura E & Amigorena S. 2013.** Inflammatory dendritic cells in mice and humans. *Trends Immunol*. 34(9):440-445.
- Shambharkar P. B., Blonska M., Pappu B. P., Li H., You Y., Sakurai H., Darnay B. G., Hara H., Penninger J. and Lin X. 2007.** Phosphorylation and ubiquitination of the IκB kinase complex by two distinct signaling pathways. *The EMBO Journal*. 26: 1794-1805.
- Shen HM & Pervaiz S. 2006.** TNF receptor superfamily-induced cell death: redox-dependent execution. *FASEBJ*. 20: 1589-1598.

- Shen W H, Balajee A S, Wang J, Wu H, Eng C, Pandolfi P & Yin Y. 2007.** Essential role for nuclear PTEN in maintaining chromosomal integrity. *Cell*. 128: 157-170.
- Shinde1 A., Ganu J & Naik P. 2012.** Effect of free radicals & antioxidants on oxidative stress: A Review. *Journal of Dental & Allied Sciences*. 1(2):63-66
- Sies H., Stahl W & Sevanian A. 2005.** Nutritional, dietary and postprandial oxidative stress. *J. Nutr*. 135: 969–972.
- Singleton, VL., Orthofer R., Lamuela-Raventos, R.M. 1999.** Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol*. 299: 152-178.
- Skulachev VP. 2006.** Bioenergetic aspects of apoptosis, necrosis and mitoptosis. *Apoptosis*. 11(4): 473-485.
- Sneller MC. 2002.** Granuloma formation, implications for the pathogenesis of vasculitis. *Cleveland Clinic Journal Of Medicine*. 69(2): Suppl 2:SII40-3.
- Solt LA, Madge LA, May MJ. 2009.** NEMO-binding domains of both IKKalpha and IKKbeta regulate IkappaB kinase complex assembly and classical NF-kappaB activation. *J Biol Chem*. 284(40): 596-608.
- Sosa V., Moline T., Somoza R., Paciucci R., Kondoh H & Leonart MEL. 2013.** Oxydative stress and cancer: An overview. *Ageing Research Reviews*. 12(1): 376-390
- Speidel D., Helmbold H & Deppert W. 2006.** Dissection of transcriptional and non-transcriptional p53 activities in the response to genotoxic stress. *Oncog*. 25, 940–953
- Steck P. A., Pershouse M. A., Jasser S. A., Yung W. K., Lin H., Ligon A. H., Langford L. A., Baumgard M. L., Hattier T., Davis T. 1997.** Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers. *Nat. Genet*. 15, 356–362.
- Strell C & Entschladen F. 2008.** Extravasation of leukocytes in comparison to tumor cells. *Cell Commun & Signal*. 6 (10): 1-13
- Stroupe C. 2011.** Autophagy: cells SNARE selves. *Curr Biol*. 21: 697-699.

Stuhlmeier LM. 2005. Effects of leflunomide on hyaluronan synthases (HAS): NF- κ B independent suppression of IL-1 induced HAS1 transcription by leflunomide. *J Immunol.* 174(11):7376-82

Suttie AW. 2006. Histopathology of the Spleen. *Toxicol Pathol.* 34 (5): 466-503

Suzanne M & Steller H. 2013. Shaping organisms with apoptosis. *Cell Death and Differ.* 20: 669–675.

T

Tait SWG & Green D R. 2010. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 11, 621-632

Tan W., Zhang W., Strasner A., Grivennikov S., Cheng JQ., Hoffman RM & Karin M. 2011. Tumor infiltrating regulatory T cells stimulates mammary cancer metastasis through RANKL- RANK signaling. *Nat.* 470: 548-553

Taylor RC., Cullen SP & Martin SJ. 2008. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 9: 231-241

Taylor RC., Cullen SP & Martin SJ., 2008. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 9, 231-241

Tazzyman S., Lewis CE & Murdoch C. 2009. Neutrophils : Key mediators of tumor angiogenesis. *Int J Exp Pathol.* 90: 222-231.

