



Université de Jijel
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie Moléculaire et Cellulaire

جامعة جيجل
كلية علوم الطبيعة و الحياة
قسم البيولوجيا الجزيئية و الخلوية

Thèse

Présentée par

Mme BENGUEDOUAR Lamia

Pour l'obtention du diplôme de

Doctorat en Sciences

Filière : Biologie

Spécialité : Toxicologie

Thème

**Modulation par l'extrait de Propolis algérienne du système de
détoxification au cours du stress oxydatif secondaire à la doxorubicine et de
la progression tumorale sur un modèle murin de cancer primaire de
mélanome cutané**

Soutenu publiquement le 12 / 04 / 2014
devant le jury composé de :

Président :	Dr. IDOUI Tayeb	Maître de Conférences à l'Université de Jijel
Directeur de thèse :	Pr. LAHOUEL Mesbah	Professeur à l'Université de Jijel
Co-Directeur de thèse :	Pr. ANTONICELLI Franck	Professeur à l'Université de Reims
Examineurs :	Pr. SATTA Dalila	Professeur à l'Université Constantine 1
	Pr. AMEDDAH Souad	Professeur à l'Université Constantine 1
	Dr. RECHRECHE Hocine	Maître de Conférences à l'Université de Jijel

Dédicaces

A la mémoire de mon père

A ma très chère mère

A Riad

A mes rayons de soleil Wassim et Meriem

A mon Frère Lamine et ma Sœur Karima

A mes amies Ilhem et Ismahene

Ainsi qu'à toute la famille et amies

*Je dédie aussi ce travail à mes directeurs de formation de
graduation le Professeur Nedjar et de Post-graduation*

le Professeur Benalicherif

*Veillez trouver dans ce modeste travail mon extrême
gratitude et ma reconnaissance*

Remerciements

Je tiens à exprimer mes vifs remerciements à Monsieur le Professeur LAHOUEL Mesbah, directeur du laboratoire de Toxicologie Moléculaire, à l'Université de Jijel, de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire et de m'avoir permis de réaliser ce travail avec beaucoup de patience d'altruisme et un bon esprit scientifique et pédagogique.

Ensuite, je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance et mes sincères remerciements au Professeur ANTONICELLI Frank directeur de l'unité de recherche à l'université de Reims Champagne Ardenne pour avoir accepté de me recevoir au sein de son équipe, et d'avoir dirigé la seconde partie de cette thèse avec beaucoup de pertinence, sa disponibilité et son altruisme légendaire. Je vous remercie de la formation que j'ai reçue au sein de votre laboratoire.

Je tiens à adresser mes vifs remerciements au Docteur Idoui Tayeb Professeur à l'université de Jijel d'avoir accepté de présider le jury de thèse et de juger également ce modeste travail.

J'adresse également mes vifs remerciements à Madame SATTI Dalila Professeur à l'Université Constantine 1 d'avoir accepté de juger le travail de thèse.

Je remercie aussi vivement Madame AMEDDAH Souad Professeur à l'université Constantine 1 d'avoir accepté de juger ce travail de thèse.

Je tiens également à adresser mes vifs remerciements à Monsieur RECHRECHE Hocine Professeur à l'université de Jijel d'avoir accepté de juger ce modeste travail de thèse.

Je tiens à remercier Monsieur le professeur BERNARD Philippe, d'avoir accepté de me recevoir au sein de son laboratoire de Dermatologie de la faculté de Médecine de l'université de Reims Champagne Ardenne.

Mes vifs remerciements s'adressent aussi à monsieur le professeur MAQUART FX, de m'avoir reçu au sein de son équipe de recherche de l'UMR CNRS 6237.

Je remercie également Madame Gangloff Sophie Professeur à la faculté de pharmacie de l'université Reims Champagne-Ardenne de m'avoir assisté et aidé à réaliser la partie expérimentale de mon travail de thèse. Merci pour votre disponibilité, gentillesse et vos conseils si précieux.

Je remercie également Madame DURLACH Anne pour sa précieuse aide lors de la réalisation des techniques histologiques ainsi que Anne Laure GOELDEL et à Eymeryk pour son aide en Immunohistochimie, vos conseils m'ont permis de continuer le travail ici en Algérie. Par cette même occasion, je tiens à remercier le Docteur NIHA (Directeur du laboratoire d'anatomopathologie à ANNABA) et le Docteur HAMEL (Directeur du laboratoire d'anatomopathologie à Jijel) pour leurs aides à l'achèvement du travail en histologie et immunohistochimie.

Ensuite je tiens à remercier l'équipe du laboratoire de dermatologie et le laboratoire de Biochimie Médicale avec qui j'ai beaucoup appris je pense à Martine, Corinne, Johanna, David pour leurs conseils et précieuse aide, je remercie mes amies Aida et Souad de leurs encouragements

Je tiens aussi à adresser mes remerciements à l'équipe du laboratoire de Toxicologie Moléculaire de l'Université de Jijel

Mes collègues Mohamed, à Wided et Hassiba et Yahia pour leurs aides et encouragements.

Mes amies et compagnes de parcours à l'université de Jijel Ismahane, Ilhem, Leila et Nadia

Ainsi qu'à tout le personnel du laboratoire de pédagogie des départements de Biologie.

A tous, veuillez trouver dans ce modeste travail l'expression de ma gratitude et de mon respect.

RÉSUMÉS

Résumé

Il est admis que tout xénobiotique médicament, toxique ou polluant, induit des effets délétères sur l'organisme. Le stress oxydatif est la résultante d'effets secondaires. Pour lutter contre les radicaux libres nocifs, l'organisme possède des systèmes de défense naturels antioxydants. Ces derniers ne sont pas toujours efficaces face à un excès de radicaux libres oxygénés générés par exemple lors de traitements par des médicaments anticancéreux. Considérés comme toxiques ils sont pro-oxydants conduisant de ce fait à des effets secondaires touchant les fonctions vitales de l'organisme. Plusieurs traitements adjuvants antioxydants sont utilisés afin de pallier aux effets toxiques des chimiothérapies anticancéreuses. La Propolis est un produit naturel apicole, de composition chimique complexe et différente selon la région de récolte, utilisé depuis l'antiquité dans la médecine traditionnelle, qui présente en conséquence un large spectre d'activités biologiques.

Nous avons dans un premier temps étudié l'activité antioxydante de l'extrait éthanolique de Propolis (EEP) algérienne ceci par l'exploration du système enzymatique et non enzymatique de détoxification au niveau hépatique et cardiaque au cours d'un traitement par les médicaments anticancéreux (doxorubicine et vinblastine) chez l'animal sain. Les résultats de cette étude confirmant l'activité antioxydante de L'EEP, nous a conduits à étudier l'effet anti-tumoral de l'EEP dans une situation physiopathologique d'un modèle murin de mélanome cutané. En traitement préventif, curatif ou continu, L'EEP seul ou en association avec la doxorubicine, augmentait la survie des animaux comparée au contrôle quel que soit le traitement administré, mais avec une meilleure survie en traitement Curatif. Une diminution significative de la croissance des tumeurs était observée chez les souris traitées par l'EEP Préventif ou en Curatif.

Cette étude nous permet de proposer le traitement par l'EEP comme agent adjuvant et curatif associé aux chimiothérapies conventionnelles contre le mélanome.

Mots clés : *Propolis , antioxydant, doxorubicine, mélanome, anti-tumoral.*

المخلص

من المسلم به أن أي دواء أجنبي بيولوجيا، سام أو ملوث، يؤدي إلى آثار ضارة على الجسم. الأكسدة هي نتيجة لهاته الآثار الثانوية. يمتلك الجسم أنظمة الدفاع الطبيعية المضادة للأكسدة، لمكافحة الجذور الحرة الضارة، هاته الأخيرة ليست دائما فعالة في التعامل مع وجود فائض من الجذور الحرة الأكسجينية على سبيل المثال أثناء العلاج بالأدوية المضادة للسرطان. فهي تعتبر سامة، كموالية للتأكسد وبالتالي تؤدي إلى آثار ثانوية تؤثر على الوظائف الحيوية للجسم. العديد من المواد المساعدة تستخدم كمضادة للأكسدة للتغلب على الآثار السامة للعلاج الكيماوي للسرطان. العكبر منتج طبيعي ناتج عن تربية النحل، ذو تركيب كيميائي معقد يختلف حسب منطقة حصاد، يستخدم منذ العصور القديمة في الطب الشعبي، بالتالي يقدم مجموعة واسعة من الأنشطة البيولوجية.

تركزت دراستنا في البداية على النشاط المضاد للأكسدة للمستخلص الإيثانولي للعكبر الجزائري عن طريق دراسة النظم الأنزيمية وغير الأنزيمية لإزالة السموم من الكبد والقلب أثناء العلاج بالأدوية المضادة للسرطان مثل، الدكسوروبيسين و الفنبلاستين (Doxorubicine et Vinblastine) عند الحيوانات السليمة. نتائج هذه الدراسة أكدت النشاط المضاد للأكسدة للمستخلص الإيثانولي للعكبر، مما قادنا إلى دراسة النشاط المضاد للأورام لهذا المستخلص في حالة فيزيولوجية مرضية لفأر يعاني من سرطان الجلد أو المبلانوم . في حالة العلاج الوقائي، العلاجي أو المستمر، أدي المستخلص الإيثانولي للعكبر وحده أو بالاشتراك مع الدكسوروبيسين ، إلى زيادة بقاء الحيوانات حية مقارنة بالشاهد، بغض النظر عن نوع العلاج ولكن مع أفضل بقاء على قيد الحياة بالنسبة للعلاجي. ولوحظ وجود انخفاض كبير في نمو الأورام في الفئران التي عولجت بالمستخلص الإيثانولي للعكبر الوقائي و/أو العلاجي.

هاته الدراسة تسمح لنا أن نقترح العلاج بالمستخلص الإيثانولي للعكبر كمساعد وعلاجي بالاشتراك مع العلاج الكيماوي التقليدي المضاد لسرطان الجلد.

الكلمات المفتاحية : العكبر، مضاد الأكسدة، الدكسوروبيسين، سرطان الجلد، مصاد للسرطان.

Abstract

It is known that xenobiotics, medicines, toxics or pollution agents induce deleterious effects in the organism. Oxidative stress is the result of these side effects. To fight against reactive oxygen species, the organism uses its antioxidant natural defence system but this last is not always efficient against ROS overproduction due to for example the use of anticancer drugs. Considered as toxics, they are pro-oxidant and induce, as a result, a number of side effects, affecting vital function of the organism. A number of antioxidant adjuvant treatments are used in order to hide the toxic effects of chemotherapeutic agents side effects. Propolis is a natural bee product with a complicated chemical composition that differs in collection regions. It is used in folk medicine from antique periods and exposes as a result a broad spectrum of biological activities. In the present work, we have first studied the antioxidant activity of the ethanolic extract of an Algerian propolis (EEP), by assaying the enzymatic and non enzymatic detoxifying system in healthy rat heart and liver treated by anticancer drugs (Doxorubicin and vinblastin). The results of this study confirmed the antioxidant activity of EEP and led us to study its anti-tumour activity in a pathologic situation of a skin cancer murine model of melanoma. As a preventive, curative or continuous treatment, EEP alone or in association with doxorubicin prolonged animal survival compared to control group with best results in curative treatment. A significant decrease in tumour growth was observed in either preventive or curative EEP treatments.

This investigation led us to propose the EEP as an adjuvant or a curative treatment associated with conventional chemotherapy against melanoma cancer.

Key words : *Propolis, antioxidant, doxorubicin, melanoma, anti-tumoural.*

Sommaire

Liste des Abréviations

Liste des Figures

Liste des Tableaux

Introduction Générale..... 1

Synthèse Bibliographique

I. La genèse d'un cancer.....	3
I.1 Génétique du cancer.....	4
I.2 Oncogènes et anti-oncogènes.....	5
II. Le Mélanome : cas du cancer de la peau.....	7
II. 1. La peau.....	7
II.2 Le mélanome.....	8
II.2.1 Epidémiologie.....	9
II.2.2. Facteurs de risques.....	9
II.2.3. Diagnostic et classifications.....	11
II.2.4. Le Mélanocyte : Point de départ du Mélanome.....	13
III. La croissance tumorale.....	14
III. 1. La prolifération cellulaire.....	14
III. 1.1. Marqueurs de la prolifération cellulaire.....	16
III.2. Progression tumorale et métastases.....	17
III.3. Angiogenèse tumorale.....	19
IV. Traitement du cancer.....	21
IV. 1. Les médicaments cytotoxiques « traditionnels ».....	22
IV. 2. Les traitements par immunothérapie, Les traitements hormonaux.....	22
IV.1. Traitements dans le cas du mélanome.....	23
IV.1.1. La chirurgie.....	23
IV.1.2. Les traitements adjuvants.....	23
IV.1.3. La doxorubicine : un anthracycline.....	25
IV.1.3.1. Mode d'action de la Doxorubicine.....	26
IV.1.3.2. Les limites de la chimiothérapie aux anthracyclines.....	26
V. Nature et sources cellulaires des ROS.....	29
V.1. Le radical anion superoxyde.....	29
V.2. Le peroxyde d'hydrogène.....	30

V.3. Le radical hydroxyle.....	31
V.4. Effets délétères des ROS.....	31
V.4.1. Les cibles cellulaires des radicaux libres oxygénés	31
V.4.1.1. Les dommages lipidiques.....	32
V.4.1.2 L'oxydation des protéines.....	34
V.4.1.3. L'oxydation des acides nucléiques.....	34
V.5. Système cellulaire de défense contre le stress oxydatif	35
V.5.1. Le système enzymatique de défense.....	36
V.5.1.1. La superoxyde dismutase.....	36
V.5.1.2. La catalase.....	37
V.5.1.3. Les glutathion peroxydases et réductases.....	37
V.5.1.4. Les peroxyredoxines (Prx), ou thioredoxines peroxydases.....	38
V.5.1.5. La glutathion-S-transférase (GST)	38
V.5.2. Le système de détoxification non enzymatique.....	38
V.5.2.1. Les antioxydants liposolubles	38
V.5.2.2. Les antioxydants hydrosolubles	40
VI. Apoptose : la mort cellulaire programmée	4&
VI.1. Les voies de signalisation de l'Apoptose.....	43
VI.1.1. Les CASPASES.....	43
VI.1.1.1. Classification des CASPASES.....	43
VI.1.1.2. Les substrats des CASPASES.....	46
VI.1.1.3. Régulation des CASPASES.....	47
VI.1.2. Voie mitochondriale ou intrinsèque de l'apoptose.....	48
VI.1.3. Voie des récepteurs extracellulaires ou voie extrinsèque de l'apoptose.....	49
VI.2. Fragmentation de l'ADN.....	50
VI.3. Perméabilisation de la membrane mitochondriale.....	51
VI.4. Les protéines de la famille Bcl-2.....	53
VII. La Propolis : Source antioxydante.....	57
VII.1. Caractères physico-chimiques	58
VII.2. Composition chimique de la Propolis.....	58
VII.3. Activités Biologiques de la Propolis	61
VII.3.1. Une activité antibactérienne à large spectre	61
VII.3.2. Une activité antifongique	61
VII.3.3. Une activité anti-oxydante.	62
VII.3.4. Activité hépatoprotectrice.	62

VII.3.5. Une activité anti-tumorale	63
VII.3.6. Activité anti-inflammatoire.	63
VII.3.7. Une Activité Immunomodulatrice.....	64
VII.3.8. Autres activités.....	64
VII.4. la Propolis : source de flavonoïdes.....	64
VII.5. Activité biologiques des Flavonoïdes.....	66
VII.5.1. Études <i>in vitro</i> des activités biologiques des flavonoïdes	66
VII.5.2. Études <i>in vivo</i> des activités biologiques des flavonoïdes	67
VII.6. Mécanisme d'action des Flavonoïdes	68
VII.6.1. Relation structure-activité antioxydante des flavonoïdes.....	65
VII.6.2. Piégeage des radicaux libres.....	69
VII.7. Les antioxydants : plus que des piègeurs d'ERO	70

Partie Expérimentale

1-Matériel et Méthodes

Objectif du travail de recherche.....	73
I. L'Extrait Ethanolique de Propolis algérienne	75
I.1. Récolte de la Propolis.....	75
I.2. Préparation de l'Extrait Ethanolique de Propolis	75
I.3. Préparation des solutions de l'extrait éthanolique de Propolis pour les expérimentations biologiques <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i>	75
II. Etude de l'activité anti-oxydante <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> de l'EEP chez le rat wistar albinos.....	77
II.1. Effet anti-radicalaire ou piègeur des ROS <i>in vitro</i> de l'EEP	77
II.2. Activité antioxydante <i>in vivo</i> de l'Extrait Ethanolique de Propolis contre le stress oxydatif induit par la doxorubicine et la vinblastine.....	80
II.2.1. Entretien des animaux.....	81
II.2.2. Isolement des fractions cellulaires et subcellulaires à analyser	81
II.2.2.1. Isolement des mitochondries hépatiques et cardiaques.....	81
II.2.2.2. Préparation de la matrice mitochondriale.....	81
II.2.2.3. Préparation de la fraction cytosolique hépatocytaire	81
II.2.3. Mesure de la production de l'anion superoxyde ($O_2^{\circ-}$) <i>in vitro</i> par les mitochondries cardiaques de rat.....	82
II.2.4. Mesure du gonflement mitochondrial (mitochondrial swelling) <i>in vitro</i>	82
II.2.5. Mesure de l'activité enzymatique de la Superoxyde Dismutase mitochondriale (Mn SOD).....	83
II.2.6. Mesure de l'activité enzymatique de la Catalase	84

II.2.7. Mesure de la peroxydation lipidique mitochondriale <i>in vitro</i>	84
II.2.8. Dosage du glutathion réduit hépatique.....	85
III- Etude <i>in vivo</i> de l'effet de l'EEP sur la progression tumorale du mélanome primaire chez la souris C57BL6.....	87
III.1. Modèle animal de mélanome primaire murin.....	87
III.2. Induction des tumeurs primaires de mélanome murin	87
III.3. Traitements des animaux.....	88
III.3.1. Le traitement Préventif par l'EEP seul ou associé à la Doxorubicine.....	88
III.3.2. Le traitement Curatif par l'EEP seul ou associé à la Doxorubicine.....	88
III.3.3. Le traitement Préventif- Curatif par l'EEP seul ou associé à la Doxorubicine...	89
III.4. Etude de la progression tumorale de mélanome primaire chez la souris C57Bl6.....	93
III.4.1. Mesure du volume tumoral et du SGR.....	93
III.4.2. Evaluation <i>ex vivo</i> de l'effet du traitement à l'EEP sur le caractère prolifératif du tissu tumoral	93
III.4.2.1. Culture <i>ex vivo</i> des cellules tumorales et mesure de la prolifération cellulaire...	94
III.4.2.2. Evaluation du taux de prolifération <i>in situ</i> du tissu tumoral.....	94
a. Fixation, inclusion en paraffine des tumeurs excisées	95
b. Détermination de l'indice mitotique.....	95
c. Analyse immunohistochimique des coupes de tumeurs	95
d. Détermination de l'indice de marquage nucléaire Ki-67.....	96
III.4.3. Evaluation <i>ex vivo</i> de l'effet du traitement à l'EEP sur la densité de la microvascularisation du tissu tumoral.....	96
III.4.4. Evaluation <i>in vitro</i> de l'effet du traitement à l'EEP sur le caractère invasif des cellules tumorales de mélanome primaire	97
III.4.4.1. Préparation de la chambre de Boyen modifiée.....	97
III.4.4.2. Ensemencement des cellules tumorales dans les chambres de Boyden.....	97
IV. Etude de l'effet de l'Extrait Ethanolique de Propolis <i>in vitro</i> sur les cellules de mélanome.....	99
IV.1. Etude <i>in vitro</i> de l'effet de l'EEP sur la viabilité des cellules cancéreuses de mélanome cutané.....	99
IV.1.1. Lignées cellulaires utilisées et culture des cellules	99
IV.1.2. Test de viabilité cellulaire	99
IV.1.2.1. Comptage cellulaire	99
IV.1.2.2. Test colorimétrique de prolifération cellulaire	100
IV.1.3. Etude de l'effet pro-apoptotique de l'Extrait Ethanolique de Propolis.....	101
IV.1.3.1. Marquages nucléaires par coloration cytochimique	101
IV.1.3.2. Méthodes d'analyse des protéines	102

a. Préparation des extraits de protéines cytosoliques et nucléaires.....	103
b. Dosage des protéines selon la méthode de Biuret	103
c. Préparation des échantillons pour l'électrophorèse en conditions dénaturantes (SDS-PAGE).....	103
d. Immunodétection des protéines : Electrophorèse en gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) et Western-blot.....	103
IV.1.3.2. Les méthodes de biologie moléculaire.....	105
a. Extraction des ARN totaux.....	105
b. Vérification de l'intégrité des extraits d'ARN.....	105
c. La transcription reverse	105
d. PCR de vérification de la RT.....	106
V. Etude Statistique.....	107

2-Résultats

I. Activité Antioxydante de l'Extrait Ethanolique de Propolis (EEP) contre le Stress Oxydatif induit par la Doxorubicine.....	108
I.1. Effet anti-radicalaire ou piègeur des ROS <i>in vitro</i> par l'EEP.....	108
I.2. Effet de l'EEP sur la production de l'anion superoxyde (O ₂ ^{•-})	109
I.2.1. Effet de l'EEP sur la production de l'anion superoxyde <i>in vitro</i>	110
I.2.2. Effet de l'EEP sur la production de l'anion superoxyde (O ₂ ^{•-}) par les mitochondries hépatocytaires <i>in vivo</i>	110
I.3. Effet de l'EEP sur le gonflement (mitochondrial swelling) et la respiration mitochondriale <i>in vitro</i>	112
I.4. Effet de l'EEP sur les activités enzymatiques de la Superoxyde Dismutase mitochondriale (Mn SOD) et de la catalase.....	113
I.5. Effet de l'EEP sur la peroxydation lipidique.....	114
I.5.1. Effet de l'EEP sur la peroxydation lipidique mitochondriale du foie <i>in vivo</i>	114
I.5.2. Effet de l'EEP sur la peroxydation lipidique cytosolique du foie <i>in vivo</i>	114
I.6. Effet de l'EEP sur la réserve en GSH cytosolique.....	115
II-Etude <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i> des effets de la propolis sur la progression tumorale du mélanome primaire chez la souris C57BL6.....	116
II.1. Effet du traitement par l'EEP seul ou combiné à la doxorubicine sur la progression tumorale de mélanomes primaires <i>in vivo</i>	116
II.1.1. Effet du traitement par L'EEP seul sur le volume tumoral de mélanome primaire chez la souris C57BL6.....	117
II.1.2. Effet de l'EEP sur la prolifération des cellules tumorale <i>ex vivo</i>	119
II.1.2.1. Index mitotique.....	119

II.1.2.2. Immunomarquage au Ki-67.....	120
II.1.2.3. Effet du traitement par l'EEP sur la vascularisation du tissu tumoral de mélanome primaire.....	121
II.1.2.4. Effet <i>ex vivo</i> du traitement par l'EEP sur la prolifération des cellules tumorale en cultures primaires	123
II.1.2.5. Effet du traitement par l'EEP sur l'invasion des cellules tumorales de mélanome primaire.....	125
II.1.3. Traitement à l'EEP seul et survie des animaux.....	126
II.2. Effet du traitement par l'EEP en association avec la Doxorubicine sur la progression tumorale de mélanome primaire chez la souris C57BL6.....	124
II.2.1. Effet du traitement par L'EEP en association avec la Doxorubicine sur la croissance tumorale de mélanome primaire chez la souris C57BL6.....	127
II.2.2. Effet de l'EEP en association avec la doxorubicine sur la survie des animaux.....	128
II.3. effet du traitement par l'EEP seul sur la prolifération et l'apoptose des cellules de mélanome.....	128
II.3.1. Effet du traitement par L'EEP en association avec la Doxorubicine sur la croissance tumorale de mélanome primaire chez la souris C57BL6.....	130
II.3.1. Effet des traitements par l'EEP et la Doxorubicine sur la prolifération des cellules de mélanome <i>in vitro</i>	132
II.3.1.1. Effet de l'EEP sur la prolifération des cellules de mélanome <i>in vitro</i>	132
II.3.1.2. Effet du traitement par la doxorubicine sur la prolifération des cellules de mélanome <i>in vitro</i>	134
II.3.1.3. Effet du traitement combiné de l'EEP et la Doxorubicine sur la prolifération des cellules de mélanome.....	135
II.3.2. Effet des traitements à l'EEP et à la doxorubicine sur la morphologie nucléaire : Marquage des noyaux	136
II.3.2.1. Effet du traitement par la doxorubicine seule sur la morphologie des noyaux des cellules SKmel28 et B16F1.....	136
II.3.2.2. Effet du traitement combiné de l'EEP et la Doxorubicine sur la morphologie des noyaux des cellules B16F1.	138
II.3.3. Implication des CASPASES-3 dans la régression tumorale du mélanome.....	139
II.3.3.1. Effet de la Doxorubicine seule sur l'expression de la CASPASE-3.....	139
II.3.3.2. Effet du traitement combinés de l'EEP et la Doxorubicine sur l'expression de la CASPASE-3 et son substrat PARP.....	139
II.3.4. Effet des différents traitements à l'EEP et la doxorubicine sur l'expression génique des	141

gènes de la famille des Bcl-2.....

3-Discussions

I. Activité Antioxydante de l'Extrait Ethanolique de Propolis contre le Stress Oxydatif induit par la Doxorubicine..... 144

II-Etude *in vivo* et *in vitro* des effets de la propolis sur la régression tumorale du mélanome 148

4-Conclusion et Perspectives 156

Références bibliographiques

Annexes

Liste des abréviations

AGPI	Acides Gras polyInsaturés
AMP	Adénosine monophosphate
APS	Persulfate d'ammonium
ABTS•	sel d'ammonium de l'acide 2,2' azinobis 3 ethylbenzothiazoline 6 sulfonique
BET	Bromure d'éthidium
b-FGF	Basic-fibroblast growth factor
Ca	Cyclosporine a
CA	Caffeic Acid
CAP	Caffeic Acid Phenyl
CAPE	Caffeic Acid Phenetyl Ester
CAT	Catalase
CDK	Cyclin dependent kinase
DAB	Diaminobenzidine
DEPC	Diéthylpyrocarbonate
DMEM	Dulbecco's modified eagle's medium
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DNase	Désoxyribonucléase
dNTPs	Désoxyribonucléotides triphosphates
DPPH	2,2-diphénylpicrylhydrazyl
DT	Doubling Time
DTNB	Acide 5,5' - DiThiobis 2-NitroBenzoïque
DTT	1,4-dithiothréitol
EEP	Extrait Ethanolique de Propolis
ECL	Electrochimiluminescence
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EGF	Endothelial growth factor
EGTA	Ethylene glycol-bis(b-aminoethyl ether)-N,N,N',N4-tetraacetic acid
ERO	Espèce Réactives de l'Oxygène
FGF	Fibroblast Growth Factor
FRAP	Ferric ion Reducing Antioxidant Parameter
GAPDH	Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
GPX	Gluthation peroxydase
GSH	Glutathion Réduit
GSSG	Glutathion oxydé
GST	Glutathion S- Transférase
HEPES	N2 hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethano-sulfonique acid
HMEC-1	Human microvasculature endothelial cells 1
HUVEC	Human umbilical vein endothelial cells
IL	Interleukine
Ig	Immunoglobuline
INF γ	Interféron γ
i.p.	Intra-péritonéal
JDE	Jonction dermo-épidermique
Ki-67	Kiel – Clone 67
MAP kinases	Mitogen activated protein kinases
MDA	Malondialdehyde

MEC	Matrice extra-cellulaire
MIC	Minimum Inhibitory Concentration
MMP	Matrix metalloproteinase
MT-MMP	Membrane-type matrix metalloproteinase
NBT	Nitro Blue Tetrazolium
NK	Natural Killer
NS	Non significatif
ORAC	Oxygen Radical Absorbance Capacity
PARP	Poly ADP-ribose polymérase
pb	Paire de bases
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PgP	P-GlycoProtein
PKB	Protéine kinase B (ou Akt)
PMSF	Phenylméthylsulfonylfluorure
pRb	Protéine du rétinoblastome
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT-PCR	Reverse transcriptase polymerase chain reaction
s.c.	Sous-cutané
SAB	Sérum albumine bovine
SDS	Sodium dodécyl sulfate
SGR	Specific Growth Rate
SOD	Superoxyde Dismutase
SVF	Sérum de veau fétal
TAE	Tris acétate EDTA
TBA	ThioBarbituric Acid
TBS	Tris buffered saline
TBS-T	TriChloroacetic Acid
TCA	Tris buffered saline-tween
TEMED	Tétraméthyl-éthylène-diamine
TGF β	Transforming Growth Factor β
TIMP	Tissue inhibitor of matrix metalloproteinase
TNB	ThioNitroBenzoïque
TNF α	Tumor necrosis factor α
tPA	Tissular plasminogen activator
TRAP	Total Radical Trapping Antioxidant Parameter
TS	Tris-Sucrose
TSE	Tris-Sucrose-EGTA
UV	Ultraviolet
VEGF	Vascular endothelial growth factor