Tenev, T., Bianchi, K., Darding, M., Broemer, M., Langlais, C., Wallberg, F., Zachariou, A., Lopez, J., MacFarlane, M & Cain, K. 2011. The Ripoptosome, a signaling platform that assembles in response to genotoxic stress and loss of IAPs. *Mol Cell.* 43, 432–448.

Terakawa N., Kanamori Y & Yoshida S., 2003. Loss of PTEN expression followed by Akt phosphorylation is a poor prognostic factor for patients with endometrial cancer. *Endocr Relat Cancer.* 10: 203-208

Testa U & Riccioni R, 2007. Deregulation of apoptosis in acute myeloid leukemia. *Hematologia.* 92 (1): 81-94.

Thorburn A. 2004. Death receptor-induced cell killing. *Cellular signaling:* 16(2): 139-144

- Thu YM & Richmond A. 2010.** NF- κ B inducing kinase: a key regulator in the immune system and in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* 21(4):213-26.
- Tooze SA & Yoshimori T. 2010.** The origin of the autophagosomal membrane. *Nat Cell Biol.* 12: 831-835.
- Trachootham D., Alexandre J & Huang P. 2009.** Targeting cancer cells by ROS mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? *Nat Rev Drug Discov.* 8: 579-591
- Trachootham D., Alexandre J & Huang P. 2009.** Targeting cancer cells by ROS mediated mechanisms: a radical therapeutic approach?. *Nat. Rev. Drug Discov.* 8: 579-591.
- Tschopp J & Schroder K. 2010.** NLRP3 inflammasome activation: the convergence of multiple signalling pathways on ROS production? *Nat Rev Immunol.* 10: 210-215
- Tukov FF., Luyendyk JP., Ganey PE & Roth RA. 2007.** The Role of Tumor Necrosis Factor Alpha in Lipopolysaccharide/Ranitidine-Induced Inflammatory Liver Injury. *Toxicol. Sci.* 100 (1): 267-280.
- Tsuchiya S, Yamabe M, Yamaguchi Y, Kobayashi Y, Konno T & Tada K. 1980.** Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int J Cancer* **26**, 171-176.

U

- Uner AH., Sağlam A., Han U., Hayran M., Sungur A & Ruacan S. 2005.** PTEN and p27 expression in mature T-cell and NK-cell neoplasms . *Leukemia & Lymphoma.* 46 (10): 1463-1470
- Urano F, Wang X, Bertolotti A, Zhang Y, Chung P, Harding HP & Ron D. 2000.** Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. *Sci.* 287:664-6.

V

- Vakkila J & Lotze MT. 2004.** Inflammation and necrosis promote tumor growth. *Nat Rev Immunol.* 4(8): 641-648.

- Valko M., Rhodes CJ., Moncol J., Izakovic M., Mazur M. 2006.** Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-biological interactions*. 160: 1-40.
- Van herreweghe F., Festjens N., Declerq W & Vandenabeele P. 2010.** Tumor necrosis factor mediated cell death: to break or to burst, that's the question. *Cell. Mol. Life Sci.* 67:1567–1579
- Vande Walle L., M Lamkanfi M & Vandenabeele P. 2008.** The mitochondrial serine protease HtrA2/Omi: an overview. *Cell Death and Differ.* 15, 453–460
- Velnar T., Bailey T & Smrkolj V. 2009.** The Wound Healing Process: an overview of the cellular and molecular mechanisms. *The J Inter Med Res.* 37: 1528 – 1542
- Von Andrian, U.H., Sallusto, F., 2007.** Lymphocyte activation. *Current Opinion in Immunology.* 19, 247–248.
- Vendramini-Costa DB & Carvalho JE. 2012.** Molecular link mechanisms between inflammation and cancer. *Curr Pharm Des.*18(26):3831-52
- Veres B. 2012.** Anti-inflammatory role of natural polyphenols and their degradation products, severe sepsis and septic shock - understanding a serious killer, Dr Ricardo Fernandez (Ed.), ISBN: 978-953-307-950-9.
- Verma UN., Yamamoto Y., Prajapati S. & Gaynor R. B. 2004.** Nuclear role of I κ B Kinase- γ /NF- κ B essential modulator (IKK γ /NEMO) in NF- κ B-dependent gene expression. *The Journal of Biological Chemistry.* 279, 3509-3515.
- Vogiatzi G., Tousoulis D., Stefanadis C. 2009.** The role of oxidative stress in atherosclerosis. *Hellenic J Cardiol.* 50: 402-409
- Vucic D., Dixit VM & Ingrid E & Wertz I E. 2011.** Ubiquitylation in apoptosis: a post translational modification at the edge of life and death. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 12: 439-452.