Liste des Figures

Figure 1 :	Représentation de la coupe de la peau et des annexes cutanées (Winslow, 2008)	8
Figure 2 :	Représentation schématique de la transformation maligne des mélanocytes en mélanome (adapté de Gray-Schopfer <i>et al.</i> 2007).....	14
Figure 3 :	Schématisation du développement d'un cancer (Fidler, 2003).....	18
Figure 4 :	La néoangiogénèse tumorale.....	21
Figure 5 :	Structure moléculaire des de la doxorubicine	24
Figure 6 :	Production de radicaux libres oxygénés au cours de la transformation métabolique de la doxorubicine.....	28
Figure 7 :	Les trois étapes de la peroxydation lipidique (D'après Sachdev et Davies, 2008).....	33
Figure 8 :	lésions de l'ADN formées par attaque des radicaux libres (Cadet <i>et al.</i> , 2003).....	34
Figure 9 :	Régulation de la production d'espèces réactives de l'oxygène par les systèmes de défenses antioxydants (D'après Pincemail <i>et al.</i> , 2002).....	36
Figure 10 :	Mécanisme de détoxification enzymatique (Marfak, 2003).....	38
Figure 11 :	Structure du glutathion.....	40
Figure 12 :	Caractéristiques morphologiques de la mort cellulaire par apoptose.....	42
Figure 13 :	Schéma de l'activation protéolytique des CASPASES (Volkova et Poltorak, 2012).....	45
Figure 14 :	Assemblage de l'apoptosome (Ho & Howkins, 2005).....	48
Figure 15 :	Voies intrinsèque et extrinsèques de l'Apoptose (Zeiss, 2003).....	50
Figure 16 :	Chaîne respiratoire et perméabilisation mitochondriale (Green et Kroemer, 2004).....	52
Figure 17 :	Les protéines de la famille Bcl-2 (Debatin et al., 2002).....	54
Figure18:	La Propolis.....	57
Figure 19 :	Squelette de base des flavonoïdes.....	65
Figure 20 :	Eléments structuraux nécessaire à l'obtention d'une activité anioxydante...	68
Figure 21 :	Piégeage des ROS (R·) par les flavonoïdes.....	69
Figure 22 :	Phénomène d'apoptose : rôle central du glutathion (GSH) et de la thiorédoxine (TRX) en tant que régulateur rédox de la cellule (Pincemail <i>et al.</i> , 2002).....	71
Figure 23	structure chimique du radical DPPH : A. Forme radicalaire. B : Structure chimique du DPPH-H réduit.....	79
Figure 24:	Induction tumorale chez la souris C57BL6et protocoles de traitement	91
Figure 25 :	Culture primaires de cellules de mélanome après excision des tumeurs	94
Figure 26 :	Schéma d'une chambre de Boyden modifiée.....	98
Figure 27 :	Clivage du sel de tetrazolium WST-1 (4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl) - 2H-5-tetrazolio]-1,3-benzene disulfonate) en formazan. (EC : couplage	

	d'électron, RS : système succinate-tetrazolim-reductase).....	100
Figure 28 :	Structure Chimique du Hoechst 33342.....	101
Figure 29 :	Effet Scavenger de l'EEP <i>in vitro</i>	108
Figure 30 :	Effet anti-radicalaire de l'EEP.....	109
Figure 31 :	Inhibition de la production de l'anion superoxyde mitochondrial par l'Extrait Ethanolique de Propolis <i>in vitro</i>	108
Figure 32 :	Effet de l'EEP sur la production mitochondriale de l'anion superoxyde <i>in vivo</i>	111
Figure 33 :	A- Respiration mitochondriale. B- Gonflement mitochondrial	112
Figure 34 :	Effet de la doxorubicine (20mg/kg) associée à la vinblastine (2mg/ml) et l'EEP (100mg/ml) associé à la doxorubicine (20mg/ml) et à la vinblastine (2mg/ml) sur les activités enzymatiques de la MnSOD hépatique (A) et la catalase (B) mitochondriale hépatique et cardiaque.	113
Figure 35 :	Taux du MDA mitochondrial au niveau du foie en présence ou non des différents traitements	114
Figure 36 :	Variation des taux de MDA mitochondrial (nM/mg de protéines) exprimés en % d'inhibition du contrôle en présence de différentes concentrations de l'EEP (10^{-10} à 10^{-2} mg/ml).....	115
Figure 37 :	Effet de la doxorubicine (20mg/kg) associée à la vinblastine (2mg/ml) et l'EEP (100mg/ml) associé à la doxorubicine (20mg/ml) et à la vinblastine (2mg/ml) sur le taux de GSH mitochondrial hépatique.....	115
Figure 38 :	Effet de l'EEP en traitement préventif seul sur la croissance tumorale de mélanome primaire <i>in vivo</i>	117
Figure 39 :	Poids des tumeurs excisées après sacrifice à J21 des souris C57BL6.....	118
Figure 40 :	Index mitotique déterminé à partir des coupes histologiques des tumeurs issues des souris traitées par l'EEP seul	119
Figure 41 :	Marquage immunohistochimique au Ki-67 des coupes de tumeurs de mélanome primaire	120
Figure 42 :	Effet du traitement par l'EEP sous différents protocoles sur le développement de néo-vaisseaux angiogéniques au sein du tissu tumoral de mélanome primaire.	122
Figure 43 :	Prolifération des cellules tumorales issues des tumeurs excisées à partir de souris traitées par l'EEP	124
Figure 44 :	Inhibition de l'invasion cellulaire par l'EEP au sein des tumeurs de mélanome primaire	125
Figure 45 :	Courbes de survie des animaux traités par les différents protocoles de l'EEP seul.	126
Figure 46 :	Effet du traitement par la doxorubicine seule ou en association avec l'EEP sur la progression tumorale de mélanome primaire.....	129
Figure 47 :	Effet de l'EEP en association avec la doxorubicine sur la croissance tumorale de mélanome primaire <i>in vivo</i>	129
Figure 48 :	Poids des tumeurs excisées des souris après sacrifice à J21.....	130
Figure 49 :	Courbes de survie des animaux traités par les différents protocoles de traitement par l'EEP seul (A : EEP Curatif, B : EEP Préventif, C : EEP Préventif Curatif) ou associé à la doxorubicine.....	131
Figure 50 :	Effet de l'EEP sur la prolifération des cellules SKmel 28 (A) et B16F1 (B)	133
Figure 51 :	Effet de la Doxorubicine sur la prolifération des cellules SKmel 28 et B16F1 après 24h d'incubation à différentes concentrations	135

Figure 52 :	Effet du traitement combiné de l'EEP et la Doxorubicine sur la prolifération des cellules B16F1 (A) et SKmel 28 (B) après 24h d'incubation à différentes concentrations (1, 5 et 10µg/mL) avec le test WST-1.....	136
Figure 53 :	Effet du traitement à la doxorubicine (2 et 3 µM) et sur la morphologie des noyaux après 24h d'incubation chez les deux lignées cellulaire SKmel28 (A-F) et B16F1(G-L).....	137
Figure 54 :	Effet du traitement par la doxorubicine (2µM)(B), l'EEP (10µg/mL) (C), et combiné (D) sur la morphologie des noyaux après 6h d'incubation chez les cellules B16F1.....	138
Figure 55 :	Expression de la pro-caspase-3 et clivage du PARP sous l'effet du traitement par la doxorubicine à la dose de 3µM des cellules B16F1 après deux temps d'incubation (3H et 6H).....	139
Figure 56 :	Expression de la procaspase 3 (A) et le clivage du PARP (B) dans la lignée cellulaire B16F1 traitée par la doxorubicine seule (2µM), l'EEP seul (10µg/mL) ou les deux combinés	140
Figure 57 :	Expression de la procaspase 3 (A) et le clivage du PARP (B) chez la lignée cellulaire SKmel 28 traitée par la doxorubicine seule (2µM), l'EEP seul (10µg/mL) ou les deux combinés.....	141
Figure 58 :	Expressions génétiques de Bcl2, BclxL, Bax et GAPDH dans la lignée cellulaire B16F1 après traitement par la doxo (2µM) seule, l'EEP seul (10µg/mL) ou combinés après une incubation de 6h.....	140
Figure 59 :	Rapports pro versus anti- apoptotique des expressions géniques.....	143

Liste des Tableaux

Tableau I	: Illustration des critères de reconnaissance d'un mélanome : la règle ABCDE	12
Tableau II	: Principaux médicaments anticancéreux.....	23
Tableau III	: Les principales espèces oxygénées réactives générées dans les systèmes biologiques (D'après Bartosz, 2003).....	29
Tableau IV	: Classification des CASPASES.....	44
Tableau V	: Les différents solvants utilisés pour l'extraction de la Propolis (Fokt, 2010)	59
Tableau VI	: Influence de l'origine géographique et de la source végétale sur la composition chimique de la Propolis (Wagh, 2013).....	60
Tableau VII	: Activités anticancéreuses des flavonoides in vitro sur des lignées cellulaires cancéreuses (Ren et al., 2003).....	67
Tableau VIII	: Protocoles de traitement des animaux par l'EEP et la doxorubicine.....	92
Tableau IX	: Séquences des amorces utilisées.....	106

INTRODUCTION

GÉNÉRALE

Introduction Générale

Le cancer qui constitue la deuxième cause de décès dans le monde a fait 8,8 millions de morts en 2015. Près d'un décès sur 6 dans le monde est dû au cancer. Environ 70% des décès par cancer surviennent dans les pays à revenu faible ou intermédiaire (Ferlay *et al.*, 2012), il en est la deuxième en Algérie (16 %) après les maladies cardiovasculaires (44,5 %), Environ 35 000 nouveaux cas de cancers sont diagnostiqués chaque année en Algérie avec une augmentation de 50% du nombre de cas depuis une décennie. 20 000 personnes décèdent annuellement dans notre pays (INSP, 2008). Hanahan et Weinberg l'ont défini dans les années 2000 en donnant les soi-disant caractéristiques du cancer. Ces caractéristiques obligatoires de pratiquement toutes les cellules néoplasiques, leur permettant de se développer dans un environnement étranger et hostile et leur conférant la capacité d'échapper aux systèmes de protections endogènes. Le cancer est donc l'un des principaux problèmes de santé publique avec un besoin vital pour de nouvelles thérapies (Hanahan et Weinberg, 2000).

Le mélanome, tumeur maligne dont la fréquence est actuellement en pleine expansion, figure parmi les cancers associés aux pronostics les plus sombres, avec un risque élevé de métastases ganglionnaires et viscérales. L'exérèse chirurgicale est actuellement le seul traitement curatif du mélanome au stade précoce. Aux stades plus avancés, les traitements palliatifs actuels, surtout représentés par la polychimiothérapie, ont peu progressé et restent peu efficaces. En raison de son taux de réponse très faible à la radiothérapie et à la chimiothérapie. Cette résistance provient essentiellement du fait que les cellules de mélanomes sont résistantes à l'apoptose, et que la radiothérapie ainsi que bon nombre d'agents chimiothérapeutiques induisent la mort des cellules cancéreuses en y induisant l'apoptose. Dès lors, de nombreuses voies de traitements autres que la chimiothérapie et la radiothérapie ont été développées dans le cadre du mélanome, mais à nouveau avec un taux de réussite très faible. De plus, en outre les effets plus ou moins bénéfiques contre les cellules cancéreuses, ces traitements anticancéreux sont nocifs pour l'organisme, leur toxicité réside dans les effets secondaires nocifs sur le reste de l'organisme, la toxicité des anticancéreux est attribuée dans le cas des antracycline (doxorubicine), largement utilisé en chimiothérapie anticancéreuse, à leur pouvoir pro-oxydant et pro-apoptotique. En effet, il est admis que tout xénobiotique médicament, toxique ou polluant, induit des effets délétères sur l'organisme. Le stress oxydatif est la résultante d'effets secondaires induits par la biotransformation de ce type de substances. Pour lutter contre les radicaux libres nocifs, l'organisme possède des systèmes

de défense antioxydants. Certains sont endogènes, alors que d'autres sont obtenus à partir de molécules apportées par l'alimentation (exogènes). Le système endogène est formé par des enzymes qui agissent en synergie, à savoir la glutathion peroxydase, la catalase et la superoxyde dismutase (SOD). En effet, la SOD transforme le superoxyde en peroxyde d'hydrogène tandis que la catalase métabolise ce dernier en une molécule d'eau et une autre d'oxygène.

Plusieurs traitements adjuvants antioxydants sont utilisés afin de pallier aux effets toxiques des chimiothérapies anticancéreuses. La question est de savoir si l'effet bénéfique des traitements adjuvants ne module en rien l'efficacité de la chimiothérapie anticancéreuse. Il serait donc nécessaire de détoxifier l'organisme en présence de ces médicaments sans en altérer l'activité.

La prévention de l'apoptose induite par les radicaux libres issus de biotransformations des médicaments anticancéreux est une voie incontournable pour une meilleure sécurité d'emploi de la chimiothérapie anticancéreuse qui demeure un espoir dans le traitement du cancer.

L'approche pharmacologique par l'utilisation des flavonoïdes est aujourd'hui au centre de recherches dans de nombreux grands laboratoires pharmaceutiques.

Avec cette approche, nous nous sommes intéressés à l'effet antioxydant d'un produit naturel apicole qui est la Propolis connus depuis l'antiquité, ce produit est un complexe de composés chimiques bioactifs. Nous avons à cet effet tenté d'en déterminer l'activité antioxydante et protectrice des tissus hépatique et cardiaque chez l'animal sain *in vivo* et *in vitro* contre le stress oxydatif induit par un traitement aux médicaments anticancéreux tels que la doxorubicine et la vinblastine et ce en explorant le système de détoxification enzymatique et non enzymatique. Ceci étant la première partie des travaux de cette thèse.

Le second volet du présent travail visait à utiliser ce même extrait éthanolique de Propolis dans un cas physiopathologique de cancer en utilisant un modèle murin de cancer de la peau. Pour ce faire, nous avons induit des tumeurs primaires de mélanome *in vivo* et utilisé les différents traitements de chimiothérapie curative et d'extrait de Propolis, ce dernier est utilisé en traitement préventif (avant induction tumorale) ou en traitement curatif (dès l'apparition de la tumeur) ou en traitement continu (préventif-curatif) seul ou en association avec un traitement curatif à la doxorubicine. Cette étude vise à la détermination de l'effet de ce type de produits naturels sur la progression tumorale mais aussi sur la survie des animaux au cours des différents protocoles de traitements.

La compréhension des phénomènes biologiques et biochimiques liées aux activités des produits chimiques bioactifs utilisé nous a amené à faire des essais *in vitro* sur deux lignées

Introduction Générale

cellulaires de mélanome murin et humain afin de déterminer sur le plan cellulaire et moléculaire les mécanismes biochimiques impliqués.

SYNTHÈSE
BIBLIOGRAPHIQUE

I. La genèse d'un cancer.

La cancérogenèse est la croissance incontrôlée de cellules gagnant le potentiel d'envahir et de perturber les fonctions des tissus vitaux. Ce processus malin comprend l'apparition de mutations «indésirables» de gènes qui induisent la transformation de cellules normales, par exemple, en plus de l'activation des voies pro-oncogéniques et l'inactivation des voies suppressive de tumeur ou anti-oncogène. Il est maintenant reconnu qu'un grand nombre de grandes voies de signalisation qui contrôlent l'oncogenèse n'est pas illimité; par conséquent, la suppression de ces voies peut fort bien conduire à la guérison du cancer. Toutefois, en thérapeutique clinique anticancéreuse. Un nombre croissant d'études ont révélé que de nombreux éléments de signalisation oncogénique montrent une double action. Ils peuvent favoriser ou supprimer la pathogenèse du cancer selon le type de tissu, le stade du cancer, le dosage des gènes, et leur interaction avec d'autres acteurs dans la cancérogenèse. Cette complexité de la signalisation oncogénique pose des défis à la thérapie du cancer traditionnelle et appelle à la prudence considérable lors de la conception d'une stratégie de médicament anticancéreux (Zhang *et al.*, 2010).

Le cancer est un ensemble de maladies des organismes supérieurs pluricellulaires. Il est caractérisé par des altérations de l'expression de plusieurs gènes, conduisant à une dérégulation de processus cellulaires normaux tels que la division cellulaire et la différenciation cellulaire. Il en résulte un déséquilibre dans le cycle cellulaire et la mort cellulaire qui favorise la croissance d'une population de cellules dites tumorales. Les caractéristiques qui définissent un cancer malin de la tumeur bénigne est la capacité à envahir localement, de se propager vers les ganglions lymphatiques régionaux et à des métastases aux organes distants dans l'organisme. Cliniquement, le cancer semble être à l'origine de plusieurs maladies différentes avec des caractéristiques phénotypiques distinctes. Comme une tumeur cancéreuse progresse, la dérive génétique dans la population de cellules produit une hétérogénéité cellulaire à des caractéristiques telles que l'antigénicité cellulaire, l'invasivité, le potentiel métastatique, le taux de prolifération des cellules, l'état de différenciation, et la réponse aux agents chimiothérapeutiques (Zhang *et al.*, 2010).

Au niveau moléculaire, tous les cancers ont plusieurs choses en commun, ce qui suggère que les lésions biochimiques ultimes conduisant à la transformation maligne et la progression peuvent être produites par un modèle commun, mais pas identique d'altérations de lecture du gène. En général, les cancers malins entraînent une morbidité significative et seront létaux à l'hôte s'ils ne sont pas traités. Les exceptions à cette règle semblent être latentes, les cancers indolents qui peuvent rester cliniquement indétectable, permettant à l'hôte d'avoir une

espérance de vie normale. Un cancer est une population de cellules qui se développent anormalement au sein d'un tissu sans plus répondre aux règles d'homéostasie de celui-ci. De plus, il présente des caractéristiques d'agressivité qui lui confèrent une disposition à la dissémination ou encore son caractère « malin ». En effet, tant que ces dernières caractéristiques sont absentes, la tumeur est considérée comme « bénigne »

2. Génétique du cancer

Les cellules cancéreuses sont génotypiquement et phénotypiquement différentes de leurs semblables tissulaires non tumorales bien différenciées. Ainsi, plus un cancer est agressif, moins il exprime de marqueurs de différenciation caractéristiques des cellules du tissu à partir duquel il se développe. Il est proposé que la plupart des néoplasmes proviennent d'une seule cellule d'origine et que la progression tumorale résulte de la variabilité génétique acquise au sein du clone d'origine, permettant la sélection séquentielle de sous-lignées plus agressives. Les populations de cellules tumorales sont apparemment plus instables génétiquement que les cellules normales, peut-être en raison de l'activation de locus de gènes spécifiques dans le néoplasme, de la présence continue de carcinogènes ou même de carences nutritionnelles dans la tumeur. L'instabilité génétique acquise et le processus de sélection associé, le plus facilement reconnu par cytogénétique, ont pour résultat que les tumeurs malignes humaines avancées sont hautement caryotypiquement et biologiquement. Par conséquent, le cancer de chaque patient peut nécessiter un traitement spécifique, et même celui-ci peut être contrecarré par l'émergence d'une sous-lignée génétiquement différente et résistante au traitement. La population cellulaire d'un cancer résulte donc du développement clonal d'une seule cellule après mutations, qui ne répond alors plus au contrôle de la croissance cellulaire. Ces cellules clonales présentent une instabilité génétique accrue et dès lors une tendance exacerbée à de nouvelles mutations à l'origine de sous-clones au sein de la tumeur. Ainsi, au fil des divisions cellulaires, des cellules sont sélectionnées et des clones cellulaires de plus en plus agressifs et différenciés évoluent au sein de la tumeur (Nowell, 1976). Ces cellules de haut degré de malignité présentent en fait des caractéristiques des cellules souches embryonnaires pluripotentes présentes dans le tissu normal pour la régénération tissulaire (Pierce *et al.*, 1977). Pierce défend ainsi une autre théorie selon laquelle le cancer dérive d'une cellule souche embryonnaire ; la différenciation de ses cellules filles est incomplète et variable, ce qui explique le caractère indifférencié de certaines cellules cancéreuses (Sell et Pierce, 1994). Néanmoins, ces cellules pourraient alors subir des mutations séquentielles selon le modèle de Nowell, les deux modèles ne s'excluant pas mutuellement. Cette population cellulaire anormale est caractérisée par un échappement au contrôle homéostatique qui régule

normalement la croissance du tissu ; elle va croître localement et former la tumeur primitive. Le développement du cancer se produit selon un processus multi-étapes qui se subdivise en trois phases : l'initiation, la promotion et la progression tumorale (Hanahan et Weinberg, 2011)

L'initiation est la première phase, et elle est irréversible. Lors de cette phase une cellule de l'organisme subit des modifications génétiques, et devient alors une cellule dont la multiplication est anormale, et donc ne répond plus à son environnement. Les facteurs qui modulent cette phase sont nombreux ; L'exposition à un agent génotoxique, c'est-à-dire produisant une lésion de l'ADN (habituellement une mutation). La liaison d'un agent chimique génotoxique à la molécule d'ADN est une liaison équimoléculaire, de molécule à molécule, de telle sorte qu'une seule molécule du composé génotoxique peut déjà produire un effet. Autrement dit, il n'y a pas de seuil au déclenchement de l'effet, lequel peut donc se manifester dès la dose la plus faible. Mais la formation d'un adduit d'ADN (molécule composée entre l'ADN et le composé chimique) n'implique pas nécessairement un effet car celui-ci sous-entend qu'une séquence significative l'ADN (oncogène ou gène suppresseur de cancer) est concernée. Si l'adduit concerne une séquence non-codante d'ADN («junk DNA») il n'y aura pas d'effet visible. Si l'exposition à des concentrations plus élevées d'agents chimiques génotoxiques augmente donc le risque de cancer, cette relation n'est cependant pas absolue, d'autant plus que l'initiation correspond au tout début du processus carcinogène. Elle est séparée de son aboutissement visible par une très longue période intermédiaire -la promotion- au cours de laquelle elle peut être infléchie dans un sens ou dans l'autre. Une série d'autres modifications génétiques réversibles, cette fois, ont lieu, et donnent à certaines cellules filles de la cellule initiée la capacité de se multiplier plus vite et une forme anormale qui les différencient des cellules normales. Cette phase aboutie a une lésion précancéreuse. Enfin lors de la progression, on assiste au passage des cellules précancéreuses aux cellules malignes (qui prolifèrent vite et ont la capacité d'envahir des tissus voisins) par d'autres modifications génétiques (Canova et *al.*, 1998).

I.2 Oncogènes et anti-oncogènes

Les mécanismes moléculaires de l'oncogénèse sont orchestrés par une famille d'oncoprotéines codées génétiquement et agissant au cours des trois phases de cancérisation. Le déséquilibre entre proto-oncogènes et anti-oncogènes. Tout gène cellulaire, appelé proto-oncogène (c-onc), susceptible de devenir, par suite d'une modification qualitative ou

quantitative, *un gène transformant*, c'est-à-dire un gène capable de conférer expérimentalement le phénotype cancéreux (transformation) à une cellule normale eucaryote. Dont l'altération d'un allèle est suffisante pour entraîner une activation anormale. Les oncogènes sont répartis en 6 grandes classes en fonction des onco-protéines pour lesquels ils codent : les facteurs de croissance (assurent une boucle de régulation autocrine), *Exemple* : proto-oncogènes codant pour les protéines de la famille FGF (fibroblast growth factor), les récepteurs transmembranaires de facteurs de croissance. *Exemple* : le proto-oncogène *erb B* code pour le récepteur à l'EGF (epidermal growth factor), les G-protéines ou protéines membranaires liant le GTP, *Exemple* : proto-oncogènes de la famille *ras*, les tyrosines protéine-kinases membranaires, les protéine-kinases cytosoliques, les protéines à activité nucléaire : contrôlent la transcription de gènes cibles en interagissant avec l'ADN. *Exemple* : proto-oncogène *erbA* codant pour le récepteur aux hormones thyroïdiennes, les proto-oncogènes *fos*, *jun* et *c-myc*. Les mécanismes d'activation des oncogènes sont multiples : l'intégration virale telle que pour l'HBV, c'est-à-dire par insertion de l'ADN viral au niveau d'un gène régulateur qui aboutit à un gène chimère à l'origine de la synthèse d'une protéine hybride. Les mutations ponctuelles dans une séquence codante pour un proto-oncogène aboutit également à une modification fonctionnelle de l'oncoprotéine. Les mutations faux-sens entraînant la substitution d'un acide aminé par un autre, sont capables d'activer des proto-oncogènes en oncogènes, en touchant par exemple un site catalytique ou en induisant une activation substitutive de la protéine. Les mutations faux-sens et activation de la famille *ras* aboutissant à un blocage en conformation active, liée au GTP. Les délétions qui aboutissent le plus souvent à une perte de fonction, peuvent parfois entraîner une activation anormale si elles touchent une région régulatrice. L'activation du proto-oncogène *erb B* qui code pour le récepteur à l'EGF peut résulter de la délétion de la partie extra-membranaire et le domaine kinase intracytoplasmique est alors actif de façon constitutive. Le réarrangement structural : Des altérations chromosomiques (translocations, inversions...) peuvent avoir pour conséquence moléculaire la formation d'un gène hybride généré par la fusion de régions codantes entraînant la synthèse de protéines chimériques non fonctionnelles (Lee et Muller, 2010).

L'amplification génique correspond à une augmentation anormale du nombre de copies du gène dans la cellule, les copies surnuméraires se trouvant alors, soit sous forme intégrée dans un chromosome, soit sous forme de minichromosomes surnuméraires, les chromosomes double-minute (DM). Cette amplification entraîne généralement une augmentation du niveau

de l'expression du gène. *Exemple* : Les proto-oncogènes *c-myc* et *N-myc* sont souvent amplifiés dans les tumeurs solides. La dérégulation de l'expression, stabilisation d'un mRNA codant pour une oncoprotéine: Les proto-oncogènes, lors de translocations chromosomiques, peuvent être déconnectés de leur environnement moléculaire normal et placés sous le contrôle inapproprié d'autres séquences à l'origine d'une modification de leur expression. Pour contrebalancer l'action des proto-oncogène, il existe une autre famille de protéines anti-oncogène ou plus communément appelée gènes suppresseurs de tumeur, Ces gènes sont aptes à inhiber la croissance cellulaire lorsqu'ils sont introduits par transfection dans les cellules tumorales. Cette propriété s'explique par la capacité de ces gènes à réguler négativement le cycle cellulaire et à induire l'apoptose ou mort cellulaire programmée. Action cellulaire récessive : une altération des 2 allèles est nécessaire à l'obtention d'une perte d'activité. Deux étapes sont nécessaires, la première étape somatique (cancer sporadique) ou germinale (cancer héréditaire : facteur de prédisposition), la deuxième étape est somatique. Les anti-oncogènes agissent principalement en phase G1/S. Cette transition G1/S est sous la dépendance des facteurs de transcription de la famille E2F qui contrôlent l'expression de gènes indispensables à la phase S de synthèse de l'ADN. Les gènes RB, p16 et p53 interviennent sur la même voie biologique, qui régule la transition G1/S. La protéine p53 régule la transcription de nombreux gènes dont certains (*bax*) régulent l'apoptose (étayé plus loin dans la progression tumorale) (Lee et Muller, 2010).

II. Le Mélanome : cas du cancer de la peau

II. 1. La peau

La peau est l'organe élastique externe recouvrant tout l'organisme et représentant environ 3 % de la masse corporelle. Ses principales fonctions sont de protéger l'individu contre les agressions environnementales en jouant un rôle de barrière, et de thermoréguler l'organisme afin de limiter les dépenses énergétiques. Ce tissu possède de nombreux récepteurs sensoriels tactiles et des fonctions immunes qui lui sont propres. Anatomiquement, la peau est constituée de 4 couches superposées (Figure 1)

- l'épiderme, couche la plus externe ;
- la jonction dermo-épidermique (JDE), ou lame basale, qui assure un accrochage solide entre l'épiderme et le derme ;
- le derme, qui constitue le tissu conjonctif de soutien de la peau ;
- l'hypoderme, couche la plus profonde de la peau.

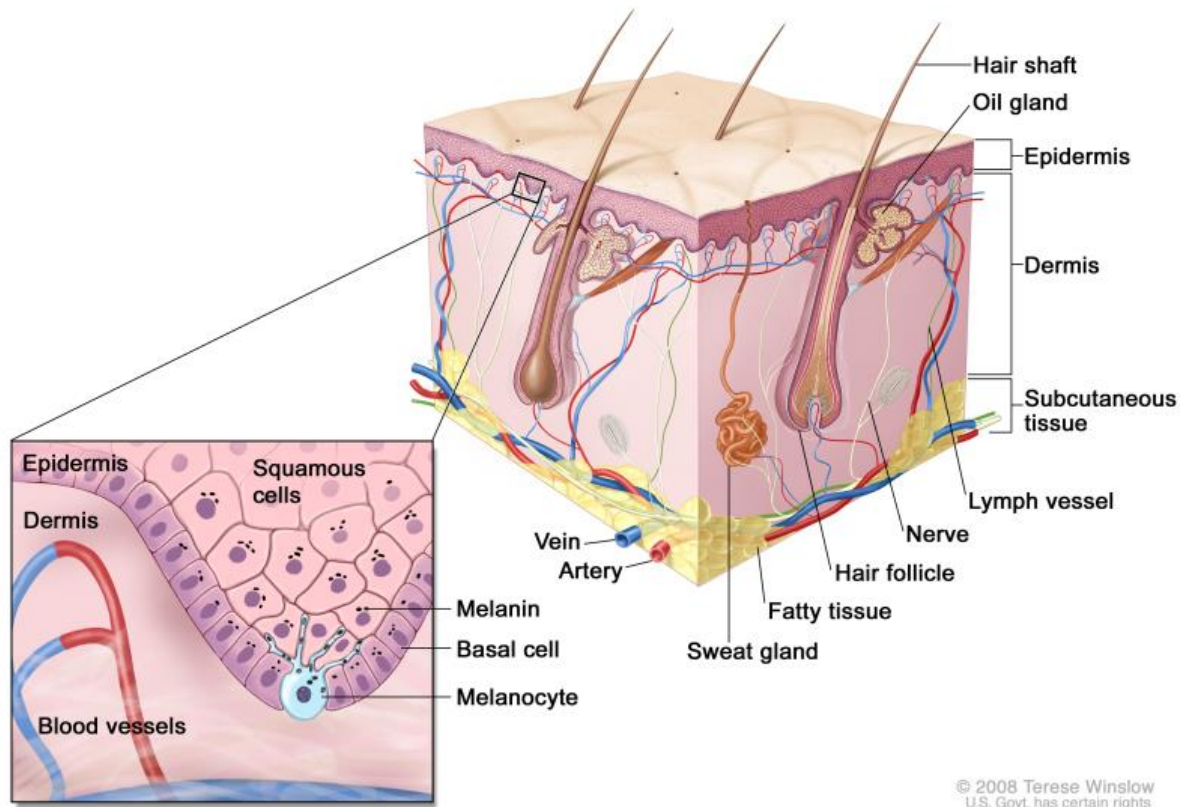


Figure 1 : Représentation de la coupe de la peau et des annexes cutanées (Winslow, 2008)

(Disponible à partir de : URL :

<https://www.teresewinslow.com/skin/rrw12kvqo9r3oxymwqo5a6tywltxnb>)

II.2 Le mélanome

Le mélanome est une tumeur maligne résultant de la transformation des mélanocytes, cellules responsables de la pigmentation de la peau d'origine neuro-ectodermique. Le mélanome peut se développer à partir de la rétine, des méninges ou du tractus intestinal, mais la grande majorité se développe à partir de la peau. Actuellement le mélanome représente 10 % des cancers de la peau et 1 % de l'ensemble des cancers. C'est le cancer cutané le plus agressif en raison de ses hauts potentiels métastatique et invasif.

Il existe deux principaux types de cancer de la peau: le mélanome et le non-mélanome. Les tumeurs non mélanomateuses les plus courantes sont le carcinome basocellulaire et le carcinome épidermoïde, qui représentent ensemble 90% des cancers de la peau (GLOBOCAN database, 2012)

II.2.1 Epidémiologie

Le mélanome représente 4% des cancers de la peau. Au total, ce rapport analyse 55 études menées dans le monde entier, portant sur près de 13 millions d'adultes, plus de 56 000 cas de cancer de la peau autre que le mélanome et 27 000 cas de cancer de la peau mélanome. Le mélanome est le 19^{ème} cancer le plus répandu dans le monde. Environ 232 000 nouveaux cas de cancer de la peau ont été enregistrés dans le monde en 2012, soit 1,6% de tous les nouveaux cas de cancer. Le cancer de la peau autre que le mélanome n'est généralement pas inclus dans les estimations des taux de cancer mondiaux et nationaux. Les données sur les cancers de la peau autres que le mélanome sont généralement moins précises et moins complètes que pour les autres cancers (GLOBOCAN databases, 2012).

Le mélanome affecte les personnes de tous les âges, l'enfant reste toutefois beaucoup moins assujéti à ce type de cancers. Plus de 60 % des mélanomes sont relevés dans la population féminine. Bien que la moitié des cas survienne chez les personnes de plus de 50 ans, c'est l'un des cancers les plus fréquents chez les jeunes adultes. Il est au premier rang des cancers de la femme de 25 à 29 ans, et au deuxième rang chez les femmes de 30 à 34 ans (Remontet *et al.*, 2003).

Le mélanome représente la première cause de mortalité par cancer cutané. La mortalité tend à augmenter moins rapidement que l'incidence. Ceci peut être attribué à un diagnostic plus précoce de la maladie (Haute autorité de santé, 2006 ; Chérié-Challine *et al.*, 2004).

II.2.2. Facteurs de risques

a. Les radiations

Les rayons solaires représentent un des facteurs environnementaux les plus incriminés dans l'épidémiologie du mélanome (Gilchrest *et al.*, 1999) et 90 % des mélanomes sont liés à une exposition excessive au soleil. La surexposition à certains types de lumière, tels que les rayons ultraviolets du soleil ou les appareils de bronzage, est la principale cause des cancers de la peau avec mélanome et autres cancers. Les rayons ultraviolet A (UV A) provoquent un vieillissement prématuré de la peau et affectent le système immunitaire, permettant la multiplication des cellules anormales. Les rayons ultraviolet B (UV B), quant à eux, provoquent des brûlures de la peau ("coup de soleil"), étant génotoxiques, ils endommagent le matériel génétique des cellules cutanées et provoquent ainsi des mutations pouvant aboutir au cancer (Gilchrest *et al.*, 1999).