W

- Walker RA.** 1993. Helix pomatia and prognosis of breast cancer. *Br. J. Cancer*, 68: 453-454.
- Wallace DC., Fan W., & Procaccio V.** 2010. Mitochondrial Energetics and Therapeutics. 5: 297-348.
- Wan X, Li J, Xie X & Lu W.** 2007. PTEN augments doxorubicin-induced apoptosis in PTEN-null Ishikawa cells. *Int J Gynecol Cancer*.17(4):808-12
- Wang C & Youle RJ.** 2009. The Role of Mitochondria in Apoptosis. *Annual Rev Genet*. 43: 95-118
- Wang D & Dubois RN.** 2010. Eicosanoids and cancer. *Nat Rev Cancer*. 10: 181-193
- Wang H., Marnett LJ., Harris TM., Rizzo CJ.** 2004. A novel synthesis of malondialdehyde adducts of deoxyguanosine, deoxyadenosine, and deoxycytidine. *Chem Res Toxicol*. 17(2):144-9.
- Waring P.**2005. Redox active calcium ion channels and cell death. *Arh. Biochem. Biophys*. 434(1): 33-42
- Waters JP., Prober JS & Bradley JR.** 2013. Tumor necrosis factor and cancer. *J Pathol*. 230(3): 241-248.
- Weber C., Fraemohs L & Dejana E.** 2007. The role of junctional adhesion molecules in vascular inflammation. *Nat Rev Immunol*. 7:467-477.
- Werling D., Sutter F., Arnold M., Kun G., Tooten PCJ., Gruys E.** 1996. Characterisation of the acute phase response of heifers to a prolonged low dose infusion of lipopolysaccharide. *Res Vet Sci*. 61:252-257.
- Whelan RS, Kaplinskiy V & Kitsis RN.** 2010. Cell death in the pathogenesis of heart disease: mechanisms and significance. *Annu Rev Physiol*. 72:19-44.
- Widlak, P., Li LY, Wang X & Garrard WT.** 2001. Action of recombinant human apoptotic endonuclease G on naked DNA and chromatin substrates: cooperation with exonuclease and DNase I. *J. Biol Chem*. 276(51): 48404-9.
- Werling D., Sutter F., Arnold M., Kun G., Tooten PC.J., Gruys, E.** 1996. Characterisation of the acute phase response of heifers to a prolonged low dose infusion of lipopolysaccharide. *Res. Vet. Sci*. 61:252-257.
- Wroblewski L., Peek Jr RM & Wilson KT.** 2010. *Helicobacter pylori* and gastric cancer: factor that modulate disease risk. *Clin. Microbiol. Rev*. 23(4): 713-739.

Wu W., Liu P & Li J. 2012. Necroptosis : An emerging form of programmed cell death. *Crit Rev in Oncol/ Hemato.* 82: 249-258.

X

Xaus J., Comalada M., Valledor AV., Lloberas J., Lopez-Soriano F., Bogdan JMA & Celada A. 2000. LPS induces apoptosis in macrophages mostly through the autocrine production of TNF α . 95:3823-3831.

Xiao G & Fu J. 2011. NF- κ B and cancer: a paradigm of Yin-Yang. *Am J Cancer Res.* 1(2): 192-221.

Y

Yamashima T. 2004. Ca²⁺-dependent proteases in ischemic neuronal death: a conserved calpain-cathepsin cascade from nematodes to primates. *Cell Calcium.* 36:285–293.