Le phototype, qui représente la sensibilité au soleil, constitue le risque individuel majeur. Il inclut la couleur de la peau, des cheveux et des yeux, et détermine le type de réactions cutanées déclenchées par le soleil. Ainsi, les sujets à phototype faible (phototypes I et II de Fitzpatrick), c'est-à-dire à peau claire et ne bronzant pas ou peu, sont plus sujets au développement d'un mélanome que les individus de phototype III ou IV, présentant une peau bronzant facilement, naturellement mieux adaptée. Cependant, même les peaux les mieux adaptées ne doivent pas s'exposer abusivement au soleil car le risque de développer des cancers cutanés reste non négligeable (Andreassi *et al.*, 1999).

b. Des médicaments

Les médicaments utilisés pour supprimer le système immunitaire après une greffe d'organe sont associés à un risque accru de cancers de la peau, en particulier de carcinome épidermoïde. Le mélanome est plus fréquent et plus agressif chez des patients immunodéprimés (Veness *et al.*, 1999).

c. Les infections

L'infection par le virus du papillome humain peut provoquer des carcinomes épidermoïdes de la peau, en particulier chez les personnes dont le système immunitaire est compromis.

d. L'exposition professionnelle

L'exposition à des produits chimiques spécifiques utilisés dans les industries plastique et chimique - les biphényles polychlorés - est fortement associée à un risque accru de cancer de la peau (Gallagher *et al.*, 2011).

e. Histoire familiale et origine ethnique :

Les personnes qui ont des antécédents familiaux de mélanome peuvent être prédisposées à ce type de cancer de la peau. Le cancer de la peau autre que le mélanome et le mélanome est plus fréquent chez les populations à peau claire que chez les populations à peau sombre en raison de la pigmentation de leur peau plus claire. Environ 10 % des mélanomes sont en relation avec les facteurs génétiques. Les phototypes clairs, la capacité à générer des naevi et la présence de naevi atypiques sont en partie génétiquement transmis. Ainsi, la prédisposition familiale est définie comme au moins 2 mélanomes sur 3 générations. Les individus ayant une susceptibilité de développer un mélanome peuvent donc être repérés, seulement l'utilisation de marqueurs moléculaires spécifiques telle que la protéine S-100 qui permet d'identifier un mélanome peu différencié (Abraha *et al.*, 1997)









f. Fréquence des naevi

Les naevi, plus communément appelés “grains de beauté”, peuvent être à l’origine du développement d’un mélanome. Toutefois, seuls 20 à 30 % des mélanomes semblent être issus de la transformation d’un naevus, les mélanomes apparaissant *de novo*. Le nombre, la taille et l’aspect des naevi sont des facteurs de risque importants concernant le développement d’un mélanome. En effet, le risque de développer un mélanome sur un naevus congénital de grande taille (couvrant 5 % de la surface corporelle) est élevé (Swerdlow *et al.*, 1995).

II.2.3. Diagnostic et classifications

Le diagnostic du mélanome est anatomo-clinique et l’interprétation anatomopathologique est à la base du diagnostic, de la prise de décisions thérapeutiques et de l’évaluation du pronostic. Le diagnostic clinique repose sur l’analyse morphologique d’une lésion cutanée pigmentée selon la règle ABCDE. Un mélanome se présente généralement sous la forme d’une lésion asymétrique (A), à bords irréguliers (B). La pigmentation peut parfois envahir la peau à proximité de la lésion. La couleur perd son homogénéité (C) avec des zones dépigmentées et des teintes variables allant du gris au rouge. Le mélanome a, le plus souvent, un diamètre supérieur à 6 mm (D) et on observe une évolution ou extension permanente de la lésion (E) (Tableau 1).

Tableau I : Illustration des critères de reconnaissance d'un mélanome : la règle ABCDE

Tache pigmentée bénigne		Tache pigmentée suspecte	
A = Asymétrie			
Forme régulière et symétrique			Forme irrégulière, non symétrique
B = Bords			
Bords réguliers et contours délimités			Bords irréguliers, non correctement délimités
C = Coloration			
Couleur uniforme			Couleurs diverses, taches
D = Dynamique			
Sans évolution			Modifications (taille, couleur, forme ou épaisseur)

Toute lésion suspecte de mélanome doit être excisée en vue d'un examen histopathologique. L'étude histologique permet d'affirmer la nature mélanocytaire de la tumeur ainsi que sa malignité. Enfin, il permet d'évaluer le degré d'invasion de la tumeur en profondeur et de mesurer son épaisseur, ce qui représente le principal facteur pronostic. La classification de Breslow est basée sur l'épaisseur de la tumeur en mm (Breslow, 1970) :

- $\leq 0,75$ mm : 96 % de survie après 5 ans
- 0,76 à 1,50 mm : 87 % de survie après 5 ans
- 1,51 à 4 mm : 76 % de survie après 5 ans
- > 4 mm : 47 % de survie après 5 ans

Il existe une corrélation inverse entre l'indice de Breslow et la survie après le traitement. Avec un diamètre supérieur à 6 mm et une couleur variable autour du naevus. Sa couleur à l'intérieur diffère de celle des bords. Les bordures sont irrégulières avec une asymétrie entre les deux moitiés.

Le niveau d'invasion selon Clark et Mihm (Clark *et al.*, 1969) est basé sur le concept de franchissement de "barrières anatomiques" :

- Clark I : mélanome intra-épidermique, sans risque métastatique
- Clark II : invasion du derme papillaire
- Clark III : invasion de la jonction réticulo-papillaire dermique
- Clark IV : invasion du derme réticulaire
- Clark V : invasion de l'hypoderme

Le bilan de ces classifications permet de déterminer 3 grands stades cliniques du mélanome d'intérêt pronostic :

- Stade I : tumeur primitive sans atteinte ganglionnaire ni métastases
- Stade II : atteinte ganglionnaire régionale
- Stade III : dissémination métastatique ganglionnaire au-delà du premier relais et/ou métastases viscérales (Clark *et al.*, 1969).

II.2.4. Le Mélanocyte : Point de départ du Mélanome

Les mélanocytes sont des cellules pigmentées spécialisées retrouvées dans la peau (épiderme et derme), l'oeil et l'oreille interne. Dans la peau, les mélanocytes se situent à la jonction derme-épiderme, dans la couche basale (Figure 2).

2. Fonctions des mélanocytes Les mélanocytes sont des cellules possédant des extensions dendritiques, ils se différencient en produisant un pigment, la mélanine, qui joue le rôle de filtre en absorbant une partie du rayonnement solaire. La mélanine s'accumule dans de petites vésicules semblables aux lysosomes, les mélanosomes, qui seront transférées via des extensions dendritiques aux kératinocytes voisins. Les kératinocytes distribuent les mélanosomes dans les régions exposées au soleil : la mélanine sert d'« ombrelle » (Lin and Fisher 2007). La pigmentation protège efficacement l'ADN des cellules épidermiques contre le haut pouvoir mutagène des U.V. La transformation des mélanocytes en mélanome se déroule en plusieurs étapes. Les premières, considérées comme bénignes, vont de la formation d'un nævus, ou grain de beauté, jusqu'au stade RGP (radial growth phase ou phase horizontale de croissance). Dans les nævi, les mélanocytes se regroupent entre eux et perdent tout contact avec les kératinocytes. A ce stade, ils se multiplient de façon horizontale : ils ne franchissent pas la lame basale de l'épiderme. Les étapes suivantes conduisent au stade VGP (vertical growth phase ou phase verticale de croissance) où les mélanocytes se multiplient activement de manière verticale et pénètrent de plus en plus profondément dans le derme. Lors de la dernière étape de la transformation pathologique des mélanocytes, ils envahissent complètement le derme et pénètrent la circulation sanguine et lymphatique. Les cellules

cancéreuses vont alors se répandre dans d'autres parties de l'organisme et être à l'origine de nouveaux cancers (Figure 6) (Gray-Schopfer et al., 2007).

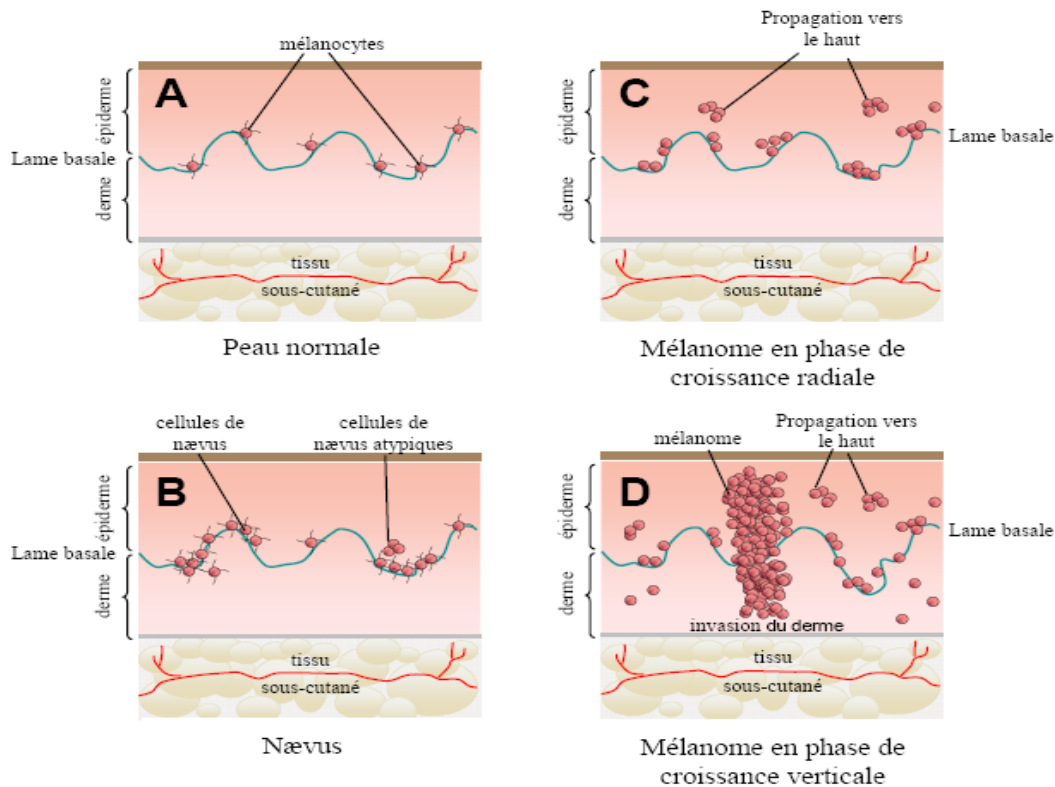


Figure 2 : Représentation schématique de la transformation maligne des mélanocytes en mélanome (adapté de Gray-Schopfer et al., 2007).

A- Peau normale. Les mélanocytes sont des cellules dendritiques situées dans la couche basale de l'épiderme. B- Nævus ou grain de beauté. Les mélanocytes dendritiques s'accumulent dans certaines zones. C- Phase de croissance radiale (RGP). Les mélanocytes sont dédifférenciés et perdent tout contact avec les kératinocytes. Début du développement d'un mélanome. D- Phase de croissance verticale (VGP) : moment critique responsable de la formation de métastases. Les mélanocytes dédifférenciés se multiplient de façon verticale, envahissent le derme et pénètrent la circulation sanguine et lymphatique.

III. La croissance tumorale.

Une masse tumorale est, comme tout autre tissu, une population cellulaire en constante évolution ; elle est à tout moment la résultante de deux phénomènes : la prolifération des cellules tumorales d'une part et la mort de certaines d'entre elles d'autre part. Ainsi la croissance globale d'une tumeur peut avoir pour origine une augmentation de la prolifération et/ ou une diminution de la mort cellulaire. Aussi, rappellerons-nous d'abord les mécanismes principaux de la prolifération cellulaire ainsi que certaines dérégulations fréquemment observées dans les cancers en général.

III. 1. La prolifération cellulaire.

La prolifération cellulaire résulte de divisions successives d'une cellule en deux cellules filles identiques ou mitoses. En fait, le cycle cellulaire peut être décomposé en quatre étapes principales et schématiques : les phases « S » de répllication d'ADN et « M » de mitose sont dites fonctionnelles et sont précédées chacune d'une phase préparatoire G1 et G2 respectivement. Les cellules peuvent également sortir du cycle cellulaire en phase G1 pour devenir « quiescentes » en phase G0. La régulation et la progression de la cellule au sein de ce cycle fait intervenir la famille des kinases cycline-dépendantes ou protéines Cdk qui représentent les sous unités catalytiques des complexes qu'elles forment avec les sous-unités régulatrices, les cyclines D, E, A et B. L'activité de ces complexes dépend également de la *Cdk-activating kinase* et d'inhibiteurs des protéines Cdk. Chaque phase du cycle cellulaire est ainsi caractérisée par l'expression et l'activité de certains de ces complexes qui s'induisent et se succèdent selon une séquence bien définie, ce qui permet le contrôle intrinsèque de la prolifération (Liu *et al.*, 2000)

Le contrôle extrinsèque fait référence aux effets de nombreux facteurs de croissance qui vont moduler l'expression et l'activité des divers intervenants de ce processus durant la phase G1, jusqu'à un point de restriction ou de non retour au-delà duquel la cellule poursuivra son cycle quel que soit son environnement (Liu *et al.*, 2000). Les signaux mitogènes, via notamment les voies de signalisation des MAPK et de la beta-caténine, vont ainsi moduler l'expression de la cycline D. La régulation de l'activité des complexes cycline D / Cdk-4 ou Cdk-6 est en effet une étape clé du cycle cellulaire ainsi que celle du complexe cycline E / Cdk-2, nécessaire et suffisant pour entrer en phase S (Liu *et al.*, 2000). Pour les organismes eucaryotes vivant, il est indispensable que les différentes phases du cycle cellulaire soient précisément coordonnées. Les phases doivent suivre un ordre correct, et une phase doit être terminée avant que la phase suivante ne démarre. Les erreurs de coordination peuvent conduire à des altérations chromosomiques. Des chromosomes ou des parties de chromosomes peuvent être perdus, réarrangés ou distribués de manière inéquitable entre les deux cellules filles. Ces types d'altérations chromosomiques sont souvent observés chez les cellules cancéreuses. Pour les organismes eucaryotes vivant, il est indispensable que les différentes phases du cycle cellulaire soient précisément coordonnées. Les phases doivent suivre un ordre correct, et une phase doit être terminée avant que la phase suivante ne démarre. Les erreurs de coordination peuvent conduire à des altérations chromosomiques. Des chromosomes ou des parties de chromosomes peuvent être perdus, réarrangés ou

distribués de manière inéquitable entre les deux cellules filles. Ces types d'altérations chromosomiques sont souvent observés chez les cellules cancéreuses (Meijer, 2003).

III. 1.1. Marqueurs de la prolifération cellulaire

En outre, le pourcentage de cellules en phase S est une bonne mesure de la prolifération tumorale. L'antigène Ki-67 fait partie des marqueurs de prolifération. L'antigène Ki67 fut décrit par Gerdes en 1983 après immunisation des souris par injection de noyaux de cellules de lymphome provenant d'un lymphome de Hodgkin (clone 67 de la plaque 96 puits, étude réalisée dans la ville de Kiel) (Gerdes *et al.*, 1983). Il est présent au niveau du noyau des cellules prolifératives, en phase G1, S, G2 et M, toutefois, sa fonction précise n'est pas connue. Il est connu par définition pour étant un marqueur de prolifération, l'antigène Ki-67 n'est pas détecté dans des cellules quiescentes ou en phase G0, mais sa présence peut être mise en évidence au cours des différentes phases du cycle cellulaire. Quantitativement, son expression augmente de la phase G1 à la phase M avec un maximum, selon les auteurs, atteint soit dès la fin de la phase S (Seigneurin *et al.*, 1991), soit lors des phases G2 et M (Lundblad *et al.*, 1991). Sa quantité est de toute façon maximale en début de mitose pour décroître ensuite. L'expression du Ki-67 est variable durant la phase G1. En effet, lors de la transition du stade G0 à G1, c'est-à-dire lors de l'entrée dans le cycle cellulaire, les cellules n'expriment pas le Ki-67, alors qu'il est détectable dans les cellules en phase G1 qui enchaînent un nouveau cycle dès la sortie du précédent. Lorsqu'il n'est pas présent au début de la phase G1, l'antigène Ki-67 apparaît sensiblement au milieu de cette phase, ce qui pourrait correspondre au début de sa synthèse (Linden *et al.*, 1992). L'antigène est ensuite constamment détecté lors des phases S, G2 et M du cycle. A noter toutefois que certains auteurs ont rapporté l'existence de rares cellules, classées en S ou G2 par leur contenu en ADN, et qui sont Ki-67 négatives : il s'agirait de cellules arrêtées ou bloquées au cours du déroulement du cycle en S ou G2 et dans lesquelles l'antigène Ki-67 aurait été dégradé (Baisch et Gerdes, 1987).

L'expression de l'antigène Ki-67 détectée par immunohistochimie présente des variations topographiques au cours des différentes phases du cycle. D'une manière générale, le marquage observé sur des cellules en interphase est strictement nucléaire sans qu'aucun marquage cytoplasmique ne soit observé dans quelque phase du cycle que ce soit, y compris durant la mitose. Le marquage apparaît régulièrement intense en région nucléolaire et globalement hétérogène pour le nucléoplasme (Van Dierendonck *et al.*, 1991).

D'autre part, des dommages de l'ADN vont générer des signaux qui peuvent induire l'arrêt du cycle cellulaire en phase G2 (*checkpoint*), soit pour permettre une réparation soit pour induire la mort cellulaire programmée de type I ou apoptose. p53 et la protéine ATM sont des intervenants majeurs dans ce processus qui est dérégulé dans de nombreux cancers (Yoshida *et al.*, 2003). Ceux-ci sont en effet caractérisés par des altérations du contrôle du cycle cellulaire en faveur de la prolifération; les plus fréquentes sont des mutations inactivatrices de gènes dits « suppresseurs de tumeurs » tels que ceux codant pour les protéines p53, rb ou encore certains inhibiteurs de Cdk comme les protéines p16 ou p21, ou l'activation d'oncogènes impliqués dans les voies de signalisation mitogènes tels que *RAS*, *RAF* ou *AKT* (Yoshida *et al.*, 2003). Dans les mélanomes en particulier, les mutations les plus fréquentes concernent *B-RAF* (50-65% des cas) et *N-RAS* (15% des cas) ainsi que *CDKN2A*, *CDK-4* et *PTEN / AKT* qui interviennent de façon directe ou indirecte sur la prolifération des mélanomes (Meier, 2003).

III.2. Progression tumorale et métastases

L'histogénèse des mélanomes suit une théorie biphasique. En effet, la première étape est une progression superficielle des cellules, au-dessus de la membrane basale puis dans le derme superficiel, avec une croissance horizontale sans caractère métastatique. Dans une seconde phase de croissance verticale, les cellules pénètrent profondément dans le derme ; elles acquièrent un fort potentiel invasif. Les cellules quittent alors la tumeur primaire et gagnent la circulation sanguine afin de coloniser d'autres organes ; c'est la formation de métastases (Figure 3). Les principales localisations secondaires métastatiques sont pulmonaires, hépatiques et cérébrales (Thomas, 2002).

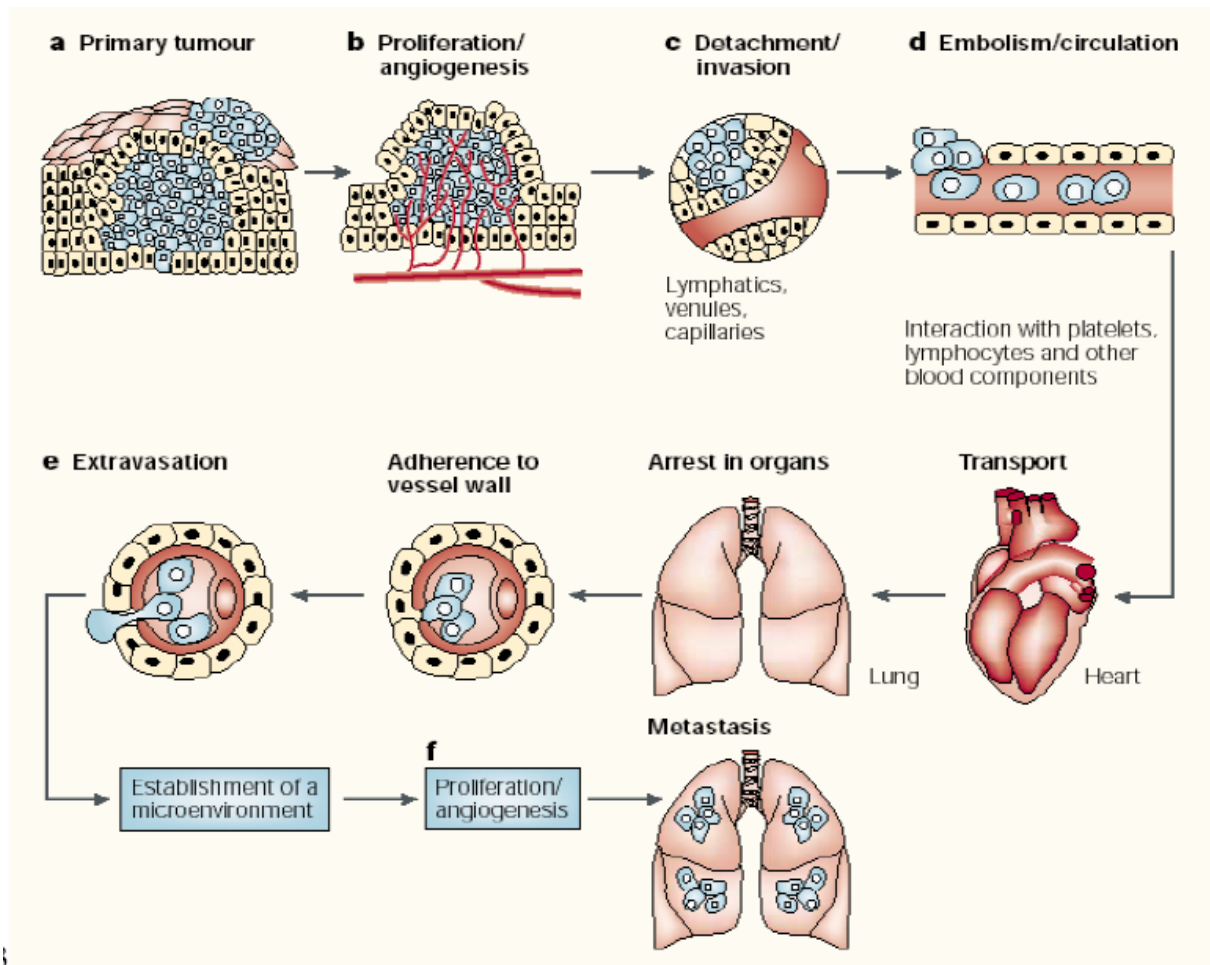


Figure 3 : schématisation du développement d'un cancer (Fidler, 2003)

Une population de cellules cancéreuses se développe au sein d'un tissu. Ensuite, pour croître d'avantage, la tumeur recrute des vaisseaux sanguins et lymphatiques qui vont lui apporter nutriments et facteurs de croissance. D'autre part cette circulation va être colonisée par les cellules cancéreuses migrantes qui se détachent de la tumeur primitive et viennent envahir ces vaisseaux. Les cellules sont ainsi amenées par l'appareil circulatoire dans les lits vasculaires d'autres organes, vont adhérer à leur paroi et, après extravasation, vont coloniser et proliférer au sein de l'organe cible pour créer des métastases. Elles peuvent être à l'origine de nouvelles disséminations au sein du tissu et vont ainsi petit à petit détruire les organes ainsi envahis.

L'invasion tumorale est une phase clé de la maladie cancéreuse. Elle permet la progression et la dissémination des cellules cancéreuses dans l'ensemble de l'organisme et aboutit à la formation de métastases, cause la plus fréquente du décès des patients. Les différentes étapes de l'invasion tumorale nécessitent la dégradation et le remodelage de la matrice extracellulaire, ce qui implique notamment la sécrétion puis l'activation d'enzymes protéolytiques, comme les métalloprotéinases matricielles (MMPs) ou le système de la plasmine. De nombreuses protéases sont impliquées dans le développement des mélanomes et dans les phénomènes de dissémination métastatique (Hofmann *et al.*, 2000a). Les cellules

de mélanome expriment essentiellement les collagénases MMP-1 et -13, les gélatinases MMP-2 et -9 et la MT1-MMP, ainsi que les TIMP-1, -2 et -3 (Hofmann *et al.*, 2005).

L'augmentation de l'expression des MMP-1, -2, -9 et MT1-MMP est souvent corrélée à un phénotype invasif. *In vitro*, la MMP-2 active est spécifiquement exprimée par les lignées cellulaires hautement invasives (Capon *et al.*, 1999). La surexpression de l'intégrine $\alpha\beta 3$ et/ou de la MT1-MMP stimule l'activation de la pro MMP-2 (Hofmann *et al.*, 2000b).

La MT1-MMP joue également un rôle direct dans la progression tumorale et la dissémination métastatique, puisqu'elle est capable de dégrader de nombreux composants matriciels, comme le collagène I, la gélatine ou encore les protéoglycannes. De plus, des études ont montré que l'extinction de son expression entraîne une inhibition de l'invasion cellulaire, et ce dans des lignées cellulaires tumorales qui produisent des niveaux élevés d'autres MMPs. Ces observations démontrent que la MT1-MMP contribue à la progression tumorale, indépendamment de ses capacités à activer la pro MMP-2 (Koike *et al.*, 2002 ; Sounni et Noel, 2005 ; Sato *et al.*, 2005).

D'autre part, la surexpression de la MMP-2 stimule la migration des cellules de mélanome (Hofmann *et al.*, 2000a). A l'opposé, l'adhésion ainsi que l'étalement des cellules tumorales en culture sont stimulés par la surexpression du TIMP-2. L'utilisation de souris déficientes en MMP-2 a permis de démontrer l'implication de cette protéase dans les phénomènes de croissance tumorale, de néoangiogenèse et de dissémination métastatique. La MMP-2 intervient donc à tous les stades du développement de la tumeur (Itoh *et al.*, 1998).

III.3. Angiogenèse tumorale

L'importance de l'angiogenèse pour la croissance des tumeurs est largement reconnue. Il a été établi que le développement d'une tumeur commence par une phase prévasculaire initiale suivie par l'augmentation du volume de la tumeur $2-3 \text{ mm}^3$, soit l'équivalent de 100 à 300 cellules tumorales, c'est la phase de l'angiogenèse tumorale (Folkman, 1971).

La formation de nouveaux vaisseaux, ou néo-angiogenèse, est nécessaire à la croissance tumorale (Folkman, 1971). Du fait de leur croissance rapide, les cellules tumorales se retrouvent en hypoxie et en acidose, et leurs besoins en nutriments ne peuvent être assurés que par de nouveaux vaisseaux sanguins (Figure 4).

La néovascularisation issue de l'angiogenèse tumorale présente un état d'activation cellulaire maximum pour une efficacité de perfusion insuffisante. Elle est très hétérogène en densité, par sa maturation phénotypique d'une zone tumorale à l'autre et d'une tumeur à

l'autre.

De nombreuses données cliniques et expérimentales suggèrent que la croissance tumorale et le processus métastatique dans son ensemble seraient grandement influencés par les interactions entre les cellules tumorales et le micro-environnement de l'organe hôte, en particulier les cellules endothéliales de nouveaux vaisseaux sanguins composant le stroma de la tumeur (Blood et Zetter, 1990). De plus, la vascularisation des tumeurs permet le passage des cellules tumorales dans la circulation sanguine ou lymphatique, assurant ainsi leur transport passif. La néo-angiogenèse est donc un élément essentiel pour la formation de métastases. Le recrutement de nouveaux vaisseaux sanguins s'organise en différentes étapes qui se déroulent séquentiellement. Les cellules tumorales en hypoxie sécrètent des inducteurs angiogéniques tels que le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) ou le bFGF (basic Fibroblast Growth Factor) ; les cellules endothéliales de vaisseaux déjà existants sont alors activées. Ces cellules dégradent la membrane basale et migrent vers le stimulus angiogénique en formant une colonne appelée bourgeon vasculaire, tout en continuant à proliférer. Par la suite, les cellules se différencient et s'organisent en tubes formant des lumières. Le raccordement de ces tubes les uns aux autres permet l'établissement de réseaux vasculaires dans lesquels pourra s'établir la circulation sanguine. L'étape finale du développement de nouveaux capillaires est la formation d'une membrane basale (Tandle *et al.*, 2004). La néo-angiogenèse se poursuit tant que la tumeur se développe, permettant l'irrigation et l'apport de nutriments aux zones hypoxiques et nécrotiques de la tumeur.

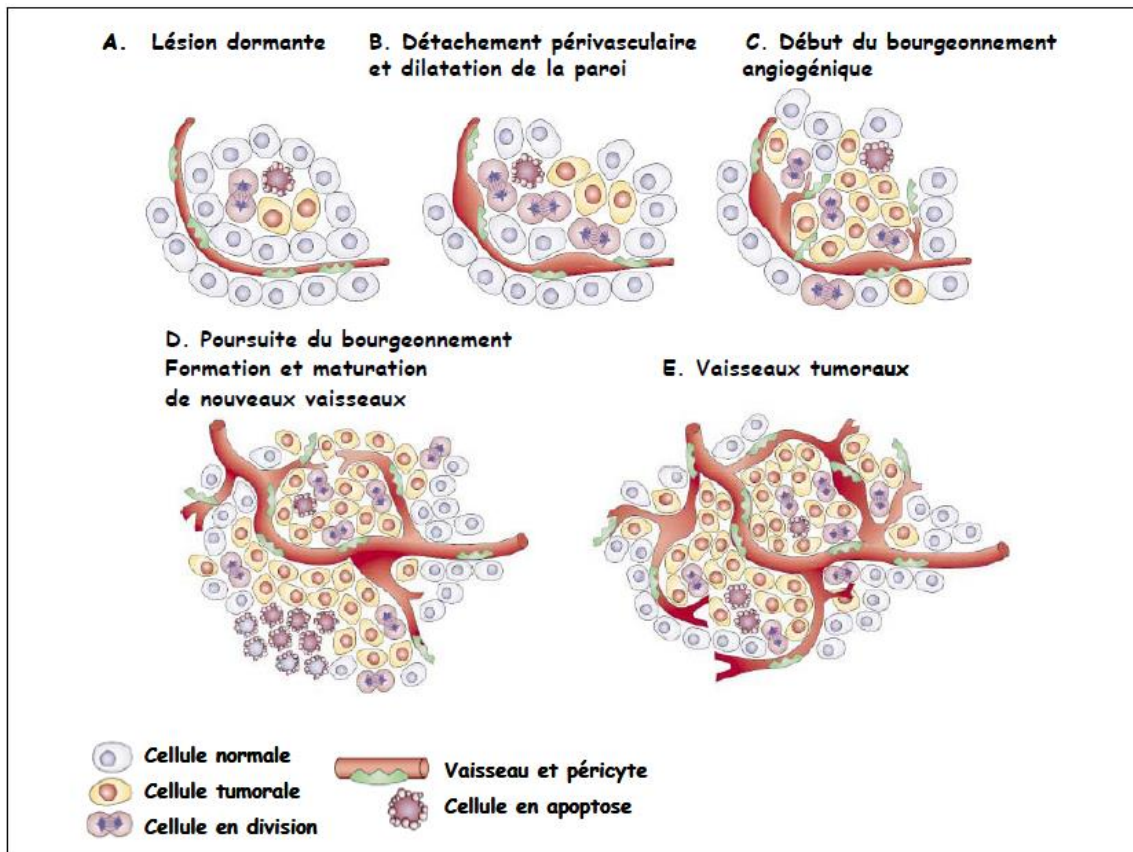


Figure 4. La néoangiogenèse tumorale (Berger et Benjamin, 2003).