Yang D., Elner SG., Bian ZM., Gerd O. Till GO., Petty HR & Elner VM. 2007. Pro-inflammatory cytokines increase reactive oxygen species through mitochondria and NADPH oxidase in cultured RPE Cells. *Exp Eye Res.* 85(4): 462–472.

Ye, H., C. Cande, Stephanou NC., Jiang S., Gurbuxani S., Larochette N., Daugas E., Garrido C., Kroemer G, Wu H. 2002. DNA binding is required for the apoptogenic action of apoptosis inducing factor. *Nat Struct Biol.* 9(9): 680-684.

Ying W., Garnier P & Swanson RA. 2003. NAD⁺ depletion prevents PARP1 induced glycolytic blockade and cell death in cultured mouse astrocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 308 : 809-813.

Ying W., Alano CC., Garnier P & Swanson RA. 2005. NAD⁺ as metabolic link between DNA damage and cell death. *Neurosci. Res.* 79 : 216-223.

Z

- Zhang H., Zhou X., McQuade T., Li J., Chan F.K & Zhang, J. 2011.** Functional complementation between FADD and RIP1 in embryos and lymphocytes. *Nat.* 471: 373–376.
- Zhang L, Yu Q., He J & Zha X. 2004.** Study of the PTEN gene expression and FAK phosphorylation in human hepatocarcinoma tissues and cell lines. *Mol Cell Biochem.* 262(1):25-33.
- Zhao M. 2007.** PTEN: a promising pharmacological target to enhance epithelial wound healing. *Br J Pharmacol.* 152(8): 1141–1144.
- Zong WX & Thompson CB. 2006.** Necrotic cell death as a cell fate. *Genes & Dev.* 20 : 1-15.
- Zong WX., Ditsworth D., Bauer DE., Wang ZQ & Thompson CB. 2004.** Alkylating DNA damage stimulates a regulated form necrotic cell death. *Genes & Dev.* 18: 1272-1282.
- Zorov DB., Juhaszova M & Sollott SJ. 2006.** Mitochondrial ROS-induced ROS release: An update and review. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Bioenergetics.* 1757: 509-517.

RESUME

L'immunosuppression est l'un des inconvénients majeur des thérapies appliquées actuellement dans le traitement des cancers. Il est donc nécessaire de rechercher de nouvelles drogues anti tumorales avec un potentiel immuno-stimulateur et qui est l'objectif de nombreux laboratoires dans le monde. Les recherche dans ce domaine s'intéressent principalement à l'extraction de ces molécules à partir des plantes. Cependant l'objectif de notre étude est de chercher un effet anti-tumoral et immuno-modulateur dans un extrait aqueux d'*Helix aspersa*, une espèce très répandue et largement consommée dans les pays méditerranéens. Notre travail débute par une étude des propriétés chimiques, anti oxydantes de l'extrait, suivie d'une évaluation de l'effet anti inflammatoire et anti tumoral. Les résultats montrent que l'extrait d'escargot possède un effet anti oxydant à de fortes concentrations, il réduit le radical DPPH et les ions Fe^{3+} . Il peut piéger le peroxyde d'hydrogène et inhiber la peroxydation des lipides. L'extrait d'*H. aspersa* possède un effet immuno-modulateur *in vitro*. Il augmente l'activité des macrophages, il peut stimuler la phagocytose comme il peut augmenter la capacité des macrophages à produire les ROS et le TNF α . *In vivo* l'extrait possèdent un effet hépatoprotecteur, en réparant le tissu hépatique lésé suite à une inflammation chronique par les LPS d'*E. Coli*. Il active la réponse immunitaire au niveau de la rate et provoque la fusion des macrophages en cellules géantes. L'extrait a également un effet anti tumoral vis-à-vis des cellules de la lignée Hs578T du cancer du sein. Il provoque une nécrose modulée par le TNF α dans les cellules tumorales. Au niveau moléculaire, l'extrait stimule l'expression du gène de la cytokine TNF α , c'est un bon inhibiteur pour les gènes Bcl2 et NF- κ B, qui stimulent la prolifération cellulaire. Aussi, il inhibe l'expression des gènes supresseurs des tumeurs P53 et PTEN.