A) La plupart des tumeurs se développent sous forme de nodules non vascularisés, jusqu'à ce qu'elles atteignent un état stationnaire avec des cellules en prolifération et en apoptose. L'initiation de l'angiogenèse est alors nécessaire à la croissance tumorale. (B) La première étape commence avec le détachement péri-vasculaire et la dilatation des vaisseaux sanguins. (C) Elle est suivie d'un bourgeonnement angiogénique, (D) de la formation et la maturation de nouveaux vaisseaux sanguins, et du recrutement des cellules périvasculaires. (E) La néoangiogenèse continue tant que la tumeur se développe.

IV. Traitement du cancer

Des dizaines de molécules, utilisées seules ou en association... Grâce à d'importantes percées dans la recherche biologique et génétique, les médicaments anticancéreux se sont multipliés ces dernières années. Dans leur ensemble, ils visent tous à empêcher la prolifération cellulaire qui caractérise les cancers, ou à détruire les cellules tumorales. Ils permettent également d'aider l'organisme à les combattre.

Le terme « chimiothérapie » est très souvent employé dans le langage courant pour évoquer ces médicaments anticancéreux. Sur le plan étymologique pourtant, le mot « chimiothérapie » désigne tout traitement reposant sur une « substance chimique ». Au début du XX^e siècle, il était principalement utilisé dans le cadre des maladies infectieuses. De nos jours, « chimiothérapie » fait presque exclusivement référence à la cancérologie, et désigne un médicament qui s'attaque à l'ADN des cellules tumorales. Il existe plusieurs dizaines de

molécules anticancéreuses administrées sous forme orale ou par voie intraveineuse. Elles peuvent être regroupées de la façon suivante :

IV. 1. Les médicaments cytotoxiques « traditionnels »

Les thérapies ciblées qui depuis quelques années, sont présentées comme la révolution en matière de traitements anticancéreux. Portée par une meilleure compréhension du fonctionnement de la cellule et des récepteurs en jeu, la recherche est actuellement en totale effervescence. Pour l'heure, les principales molécules utilisées dans le cadre de ces thérapies ciblées appartiennent aux familles des inhibiteurs de l'angiogénèse (anti-VEGF) et des inhibiteurs des voies de transduction du signal (anti-HER, anti-VEGF) ;

IV. 2. Les traitements par immunothérapie, Les traitements hormonaux.

En chimiothérapie clinique du cancer, il est établi par expérience que la réponse des métastases aux traitements diffère de manière significative selon le tissu envahi. De ce fait la sensibilité aux traitements. Le tableau II ci-dessous rassemble les différentes classes de médicaments et leurs modes d'action.

Tableau II: Principaux médicaments anticancéreux

Classe de médicament	Mode d'action
Alcaloïdes et agents antimicrotubuline	Inhibiteurs de la polymérisation de la tubuline : Vincristine, Vinblastine, Navelbine Inhibiteurs de la dépolymérisation de la tubuline : Paclitaxel, Docetaxel
Agents antimétabolites	Antifolates : Méthotrexate, Trimetrexate et Raltrexed Analogues des pyrimidines : Fluorouracile, Capecitabine, Eniluracile, Cytosine-arabinoside, Gemcitabine Analogues des purines : 6-mercaptopurine, 6-thioguanine, Fludarabine, cladribine
Agents alkylants et apparentés	Moutardes azotées : Cyclophosphamide, Ifosfamide, Melphalan, Chlorambucil Aziridines : Thiotepa, Mitomycine C Alkyls sulfonates : Busulphan Nitrosourées : carmustine ou BCNU, lomustine ou CCNU, MéthylCCNU Hydrazines et triazines : Procarbazine, Dacarbazine et Temozolomide Dérivés du platine : Cis Platine, Carboplatine et Oxaliplatine
Agents interagissant avec les topoisomérases	Epipodophylotoxines : Etoposide ou VP-16 , Teniposide ou VM-26 Analogues de la Camptothecine : Camptothecine, Irinotecan, Topotecan Anthracyclines et composés voisins : Doxorubicine, Epirubicine, Idarubicine, Mitoxantrone, Actinomycine D
Autres molécules	Bléomycine, Hydroxyurée, L-Asparaginase, Colchicine (non utilisé en clinique)

IV.1. Traitements dans le cas du mélanome

IV.1.1. La chirurgie :

La tumeur primitive doit être excisée et les marges de résection seront fonction de l'indice de Breslow (Breslow, 1970). Pour les stades IA (Breslow \leq 1mm, non ulcérés), cette intervention chirurgicale est suffisante et la survie excellente. Pour les stades cliniques IB et II, une analyse du ganglion sentinelle sera préconisée afin de déterminer la nécessité d'un évidement ganglionnaire si elle s'avère positive. Un tel évidement sera pratiqué en cas d'évidence d'atteinte ganglionnaire (stade III ou IV).

IV.1.2. Les traitements adjuvants

Ils comprennent la radiothérapie qui est utilisée à visée palliative dans le cas de métastases cérébrales ou osseuse (Atallah et Flaherty, 2005 ; Marnitz *et al.*, 2006).

Divers protocoles de chimiothérapie ou d'immunothérapie peuvent être proposés pour les stades avancés, dont un traitement biomolécules telles que les cytokines comme l'interleukine-2 (IL-2) ou l'interféron alpha 2b (IFN α 2b) permettent de renforcer la défense immunitaire naturelle anti-tumorale et sont approuvées par la FDA pour le traitement du mélanome. Ce dernier donnant des résultats mitigés (Ives *et al.*, 2007). La combinaison de ces traitements avec des agents cytotoxiques n'a pu être montrée plus efficace que leur utilisation seule (Falkson *et al.*, 1998; Keilholz *et al.*, 2005). en cas de métastases en transit au niveau d'un membre, une chimiothérapie, généralement à base de melphalan, est administrée uniquement au niveau de celui-ci par dérivation vasculaire afin d'augmenter les doses sans pour autant augmenter les effets secondaires ; l'adjonction de TNF- α semble augmenter le bénéfice thérapeutique obtenu par cette technique (Grunhagen *et al.*, 2006). Actuellement, malgré la diversité des produits potentiellement actifs, le taux de réponse reste donc au mieux de 15% quelle que soit la combinaison thérapeutique choisie, et le taux de survie des patients n'a pu être amélioré depuis plusieurs décennies (Atallah et Flaherty, 2005)

Diverses études ont montré que le témozolomide a une efficacité comparable à la dacarbazine et peut être utilisé dans le mélanome, seul ou en combinaison ; cette molécule a l'avantage de passer la barrière hémato-méningée, pouvant ainsi agir sur les métastases cérébrales, et de pouvoir être administrée par voie orale (Agarwala *et al.*, 2004).

Dans les formes métastatiques, plusieurs médicaments sont en cours de test, avec des résultats prometteurs, dont le vemurafenib (Flaherty *et al.*, 2010), un inhibiteur de la kinase mutée codée par le gène *BRAF* présent chez la moitié des patients, le dabrafenib (Hauschild *et al.*, 2012) et l'Ipilimumab (Hodi *et al.*, 2010), le trametinib (). Le vemurafenib et l'Ipilimumab ont reçu une AMM Européenne en 2012.

Le 4 juillet 2014, une autorisation de mise sur le marché a été accordée au nivolumab par le Japon dans l'indication mélanome non résecable. Il sera commercialisé par la firme japonaise Ono Pharmaceutical sous l'appellation *Opdivo*. Hors Asie, la molécule est sous licence Bristol-Myers Squibb (Ono Pharmaceutical Co, 2014).

Dans cette partie présentant les différentes classes d'agents anticancéreux, nous développerons plus en détails les caractéristiques des anthracyclines telles que la doxorubicine utilisée dans la partie expérimentale de cette thèse.

IV.1.3. La doxorubicine : un anthracycline

La Doxorubicine est un antibiotique à large spectre, c'est une anthracycline utilisée pour traiter une variété de tumeurs malignes. Il interfère avec la production de matériel génétique et peut tuer les cellules en division rapide, telles que les cellules tumorales. Il est considéré comme étant le médicament de référence pour le traitement du cancer du sein, de la tumeur solide chez l'enfant, du sarcome des tissus mous, du myélome multiple, et des lymphomes agressifs (Alba *et al.*, 2003). La doxorubicine (ou adriamycine), composée d'un noyau tetracyclique chromophore relie par une liaison glucosidique a un substitut glucosamine, est l'anthracycline de référence.

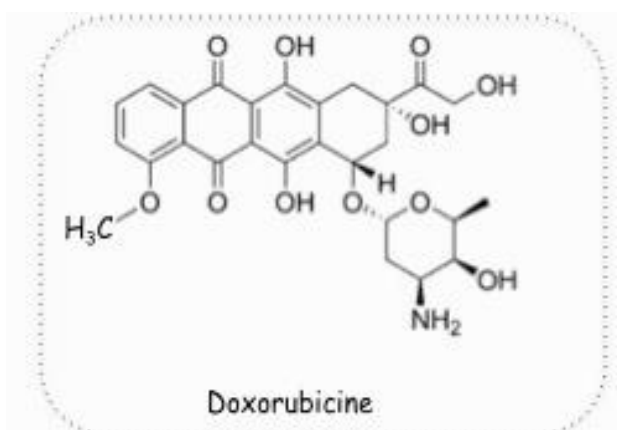


Figure 5. Structure moléculaire des de la doxorubicine (Alba et al., 2003)

Au pH intracellulaire, le groupement sucre se charge positivement, ce qui permet de stabiliser la molécule intercalée *via* des liaisons électrostatiques. L'épirubicine est un épimère en 4' de la doxorubicine. Bien que cette différence structurale soit modeste, il en découle quelques spécificités dont les plus manifestes sont une meilleure pénétration cellulaire du fait d'un pKa plus faible et une élimination par glucuronication plus active. Comparée à la doxorubicine, ses caractéristiques donnent à l'épirubicine une meilleure activité anti-tumorale et une toxicité réduite. Les anthracyclines sont utilisées par voie veineuse. La demi-vie de l'épirubicine est de 35 heures et elle possède une importante diffusion tissulaire. Son transport transmembranaire associe une diffusion passive et un efflux actif (notamment dans les cellules qui expriment la P-glycoprotéine ou PgP). Elle est métabolisée sous forme d'épirubicinol mais également sous forme de dérivés glucuroconjugués de l'épirubicinol et de l'épirubicine. Elle est éliminée principalement par voie biliaire mais également par voie

rénale (10 à 15 % de la dose administrée sont retrouvés dans les urines en 7 jours) (Ratain & Ewesuedo, 1999).

IV.1.3.1. Mode d'action de la Doxorubicine

Les mécanismes d'actions de ces molécules sont multiples :

- Les anthracyclines entraînent une inhibition de la réplication et la transcription. En raison de l'existence dans leur structure de cycles plans qui s'intercalent dans la double hélice des acides nucléiques et en gênent les fonctions, ces molécules peuvent interférer avec l'activité des topoisomérases en bloquant la réplication et entraînant la mort cellulaire (Duguet, 1994). Les topoisomérases sont des enzymes qui permettent la séparation des brins d'ADN lors des phases de transcription, de réplication et de réparation. Ces topoisomérases sont de deux types : la topoisomérase I, qui crée une rupture monocaténaire et la topoisomérase II, qui coupe les deux brins de l'ADN. La relaxation de la molécule d'ADN est suivie d'une religation du ou des brins coupés. Les agents inhibiteurs des topoisomérases forment un complexe ternaire stable avec l'enzyme et l'ADN scindé, empêchant ainsi la soudure des brins d'ADN.
- L'inhibition de la synthèse d'ADN par une voie de signalisation impliquant la protéine P53 (Kastan *et al.*, 1991) est un autre mode d'action. En effet, la doxorubicine peut induire l'expression de la protéine P53 de manière dose dépendante. En réponse à des niveaux élevés de P53, la synthèse d'ADN est inhibée.
- La doxorubicine peut également exercer son action cytotoxique en interagissant avec les membranes plasmiques. En effet, la doxorubicine modifie les propriétés de fluidité membranaire (Siegfried *et al.*, 1983). De plus, l'inhibition de l'entrée dans la cellule par couplage de la doxorubicine avec une molécule volumineuse ne supprime pas l'action cytotoxique de la molécule (Triton et Yee, 1983).

IV.1.3.2. Les limites de la chimiothérapie aux anthracyclines

Une des limites de la chimiothérapie est que son effet est non spécifique, non sélectif des cellules tumorales ce qui peut entraîner une toxicité. Son efficacité étant maximale sur des cellules proliférantes, elle ne touche pas les tumeurs à cellules non proliférantes. Il existe une sensibilité variable des cellules au sein d'une même tumeur et cela peut conduire à la sélection de cellules résistantes. Les principales toxicités communes pour les médicaments à effet antiprolifératif atteignent l'appareil digestif (nausées et vomissements, diarrhées ou constipation, mucites), la peau et les phanères (troubles cutanés, alopecie) et le système

hématopoïétique (neutropénie, thrombopénie, anémie). Il existe également des toxicités spécifiques liées au type de molécule utilisée. Ainsi des atteintes de l'appareil cardiovasculaire (myocardiopathie responsables d'insuffisance ventriculaire retardée) sont principalement observées lors de l'utilisation d'anthracyclines, tandis qu'une neuro-toxicité sera plutôt observée avec des agents alkylants et des agents anti-métabolites.

La doxorubicine : inducteur de stress oxydatif cellulaire

La toxicité induite par le traitement par la doxorubicine est principalement liée à sa cardiotoxicité, du fait du passage du médicament dans la circulation sanguine et obligatoirement par le myocarde, les cardiomyocytes sont exposés directement aux métabolites réactifs toxiques de ce médicament. En effet, le mode d'action le plus connu des anthracyclines reste leur capacité à majorer la production de radicaux libres oxygénés induisant le phénomène de stress oxydatif au niveau de la cellule tumorale et cela contribue à leur action cytotoxique mais aussi au niveau des cardiomyocytes (Mates *et al.*, 2008).

Le phénomène de stress oxydant a été défini comme étant un déséquilibre intracellulaire prononcé entre antioxydants et pro-oxydants en faveur de ces derniers et de leurs effets potentiellement néfastes. Les composés incriminés dans la production des radicaux libres sont les dérivés réactifs de l'oxygène (ERO) dont la réactivité est différente selon le type de radical impliqué. Il est potentiellement impliqué dans le développement de plus d'une centaine de pathologies humaines différentes (Pincemail *et al.*, 2002) allant de l'athérosclérose au cancer tout en passant par les maladies inflammatoires, cardiovasculaires, neurodégénératives et le diabète. Le rôle du stress oxydant a été également évoqué même dans des processus physiologiques tels que le vieillissement (Martinez-Cayuela, 1995 ; Lehucher-Michel *et al.*, 2001 ; Sorg, 2004 ; Valko *et al.*, 2007).

Le déséquilibre pro-oxydant anti-oxydants peut avoir diverses origines, citons la surproduction endogène d'agents prooxydants d'origine inflammatoire, un déficit nutritionnel en antioxydants ou même une exposition environnementale à des facteurs pro-oxydants (tabac, alcool, rayons gamma, rayons ultraviolets, herbicides, ozone, amiante, métaux toxiques (Pincemail *et al.*, 2002 ; Sorg, 2004 ; Kocchilin-Ramonatxo, 2006).

La biotransformation de certains médicaments conduit à la génération des ROS, c'est le cas des anthracyclines. En effet, des études ont mis en évidence une corrélation entre la quantité de radicaux hydroxyles formés et la cytotoxicité induite par la doxorubicine. Cette formation de radicaux libres est induite soit directement lors de la formation de complexes, soit indirectement lors d'une activation métabolique. En effet, comme tous les xénobiotiques,

les anthracyclines peuvent subir des réactions d'oxydo-réductions par les enzymes de phase I, telles que les cytochromes P450 pour les rendre plus hydrosolubles et donc plus facilement éliminables par l'organisme. Ce processus est connu pour générer des espèces réactives de l'oxygène (ERO) (Chopra *et al.*, 1995).

Les anthracyclines peuvent subir d'autres étapes de biotransformation qui consistent en des réactions de réduction impliquant le transfert d'un ou de deux électrons et conduisant à la formation de radical semi-quinone ou d'hydroquinone respectivement. Ces réductions sont catalysées par différentes réductases telles que la NADPH cytochrome P450 réductase, la cytochrome b5 réductase, la xanthine oxydase ou la xanthine déshydrogénase. En présence d'oxygène ou de peroxyde d'hydrogène, le radical semi quinone est oxydé et perd cet électron pour produire des ERO telles que l'anion superoxyde, le peroxyde d'hydrogène, le radical hydroxyle, et l'oxygène singulet (O'Brien et Tew, 1996)

Enfin, le radical semi-quinone des anthracyclines est un réducteur de métaux (en particulier du fer) et forme avec ceux-ci des complexes qui réagissent avec l'oxygène moléculaire ou d'autres espèces oxygénées pour donner des radicaux hydroxyles. Dans ce cas, la formation de radicaux libres oxygénés est indépendante de toute activité enzymatique (Simon *et al.*, 1994) (Figure 6).

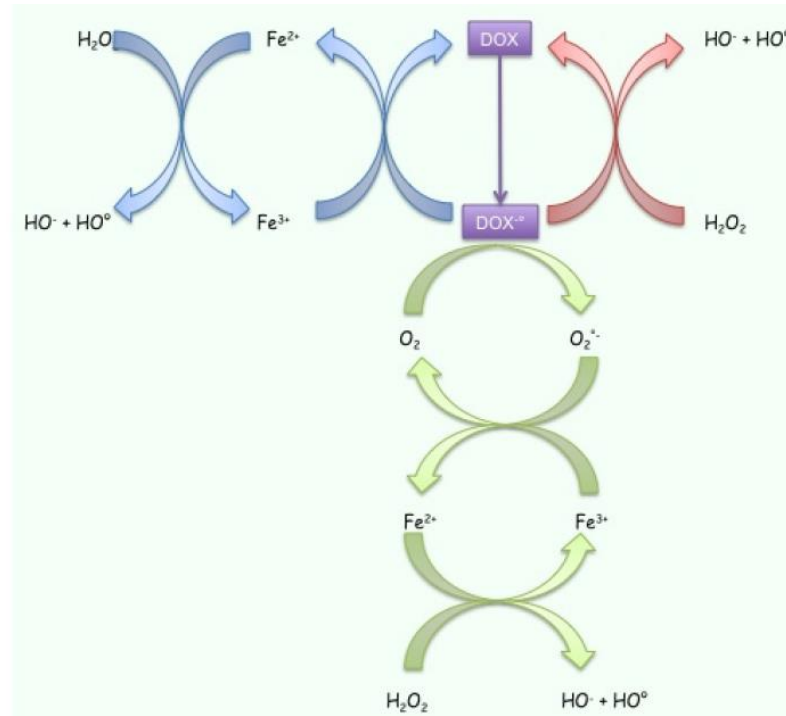


Figure 6 : Production de radicaux libres oxygénés au cours de la transformation métabolique de la doxorubicine. Trois mécanismes ont été proposés dans la production de radical hydroxyle par le radical semi-quinone de la doxorubicine (indiqués par trois couleurs différentes sur le schéma). DOX : forme native, DOX^{•-} : radical semi-quinone, HO[•] : radical hydroxyle, H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène (Muindi *et al.*, 1985).

V. Nature et sources cellulaires des ROS

Les EOR se forment de façon parasitaire dans toutes les réactions biochimiques comportant le transfert d'électrons ou la participation de l'oxygène. Divers types cellulaires et tissus donnent naissance aux EOR par des réactions enzymatiques ou par auto-oxydation au cours de leur métabolisme normal et parfois en réponse à un stimulus spécifique. Dans ce contexte, plusieurs exemples peuvent être cités.

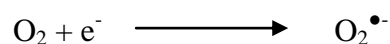
On distingue deux grandes classes de radicaux libres : les radicaux libres primaires, directement formés à partir de l'oxygène et les radicaux libres secondaires ou organiques générés par l'action des radicaux libres primaires. Le tableau III présente les plus connus des radicaux libres oxygénés

Tableau III : Les principales espèces oxygénées réactives générées dans les systèmes biologiques (Bartosz, 2003)

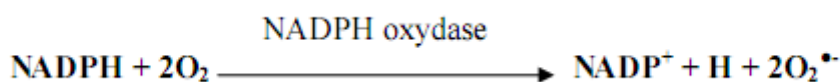
Nom	Symbole
Espèces radicalaires	
Anion superoxyde	$O_2^{\bullet -}$
Radical hydroxyle	OH^{\bullet}
Monoxyde d'azote	NO^{\bullet}
Espèces non radicalaires	
Peroxyde d'hydrogène	H_2O_2
Acide hypochlorique	$HOCl$
Oxygène singulier	1O_2
Peroxynitrite	$ONOO^-$

V.1. Le radical anion superoxyde

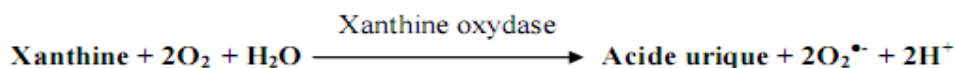
Par sa configuration électronique l'oxygène moléculaire est un radical, il possède en effet deux électrons non appariés, heureusement un blocage cinétique limite sa réactivité ; les spins de ses deux électrons son parallèles lui attribuant une stabilité relativement grande. Cependant, dans l'organisme, une partie de cet oxygène moléculaire peut capter d'une manière univalente un électron conduisant à la formation du radical superoxyde ($O_2^{\bullet -}$); chef de file des EOR (Kochilin-Ramonatxo, 2006).



La source principale de ce radical est la chaîne de transport d'électrons mitochondrial (Bartosz, 2003) au niveau du complexe I (NADH /ubiquinone oxydoréductase) et du complexe III (ubiquinol /cytochrome c oxydoréduction) (Chiarugi et Fiaschi, 2007). Environ 0 à 5 % de l'oxygène moléculaire utilisé par les mitochondries est partiellement réduit par des électrons qui s'échappent des transporteurs d'électrons de la chaîne respiratoire (Bartosz, 2003). De même, la NADH-déshydrogénase située dans la membrane mitochondriale interne, peut conduire à la formation de radicaux $O_2^{\bullet-}$. Cette enzyme normalement dormante est activée lorsque la cellule phagocytaire est stimulée pour produire le $O_2^{\bullet-}$. Cette production est à l'origine de la synthèse de molécules comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou l'hypochlorite ($ClO^{\bullet-}$) indispensables à la digestion du matériel phagocyté (Babior *et al.*, 2002).



Le système enzymatique xanthine/xanthine oxydase intervient aussi dans la production du superoxyde au cours de l'oxydation de la xanthine en acide urique selon la réaction suivante



Par ailleurs, l'apparition de radicaux superoxydes peut résulter de l'auto-oxydation (oxydation par l'oxygène) de composés tels que des neuromédiateurs (adrénaline, noradrénaline, dopamine...), des thiols (cystéine), des coenzymes réduits ($FMNH_2$, $FADH_2$), mais aussi de la détoxification des xénobiotiques (toxiques, médicaments) par le système des cytochromes P450 présents au niveau du réticulum endoplasmique.

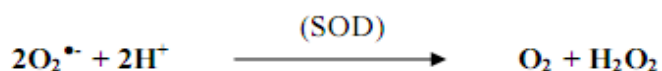
Le radical $O_2^{\bullet-}$ a la réactivité la plus faible vis-à-vis de la majorité des substrats bioorganiques (acides nucléiques, protéines, lipides et leurs constituants). Il n'est donc pas toxique par lui-même. Sa toxicité indirecte peut s'expliquer par la formation :

- De radical perhydroxyle HO_2^{\bullet} qui en est la forme protonée
- ($O_2^{\bullet-} + H^+ \longrightarrow HO_2^{\bullet}$), plus réactive.
- De peroxydinitrite, très réactif, par réaction avec le peroxyde d'azote ($O_2^{\bullet-} + NO^{\bullet} \longrightarrow ONOO^{\bullet}$).
- Et, surtout de peroxyde d'hydrogène H_2O_2 par dismutation enzymatique (Delbosc *et al.*, 2001).

V.2. Le peroxyde d'hydrogène

Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) a deux origines principales :

- La réaction de dismutation enzymatique du radical $O_2^{\bullet-}$ en présence du superoxyde dismutase (SOD) (Pal Yu, 1994). La réaction de dismutation spontanée est possible, mais très lente



- Des réactions catalysées par des oxydases présentes particulièrement dans les peroxyosomes (Kohen et Nyska *et al.*, 2002). Cependant, certaines de ces oxydases comme la glycoxylate oxydase, la D-aminoacide oxydase peuvent catalyser directement la réduction divalente de l'oxygène moléculaire produisant ainsi le peroxyde d'hydrogène sans formation du radical superoxyde (Del Rio *et al.*, 1996), le foie est l'organe central de cette production. Les microsomes sont responsables dans 80% de la concentration d' H_2O_2 généré in vivo dans les sites hyperoxiques (Valko *et al.*, 2006).

- L'absence de charge à sa surface rend cette EOR très lipophile et peu réactif en milieu aqueux, le peroxyde d'hydrogène peu néanmoins être considéré comme un dérivé réactif de l'oxygène potentiellement toxique car sa faible réactivité associée à sa capacité de traverser les membranes biologiques fait qu'il peu se retrouver à une grande distance de son lieu de synthèse, il peut alors participer à la biosynthèse du radical hydroxyle (Valko *et al.*, 2006).

.V.3. Le radical hydroxyle

Le radical hydroxyle (OH^{\bullet}) est formé principalement par la dégradation du H_2O_2 en présence de métaux de transition sous leur forme réduite, ainsi H_2O_2 associé à du fer ferreux conduit à la réaction de Fenton.



H_2O_2 peut également réagir avec le radical superoxyde, aboutissant là encore à la production de l' OH^{\bullet} , ce mécanisme réactionnel est appelé réaction d'Haber et Weiss (Gutteridge, 1993).

V.4. Effets délétères des ROS

V.4.1. Les cibles cellulaires des radicaux libres oxygénés :

Lorsque les systèmes de défense anti-radicalaire sont dépassés, il se produit une accumulation de ROS créant une situation de stress oxydant qui a pour conséquence l'apparition de dégâts cellulaires et tissulaires souvent irréversibles dont les cibles biologiques les plus vulnérables sont les protéines les lipides et l'acide désoxyribonucléique, mais aussi de lésions secondaires dues au caractère cytotoxique et mutagène des produits libérés, notamment lors de l'oxydation des lipides (Halliwell et Whiteman 2004; Valko *et al.*, 2006).

V.4.1.1. Les dommages lipidiques :

Les acides gras polyinsaturés (AGPI) sont la cible privilégiée des EOR en raison de leurs hydrogènes bis-allyliques facilement oxydables. Plus l'acide gras est insaturé et plus il est susceptible d'être peroxydé. Comme ces derniers sont les lipides majeurs des membranes cellulaires et des lipoprotéines, on comprend leurs vulnérabilités particulières. Il s'agit d'un enchainement de réactions radicalaires organisées en trois phases successives : l'initiation, la propagation et la terminaison (figure 7) (Halliwell et Gutteridge, 1989). La phase d'initiation consiste en la création d'un radical d'acide gras (L°) à partir d'un acide gras (LH) par soustraction d'un atome d'hydrogène provenant d'un groupement méthylène $-CH_2-$ bis allylique. Cette déshydrogénation peut être provoquée par un initiateur radicalaire tel que le $\bullet OH$ et le $HOO\bullet$. Le radical lipidique L° subit ensuite un réarrangement moléculaire pour donner un radical avec une structure de diène conjugué, plus stable, qui peut réagir avec une molécule d' O_2 et former un radical peroxyde ($LOO\bullet$) (Esterbauer *et al.*, 1997). Ce radical est suffisamment réactif pour arracher à nouveau, un hydrogène à un acide gras polyinsaturé voisin, propageant ainsi la réaction. L'hydroperoxyde lipidique ($LOOH$) formé peut être oxydé en présence de métaux de transition divalents de Fe^{2+} ou Cu^{2+} et entraîner la formation d'alcanes et d'aldéhydes; le malondialdéhyde (MDA) et le 4-hydroxynonéal représentant les produits les plus toxiques de la peroxydation lipidique (Martínez-Cayuela, 1995 ; Lehucher-Michel, 2001). La réaction en chaîne peut être interrompue (phase de terminaison) par l'association de deux radicaux libres et la formation d'un composé stable ou le plus souvent par la réaction du radical avec une molécule antioxydante dite briseur de chaîne (Delattre *et al.*, 2005).

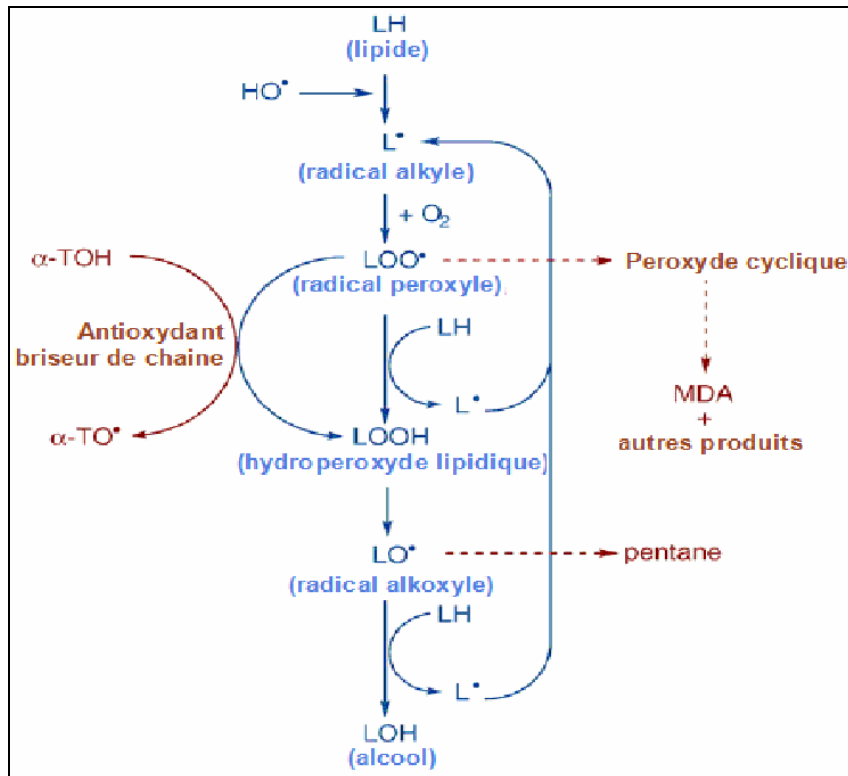


Figure 7. Les trois étapes de la peroxydation lipidique
(Sachdev et Davies, 2008)

La peroxydation lipidique spontanée s'avère toujours néfaste. Dans les conditions physiologiques normales, elle reflète la toxicité de l'oxygène et a plusieurs conséquences (Halliwell et Gutteridge, 1989 ; Kuhn et Borchert, 2002) :

La présence d'un groupement peroxyde perturbe les interactions hydrophobes lipides/lipides et lipides/protéines, ceci conduit à des altérations structurales des membranes et des lipoprotéines. En plus, la fluidité des membranes est diminuée et la perméabilité est augmentée, des enzymes et des récepteurs membranaires sont susceptibles d'être inactivés.