Mot clés : *Helix aspersa*, anti oxydant, inflammation, prolifération tumorale, TNF α , Bcl2, NF- κ B, P53, PTEN, apoptose, nécrose.

Abstract

The treatment of cancer is basically on synthetics and chemotherapeutics; these kinds of treatment cause various harmful side effects to human beings. For this reason the search for new natural and safe drugs is the aim of the different laboratories in the world. Plant and marine species are the major source of natural drugs; few researches have been interested in purifying bioactive molecules from other terrestrial consumed species like snails. The aim of our study is to test the anti tumor and the immuno-modulatory effect of an aqueous extract from *Helix aspersa*. The garden snail is a big land snail found widely in the Mediterranean countries, it is one of the most consumed species and widely used in zotherapy. Firstly, we have interest to test the anti oxidant propriety by chemical methods. Then we have tested its effect *in vitro* on the tow cell lines THP1 and Hs578T *In vivo* the extract's effects have been explored on a model of chronic of inflammatory response, induced in mice by lipopolysaccharides from *Escherichia coli*. The results show that, *H. aspersa* extract have an anti-oxydant effect at high dose, it can reduce the radical DPPH and Fe³⁺ ions. It can scavenge peroxyde hydrogen and inhibits lipid peroxidation. The extract has also an anti tumor effect on breast cancer cells Hs578T. The data demonstrate that it induces a programmed necrosis in tumour cells. It enhances significantly the expression of TNF α . The mRNA level of the cytokine was 20 times more important in treated cells compared to non treated cells. Our extract is a good inhibitor of Bcl2 and NF- κ B. It inhibits also the expression of tumor suppressor genes P53 and PTEN.

المخلص:

يعتبر فقدان المناعة واحدا من الأعراض الجانبية للعلاجات المطبقة حاليا في علاج السرطان. لذا تعتمد العديد من المخابر العلمية في العالم إلى البحث عن طرق بديلة للعلاج، لها القدرة على قتل الخلايا السرطانية وفي نفس الوقت لها خاصية تنشيط الجهاز المناعي. معظم الأبحاث في هذا المجال تتجه نحو استخلاص مركبات ذات خصائص علاجية من النباتات.

في هذا الإطار، تهدف دراستنا إلى البحث عن وجود خاصية علاجية ضد السرطان و الالتهابات في مستخلص الحلزون *Helix aspersa*. وهو أحد أصناف الحلزونات المنتشرة في منطقة البحر الأبيض المتوسط و أكثرها استهلاكا. قمنا أولا بدراسة خصائص الأكدسة في المستخلص بطرق كيميائية ثم عمدنا إلى دراسة إمكانية وجود خصائص ضد الالتهابات و السرطانات. كما قمنا بدراسة مفعول المستخلص على الجهاز المناعي لفئران في حالة التهاب دائم وذلك من خلال دراسة آثاره على الكبد والطحال.

بينت النتائج أن المستخلص له خاصية إرجاع الجدر الحر DPPH و أيونات الحديد Fe^{3+} كما يمكنه تثبيت جزيئات بيروكسيد الهيدروجين ومنع أكسدة الليبيدات. المستخلص له خصائص تنشيط خلال المكروفاج من خلال رفع قدرتها على إنتاج جذور الأوكسجين Reactive oxygen species و السيتوكين $TNF \alpha$. الدراسة على الفئران في وجود التهاب بليبوبوليسكاريدات البكتيريا ال *Escherichia Coli* بينت أن مستخلص الحلزون له خصائص ضد الإلتهاب يقلل من إفراز سيتوكين $TNF \alpha$ في البلازما و يعالج الأضرار الناتجة عن الإلتهاب في الكبد. كما ينشط الإستجابة المناعية في الطحال.

مستخلص الحلزون *Helix aspersa* له خاصية قتل لخلايا السرطانية بعملية النخر المبرمج ، كما يحفز ها على إنتاج سيتوكين $TNF \alpha$ و يمنع تخليق

NF-KB, PTEN ,P53. Bcl2