Les hydroperoxydes lipidiques sont à leur tour la source de radicaux libres qui peuvent induire des modifications secondaires des autres membranes et/ou des constituants des lipoprotéines.

La peroxydation lipidique spontanée exerce par ailleurs une toxicité propre liée aux aldéhydes issus de la dégradation des formes lipoperoxydées instables. Les aldéhydes comme le 4-hydroxy-2,3-nonéanal (4-HNE) ou le dialdéhyde malonique (MDA) peuvent former des adduits avec les protéines au niveau des résidus lysine, histidine ou cystéine, entraînant la formation de bases de Schiff et des pontages intra et inter moléculaires (Requena *et al.*, 1996).

V.4.1.2 L'oxydation des protéines :

Les acides aminés des protéines sont la cible des EOR, soit au niveau de leur chaîne latérale, avec formation de produits d'oxydations, soit au niveau de la liaison peptidique, entraînant la fragmentation de la chaîne. Si la majorité des acides aminés peuvent être oxydés par les EOR, les acides aminés aromatiques comme le tryptophane, la tyrosine et l'histidine sont les plus sensibles à l'action des ROS. Le radical hydroxyle OH° peut s'additionner sur eux, modifiant ainsi la conformation de la protéine (Berlett et Stadtman, 1997).

Sur les acides aminés contenant un atome de soufre tels que la cystéine et la méthionine, l'oxydation par les radicaux libres conduit à la formation d'un pont disulfures, donc à l'agrégation de plusieurs molécules de protéines. L'oxydation des acides aminés génère des groupements hydroxyles et carbonyles sur les protéines mais peut également induire des modifications structurales plus importantes comme des réticulations intra ou intermoléculaires, ce qui affecte leurs fonctionnements, antigénicités et leurs activités, (Martinez-Cayuela, 1995 ; Lehucher-Michel *et al.*, 2001 ; Valko *et al.*, 2007). Les deux marqueurs biologiques utiles et faibles de l'oxydation des protéines sont les carbonyles et les nitrotyrosines (Frelon, 2003). Les protéines modifiées deviennent généralement plus sensibles à l'action des protéase et sont alors dirigées vers la dégradation protéolytique au niveau du protéasome (Jung et Reszka, 2001).

V.4.1.3. L'oxydation des acides nucléiques :

L'ADN (nucléaire ou mitochondrial) est très sensible à l'attaque par les ROS (Frelon, 2003). Cinq classes principales de dommages oxydatifs médiés par le radical hydroxyle peuvent être générées : modification des bases puriques et pyrimidiques, pertes de bases « sites abasiques », cassures simples ou doubles-brins, altérations des sucres (2-désoxyriboses) et aussi pontages ADN-protéines (Figure 8)(Cadet *et al.*, 2003).

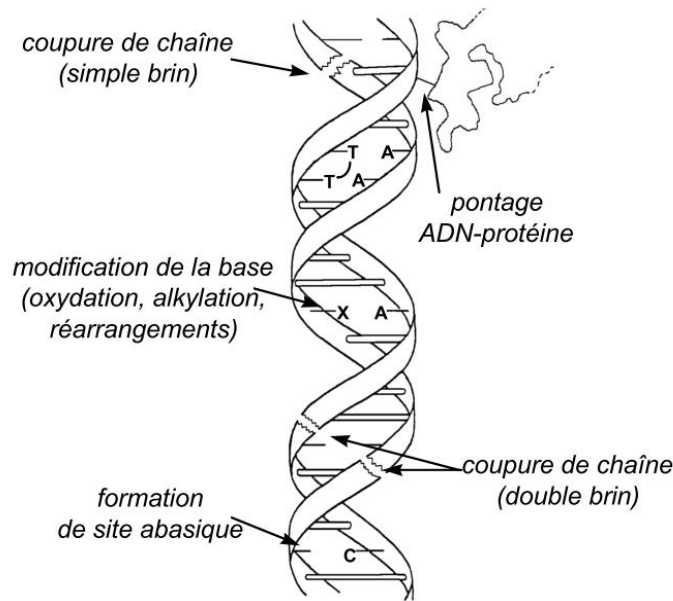


Figure 8 : lésions de l'ADN formées par attaque des radicaux libres (Cadet *et al.*, 2003)

Les bases qui composent l'ADN sont sensibles à l'oxydation. L'attaque radicalaire peut être directe et entraîner l'oxydation des bases, engendrant un grand nombre de bases modifiées. Induisant ainsi des propriétés mutagènes et carcinogènes. D'autre part, l'ARN est également une cible des ROS. Il est plus facilement oxydé et altéré par sa localisation cytoplasmique. Toutefois, sa durée de vie est courte mais ces dommages entraîneront tout de même des erreurs lors de la traduction en protéines. Les dommages causés aux ARNs ne sont pas réparés ; en revanche, les processus de réparation de l'ADN semblent pouvoir éliminer pratiquement sans erreurs les lésions oxydatives de l'ADN. Cependant si les dommages excèdent les capacités de réparation, les altérations du matériel génétique s'accumuleront au sein de l'ADN représentant ainsi la première étape impliquée dans la mutagenèse, la carcinogenèse et le vieillissement (Lehucher-Michel *et al.*, 2001 ; Frelon, 2003 ; Valko *et al.*, 2006).

V.5. Système cellulaire de défense contre le stress oxydatif

Pour se protéger de ces effets délétères, la cellule a développé un système antioxydant composé de plusieurs enzymes telles que la superoxyde dismutase (SOD), qui réduit l' $O_2^{\cdot-}$ en H_2O_2 , la catalase et la glutathion peroxydase qui réduit le H_2O_2 en H_2O . Il existe également des molécules antioxydantes non enzymatiques comme les vitamines A, C et E, les caroténoïdes, les thiols dont le glutathion, l'ubiquinone, la thiorédoxine, etc. (Valko *et al.*, 2006) (figure 9)

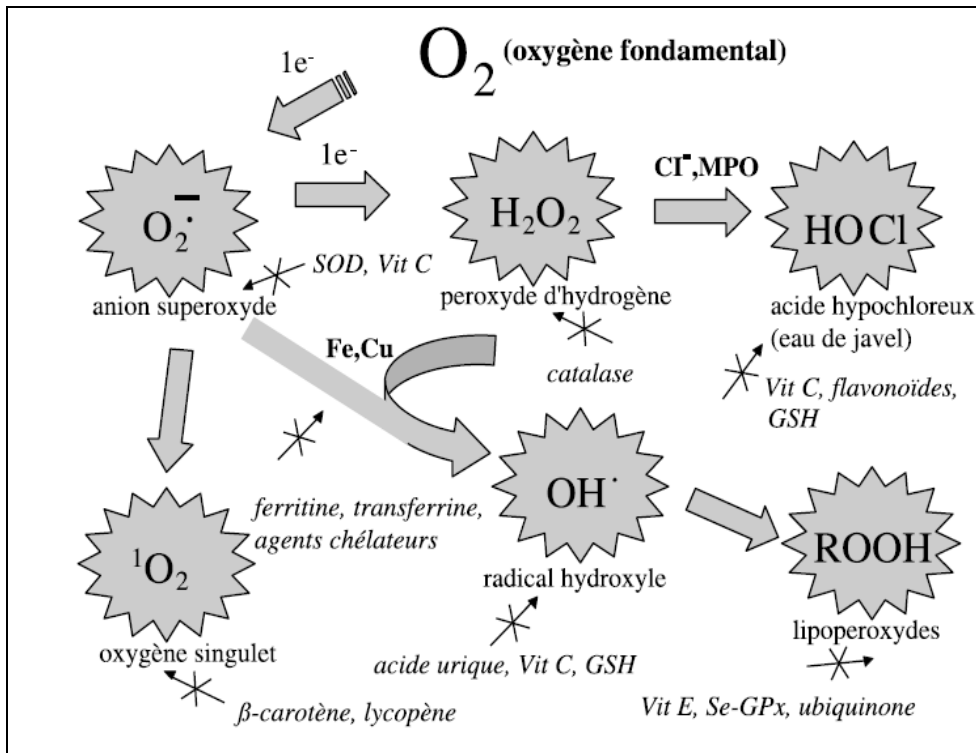


Figure 9 : Régulation de la production d'espèces réactives de l'oxygène par les systèmes de défenses antioxydants (Pincemail et al., 2002).

V.5.1. Le système enzymatique de défense

Cette ligne de défense est constituée principalement de trois enzymes. Il s'agit de la superoxyde dismutase (SOD), de la catalase et de la glutathion peroxydase (GPx). Ces enzymes ont une action complémentaire sur la cascade radicalaire au niveau du superoxyde et du peroxyde d'hydrogène, conduisant finalement à la formation d'eau et d'oxygène moléculaire.

V.5.1.1. La superoxyde dismutase

Comme l'indique son nom, la superoxyde dismutase (SOD), qui existe sous différentes formes, est une enzyme qui accélère la dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène selon la réaction suivante :

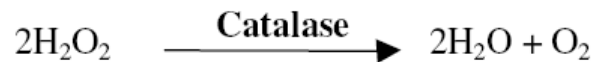


Il existe plusieurs isoenzymes de SOD ; SOD ferreux (Fe-SOD) (exclusivement chez les procaryotes), SOD à cuivre (Cu-SOD) et SOD à manganèse (Mn-SOD) qui diffèrent selon la localisation chromosomique du gène, leur structure quaternaire et leur contenu métallique,

dont le métal du site catalytique va conférer des propriétés particulières à la SOD notamment en terme de localisation cellulaire (Zelko *et al*, 2002). Les SODs sont restreintes à des compartiments cellulaires différents : une forme cytosolique et nucléaire, a pour cofacteurs le cuivre et le zinc (CuZn-SOD), une forme mitochondriale a pour cofacteur le manganèse (Mn-SOD) et une forme extracellulaire (SOD-EC), située sur la face externe de la membrane cellulaire. C'est donc indirectement que ces métaux possèdent une activité antioxydante, alors que le cuivre par exemple, sous forme libre, est directement prooxydant (Wassmann *et al*, 2004).

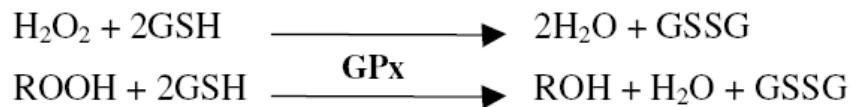
V.5.1.2. La catalase

Cette enzyme est contenue dans les peroxysomes qui vivent en aérobie (présence d'oxygène). Elle existe en forte concentration dans le foie et les globules rouges. Au niveau sub-cellulaire, la catalase se retrouve dans le cytosol et dans les peroxysomes. Elle agit en synergie avec la SOD puisque son rôle est d'accélérer la dismutation du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire selon la réaction suivante : (Sorg, 2004).



V.5.1.3. Les glutathion peroxydases et réductases

Ces deux enzymes sont localisées dans le cytosol et dans les mitochondries. Le rôle de la glutathion peroxydase (GPx) est de réduire d'une part le peroxyde d'hydrogène en molécule d'eau, et d'autre part les hydroperoxydes organiques (ROOH) en alcools. Lors de cette réaction, qui demande l'intervention de deux molécules de glutathion (GSH), celles-ci se transforment en glutathion-disulfure (GSSG) : (Forstrom, 1978)



La glutathion réductase (GR), quant à elle, a pour rôle de régénérer le GSH à partir du GSSG. Au cours de cette réaction, la glutathion réductase utilise un cofacteur, le NADPH :



Cette réaction produit du NADP⁺ qui sera régénéré en NADPH pour une utilisation ultérieure, par une autre enzyme, le G6PD (glucose-6-phosphate-déhydrogénase) :



Au total, le mécanisme réactionnel invoqué dans la détoxification active peut être résumé dans le schéma suivant (Marfak, 2003) :

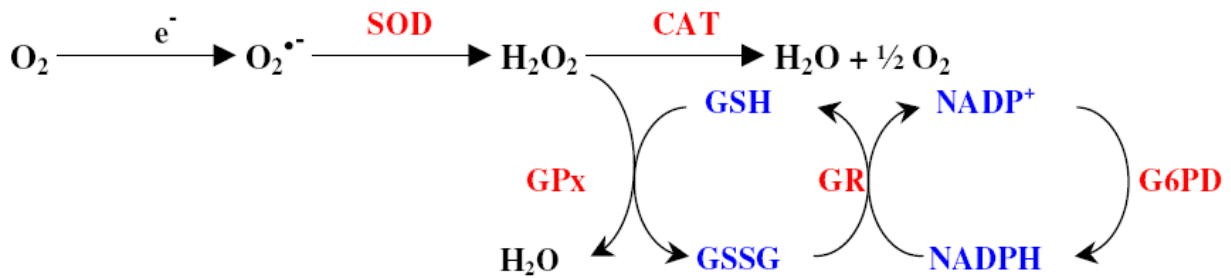


Figure 10 : Mécanisme de détoxification enzymatique (Marfak, 2003)

V.5.1.4: Les peroxyredoxines (Prx), ou thioredoxines peroxydases

Ce sont des protéines antioxydantes qui ont été découvertes récemment. Elles possèdent une activité oxydoréductase, elles font l'objet de nombreux travaux concernant leurs fonction antioxydantes. Elles sont au nombre de six chez les mammifères et sont localisées dans le cytosol, les mitochondries, les péroxysomes, associées au noyau et aux membranes. Ces enzymes exercent leur rôle antioxydant à travers une activité peroxydase, où l'H₂O₂, le peroxy-nitrite et de nombreux hydroperoxydes sont les substrats. Au lieu d'utiliser le glutathion comme donneur d'électrons, ces enzymes utilisent une petite protéine (la thiorédoxine), une fois oxydée, la thiorédoxine est réduite par la thiorédoxine réductase (TRxR) qui est une enzyme possédant un groupement sélénocystéine dans son site actif. La TRxR intervient aussi dans la dégradation des peroxydes lipidiques et du peroxyde d'hydrogène et dans la régénération du radical ascorbyl en acide ascorbique (Wood *et al.*, 2003).

V.5.1.5. La glutathion-S-transférase (GST)

La glutathion transférase est une enzyme de phase II qui intervient dans plusieurs processus physiologiques parmi lesquels figure la défense contre les dommages oxydatifs dont leur rôle est l'élimination de l'hydroperoxyde lipidique. Elle est induite par de nombreux composés dont certains sont également responsables de l'induction des cytochromes P₄₅₀ (Hoarom *et al.*, 2001).

V.5.2. Le système de détoxification non enzymatique

Cette troisième ligne de défense permet la réduction des radicaux libres qui ont pu « survivre » aux deux autres lignes de défense. Sont regroupées dans cette catégorie des molécules antioxydantes

V.5.2.1. Les antioxydants liposolubles

Ceux-ci, du fait de leur lipophilicité, sont incorporés dans les structures lipoprotéiques membraneuses ou circulantes.

a). La vitamine E : la vitamine E est le principal antioxydant liposoluble qui se localise surtout dans la membrane externe des mitochondries et dans celle du réticulum endoplasmique du fait de son caractère lipophile. Elle est apportée par l'alimentation sous 8 formes stériques différentes et est trouvée dans l'organisme essentiellement sous la forme α -tocophérol. Leur effet protecteur est principalement lié à leur capacité à céder un de leurs électrons situé dans le noyau phénolique, pour arrêter la propagation radicalaire, formant donc le radical tocophéroxyde (α -TO[•]) tout en étant capable soit de céder un second électron lors d'une réaction d'oxydation conventionnelle soit de se régénérer par le remplacement de l'électron manquant, cette régénération est assurée par d'autres antioxydants, dont la vitamine C, le glutathion (GSH) et l'ubiquinone. Il s'agit du fameux effet de synergie qui existe entre la plupart des vitamines antioxydantes. (Januel *et al.*, 2003 ; Ré *et al.*, 2005)

b. Les caroténoïdes : les caroténoïdes (piégeurs liposolubles de ROS) sont très nombreux et représentent la principale source alimentaire de rétinol. En plus de leur activité de provitamine A, les caroténoïdes sont d'excellents piégeurs de radicaux libres peroxydes et d'oxygène singulet grâce à leur longue chaîne carbonée, riche en double liaisons. Le β -carotène est particulièrement réactif vis-à-vis des lipoperoxydes : le radical peroxyde se fixerait sur un carbone de la chaîne polyinsaturée et serait stabilisé par résonance. Différents systèmes *in vitro* ont confirmé le rôle protecteur de ces molécules. Cependant, les études effectuées *in vivo* sont peu nombreuses et le rôle antiradicalaire des caroténoïdes reste à préciser (Milane, 2004). Une molécule de caroténoïde peut piéger plusieurs ROS avant d'être finalement détruite (Januel *et al.*, 2003)

c. L'ubiquinone ou Coenzyme Q10 : l'importance de l'activité antioxydante de l'ubiquinone réside dans sa capacité à maintenir un minimum d'activité suite à un stress. Cette particularité provient de son implication dans la chaîne de transport d'électrons qui permet le recyclage spontané de sa forme antioxydante (QH₂), de plus, l'ubiquinone est présente dans la mitochondrie en quantité beaucoup plus grandes (facteur 5 à 10) que les autres composés de la chaîne de transport d'électrons, représentant ainsi un réservoir d'activité antioxydante (Kagan *et al.*, 1990, Stocker *et al.*, 1991, Thomas *et al.*, 1996, Nohl *et al.*, 1998, Picemail et Defraigne, 2003).

Un grand nombre de publications démontrent que l'ubiquinol (la forme réduite de l'ubiquinone) peut agir en tant qu'antioxydant (Beyer et Ernster ; 1990, Kagan *et al.*, 1990, Krinskay ; 1992). L'ubiquinone serait donc le seul antioxydant liposoluble synthétisé de novo et, contrairement aux autres antioxydants, ses niveau tissulaires seraient indépendants de l'apport alimentaire (Mohr *et al.*, 1992)

V.5.2.2. Les antioxydants hydrosolubles :

a. Le glutathion (GSH) :

le glutathion ou L-γ-glutamyl-L-cystéinyglycine (figure.11) est un tripeptide très abondant dans les cellules des mammifères dont la concentration cellulaire est comprise entre 0.5 et 10 mM alors que sa concentration plasmatique est 1000 fois plus faible (0.5 à 10 μM). Grâce à son groupement SH libre, il constitue les principales sources de thiol dans la cellule dont les propriétés réductrices et nucléophiles jouent un rôle majeur dans la protection contre les altérations oxydantes des lipides, des protéines et des acides nucléiques (Januel, 2003).

Il agit soit en interagissant directement avec différents ROS (radical hydroxyle, superoxyde, monoxyde d'azote...) par donation d'un atome d'hydrogène, soit en tant que cosubstrat de la glutathion peroxydase, soit en régénérant d'autres antioxydants comme la vitamine C et la vitamine E (Ré *et al.*, 2003 ; Singh *et al.*, 2004).

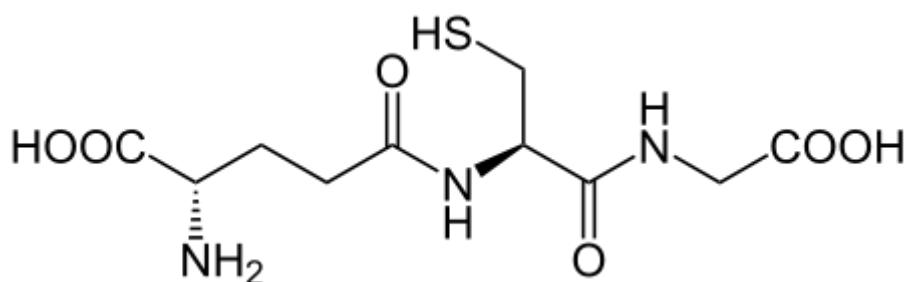
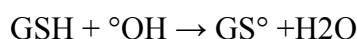


Figure 11. Structure du glutathion (Lu, 1999)

Le glutathion est aussi une forme de transport et de stockage de la cystéine, un régulateur de l'apoptose et de la prolifération cellulaire, un partenaire dans les réactions de détoxification des xénobiotiques auxquels il est conjugué par la GSH-S-transférase et un cofacteur des réactions d'isomérisation. Il est également impliqué dans la synthèse des

désoxyribonucléiques et il permet de garder les groupements SH des protéines cellulaires sous forme réduite, contribuant ainsi au maintien du potentiel redox de la cellule et donc au maintien de bon nombre de processus de signalisation (Ré *et al.*, 2003 ; Januel, 2003).

Sur les plans cellulaire et moléculaire, les travaux d'actualité sur les nouvelles thérapies contre le cancer visent à induire un arrêt dans le cycle de prolifération cellulaire du cancer ou à provoquer une mort cellulaire programmée des cellules cancéreuses.

Ces dernières décennies, un grand intérêt est porté sur les substances d'origine naturelle végétales ou animales pro-apoptotiques ou non utilisées en traitement préventif adjuvant contre les effets délétères induits par les médicaments pro-oxydants tels que la doxorubicine.

Lorsque le système de défense antioxydant cellulaire est incompetent devant une production incontrôlée de ROS, la cellule évolue vers l'apoptose.

Il convient d'abord d'introduire ce phénomène hautement organisé à l'échelle cellulaire et moléculaire.

VI. Apoptose : la mort cellulaire programmée

Le terme apoptose est utilisé pour décrire une des formes de mort cellulaire survenue dans les organismes multicellulaires. L'apoptose est définie en tant que mort cellulaire programmée qui implique le « suicide » des cellules à l'état individuel en faveur du bon fonctionnement de l'organisme dans son ensemble. L'apoptose est un processus qui nécessite beaucoup d'énergie. Elle subit un ensemble de mécanismes de régulation et engage un grand nombre de voies de la signalisation cellulaire. Les composants de ces voies sont codés par le génome, exprimés et prêts à être activés lorsque le *stimulus*-inducteur de la mort cellulaire apparaît (Hengartner, 2000). La recherche sur le phénomène de la mort cellulaire programmée a commencé à la fin des années 1960. Un des pionniers dans le domaine était John Kerr, qui a étudié la mort des hépatocytes chez le rat avec une insuffisance hépatique aiguë [9]. En 1972, une équipe de scientifiques britanniques dirigée par Kerr a d'abord inventé l'apoptose à long terme pour désigner la mort cellulaire programmée. Les auteurs ont décrit deux phases du processus (formation de corps apoptotiques et leur phagocytose par d'autres cellules), et a souligné que l'apoptose est un processus actif et contrôlé. L'activité apoptotique est nécessaire aussi bien lors du développement d'un organisme durant les changements morphologiques qu'il subit à l'embryogenèse, que pendant l'activation du système immunitaire (Siegel, 2006). Ce processus est essentiel dans le maintien du nombre de cellules dans les tissus et de manière générale, dans le maintien de l'équilibre de

l'organisme. L'inhibition de l'apoptose ou une apoptose défectueuse ont pour conséquence le développement de cancers, de pathologies auto-immunes et de maladies d'origine virale alors qu'une apoptose excessive peut conduire au développement de désordres neurodégénératifs (Rathmell et Thompson, 2002). L'apoptose conduit à la perte de l'intégrité des membranes cellulaires, ainsi qu'au gonflement et la rupture de la cellule sans provoquer de dommages aux cellules environnantes. Les cellules apoptotiques sont caractérisées par des changements morphologiques stéréotypiques tels que le rétrécissement cellulaire, la perte de l'homogénéité de la forme, la condensation de la chromatine, la fragmentation de l'ADN, la dégradation des protéines, le désassemblage des organites et la formation des corps apoptotiques qui sont éliminés par le système immunitaire (Jones et Gores, 1997) (Figure 12).

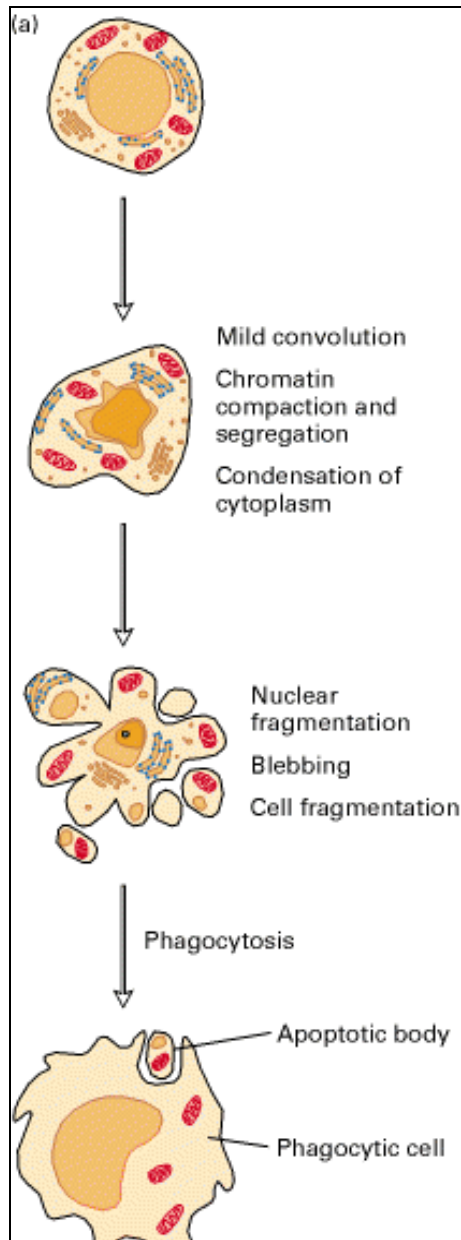


Figure 12 : Caractéristiques morphologiques de la mort cellulaire par apoptose.

Schéma illustrant les changements morphologiques au cours de l'apoptose. Au début, la chromatine se condense en périphérie du noyau. Le corps cellulaire rétrécit, bien que la plupart des organites restent intacts. Plus tard, le noyau et le cytoplasme se fragmentent, formant des corps apoptotiques qui sont phagocytés par des cellules proches (Kuby, 1997).

De nombreux stimuli localisés à l'intérieur et à l'extérieur de la cellule sont à l'origine de l'enclenchement d'un processus apoptotique. Dans certains cas, l'absence de facteurs de croissance peut être suffisante pour induire l'apoptose au même titre que l'ADN endommagé, le stress oxydatif, le traitement avec des molécules cytotoxiques ou l'irradiation, l'interruption de la signalisation qui régule le cycle cellulaire, les ligands de récepteurs spécifiques de la mort cellulaire (DR : Death Receptors) (Elmore, 2007)

VI.1. les voies de signalisation de l'Apoptose

Il existe deux voies de signalisation principales qui contrôlent le déroulement de l'apoptose : la voie extrinsèque ou celle des récepteurs extracellulaires et la voie intrinsèque ou mitochondriale. Le signal apoptotique implique l'activation de nombreux enzymes qui font partie de deux grandes familles : celle des CASPASES et celle des protéines de la famille Bcl-2. Les CASPASES ont un rôle important dans les processus de dégradation des organites cellulaires, alors que les protéines Bcl-2 participent au maintien et à la propagation du signal (Kim *et al.*, 2006b).

VI.1.1. Les CASPASES

Les acteurs essentiels de l'apoptose sont des enzymes protéolytiques connues sous le nom des CASPASES (Cysteinyl-ASpartate-SPECIFIC proteASES). Les caspases jouent un rôle essentiel dans les processus d'apoptose, de nécrose et d'inflammation

VI.1.1.1. Classification des CASPASES.

Le génome humain code pour au moins 14 CASPASES (Tableau IV).

Jusqu'à présent, au moins 14 caspases de mammifères ont été décrites: 8 caspases sont impliquées dans l'apoptose, 5 activent des cytokines anti-inflammatoires et 1 agit sur la différenciation des kératinocytes. Cette division est cependant assez arbitraire - nous savons de nombreux articles que certaines caspases apoptotiques peuvent, selon les conditions, participer à d'autres processus de la vie cellulaire, tels que la prolifération, la différenciation, la modification de la sensibilité à la lyse des leucocytes (Volkova et Poltrack, 2012).

Tableau IV : Classification des CASPASES.

Caspase	Fonction	Unité interaction
	Activateurs des cytokines	
Caspase-1	Interleukine (IL)-1 β	CARD
Caspase-4	-	CARD
Caspase-5	-	-
Caspase-11	-	-
Caspase-12	Niveau RE, active caspase-3/9	-
Caspase-13	-	-
Caspase-14	-	-
	Initiatrices	
Caspase-2	Libération cytochrome c	CARD
Caspase-8	Voie extrinsèque	DED
Caspase-9	Voie intrinsèque	CARD
Caspase-10	Voie extrinsèque	DED
	Effectrices	
Caspase-3	Déclenche l'apoptose	-
Caspase-6	-	-
Caspase-7	-	-

Il y a 7 CASPASES responsables de l'apoptose qui sont divisées en deux groupes :

- les CASPASES initiatrices (2, 8, 9 et 10), qui possèdent une région N-terminale longue ;
- les CASPASES effectrices (3, 6 et 7), qui possèdent une région N-terminale courte.

Les autres CASPASES interviennent dans l'inflammation et l'activation des cytokines. La CASPASE-12 est issue d'un pseudogène. Elle est localisée chez la souris au niveau du RE. Elle est activée suite à un stress du RE, telle que la rupture de l'homéostasie du Ca²⁺ (Cohen, 1997; Rai *et al.*, 2005).

Les CASPASES sont synthétisées en tant que pro-enzymes avec une faible activité intrinsèque. Leur activation nécessite une maturation protéolytique ou une interaction avec un activateur allostérique. La structure des CASPASES à l'état inactif est constituée d'une unité protéique large d'environ 20 kDa et d'une sous unité protéique d'environ de 10 kDa. Le site d'interaction protéine-protéine se situe au niveau du domaine N-terminal et il se différencie en domaine DED pour « Death Effector Domain » et CARD pour « CASPASE Recruitment Domain ». Le domaine DED permet l'interaction avec d'autres molécules qui contiennent également le site DED, alors que le site CARD permet aux CASPASES de s'associer à

d'autres CASPASES ou molécules adaptatrices. La large sous unité de 20 kDa contient le site catalytique qui comprend un résidu cystéine (C) localisé au centre du motif QACXG (où X= R, Q ou G). Il est activé lorsqu'il s'associe à la petite sous unité après clivage. Des études cristallographiques ont montré, que les CASPASES activées forment des tétramères suite à l'association de deux hétérodimères, qui contiennent chacun deux sites catalytiques indépendants (Wilson *et al.*, 1994). L'activation des pro-CASPASES se déroule en deux étapes au niveau de sites consensus, toujours après la liaison Asp-X (Figure 13)

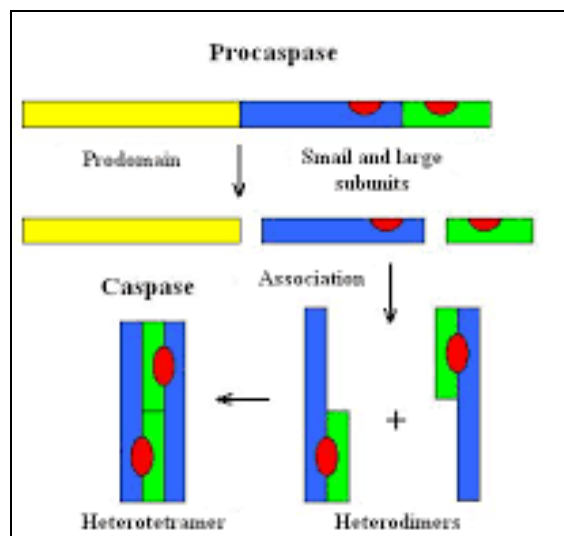


Figure 13 : Schéma de l'activation protéolytique des CASPASES (Volkova and Poltorak, 2012)
 (adopted from http://www.muldyr.ru/a/a/apoptoz_fazyi_apoptoza)).

L'activation des CASPASES initiatrices peut être achevée par la formation de complexes polyprotéiniques, tels que :

- L'inflammasome, participe dans le processus inflammatoire et active soit la CASPASE-1 nécessaire à la sécrétion de l'interleukine mature IL-1 β soit les CASPASES -4 et -5. Son rôle dans l'apoptose n'est pas très bien élucidé (Martinon et Tschopp, 2004)
- Le piddosome (Tinel et Tschopp, 2004) catalyse la maturation de la pro-CASPASE-2 en réponse aux dommages à l'ADN
- Le DISC (Death-Inducing Signaling Complex) (Krammer, 2000) est formé suite à l'activation du récepteur CD95/Fas et stimule ainsi la maturation de la pro-CASPASE-8. Le DISC participe à la voie extrinsèque de l'apoptose qui est contrôlée par des récepteurs de la surface membranaire
- L'apoptosome (Jiang et Wang, 2004) : se forme au cours de l'activation de la voie intrinsèque de l'apoptose. Suite à la perturbation mitochondriale, le cytochrome *c* (cyt *c*) est

libéré dans le cytosol et en association avec le facteur Apaf-1 (Apoptotic Protease Activating Factor-1) forme l'apoptosome, qui favorise la maturation de la pro-CASPASE-9.

L'activation massive des CASPASES est souvent nécessaire dans l'activation de l'apoptose et le circuit d'une telle machinerie est très complexe. Souvent, l'activation des CASPASES initiatrices -2 -9 ou -8 n'est pas suffisante pour aboutir à l'apoptose, ce qui nécessite une amplification de la réaction par la perméabilisation mitochondriale ainsi que l'implication d'autres organites (Danial et Korsmeyer, 2004; Enoksson *et al.*, 2004).

VI.1.1.2. Les substrats des CASPASES

Les CASPASES ont été classées selon la spécificité du substrat. Des térapeptides de synthèse ont été utilisés avec différentes combinaisons d'acides aminés. Les résidus présents en position P4-P2 influent sur la spécificité de la CASPASE (Thornberry *et al.*, 2000). Les CASPASES -2, -3 et -7 ont une affinité pour l'aspartate en position P4. Les CASPASES -8, -9 et -10 préfèrent les acides aminés en position P4 qui possèdent une chaîne aliphatique. Ces résultats ne sont pas exhaustifs car d'autres études ont apporté des éléments supplémentaires sur le type et la taille de la séquence des acides aminés (Talanian *et al.*, 1997). Il est possible, que les similarités entre les séquences des térapeptides de synthèse et les séquences peptidiques, qui associent les sous unités dans certaines CASPASES (ex. -2, -8, -9), reflètent la capacité de ces CASPASES à s'autocliner (Thornberry *et al.*, 1997). Les peptides de synthèse sont largement étudiés et ils permettent également de synthétiser des inhibiteurs spécifiques pour affiner des études *in vitro*. En ce qui concerne les substrats naturels, il s'agit de protéines de grande taille et l'affinité d'une CASPASE pour son substrat peut être déterminée aussi bien par la séquence des acides aminés que par la structure de la protéine.

Un grand nombre de substrats naturels sont définis et le clivage protéolytique par les CASPASES dépend du contexte et de l'état cellulaire. Au cours de l'apoptose, les CASPASES inactivent au moins deux protéines nécessaires pour l'intégrité du génome, la PARP (Poly- (ribo-Adénine)-polymérase) et la DNA-PK (DNA-dependent Protein Kinase). En même temps, elles activent d'autres pro-CASPASES ou endonucléases responsables de la fragmentation d'ADN tel que le ICAD/DFP45 (Inhibitor CASPASE-Activated DNase/DNA Fragmentation Factor). Les CASPASES interviennent de manière générale dans : l'élimination des cellules lors des processus de la réparation ou leur maintien lorsque ceci est possible, l'arrêt de la progression du cycle cellulaire, l'inactivation des inhibiteurs d'apoptose, l'initiation des modifications structurales et morphologiques qui marquent la mort cellulaire (Nicholson, 1999).

VI.1.1.3. Régulation des CASPASES

La régulation de l'activité des CASPASES fait intervenir des phosphorylations, l'acide nitrique, des protéines inhibitrices à domaines CARD et DED, les protéines IAP (Inhibitor of Apoptosis Proteins) (Deveraux *et al.*, 1998) :

-Les phosphorylations : de nombreuses études ont démontré que la régulation de la CASPASE-9 fait intervenir le processus de phosphorylation. Les protéines PKB-Akt (Protein Kinase B) et ERK2 (Extracellular signal-Regulated Kinase 2) sont impliquées dans la phosphorylation de la CASPASE-9 qui a pour conséquence l'inhibition du processus protéolytique de la pro-CASPASE-9 et donc la diminution de son activité (Johnson et Jarvis, 2004) ; *-La nitrosylation* : il a été démontré que le taux d'oxyde nitrique (NO) présent dans la cellule, le type cellulaire ainsi que l'état d'oxydo-réduction cellulaire, peuvent réguler l'activité des CASPASES. L'interaction du NO avec les groupements thiols des protéines conduit à la S-nitrosylation.

Lorsqu'elle a lieu au niveau du site catalytique des CASPASES, l'apoptose peut être inhibée. La CASPASE-3 possède une cystéine au niveau de son site catalytique, constituant ainsi une cible potentielle pour NO (Kim *et al.* 1997, 2002) ;

-Protéines inhibitrices à domaine CARD ou DED : il s'agit de molécules qui miment les CASPASES par leur domaine CARD ou DED. Elles sont catalytiquement inactives, mais en empêchant le recrutement et l'oligomérisation des CASPASES, elles inhibent l'apoptose. La protéine cellulaire c-FLIP (cellular FLICE Inhibitory Protein) possède un domaine DED. Elle empêche le recrutement de la pro-CASPASE-8 et bloque ainsi l'induction de l'apoptose par voie extrinsèque (Kataoka, 2005) ;

-Protéines IAP : la famille des protéines IAP est un ensemble de facteurs dont la séquence peptidique est hautement conservée. Ils participent aussi bien dans la régulation des deux voies apoptotiques, que dans le cycle et la signalisation cellulaires. Les protéines IAP identifiées chez l'homme sont : XIAP (X-chromosome linked IAP), cIAP1 et 2 (cellular IAP), NAIP (Neuronal IAP), livine et survivine. Excepté la NIAP, les autres IAP sont très bien étudiées. Les XIAP, cIAP1 et cIAP2 contiennent trois copies en tandem d'un motif de 70 acides aminés nommé BIR (Baculovirus IAP domain), ainsi qu'un doigt de zinc. Les cIAP1 et cIAP2 contiennent en plus, un site CARD. L'activité des protéines IAP dépend du domaine BIR. Le BIR2 fixe et inhibe l'activité des CASPASES -3 et -7, alors que le BIR3 est un segment inhibiteur de la CASPASE-9. Le domaine BIR1 n'a pas un potentiel inhibiteur. La survivine contient une seule copie du domaine BIR, structuralement similaire au BIR3 de la XIAP. Il est donc admis que cette protéine fixe et inhibe la CASPASE-9. L'activité de la

survivine ne se limite pas aux CASPASEs, mais elle est étroitement liée au cycle cellulaire et elle bloque également d'autres facteurs qui interviennent notamment dans la fragmentation de l'ADN (Wrzesien-Kus, 2004).

VI.1.2. Voie mitochondriale ou intrinsèque de l'apoptose

L'importance du rôle de la mitochondrie dans l'activation de l'apoptose est largement étudiée et décrite (Green and Kroemer, 2004; Kim *et al.*, 2005; Dejean *et al.*, 2006). Les *stimuli* extracellulaires ou intracellulaires tels que l'hypoxie, les produits du stress oxydatif, les radiations gamma ou UV, l'absence de facteurs de croissance, les molécules cytotoxiques etc., peuvent enclencher une perturbation de la membrane mitochondriale qui conduit à la fragmentation de l'ADN soit par le biais des CASPASEs soit indépendamment de celles-ci (Mohamad *et al.*, 2005 ; Kim *et al.*, 2006c). La perméabilisation de la membrane mitochondriale permet la libération dans le cytosol des molécules pro-apoptotiques, qui se localisent normalement dans l'espace intermembranaire mitochondrial : le cyt *c*, le facteur AIF (Apoptosis Inducing Factor) et la protéine Smac-DIABLO (Second Mitochondria-derived Activator of CASPASE/Direct Inhibitor apoptosis (IAP)-Binding protein LOw Pi) (Acehan *et al.*, 2002; Schefer et Kornbluth, 2006). Au cours de l'activation de cette voie, il y a formation de l'apoptosome constitué du cyt *c*, du facteur Apaf-1 et de la pro-CASPASE-9. En présence du dATP, le cyt *c* cytosolique se fixe sur l'Apaf-1 et initialise ainsi, la multimérisation de ce dernier. Suite à des changements conformationnels, il y a exposition du domaine CARD dans la partie N-terminale de l'Apaf-1, ce qui permet des interactions avec d'autres sites CARD, notamment celui présent dans la pro-CASPASE-9. Il y a formation ainsi d'un complexe heptamérique, l'apoptosome. Il est constitué d'un corps principal formé de 7 molécules de la CASPASE-9 entourés par 7 complexes cyt *c*/Apaf-1 (Figure 14) (Joza *et al.*, 2001).

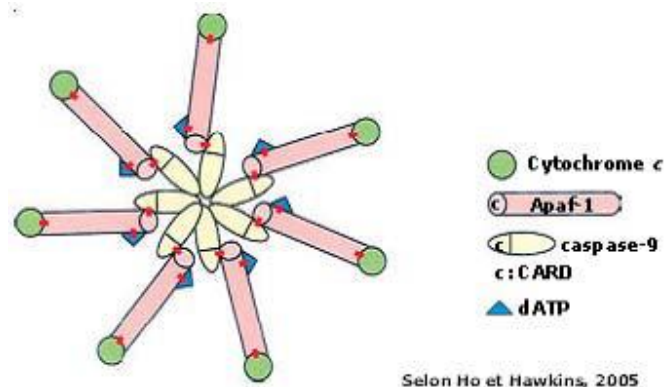


Figure 14 : Assemblage de l'apoptosome (Ho et Howkins, 2005).

Il est possible que la formation d'un tel complexe ait pour fonction d'induire des changements conformationnels de la CASPASE-9 pour favoriser l'activation de la pro-CASPASE-3 (Rodriguez et Lazebnik, 1999). Même en présence de mutations au niveau de la séquence peptidique de la CASPASE-9, celle-ci active la pro-CASPASE-3 (Stennicke *et al.*, 1999).

VI.1.3. Voie des récepteurs extracellulaires ou voie extrinsèque de l'apoptose

La voie extrinsèque nécessite l'activation des récepteurs extracellulaires tels que les récepteurs Fas/CD95, TNF α et TRAIL (Schmitz *et al.*, 2000) par des ligands spécifiques. La fixation du ligand conduit à l'oligomérisation du complexe ligand/récepteur et le recrutement de molécules adaptatrices au niveau du domaine intracellulaire du récepteur. Des CASPASES initiatrices telles que les pro-CASPASES -8 ou -10, s'associent au complexe récepteur/ligand par le biais des molécules adaptatrices et ils forment ainsi le complexe DISC. La pro-CASPASE engagée est activée par protéolyse. La CASPASE initiatrice mature active à son tour les CASPASES effectrices -3 ou -7. Les deux voies semblaient au départ fonctionner de manière indépendante. Pourtant dans certains cas de figure, il existe une liaison entre elles, à travers les protéines de la famille Bcl-2. En effet, la CASPASE-8 intervient également dans le clivage protéolytique de la protéine pro-apoptotique Bid, membre de la famille des protéines Bcl-2. La protéine Bid migre alors vers la mitochondrie et provoque la libération du cyt *c* dans le cytoplasme, ce qui pourrait avoir pour conséquence l'activation de la CASPASE-9 (Li *et al.*, 1998; Antonsson, 2004) (Figure 15).

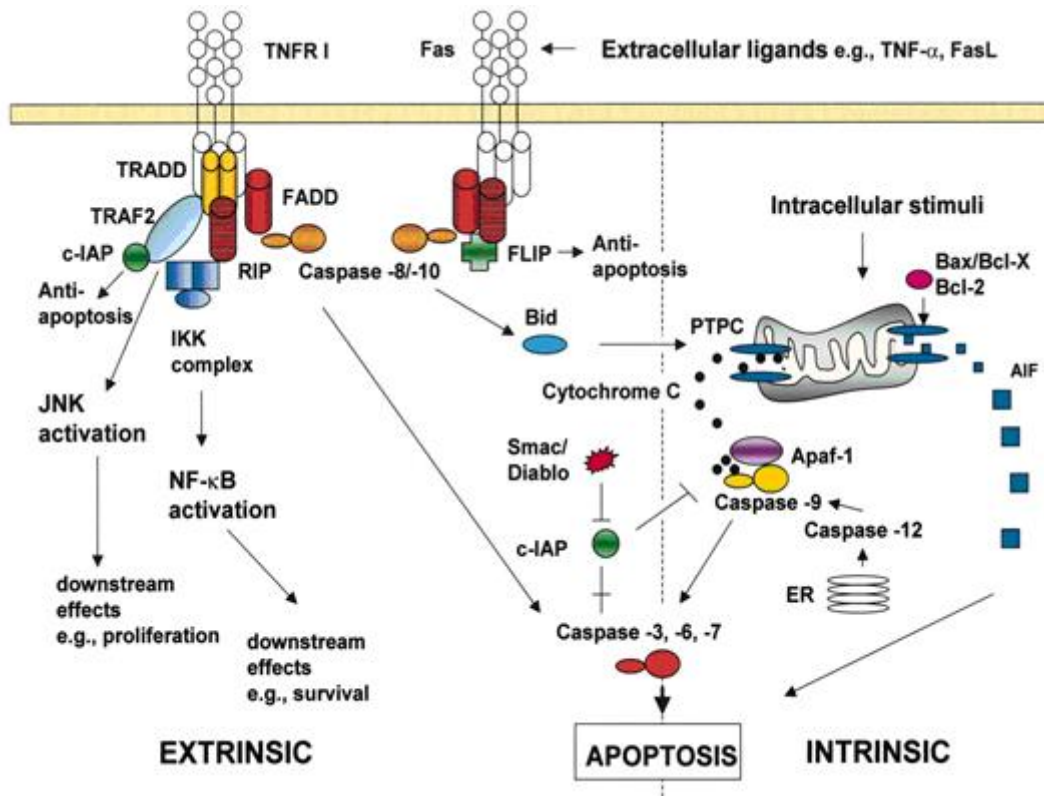


Figure 15 : Voies intrinsèque et extrinsèques de l'Apoptose (Zeiss, 2003)

VI.2. Fragmentation de l'ADN

L'apoptose est marquée morphologiquement par la condensation de la chromatine et la fragmentation de l'ADN, associées à la formation de corps apoptotiques (Kroemer et Martin, 2005). L'ADN nucléaire est clivé dans un premier temps, au niveau des sites riches en A/T en générant des fragments de l'ordre de 50 à 300 pb. Ces fragments sont, par la suite digérés au niveau de régions internucléosomiales libérant des fragments d'ADN de l'ordre de 200 pb (Wyllie *et al.*, 1984). La fragmentation de l'ADN génomique est une étape tardive de l'apoptose et peut avoir lieu lors d'un processus apoptotique. Elle peut être dépendante des CASPASES dans ce cas la CASPASE-3 active une endonucléase nommée CAD (CASPASE-Activated DNase). Dans les cellules non apoptotiques, la protéine CAD est associée à son inhibiteur, la protéine ICAD (Inhibitor of CAD). Les deux forment un complexe cytoplasmique, le facteur DFF (DNA Fragmentation Factor). Au cours de l'apoptose, les CASPASEs-3 ou -7 clivent le complexe qui libère ainsi la protéine CAD. Grâce à sa séquence de localisation nucléaire (NLS), elle migre dans le noyau et clive l'ADN chromosomique. Chez l'homme le facteur DFF est composé d'une sous unité de 45 kDa (DFF45) et d'une sous unité de 40 kDa (DFF40) (Sakahira *et al.*, 1998; Degen *et al.*, 2000).

La CASPASE-3 active également le facteur ACINUS (Apoptotic Chromatin Condensation Inducer in the nucleUS) qui agit sur la condensation de l'ADN. Enfin, les CASPASES clivent HELICARD qui est une hélicase cytosolique contenant un site CARD. Ce clivage permet la libération de l'hélicase sans le domaine CARD (Saelens *et al.*, 2004).

D'autre part, Il existe des facteurs qui agissent indépendamment des CASPASEs, et qui interviennent dans la fragmentation de l'ADN. Dans certains cas, l'inhibition des CASPASES ne suffit pas à empêcher la fragmentation de l'ADN (Lorenzo *et al.*, 1999). La mitochondrie libère des facteurs dont la fonction est indépendante des CASPASEs. Le facteur AIF (Apoptosis Inducing Factor) et l'endonucléase G (Endo G) sont des protéines mitochondriales qui agissent indépendamment de l'activation des CASPASEs. Le facteur AIF (67 kDa) est localisé au niveau de l'espace intermitochondrial, il est libéré en réponse à des *stimuli* apoptotiques et il migre vers le noyau où il termine sa maturation. Il a été suggéré que l'AIF se fixe à l'ADN, déplace les protéines qui lui sont associées, et recrute ou active des endonucléases, et initie ainsi la fragmentation de l'ADN de large échelle (50 Kb) (Ye *et al.*, 2002). L'Endo G (35 kDa) est également localisée dans l'espace intermembranaire mitochondrial. Elle migre également vers le noyau et induit la fragmentation de l'ADN (Cregan *et al.*, 2004). Il semblerait que l'Endo G coopère avec des exonucléases et la DNase I afin de générer des fragments d'ADN internucléosomiaux. Chez *C. elegans*, l'analogue de l'Endo G interagit avec l'analogue du facteur AIF (Saelens *et al.*, 2004).

VI.3. Perméabilisation de la membrane mitochondriale

La mitochondrie possède un gradient électrochimique ($\Delta\Psi_m$) au niveau de sa membrane interne. Ce gradient est créé suite à l'efflux des ions H^+ à partir de la matrice mitochondriale vers l'espace intermembranaire. La différence de concentration des protons installe un déséquilibre ionique, ce qui résulte dans la formation d'un gradient de pH et de voltage à travers la membrane mitochondriale. La mitochondrie génère l'énergie sous forme d'ATP grâce au processus de phosphorylation oxydative qui a lieu au niveau de la membrane interne. Lors de cette phosphorylation, des électrons sont générés à partir du NADH et sont transférés à l'oxygène moléculaire par une série de quatre complexes enzymatiques situés dans la membrane interne: NADH déshydrogénase (I), succinate déshydrogénase (II), cytochrome *c* réductase (III) et cytochrome *c* oxydase (IV). Les protons H^+ sont expulsés de la matrice vers l'espace intermembranaire grâce à l'énergie qui est produite par le transfert d'électrons entre les complexes.

L'existence du $\Delta\Psi_m$ autorise une diffusion spontanée de H^+ vers la matrice par le canal ATP synthase-complexe V. Ce flux de protons est utilisé par le complexe V pour fabriquer de

l'ATP, qui est exporté en échange de l'ADP (Figure 16).

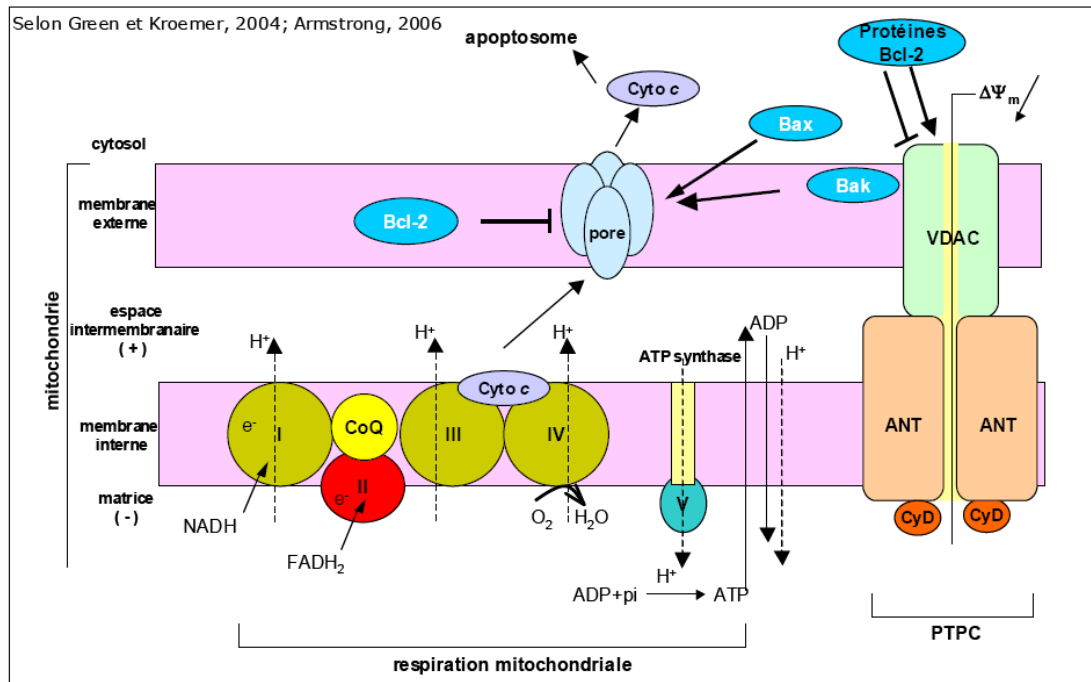


Figure 16 : Chaîne respiratoire et perméabilisation mitochondriale (Green et Kroemer, 2004).

La perméabilisation de la membrane mitochondriale (MMP : Mitochondrial Membrane Permeabilization) a lieu au cours de l'apoptose, et elle est responsable de la libération de facteurs qui résident initialement dans l'espace intermembranaire, situé entre la membrane externe et la membrane interne de la mitochondrie (cyt *c*, AIF, Endo G etc.) (Green et Kroemer, 2004). Avant, pendant et après la perméabilisation, il y a dissipation du potentiel $\Delta\Psi_m$. De manière générale, deux mécanismes sont décrits. L'un qui contrôle la perméabilisation de la membrane externe et l'autre qui contrôle la perméabilisation de la membrane interne (Armstrong, 2006).

La perméabilisation de la membrane externe ou MOMP (Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization) est gouvernée par les protéines de la famille Bcl-2. La MOMP est caractérisée par l'ouverture du canal VDAC (Voltage-Dependent Anion Channel) et/ou par des pores qui sont formés par les protéines de la famille Bcl-2. La perméabilisation de la membrane interne ou MIMP (Mitochondrial Inner Membrane Permeabilization) est régulée par un ensemble de facteurs, qui contrôlent la transition de la perméabilité mitochondriale (MPT : Mitochondrial Permeability Transition). Ce processus est caractérisé par l'ouverture de pores formés par un complexe protéique contenant le translocateur nucléotidique ANT (Adenine Nucleotide Translocator) et la cyclophiline D (CyD). Ces pores sont également appelés PTP (Permeability Transition Pore). L'ouverture de ces pores interfère avec le

transport d'électrons de la chaîne respiratoire, ainsi que la production de l'ATP. Elle provoque le gonflement de la mitochondrie suite à la redistribution des molécules d'eau et des ions entre le cytosol et la matrice mitochondriale. La perte du potentiel mitochondrial est souvent associée à l'ouverture irréversible des pores mais, d'autres événements peuvent également en être la cause. La MIMP peut ainsi précéder la MOMP et *vice versa*.

Le contact entre le MOMP et le MIMP donne naissance à un complexe polyprotéique qui contrôle la transition de la perméabilité mitochondriale, connu sous le nom PTPC (Permeability Transition Pore Complex) (Figure 10). Les facteurs qui participent à la formation du PTPC sont le VDAC et le récepteur benzodiazépine situés dans la membrane externe, l'héxokinase II qui est associée au VDAC dans la partie cytosolique, la créatine kinase qui est localisée dans l'espace intermembranaire, l'ANT localisée dans la membrane interne, la CyD située dans la matrice et les protéines de la famille Bcl-2. Le VDAC est normalement perméable à des molécules de taille de l'ordre de 5 kDa, et son association avec les pores de la membrane interne, permet l'échange des substrats de la chaîne respiratoire tels que le NADH, FADH et ATP/ADP. En revanche, la membrane interne est normalement imperméable, fonction essentielle pour l'établissement du gradient électrochimique $\Delta\Psi_m$. L'ouverture du PTPC a pour conséquence l'interférence avec la chaîne respiratoire et le passage de molécules d'eau ou de molécules de large poids moléculaire supérieur à ~1,5 kDa. Des ligands spécifiques comme la cyclosporine A (CsA) et ses dérivés ou les membres antiapoptotiques de la famille des protéines Bcl-2 peuvent inhiber la perméabilisation mitochondriale (Zamzami et Kroemer, 2001).

VI.4. Les protéines de la famille Bcl-2

Le processus apoptotique est contrôlé par un groupe de protéines hautement conservées au cours de l'évolution, les protéines de la famille Bcl-2. Le gène de la protéine Bcl-2, a été le premier identifié en tant que proto-oncogène dans les lymphocytes B. Au sein du lymphome, les cellules B sont résistantes grâce à la surexpression de la protéine Bcl-2 (Tsujiimoto *et al.*, 1985). Cette famille de protéines est composée de plus d'une vingtaine de composants, avec une faible homologie entre leurs séquences totales en acides aminés. En revanche, elles présentent des fortes homologies entre des régions précises. Il s'agit de régions appelées domaines BH (Bcl-2 Homology) et elles sont essentielles pour les interactions entre protéines (Yin *et al.*, 1994). La famille des protéines Bcl-2 est divisée en deux groupes : les protéines antiapoptotiques et les protéines pro-apoptotiques. Les protéines anti-apoptotiques présentent les 4 régions BH, sont localisées au niveau de la mitochondrie et stabilisent les membranes.

Au sein du groupe pro-apoptotique, il y a deux sous groupes séparés en fonction du nombre des domaines BH présents. Il y a ainsi les protéines à plusieurs domaines BH ("multidomains") et les protéines qui contiennent uniquement le domaine BH3 (BH3-only). L'ensemble des protéines de la famille Bcl-2 est illustré par la Figure 17.

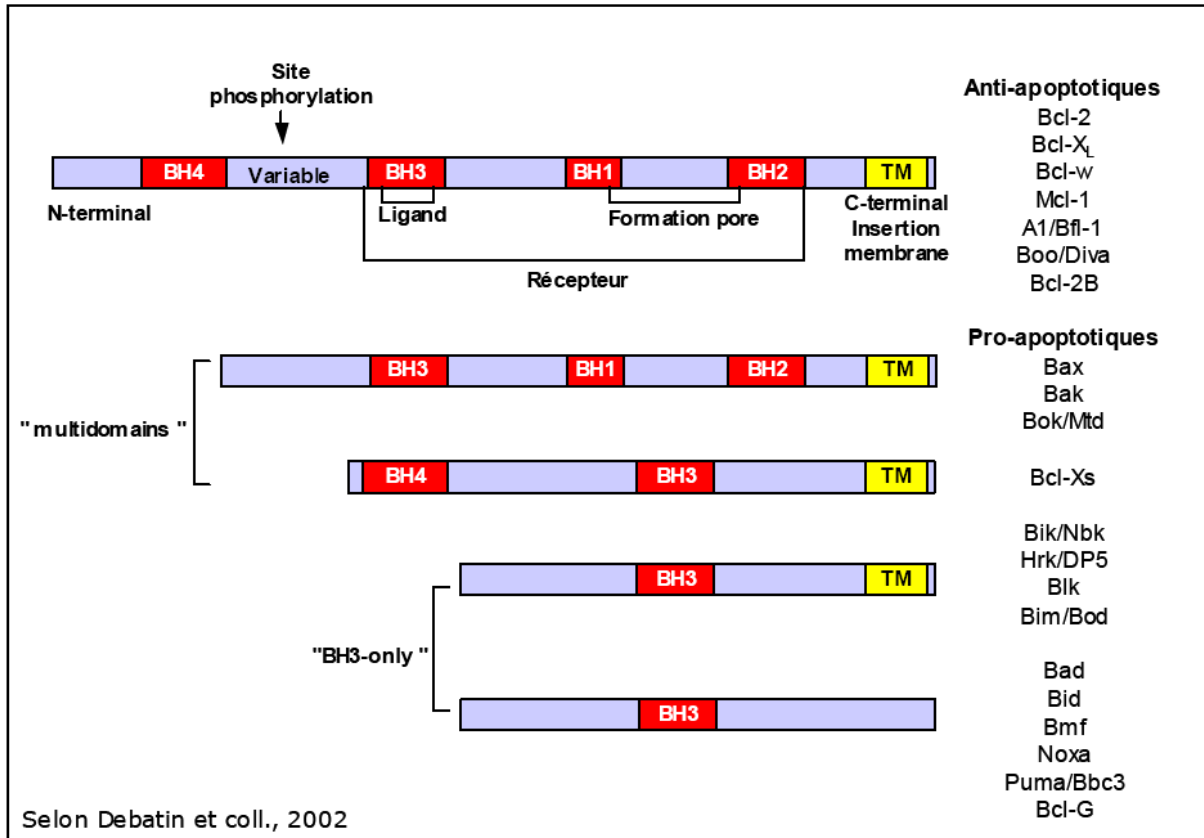


Figure 17 : Les protéines de la famille Bcl-2 (Debatin et al., 2002).

Les protéines pro-apoptotiques « BH3-only » interviennent dans l'induction de l'apoptose par activation de protéines pro-apoptotiques à plusieurs domaines ou par séquestration des protéines anti-apoptotiques. Elles interviennent dans la voie extrinsèque de l'apoptose et elles peuvent mettre en relation la voie extrinsèque et la voie intrinsèque (Kim *et al.*, 2006a). Les autres membres forment *in vitro* des canaux à travers les biomembranes, ce qui laisse supposer une fonction dans la formation de pores (Antonsson *et al.*, 1997). Les protéines de la famille Bcl-2 jouent un rôle très important dans le contrôle de l'apoptose. La surexpression ou la perte de fonction de certaines protéines anti-apoptotiques et proapoptotiques de la famille Bcl-2 déterminent la survie ou la mort cellulaire (Garrido *et al.*, 2003).

Ces protéines interviennent aussi dans la régulation des événements mitochondriaux apoptotiques qui se font par le biais des membres de la famille de protéines Bcl-2 (Cory et Adams, 2002). La protéine suppresseur de tumeur p53 joue un rôle critique dans la régulation de la famille de protéines Bcl-2, mais les mécanismes exacts n'ont pas encore été

complètement élucidés (Schuler et Green, 2001). La famille Bcl-2 de les protéines régissent la perméabilité de la membrane mitochondriale et peuvent être pro-apoptotiques ou anti-apoptotiques. À ce jour, 25 gènes au total ont été identifiés dans la famille Bcl-2. Certains codent pour des protéines anti-apoptotiques comprenant Bcl-2, Bcl-x, Bcl-XL, Bcl-XS, Bcl-w, BAG et d'autres pour des protéines pro-apoptotiques qui comptent Bcl-10, Bax, Bak, Bid, Bad, Bim, Bik et Blk. Ces protéines ont une signification particulière puisqu'elles peuvent déterminer si la cellule est conduite vers l'apoptose ou à au contraire à un arrêt de ce processus. Des chercheurs pensent que le mécanisme d'action principal de la famille des protéines Bcl-2 est la régulation de la libération du cytochrome c par les mitochondries *via* l'altération des protéines intervenant dans la perméabilité de la membrane mitochondriale (Elmore, 2007). Quelques mécanismes possibles ont été étudiés mais aucun n'a été prouvé de manière définitive. Les dommages mitochondriaux dans la voie Fap de l'apoptose sont médiées par le clivage de la caspase-8 de Bid (Li et al., 1998; Esposti, 2002). C'est un exemple de «dialogue croisé» entre la voie du récepteur de la mort (extrinsèque) et la voie mitochondriale (intrinsèque) (Igney et Krammer, 2002). La phosphorylation de Bad est associée un membre d'une famille de molécules de liaison phosphosérine multifonctionnelles. Lorsque Bad est phosphorylé, il est piégé par la protéine 14-3-3 et séquestré dans le cytosol, mais une fois que Bad est non phosphorylé, sa translocation aux mitochondries est effective pour libérer le cytochrome C (Zha, et al., 1996). Bad peut également être hétérodimérisé avec Bcl-XL ou Bcl-2, en neutralisant leur effet protecteur et favoriser la mort cellulaire (Yang et al., 1995). Lorsqu'ils ne sont pas séquestrés par Bad, Bcl-2 et Bcl-XL inhibent la libération du cytochrome c par les mitochondries bien que le mécanisme ne soit pas bien compris. Les rapports indiquent que Bcl-2 et Bcl-XL inhibent la mort par apoptose principalement en contrôlant l'activation des CASPASEs (Newmeyer et al., 2000). Une protéine supplémentaire "Aven" semble se lier à la fois à Bcl-XL et à Apaf-1, empêchant ainsi l'activation de la pro-caspase-9 (Chau et al., 2000). Il existe des preuves que la surexpression de Bcl-2 ou de Bcl-XL régule négativement l'autre, indiquant une régulation réciproque entre ces deux protéines.

Une surproduction des ROS et/ou un dysfonctionnement du système antioxydant sont souvent impliqués dans les mécanismes physiopathologiques de certaines maladies (athérosclérose, maladies neurodégénératives, cancers...). Pourtant les ROS sont également des acteurs importants de la signalisation cellulaire et de la régulation des métabolismes. Ce paradoxe apparent peut être dépendant du type cellulaire, de la source productrice ainsi que de la dose des ROS (Delattre *et al.*, 2005). Les cellules cancéreuses peuvent produire de

grandes quantités de peroxyde d'hydrogène (Szatrowski et Nathan, 1991). Certains tissus du cancer du côlon produisent des ROS en excès (Keshavarian *et al.*, 1992). Cet excès dans les cellules tumorales pourrait maintenir la prolifération anormale à des taux élevés grâce à l'augmentation des mutations que pourrait subir l'ADN (Kang, 2002).

Même si les ROS favorisent la cancérogenèse, certains cas de figure montrent qu'ils peuvent contribuer à l'amplification des signaux de mort. En effet, les ROS peuvent faciliter la perturbation de la membrane mitochondriale et favoriser ainsi l'ouverture des canaux (Kim *et al.*, 2006b). La protéine anti-apoptotique Bcl-2, renforce la résistance des cellules au stress oxydatif étant donné que son rôle se résume au maintien de la fermeture des pores mitochondriaux (Armstrong, 2006).

En outre l'implication de la cancérogenèse dans le processus pro-oxydant, paradoxalement, le traitement du cancer par des agents physiques ou chimiques, est encore plus nocif en termes de production de ROS, ce qui cause des effets délétères dans l'organisme.

A cause des agents externes comme les polluants de l'air, les radiations UV et l'alcool, les radicaux libres peuvent être produits en excès. De ce fait, notre système endogène de défense se trouve incapable de réduire toutes ces espèces réactives. Pour diminuer ces dommages oxydatifs, notre organisme a alors besoin d'une alimentation riche en antioxydants exogènes. Parmi ces antioxydants, on trouve les vitamines C, E et A, ainsi que les flavonoïdes retrouvés en excès dans les produits naturels d'origine végétale ou animale. Ces produits font l'objet de plusieurs études de recherche ces dernières décennies, c'est pour cela que notre intérêt s'est porté sur un de ces produits naturels très riche en flavonoïdes et autres produits bio-actifs « la Propolis ».

VII. La Propolis : Source antioxydante

La Propolis désigne toute une série de substances résineuses, gommeuses et balsamiques, de consistance visqueuse, recueillies sur certaines parties de végétaux (bourgeons, écorce) par les abeilles. Ces dernières les modifient, en partie, par ajout de sécrétions salivaires et de cire. Les principales essences d'arbres connues pour être productrices de propolis sont le pin, le sapin, l'épicéa, le peuplier, l'aulne, le saule...

La propolis se présente sous l'aspect d'une substance de couleur pouvant varier du jaune clair au brun très foncé, presque noir suivant les types de résines recueillies par les ouvrières. Elle possède une saveur âcre, voire amère, et dégage une odeur douceâtre et agréable liée aux résines aromatiques qu'elle renferme (Burdock, 1998).

C'est un enduit dont les abeilles se servent pour vernisser toutes les surfaces intérieures de la ruche, afin d'en assurer l'étanchéité et la solidité. La propolis joue également un rôle hygiénique, en créant une couche protectrice contre les invasions microbiennes ou fongiques. L'ouverture qui se trouve à l'entrée de la ruche est constamment ajustée et remodelée à l'aide de la propolis, afin d'adapter ses dimensions et son orientation en fonction des conditions climatiques (figure 18) (Burdock, 1998).



Figure18: La Propolis

Propolis vient de « pro » qui signifie « en avant » et de « polis » qui signifie «la cité». où elle servait à l'embaumement. La Propolis, beaucoup moins anciennement connue que le miel, remonte vraisemblablement à l'Egypte antique et de façon certaine, aux Grecs, (*propolis vient du grec: pro, qui signifie: en avant, et de polis: la cité, l'entrée de la ruche*). ARISTOTE en parle dans son « Histoire des animaux »et la considère comme « remède aux affections de la peau, plaies et suppurations ». Connue des Incas chez lesquels elle était utilisée dans le cadre des infections fébriles, la propolis est retrouvée également dans les livres de Médecine de Géorgie à partir du 12^{ème} siècle où elle entre dans la préparation de nombreux remèdes (Wagh, 2013).

En France, c'est surtout à l'occasion de la guerre des Boers en Afrique du Sud au XIX^{ème} siècle qu'elle connaît son apogée d'utilisation, dans le cadre de ses propriétés purifiantes désinfectantes et cicatrisantes, du fait des excellents résultats qu'elle procure. Son utilisation donc, sans avoir été permanente, s'est maintenue au fil des siècles et est à nouveau «redécouverte » de façon relativement récente par de nombreux chercheurs qui s'attachent et s'efforcent progressivement, depuis quelques années, d'expérimenter scientifiquement l'ensemble des données empiriques de ce produit (Wagh, 2013).

VII.1. Caractères physico-chimiques

La Propolis se présente sous l'aspect d'une substance de consistance variable en fonction de la température ; dure et friable à 15°C, elle devient molle et malléable aux alentours de 30°C et collante ou gluante au-dessus jusqu'à fondre vers 60-70°C en moyenne, mais le point de fusion peut aller jusqu'à 100°C et au-delà, chauffée doucement au bain-marie, elle se divise en deux parties bien distinctes, l'une visqueuse qui tombe au fond l'autre liquide (cire de propolis) qui surnage à la surface et trouve de nombreux usages dans le domaine apicole; de couleur très variable selon sa provenance, allant du jaune clair (conifères) au brun très foncé, presque noir, en passant par toute une gamme de bruns extrêmement riche et étendue (rougeâtre, verdâtre, etc.), de saveur souvent âcre et parfois amère et d'odeur variable selon son origine; en général arôme agréable et douceâtre, mélangé à celui du miel, de la cire et d'autres produits (cannelle, vanille, etc.). Si elle est brûlée, elle dégage une odeur d'encens très délicate et très recherchée en rapport avec les résines aromatiques qu'elle contient. Ces caractéristiques dépendent de sa source et de son âge (Ghisalberti, 1979).

La Propolis est insoluble dans l'eau mais elle est soluble partiellement dans l'acétone, l'alcool, l'ammoniaque, le benzène, le chloroforme, l'éther, le trichloréthylène, etc., et seul un mélange adéquat de différents solvants permet de dissoudre la quasi-totalité de ses composants (Donadieu, 2000)

VII.2. Composition chimique de la Propolis:

La composition chimique de la Propolis, sa couleur ou encore sa valeur aromatique peuvent changer selon la zone géographique et la saison de sa récolte. L'identification de la composition chimique de la Propolis a fait l'objet de plusieurs études au cours des deux dernières décennies ; La composition de la Propolis est variable selon la source végétale

visitée par les abeilles, mais présente tout de même qualitativement de nombreuses substances qui s'y retrouvent de façon constante et relativement stable, constance vérifiée et confirmée par des travaux d'analyse chromatographique effectués sur de très nombreux échantillons. Généralement, la Propolis recueillie dans la ruche est constituée de 50 à 55% de résines et baumes; 25 à 35% de cire (soit 30% en moyenne) 10% d'huiles volatiles ou essentielles; 5% de pollen (les pollens présents dans la propolis le sont par accident, au même titre que ceux retrouvés partout dans la ruche); 5% de matières diverses organiques et minérales (Marchenay, 1977 ; Burdock, 1998 ; Park *et al.*, 2002 ; Pietta *et al.*,2002). Plus de 300 composés ont été identifiés dans différents échantillons et beaucoup de nouveaux composés sont découverts au cours des caractérisations chimiques des nouvelles sources de Propolis (Marcucci, 1995).

Plusieurs méthodes analytiques ont été utilisées pour la séparation et l'identification des constituants de la Propolis, selon la méthode d'extraction et les solvants organiques utilisés, plusieurs substances bioactives ont été identifiées (Tableau V), ces substances appartiennent aux groupes de composés chimiques suivants : les polyphénols principalement des composés aromatiques mais les principaux composés sont de la classe des flavonoïdes: isolés en 1964 et 1969 par Villanveva, Bogdanovsky, Barbier, Gonnet et Lavie), il y a aussi acide benzoïque et dérivés, quelques aldéhydes, acide cinnamique et ses dérivés, des sesquiterpènes et terpènes, des dérivés du benzaldéhyde, hydrocarbures aliphatiques, des stérols et stéroïdes, des minéraux, des sucres et des acides aminés (Walker & Crane, 1987), il est probable de trouver quelques produits volatiles dans la composition des certaines propolis (produites par les plantes source) en petites quantités, quelques composés sont communs dans tous les échantillons propolis ce qui détermine ses propriétés caractéristiques. (De Castro, 2001).

Tableau V: Les différents solvants utilisés pour l'extraction de la Propolis (Fokt, 2010).

Eau	Methanol	Ethanol	Chloroform	Dichloromethane	Ether	Acetone
Anthocyanins, starches, tannins, saponins, terpenoids, polypeptides, and lectins	Anthocyanins, terpenoids, saponins, xanthoxylines, totarol, quassinoids, lactones, flavones, phenones, polyphenols, polypeptides, and lectins	Tannins, polyphenol, polyacetylenes, terpenoids, sterols, and alkaloids,	Terpenoids, flavonoids	Terpenoids, tannins, polyphenols, polyacetylenes, sterols, and alkaloids	Alkaloids, terpenoids, coumarins, and fatty acids	Flavonols

La propolis issues de différentes origines contient différents constituants dont certains sont spécifiques aux plantes de la région de récolte (Ghisalberti, 1979). D'autre part, les

échantillons de Propolis issus de différentes régions géographiques varient avec ses activités biologiques ceci étant en relation avec les conditions climatiques de la région en question (Kujumgiev *et al.*, 1999). Les principaux composés essentiels responsables des activités biologiques sont les polyphénols, les acides aromatiques, et acides diterpéniques, la différence est liée à la composition florale de la région. Une autre variante pouvant influencer la composition des différentes propolis étant la saison de récolte de cette dernière. Miguel et collaborateurs ont rapporté dans leur travaux sur un échantillon de propolis recueilli de la région de Algrave du sud du Portugal que les extraits hydro-alcoolique de propolis récolté à la saison du printemps étaient plus riche en phénols (phénols totaux, flavones, flavonols, flavanones, et dihydroflavonols) que ceux récoltés en hiver (Miguel *et al.*, 2010). Jusqu'à présent, il a été fractionné et identifié de très nombreux constituants. La composition qualitative et quantitative en composés bioactifs de la Propolis est différente d'une région à une autre selon la végétation, le climat et les conditions environnementales, le tableau 6 ci-dessous en montre la différence dans la composition (tableau VI) (Wagh, 2013).

Tableau VI : Influence de l'origine géographique et de la source végétale sur la composition chimique de la Propolis (Wagh, 2013)

Origine géographique	Source végétale	Composés bioactifs potentiels	référence
Europe, Amérique du nord et régions non tropicales d'Asie.	Populus spp, plus souvent <i>P. nigra L.</i>	polyphénols	(Monti <i>et al.</i> , 1983)
Russie	<i>Betula verrucosa Ehrh</i> <i>Baccharis spp.</i>	polyphénols	(Monti <i>et al.</i> , 1983)
Brésil	Famille des Asteraceae <i>B.dracunculifolia DC.</i>	p-Acide coumaric prénylé, acides diterpéniques	(Marcucci, 1995,)
Cuba, Venezuela	<i>Clusia spp.</i>	Benzophénones polyprénylés	(Trusheva <i>et al.</i> , 2003)
Régions du pacifique (Okinawa, Taiwan)	inconnue	C-prényl-flavanone	(Kumazawa <i>et al.</i> , 2002)
Iles Canaries	inconnue	Furofurane lignanes	(Kujumgiev <i>et al.</i> , 1999)
Kenya	inconnue	Polyphénols et arylnaphtalene lignanes	Grange & Davey, 1990 ; Kosalec <i>et al.</i> , 2005 ; Petrova A, et al, 2010)
Grèce et Chypre	inconnue	Flavonoides et terpènes	(Kalogeropoulos <i>et al.</i> , 2009)

VII.3. Activité Biologiques de la Propolis :

Depuis la plus haute antiquité, des préparations à base de propolis ont été utilisées pour leurs propriétés anti-infectieuses, anti-inflammatoires, cicatrisantes et anesthésiques. Parmi ses principales propriétés scientifiquement prouvées, on peut citer :

VII.3.1. Une activité antibactérienne à large spectre :

Selon Kumar *et al.*, La propriété antimicrobienne de propolis, collectée de la région de Gujarat (Inde), a été mise en évidence par la méthode de diffusion en gélose agar contre les souches bactériennes *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, et *Aspergillus niger*. Les Extraits éthanoliques de l'échantillon (200µg / ml) ont montré une activité antibactérienne élevée contre les bactéries Gram-positif (*Bacillus subtilis*) mais une moindre activité contre les bactéries Gram-négatives (*P. aeruginosa* et *E. coli*). L'extrait de la levure a montré une zone d'inhibition tandis que *A. Niger* n'a pas montré d'activité. Cependant, la moindre activité était relevée à 40% en utilisant l'extrait méthanolique (Kumar *et al.*, 2008). Selvan *et al.* ont observé que la propolis en combinaison avec de la chlorhexidine possède une forte activité antimicrobienne contre *Streptococcus mutans*. Cette action pouvant supprimer les agents pathogènes de la plaque dentaire par une inhibition de l'adhérence et l'accumulation de streptocoques cariogènes à la surface de la dent suggérant un potentiel traitement de la carie dentaire (Selvan *et al.*, 2011)

VII.3.2. Une activité antifongique :

Koc et collaborateurs ont mis en évidence l'effet fongicide de la Propolis sur des champignons nuisibles (*Famata*, *C. glabrata*, *C. kefyr*, *C. pelliculosa*, *C. parapsilosis*, et *Pichia ohmeri*) (Koc *et al.*, 2007); l'effet fongicide a été associée à la présence de flavonoïdes (Farnesi *et al.*, 2007). La propolis a été testée pour l'activité antifongique sur une série de 40 souches de levure de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, et *Trichosporon* (Koc *et al.*, 2011). La Propolis inhibé la croissance de *C. albicans* (MIC 0,2 à 3,75 g / ml), *C. glabrata* (MIC 0,03 à 7,5 mg / ml), *Trichosporon spp.* (CMI de 0,1 à 0,4 pg / mL), et *Rhodotorula sp.* (CMI <0,01 g / ml) et la souche la plus sensible était *Rhodotorula spp.* La souche la plus résistante était *C. albicans* (Hendi *et al.*, 2011).

VII.3.3. Une activité anti-oxydante.

Il est bien connu que l'oxydation endommage diverses substances biologiques et provoque par la suite de nombreuses maladies, telles que la carcinogenèse, le diabète ou l'athérosclérose (Yang *et al.*, 2011). Par conséquent, les antioxydants jouent un rôle important dans la réduction du risque d'un large éventail de maladies chroniques. Récemment, l'identification et l'isolation de nouveaux antioxydants à partir de sources naturelles est devenue un domaine de recherche actif, puisqu'un certain nombre de produits naturels, tels que les flavonoïdes, les phénoliques ou les terpènes, isolés de plantes et d'aliments ont démontré une activité antioxydante puissante (Yang *et al.*, 2011).

La Propolis de certaines régions du monde étant un concentré de flavonoïdes, ces derniers sont de puissants antioxydants. L'une des techniques les plus couramment utilisées pour évaluer le potentiel antioxydant est basé sur l'épuisement des radicaux libres par l'addition de composés piègeurs ou neutralisants les ROS. Des mesures de la consommation du radical 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle (DPPH) est liée à la capacité intrinsèque d'une substance ou un mélange complexe à donner des atomes d'hydrogène ou des électrons à cette espèce réactive dans un système homogène. Des études menées *in vitro* sur l'activité anti-oxydante des différents extraits de propolis ont conclu que ce complexe bioactif est doté d'une activité anti radicalaire comparable aux antioxydants de référence tels que les vitamines (C) (Kumar *et al.*, 2008).

VII.3.4. Activité hépatoprotectrice.

Le potentiel de protection de la propolis a été évalué contre le stress oxydatif induit par le mercure et la modification enzymatique antioxydant dans le foie des souris. L'exposition au chlorure de mercure (HgCl₂, 5 mg / kg; ip) induit le stress oxydatif en augmentant la peroxydation lipidique et le taux de glutathion oxydé avec diminution concomitante en glutathion et diverses enzymes antioxydantes. Le traitement conjoint de la propolis (200 mg / kg; par voie orale) inhibe la peroxydation des lipides et le niveau de glutathion oxydé alors qu'une 'augmentation du niveau de glutathion est notée. L'activité des enzymes antioxydant (SOD) superoxyde dismutase, la catalase, la glutathion S-transférase, et le glucose-6-phosphate déshydrogénase, était également restauré de façon concomitante par rapport au contrôle après le traitement par la propolis. Les résultats suggèrent que la propolis augmente la défense antioxydante contre la toxicité induite par le mercure (Zhao *et al.*, 2009).

VII.3.5. Une activité anti-tumorale :

L'activité antitumorale de la propolis a été examinée par Orsolich et al. L'activité chimio-préventive de propolis dans des modèles animaux et des cellules en culture, est le résultat de leur capacité à inhiber la synthèse d'ADN dans les cellules tumorales, leur capacité à induire l'apoptose des cellules tumorales, et l'activation des macrophages à produire des facteurs capables de réguler les fonctions des cellules B et T et NK, respectivement (Orsolich *et al.*, 2006). De plus, ces résultats suggèrent que les flavonoïdes de la propolis jouent un rôle protecteur contre la toxicité des agents chimiothérapeutiques ou des radiations chez la souris, donnant l'espoir qu'ils peuvent avoir une action protectrice similaire chez l'homme. La combinaison avec un antioxydant en traitement adjuvant peut améliorer l'efficacité de la chimiothérapie et en atténuer les effets secondaires sur les leucocytes, le foie et les reins et, par conséquent, permettant l'augmentation de la dose (Oolic, 2011). Bien que beaucoup de polyphénols ont une activité antimétastatique, l'acide caféique esters phényliques (CAPE) de propolis de peuplier et d'artépilline C de propolis de *Baccharis* ont été identifiés comme les agents antitumoraux les plus puissants (Orsolich *et al.*, 2005, Ahn *et al.*, 2007). Le potentiel anticancéreux *in vitro* de la propolis dans les lymphocytes humains ont été étudiés. Des échantillons de sang ont été obtenus à partir de dix hommes en bonne santé et des volontaires non-fumeurs. Les différences entre les cellules témoins et les cellules exposées étaient statistiquement significatives. L'exposition à différentes concentrations de propolis ne peut produire d'effet cancérogène lymphocytes sur des humains périphériques *in vitro*. Cependant, l'augmentation du taux de micronoyaux (MN) a montré que la propolis pouvait avoir un effet cancérogène à forte concentration (Ozkul et al., 2005).

VII.3.6. Activité anti-inflammatoire.

L'inflammation est la réponse biologique complexe des tissus vasculaires à des stimuli nocifs, comme les agents pathogènes, les cellules endommagées, des irritants, et les radicaux libres. Almeida et Menezes ont examiné l'activité anti-inflammatoire de la propolis, les résultats aboutissent à des effets inhibiteurs sur l'activité de la myéloperoxydase, NADPH oxydase ornithine décarboxylase, tyrosine-protéine kinase, et hyaluronidase par les mastocytes de porc. Cette activité anti-inflammatoire peut être expliquée par la présence de flavonoïdes actifs et des dérivés de l'acide cinnamique. Le premier comprend l'acacétine, la quercétine, et naringénine; celui-ci comprend l'Acide caféique phénylique (CAP) et l'acide caféique (CA) (Almeida et Menezes, 2002). L'Acide Caféique phénylique ester (CAPE) et la

galangine, les deux étant des constituants typiques de la propolis de peuplier, présentaient une activité anti-inflammatoire et inhibaient significativement l'œdème de carragénine, et les inflammations de l'arthrite chez le rat (Borrelli *et al.*, 2002 ; Du Toit *et al.*, 2002). Un extrait éthanolique de propolis a supprimé la génération de prostaglandine leucotriènes par les macrophages péritonéaux de souris *in vitro* et au cours de l'inflammation péritonéale aiguë induite le zymosane (complexe de protéines et de glucides extrait de la membrane des cellules de levure) *in vivo*. La Propolis donnée de manière continue par voie orale a supprimé de manière significative la voie de la lipoxigénase du métabolisme de l'acide arachidonique lors de l'inflammation *in vivo*. Le CAPE était un modulateur plus puissant du métabolisme de l'acide arachidonique que l'acide caféique, la quercétine, ou la naringénine (Mirzoeva & Calder, 1996).

VII.3.7. Une Activité Immunomodulatrice :

L'étude d'un dérivé hydrosoluble de la propolis administré par voie orale et parentérale a conduit aux résultats suivants une augmentation du taux de survie le temps moyen de survie dans des infections expérimentale, bactérienne (*Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*) et fongiques (*Candida albicans*), chez la souris. Une augmentation de la résistance était également observé dans l'infection par *Klebsiella pneumoniae* induit après le traitement par le cyclophosphamide. Le dérivé de la propolis a stimulé la production *in vitro* d'interleukines -1 par les macrophages péritonéaux, ce qui correspond à leur sécrétion élevée de protéine totale. Ce dérivé a été suggéré d'augmenter la défense non spécifique de l'hôte *via* l'activation des macrophages (Dimov *et al.*, 1992)

VII.3.8. Autres activités :

En addition des activités suscitées, beaucoup d'autres travaux sont publiés sur les différentes activités de la propolis, nous citons l'activité anti virale anti-herpétique et virocide sur certains virus grippaux, A2 en particulier. Une activité régénératrice des tissus par stimulation des processus de régénération cellulaire (Yang *et al.*, 2011).

VII.4. La Propolis : source de flavonoïdes

- Les activités biologiques exercées par la propolis sont attribuable à la présence de polyphénols dans sa composition et plus précisément les flavonoïdes. Cette classe de produits naturels est composée essentiellement de composés polyphénoliques qui sont ubiquitaires

dans les plantes. Par ailleurs, les flavonoïdes (figure 19) présentent un intérêt thérapeutique qui date de la découverte de la vitamine C par Szent Gyorgyi (Prix Nobel, 1937), chercheur de l'Université de Szeged (Hongrie), qui a constaté que les symptômes hémorragiques du scorbut, liés à la fragilité ou l'hyperperméabilité des vaisseaux, étaient guéris par des extraits de paprika ou de jus de citron, riches en vitamine C et flavonoïdes. Cette action a été appelée propriété vitaminique P (P étant la première lettre du mot perméabilité) (Grzybowski et Pietrzak, 2013)

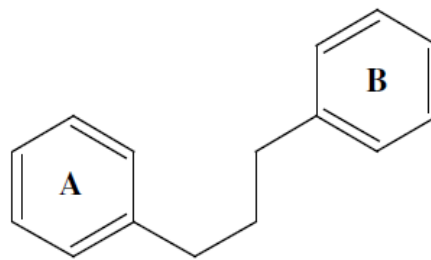


Figure 19 : Squelette de base des flavonoïdes (Marfak, 2003)

Malgré ces premiers résultats prometteurs, les recherches ne permirent pas ensuite d'attribuer un rôle essentiel aux divers polyphénols du monde végétal. A partir des années quatre-vingts, c'est la découverte du rôle des radicaux libres dans les processus pathologiques qui a relancé l'intérêt pour ces molécules dont les propriétés antioxydantes sont très marquées.

Ils se sont révélés posséder une variété d'activités biologiques à des concentrations non toxiques dans les organismes. Le rôle des flavonoïdes alimentaires dans la prévention du cancer est largement discutée. Données convaincantes des études en laboratoire, les enquêtes épidémiologiques et les essais cliniques humains indiquent que les flavonoïdes ont des effets importants sur la chimioprévention du cancer et la chimiothérapie. De nombreux mécanismes d'action ont été identifiés, y compris l'inactivation cancérogène, anti-prolifération, arrêt du cycle cellulaire, l'induction de l'apoptose et la différenciation, l'inhibition de l'angiogenèse, anti-oxydation et l'inversion de la résistance à des médicaments multiples ou une combinaison de ces mécanismes. Sur la base de ces résultats, les flavonoïdes peuvent être des agents anticancéreux prometteurs

VII.5. Activité biologiques des Flavonoïdes

VII.5.1. Études *in vitro* des activités biologiques des flavonoïdes

De nombreux chercheurs ont mené des études *in vitro* sur l'activité anticancéreuse potentielle de flavonoïdes dans les systèmes cellulaires divers. Les rapports collectés sur les propriétés inhibitrices de flavonoïdes contre la carcinogenèse sont résumés dans le tableau II. Hirano et ses collaborateurs ont examiné l'efficacité anticancéreuse de 28 flavonoïdes sur la lignée cellulaire de leucémie myéloïde humaine aigüe HL-60, et comparé les différences entre l'activité anti-proliférative et la cytotoxicité de ces composés avec ceux de quatre agents anticancéreux cliniques. Huit des 28 flavonoïdes ont montré des effets inhibiteurs considérables sur la croissance cellulaire des cellules HL-60 avec des CI50 allant de 10 à 940 ng / ml. La génistéine a eu les effets les plus forts presque équivalents aux effets des agents anticancéreux actuels avec peu de cytotoxicité contre cellules HL-60, alors que les agents anticancéreux avaient une cytotoxicité puissante (Hirano *et al.*, 1994).

Kuntz et collaborateurs ont criblé plus de 30 flavonoïdes pour leurs effets sur la prolifération des cellules et de la cytotoxicité potentielle dans des lignées cellulaires humaines de cancer du côlon Caco-2 et HT-29. Presque tous les composés présentaient une activité anti-proliférative sans cytotoxicité. Il n'y avait pas de relation structure-activité évidente dans les effets anti-prolifératifs, soit sur la base des sous-classes (c'est à dire, les isoflavones, les flavones, les flavonols, et flavonones) ou à l'égard de la position des substituants dans la sous-classe (Kuntz *et al.*, 1999). Un criblage de 55 flavones ayant une variété de substituants a été évaluée par Cushman et Nagarathnam sur l'effet cytotoxique dans les cinq cultures de cellules de cancer, a-549 de carcinome pulmonaire, les cellules MCF-7 cancer du sein, du côlon HT-29 adénocarcinome, SKMEL-5 mélanome, and MLM melanoma. Quinze des 55 dérivés de flavones ont été significativement actifs contre au moins une de ces cellules en cultures (Cushman & Nagarathnam, 1991). En outre, sept des 27 flavonoïdes d'agrumes examinés ont inhibé la prolifération des cellules tumorales, tandis qu'ils sont moins actifs contre des cellules humaines normales (Kawaii *et al.*, 1999). Le tableau VII ci-dessous résume certaines activités *in vitro* des flavonoïdes sur des lignées cellulaires (Ren *et al.*, 2003).

Tableau VII : Activités anticancéreuses des flavonoïdes *in vitro* sur des lignées cellulaires cancéreuses (Ren *et al.*, 2003)

<i>Cancer</i>	<i>Cellules</i>	<i>Flavonoïde</i>	<i>Références</i>
Cancer oral humain	HSC-2, HSG, SCC-25	Flavanones, isoflavans, EGC, chalcones, EGCG, curcumin, genistein, ECG, quercetin, cisplatin	Shi <i>et al.</i> , 2001 ; Fukai <i>et al.</i> , 2000 ; Sakagami <i>et al.</i> , 2000 ; Elattar & Virji, 2000a ; Elattar & Virji, 2000b)
Cancer du sein humain	MCF-7	Flavanones, daidzein, genistein, quercetin, luteolin	Pouget <i>et al.</i> , 2001 ; Han <i>et al.</i> , 2001
Cancer de la Tyroïde humain	ARO, NPA, WRO	Genistein, apigenin, kaempferol, chrysin, luteolin, biochanin A	Yin <i>et al.</i> , 1999a ; Yin <i>et al.</i> , 1999b
Cancer des Poumons humain	SK-LU1, SW900, H441, H661, haGo-K-1, A549	Flavone, quercetin	Bai <i>et al.</i> , 1998 ; Caltagirone <i>et al.</i> , 1997
Cancer de la Prostate humain	LNCaP, PC3, DU145	Catechin, epicatechin, quercetin, kaempferol, luteolin, genistein, apigenin, myricetin, silymarin	Agarwal <i>et al.</i> , 2000 ; Kampa <i>et al.</i> , 2000 ; Knowles <i>et al.</i> , 2000 ; Bhatia <i>et al.</i> , 2001
Cancer du Colon Humain	Caco-2, HT-29, IEC-6, HCT-15	Flavone, quercetin, genistein, anthocyanin	Wenzel <i>et al.</i> , 2000 ; Kamei <i>et al.</i> , 1998 ; Kuntz <i>et al.</i> , 1999 ; Kuo <i>et al.</i> , 1997 ; Kuo, 1996.
Leucémie humaine	HL-60, K562, Jurkat	Apigenin, quercetin, myricetin, chalcones	Wang <i>et al.</i> , 1999 ; Chung <i>et al.</i> , 1999 ; Csokay <i>et al.</i> , 1997 ; De Vincenzo <i>et al.</i> , 2000.
Mélanome murin B16	4A5	Chalcones	Iwashita <i>et al.</i> , 2000

VII.5.2. Études *in vivo* des activités biologiques des flavonoïdes

Les flavonoïdes ont été démontrés pour inhiber la carcinogénèse *in vitro* et des preuves substantielles indiquent qu'ils peuvent aussi le faire *in vivo* (Miyagi *et al.*, 2000 ; Kamei *et al.*, 1996 ; Caltagirone *et al.*, 2000). Ils peuvent inhiber la carcinogénèse en affectant les événements moléculaires dans les étapes d'initiation, la promotion et la progression. Des études expérimentales utilisant différents modèles cellulaires ont suggéré que certains flavonoïdes pourraient inhiber l'initiation de la tumeur ainsi que sa progression. (Deschner *et al.*, 1991 ; Tanaka *et al.*, 1997 ; Mukhtar *et al.*, 1996 ; Yang *et al.*, 1997 ; Tanaka *et al.*, 1997) Une étude récente a montré que le lait de soja fermenté contenant de grandes quantités de génistéine et daidzéine d'un et d'un mélange d'isoflavones non fermentés, a inhibé les tumeurs mammaires induites par le 2-amino-1-méthyl-6-phénylimidazo [4 , 5-b] pyridine (PhIP) chez le rat (Ohta *et al.*, 2000).

La quercétine alimentaire inhibait la carcinogénèse buccale (Balasubramanian *et al.*, 1996) induite par le DMBA chez le hamster et la carcinogénèse des glandes mammaires chez le rat (Verma *et al.*, 1988). Lorsqu'ils sont administrés pendant la phase d'initiation, la quercétine et l'acide éllagique, inhibent également la tumorigénèse pulmonaire induite par le DEN chez la souris (Khanduja *et al.*, 1999). Dans un modèle de carcinogénèse multiviscérale à moyen

terme chez le rat, la quercétine (1% alimentaire) a inhibé la tumorigénèse dans l'intestin grêle (Akagi et al., 1995). La supplémentation alimentaire avec la quercétine, le chalcone et 2-hydroxychalcone (à 0,05%), soit pendant la phase d'initiation ou de progression du cancer conduit à une inhibition de la formation d'un cancer. Ces composés également diminuent la prolifération cellulaire (Makita *et al.*, 1996).

Siess et collaborateurs ont étudié les effets de supplémentation alimentaire des rats avec des flavones, flavanones, tangerétine, et la quercétine sur deux étapes de l'hépatocarcinogénèse (d'initiation et de progression) induite par l'aflatoxine B1 (AFB1) et ont constaté que les flavone, flavanone et tangerétine administrés pendant la période d'initiation diminuent le nombre de foyers préneoplastique observé par la gamma-glutamyl transférase. De plus, il a été observé chez les rats recevant une alimentation supplémentée de flavanone pendant l'étape de progression tumorale par le phénobarbital, une réduction de façon significative des foyers préneoplasiques marqués à la glutathion S-transférase. Par conséquent, ce flavanone agirait comme un anti-initiateur et ainsi qu'un anti-promoteur tumoral (Siess *et al.*, 2000).

VII.6. Mécanisme d'action des Flavonoïdes

VII.6.1. Relation structure-activité antioxydante des flavonoïdes

De nombreuses études ont mis en évidence l'existence de relation structure – activité dans le cas des flavonoïdes. Ainsi, il a été montré que l'activité des flavonoïdes et de leurs métabolites dépendent essentiellement du nombre et de la position de leurs groupements fonctionnels. Les éléments structuraux nécessaires à l'obtention d'une activité anti-oxydante optimale ont pu être établis par plusieurs auteurs (Khlebnikov, 2007 ; Wolf et Liu, 2008 ; Mercader *et al.*, 2008).

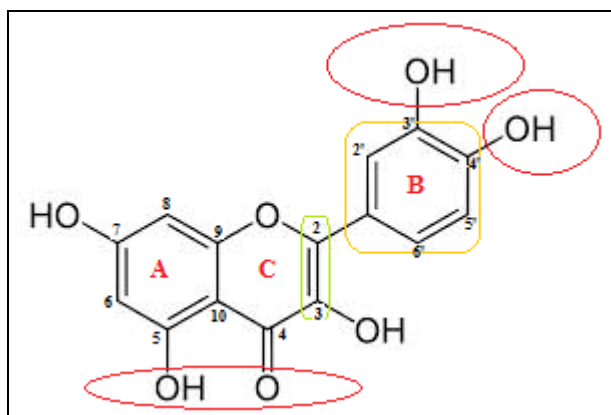


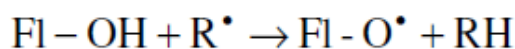
Figure 20 : Eléments structuraux nécessaires à l'obtention d'une activité antioxydante

Ces éléments sont :

La présence d'une fonction catéchol sur le cycle B : les hydroxyles au niveau du noyau B sont des donneurs d'hydrogène et d'électrons vis-à-vis des radicaux hydroxyle, peroxyde et peroxy nitrile conduisant à des espèces radicalaires beaucoup plus stables. Cette fonction sur le cycle B est étroitement corrélée à une activité antioxydante importante du fait de la stabilisation du radical phénoxy généré lors du piégeage par la fonction phénolique située en ortho. La présence d'un groupement hydroxyle libre en position 3 augmente également la capacité scavenger des flavonoïdes. Dans le cas des flavonols, la glycosylation ou méthylation de ce groupement conduit à une diminution importante de l'activité antioxydante (Musialak *et al.*, 2009 ; Ma *et al.*, 2007) en présence d'une double liaison entre les carbones C2-C3, conjugué à la fonction carbonyle en C4 permet une bonne stabilisation du radical phénoxy (Musialak *et al.*, 2009) et donc permettent une meilleure activité antioxydante. La comparaison des activités respectives de la quercétine et de la dihydroquercétine (taxifoline) par exemple, suggère que la fonction carbonyle et la double liaison en C2-C3 sont à l'origine de cette activité (Burda *et al.*, 2001 ; Rice-Evans *et al.*, 2006).

VII.6.2. Piégeage des radicaux libres

L'interaction des flavonoïdes avec de nombreux radicaux a été employée dans plusieurs études afin de déterminer les éléments majeurs de l'activité antioxydante. A cause de leurs faibles potentiels redox, les flavonoïdes (Fl-OH) sont thermodynamiquement capables de réduire les radicaux libres oxydants comme le superoxyde, le peroxyde, l'alkoxyde et l'hydroxyle par transfert d'hydrogène (Jovanovic, 1994) :



Où R• représente l'anion superoxyde, le peroxyde, l'alkoxyde et l'hydroxyle. Le radical flavonoxy (Fl-O•) peut réagir avec un autre radical pour former une structure quinone stable (Figure 21) (Marfak, 2003).

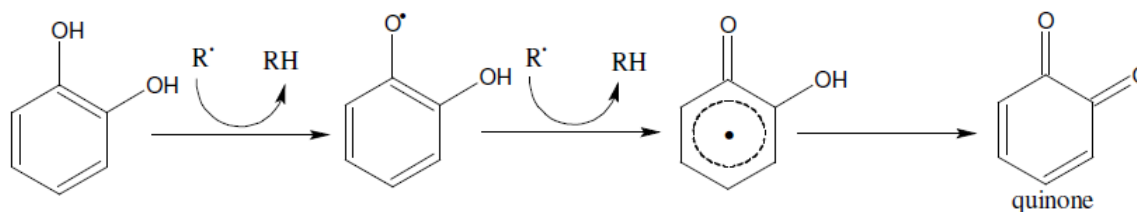


Figure 21 : Piégeage des ROS (R•) par les flavonoïdes (Marfak, 2003)

VII.7. Les antioxydants : plus que des piègeurs d'ERO

L'avènement de la biologie moléculaire a montré que les antioxydants sont des molécules qui possèdent des propriétés allant bien au-delà de leur capacité à piéger les ERO (Kuntz *et al.*, 1999). La vitamine E est ainsi capable d'inhiber la prolifération cellulaire et l'adhésion des monocytes. La vitamine E affecte également l'expression de certains gènes comme le CD36, l'alpha-tropomyosine et la collagénase. Expérimentalement, il est bien prouvé que les antioxydants présentent des activités anticancéreuses non seulement en piégeant des ERO mais aussi en augmentant la réponse immunitaire, en diminuant l'expression d'oncogènes ou en inhibant l'angiogenèse des tumeurs. Des recherches sur cultures de cellules cancéreuses ont montré que le sélénium diminue le nombre de mitoses de ces cellules.

Les antioxydants jouent également un rôle clé dans la régulation des signaux cellulaires. Un exemple concret concerne le phénomène de l'apoptose qui participe directement au contrôle de l'homéostasie tissulaire par un effet régulateur de la croissance cellulaire, un contrôle du renouvellement des tissus normaux et une élimination des cellules en fin de différenciation. La régulation de l'apoptose est complexe et met en jeu des effecteurs enzymatiques (caspases) et des protéines régulatrices (p53, Bcl2, NF κ B ...) dont l'activité du facteur AP-1 qui régule l'expression des médiateurs de croissance cellulaire, est contrôlée par des concentrations physiologiques en EOA. Par contre, si trop d'EOA sont produites, le facteur AP-1 sera surexprimé et conduira à une prolifération anormale de cellules (Pincemail *et al.*, 2002) (figure 22).

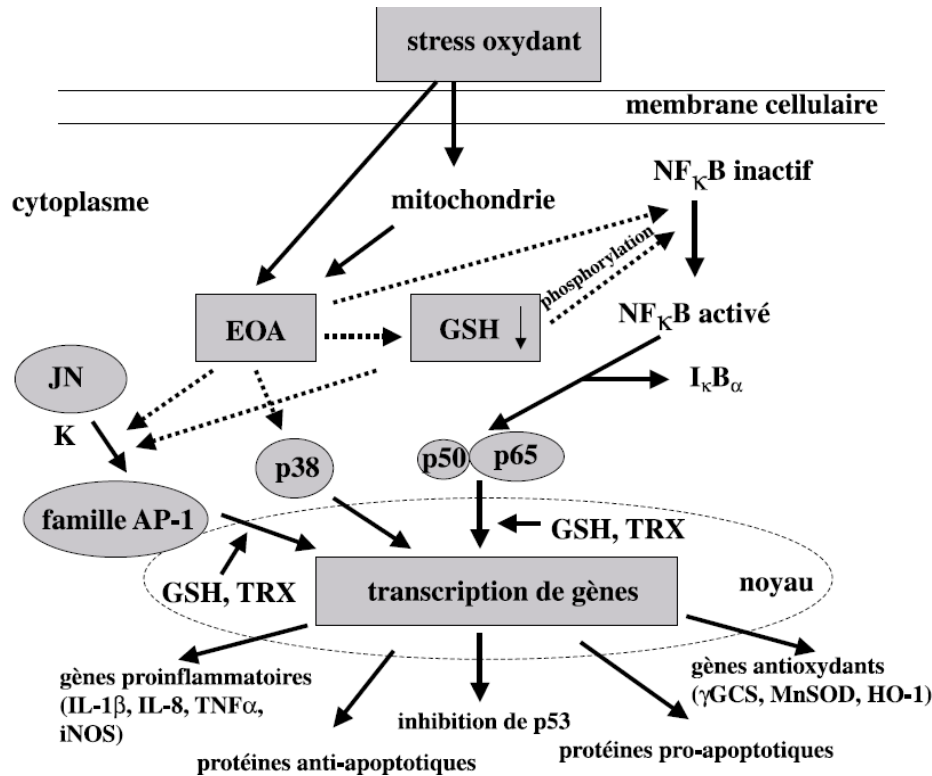


Figure 22 : Phénomène d'apoptose : rôle central du glutathion (GSH) et de la thiorédoxine (TRX) en tant que régulateur redox de la cellule (Pincemail et al., 2002)

Parmi les substances anti-apoptotiques, le facteur de transcription NFκB dont l'activation est elle-même régulée par les EOA. Dans sa forme inactive, ce facteur existe sous la forme d'un trimère composé des sous-unités p50, p50 et IκBα. En réponse à un stress oxydant, l'unité IκBα se dissocie et la forme activée de NFκB (dimère p50/p50) peut alors migrer dans le noyau et activer des gènes codant pour l'expression de molécules anti-apoptotiques (Pincemail et al., 2002).

Comme le montre la figure 22, le glutathion réduit, joue un rôle très complexe dans la régulation de l'apoptose (Circu et Yee Aw, 2008) mais aussi dans la transcription de gènes pro- et anti-inflammatoires ou de gènes codant pour l'expression d'enzymes antioxydantes. D'autre part, plusieurs études ont montré que l'état redox de la cellule était maintenu grâce à la présence de la thiorédoxine (TRX), une protéine possédant le groupement disulfide/dithiol au niveau de son site actif (Kemp et al., 2008). Un stress oxydant induit une augmentation de l'activité de cette protéine qui peut directement interagir avec les EOA (action antioxydante directe) (Kemp et al., 2008).

Dans le noyau, le TRX aura un rôle très important en contrôlant les interactions protéines-protéines et en modulant l'activation du NFκB et des facteurs de transcription de la famille AP-1 (c-Jun/c-Jun; c-Jun/c-Fos) dans l'expression de substances contrôlant l'apoptose (Zhang *et al.*, 2004).

Plusieurs travaux ont mis en avant le rôle joué par la mitochondrie dans l'apoptose. En cas d'ouverture des mégapores de la mitochondrie, il y a libération dans la cellule de cytochrome C ou d'autres facteurs qui vont activer la voie des caspases, éléments déclencheurs de l'apoptose. La protéine BCL-2 dont l'activité est étroitement régulée par le GSH, empêche l'ouverture de ces canaux et donc un déclenchement intempestif du processus de l'apoptose (Zimmermann *et al.*, 2007).

1- MATÉRIEL ET MÉTHODES

Objectif du travail de recherche

Le présent travail évoque deux parties.

Les travaux de cette thèse ont été réalisés au sein de deux laboratoires : le laboratoire de Pharmacologie et Phytochimie de l'université de Jijel où la première partie concernant l'évaluation de l'activité antioxydante *in vitro* et *in vivo* de l'Extrait Ethanolique de Propolis algérienne. L'activité anti-oxydante de l'EEP *in vitro* est appréciée en premier lieu par un test chimique au DPPH mesurant la capacité de capture des radicaux libre oxygénés par l'EEP en comparaison avec deux agents antioxydant de référence (Vitamine E et le quercétine).

Le métabolisme mitochondrial normal est associé à la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), intrinsèquement liée au fonctionnement de la chaîne respiratoire. Tous les constituants de la mitochondrie (mtDNA, protéines, lipides) sont susceptibles d'être altérés par les ROS. Dès lors, le stress oxydant induit une cascade de réactions d'oxydation qui participent aux perturbations des fonctions mitochondriales et induisent dans les cas avancés la mort cellulaire. Avec cette approche nous avons tenté de mettre en évidence l'effet de l'EEP sur le stress oxydatif inhérent au traitement *in vitro* par la doxorubicine des mitochondries cardiaques isolées. Pour cela, la production de l'anion superoxyde et le gonflement mitochondriaux ont été mesurés en présence de l'EEP.

L'activité anti-oxydante de l'EEP *in vivo* est réalisée chez le rat wistar traité ou non par les médicaments doxorubicine et vinblastine utilisées en chimiothérapie anticancéreuse conventionnelle. Ces derniers sont utilisés comme agents pro-oxydants. L'évaluation de l'effet antioxydant de l'EEP est mis en évidence par l'exploration du système de détoxification enzymatique et non enzymatique dans les tissus hépatique et cardiaque.

Extrait Ethanolique de Propolis

I. L'Extrait Ethanolique de Propolis algérienne

I.1. Récolte de la Propolis

La Propolis a été récoltée au mois d'avril-mai de l'année 2005 à partir des ruches de la coopérative apicole de la commune de Kaous (Jijel). La récolte est réalisée par grattage et raclage des cadres et des parois de la ruche. La propolis brute a été stockée à 4° C à l'abri de la lumière et de l'oxygène (dans un récipient fermé) jusqu'à son utilisation afin d'éviter la dégradation de ses constituants.

I.2. Préparation de l'extrait éthanolique de propolis

Nous nous sommes intéressés au cours de cette étude à l'extrait éthanolique de Propolis (EEP) en raison de sa richesse en composés polyphénoliques et spécifiquement les flavonoïdes. L'étude phytochimique de la composition chimique de l'EEP est réalisée au sein du laboratoire de Pharmacologie et Phytochimie (Lahouel *et al.*, 2010).

Pour la préparation de l'EEP, la Propolis préalablement récoltée et conservée à 4°C est d'abord coupée en petits morceaux, lavées dans l'éthanol pendant deux heures pour éliminer les impuretés et laissée macérer pendant 15 jours dans l'éthanol 95°, 1g de Propolis pour 10 ml d'éthanol. Le macérât est ensuite filtré avec du papier filtre et le filtrat est évaporé à 60°C en utilisant un évaporateur rotatif (Evaporateur E100, Hei Dolph), l'extrait obtenu est repris dans l'éthanol. L'évaporation du deuxième macérât aboutit à un extrait visqueux de couleur brune appelé extrait éthanolique de Propolis (EEP).

Un affrontement par 500ml d'Ether de Pétrole est nécessaire pour éliminer les cires et graisses présentes dans la phase hydro alcoolique de l'extrait de propolis.

Une solution stock en Propolis est préparée dans l'éthanol absolu à 0,1g/ml. Plusieurs dilutions sont ensuite réalisées pour les utilisations *in vitro* et *in vivo* dans différents solvants adéquat pour chaque expérimentation.

I.3. Préparation des solutions de l'extrait éthanolique de Propolis pour les expérimentations biologiques *in vivo* et *in vitro*

L'extrait le Propolis étant insoluble dans l'eau, une fraction éthanolique bien que minime est indispensable dans la préparation des solutions pour éviter sa précipitation.

Pour les études *in vivo* deux préparations ont été nécessaires :

Une solution hydro-alcoolique de l'EEP est préparée à la concentration finale de 12,5mg/ml en EEP et 1% en éthanol, cette solution a été administrée par voie orale aux animaux afin d'évaluer l'activité anti-oxydante de l'EEP *in vivo*. Une autre solution hydro-alcoolique a été réalisée dans l'eau physiologique à une concentration finale de 0,2mg/ml avec 0,1% en éthanol. Cette solution a été injectée par voie intra-péritonéale aux souris C57Bl6 par différents protocoles pour estimer l'effet anti-tumoral et protecteur de l'EEP. Les volumes à injecter sont ajustés extemporanément en respectant les poids corporels des animaux.

Pour les tests *in vitro* sur les cellules en culture, l'EEP est préparé en solution stock dans l'éthanol et dilué par la suite dans les milieux de culture adéquats pour chaque lignée cellulaire, avec une proportion éthanolique finale dans les puits ne dépassant pas 0,1%.

Première partie
Etude de l'activité anti-oxydante
in vitro et in vivo
de l'Extrait Ethanolique de Propolis
chez le rat wistar albinos

II. Etude de l'activité anti-oxydante *in vitro* et *in vivo* de l'EEP chez le rat wistar albinos

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 tocophérol (vitamine E) ainsi que les composés phénoliques. En raison de la présence des groupes hydroxyphénoliques dans leur structure, les substances bioactives d'origine naturelle possèdent des propriétés anti-oxydantes qui sont attribuées en partie, à la capacité de piéger les radicaux libres tels que les radicaux hydroxyles ($\text{OH}\cdot$) et superoxydes ($\text{O}_2\cdot$) (Rice-Evans *et al.*, 1995; Burda et Oleszek, 2001 ; Antolovich *et al.*, 2002 ; Bartosz, 2003).

Afin de tester l'effet anti-oxydant de l'EEP, un test *in vitro* mettant en évidence le pouvoir piégeur des radicaux libres est réalisé.

II.1. Effet anti-radicalaire ou piégeur des ROS *in vitro* de l'EEP

Plusieurs méthodes sont utilisées pour évaluer, *in vitro* et *in vivo*, l'activité antioxydante par piégeage de radicaux différents, comme les peroxydes $\text{ROO}\cdot$ par les méthodes ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) et TRAP (Total Radical Trapping Antioxidant Parameter) (Ricardo da Silva *et al.*, 1991) ; les ions ferriques par la méthode FRAP (Ferric ion Reducing Antioxidant Parameter) (Benzie et Strain, 1996); ou les radicaux $\text{ABTS}\cdot$ (sel d'ammonium de l'acide 2,2' azinobis 3 ethylbenzothiazoline 6 sulfonique) (Re *et al.*, 1999), ainsi que la méthode utilisant le radical libre DPPH \cdot (diphényl picrylhydrazyle) (Sharma et Bhat, 2009). Compte tenu de la complexité des processus d'oxydation et la nature diversifiée des antioxydants, avec des composants à la fois hydrophiles et hydrophobes, il n'y a pas une méthode universelle par laquelle l'activité antioxydante peut être mesurée quantitativement d'une façon bien précise.

De point de vue méthodologique, le test au radical libre DPPH \cdot est recommandé pour des composés contenant SH-, NH- et OH- groupes (Salah *et al.*, 1995). Il s'effectue à température ambiante, ceci permettant d'éliminer tout risque de dégradation thermique des molécules thermolabiles. Le test est largement utilisé pour les extraits bruts ou purifiés riches en composés phénoliques (Yi-Zhong *et al.*, 2006 ; Hatzidimitriou *et al.*, 2007).

Au cours de la présente étude, l'effet scavenger ou la capacité de piégeage des radicaux libres de l'EEP est déterminé en utilisant la méthode au DPPH d'après Ancerewicz *et al* (1998) cette méthode a la capacité de mesurer l'activité anti-oxydante des extraits en utilisant le radical

libre 2,2-Diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH°). Le DPPH est stable au cours du temps et largement utilisé en tant que donneur d'hydrogène pour évaluer l'activité anti-oxydante d'un composé X (Cotelle, 1996 ; Marfak *et al.*, 2003).

Cette méthode a été employée ces dernières années pour mesurer les antioxydants dans les systèmes biologiques complexes. La réaction du radical DPPH avec un composé antioxydant pouvant donner des protons conduit à sa réduction en DPPH-H ce qui induit un changement de sa couleur (du violet vers le jaune). Ceci se traduit par une décroissance de l'absorbance en fonction du temps à 515nm. Les deux formes radicalaire et réduite du DPPH sont représentées ci-dessous (figure 23)

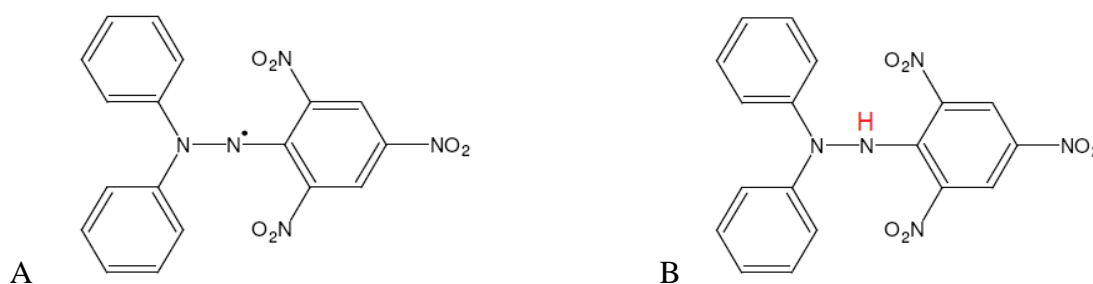


Figure 23: structure chimique du radical DPPH :
A. Forme radicalaire. B : Structure chimique du DPPH-H réduit

L'effet antioxydant de l'EEP a été réalisé *in vitro* par la méthode spectrophotométrique (spectrophotomètres Ultraspec 100 pro) en utilisant 1.5 ml du radical DPPH° (100µM) et 15µl de l'EEP à différentes concentrations (10⁻⁸g/ml à 10⁻²g/ml). La mesure de la Densité Optique s'effectue chaque 30 secondes pendant 2 minutes à 515 nm. L'effet piègeur est déterminé en pourcentage de réduction contre un contrôle à 100% (DPPH° seul) en utilisant la relation suivante :

$$\% \text{ de réduction} = [A_C - A_E / A_C] \times 100.$$

Où :

A_C : Absorbance du contrôle après 2min

A_E : Absorbance de l'essai après 2min

II.2. Activité antioxydante *in vivo* de l'extrait éthanolique de Propolis contre le stress oxydatif induit par la doxorubicine et la vinblastine

II.2.1. Entretien des Animaux

L'étude de l'effet préventif de L'extrait éthanolique de la Propolis jijelienne contre le stress oxydatif mitochondrial induit par les médicaments anticancéreux a été réalisée sur des rates wistar albinos pesant entre 250 et 280g provenant de l'Institut Pasteur (Alger). Afin d'éviter la variabilité inter-sexe, nous n'avons utilisé que des rats femelles. Les animaux ont été placés dans une animalerie respectant les conditions environnementales de température moyennant les 22°C et un cycle d'éclairage de 12h par 24h au cours de l'expérience.

Les animaux sont répartis en 2 grands groupes :

- Les rats du groupe (1) (n=24) reçoivent une solution hydro-alcoolique de Propolis (solution de Propolis dans le NaCl à 0.9% à 1% Ethanol final) *per os* à la dose de 100 mg/kg pendant 4 jours. A la fin du prétraitement ce groupe est divisé en trois lots (n=8) recevant chacun une dose unique par voie intra-péritonéale de 20 mg/kg de doxorubicine seule (lot 1), 2mg/kg de vinblastine seule (lot 2) et un traitement combiné (doxorubicine + vinblastine) (lot 3).
- Les animaux du groupe (2) (n=32) reçoivent un prétraitement par le véhicule (solution à 1% Ethanol final) *per os* pendant 4 jours, les animaux sont ensuite répartis en quatre lots (n=8) recevant chacun une dose unique par voie intra-péritonéale de 20 mg/kg de doxorubicine seule (lot 4), 2mg/kg de vinblastine seule (lot 5), traitement combiné par la doxorubicine + la vinblastine aux mêmes doses de 20 mg/kg + 2mg/kg respectivement (lot 6) et une solution de NaCl à 0.9% (lot 7) ce dernier représentant un lot contrôle.

Après 24h de l'injection intra-péritonéale par les médicaments anticancéreux, les animaux sont sacrifiés par décapitation. Les foies et les cœurs sont excisés rapidement et placés dans un tampon phosphate (0.1M, pH 7.4) à 4°C pour les différentes extractions de fraction mitochondriales et cytosoliques. Les foies sont divisés en trois parties plongées chacune dans : le tampon TSE (Tris 0.5 M, Sucrose 250 mM, EGTA 5mM, pH 7.2 à 4°C) utilisé pour préparer une suspension de mitochondries hépatiques servant aux mesures du gonflement, de la production de l'anion superoxyde du MDA et des enzymes anti-oxydantes ; le tampon phosphate (0.1M, pH 7.4) contenant du KCl à 1.17% utilisée pour la mesure de l'activité des enzymes anti-oxydantes Cu/Zn SOD et Catalase cytosoliques ; la solution de KCl (1,15%) pour le dosage du GSH et du MDA cytosoliques (Lahouel *et al.*, 2004).

II.2.2. Isolement des fractions cellulaires et subcellulaires à analyser

II.2.2.1. Isolement des mitochondries hépatiques et cardiaques

La préparation de la suspension de mitochondries hépatiques se fait selon la méthode décrite par Rustin et collaborateurs (1991). Il s'agit d'une centrifugation différentielle.

Après sacrifice des rats pesant environ 200g, les foies et les cœurs sont excisés et pesés, 1 g de foie sont prélevés et coupés finement dans du tampon TSE. Les particules coupées sont ensuite lavées deux fois dans le même tampon et broyées dans un broyeur de DOUNCE, avec 3 ml de TSE, ce qui permet la destruction des cellules et la libération des mitochondries.

L'homogénat récupéré est centrifugé une première fois à 1770 rpm pendant 10 min (centrifugeuse Sigma 6K15) permettant ainsi l'élimination des gros débris cellulaires. Le surnageant issu de cette centrifugation est centrifugé à 9600 rpm pendant 10 min à 4°C et le culot obtenu est resuspendu dans 1.5 ml du TSE et centrifugé à nouveau à 9600 rpm pendant 10 min. Le culot issu de cette centrifugation est suspendu dans 1.5 ml du tampon TS (50mM Tris, 250mM Sucrose, pH 7.2 à 20°C) et centrifugé pendant 10 min à 9600 rpm. Le culot final constitue les mitochondries, il est subdivisé en deux fractions égales : la première (F1) est reprise dans 200µl de tampon TS, appelé aussi tampon respirant, permettant de conserver les fonctions physiologiques des mitochondries en suspension, la seconde (F2) dans la solution hypotonique (25mM KH₂PO₄, 5mM MgCl₂, pH 7.2) induisant la libération de la matrice mitochondriale servant aux mesures des activités enzymatiques.

II.2.2.2. Préparation de la matrice mitochondriale

Le culot de mitochondries issu des centrifugations différentielles (F2) est suspendu dans une solution hypotonique (25mM KH₂PO₄, 5mM MgCl₂, pH 7.2) (V/V) et congelé-décongelé 6 à 8 fois avec pottérisation accrue et répétée à l'aide d'un Potter Elvehjem Homogeniser (2ml) afin d'éclater les mitochondries. Une centrifugation de l'homogénat à 9600 rpm pendant 10min permet de récupérer le surnageant utilisé comme source d'enzymes. Le dosage des protéines est réalisé sur cette fraction par la méthode de Lowry (Lowry *et al.*, 1951).

II.2.2.3. Préparation de la fraction cytosolique hépatocytaire

La fraction cytosolique hépatique est préparée selon la méthode d'Iqbal (Iqbal *et al.*, 2003). Pour cela 1g de foie est coupé et homogénéisé avec 3 volumes de tampon phosphate (0.1M, pH 7.4) contenant du KCl à 1.17% en utilisant le broyeur de DOUNCE. L'homogénat est ensuite centrifugé à 2000 rpm pendant 15 min à 4°C pour séparer les débris nucléaires. Le

surnageant issu de cette centrifugation est centrifugé à 9600 rpm à 4°C pendant 30 min, le surnageant ainsi obtenu est utilisé comme source d'enzymes cytosoliques du foie.

II.2.3. Mesure de la production de l'anion superoxyde ($O_2^{\circ-}$) *in vitro* par les mitochondries cardiaques de rat

L'anion superoxyde est l'un des radicaux libres les plus nocifs, il est généré par les mitochondries notamment par le complexe I et III de la chaîne respiratoire. La génération des $O_2^{\circ-}$ par les mitochondries hépatiques en suspension a été réalisée selon la méthode de Zini et al (1999) en mesurant la réduction du NBT (de couleur jaune) par le superoxyde en monoformazan (de couleur bleue) qui absorbe à 560nm selon la réaction :



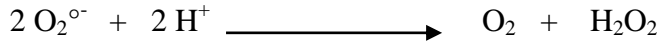
La suspension mitochondriale (F1) est utilisée à 0.2mg/ml dans un mélange réactionnel de volume final de 1.2 ml contenant 1 μ M CsA, 100 μ M NBT dans de tampon TS, après incubation à 37°C pendant 110 minutes ensuite à 25°C, la réaction est amorcée par addition de succinate (6mM), le taux de NBT réduit est mesuré au spectrophotomètre à 560nm pendant 4min. Le pourcentage de production de l'anion superoxyde est calculé en prenant le 100% du contrôle réalisé en absence du succinate (substrat mitochondrial).

II.2.4. Mesure du gonflement mitochondrial (mitochondrial swelling) *in vitro*

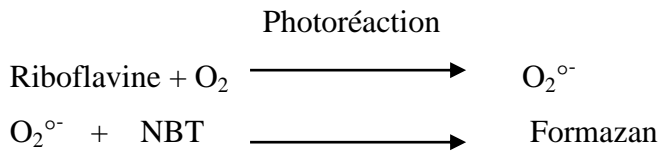
Le gonflement mitochondrial est un indicateur de la perméabilité de la membrane mitochondriale. La mise en évidence de ce phénomène physiologique *in vitro* est réalisée sur des mitochondries en suspension selon la méthode de Kristal *et al* (1996) par la mesure de la décroissance de l'absorbance à 540 nm. Pour cela, la suspension mitochondriale, utilisée à 1mg/ml, est incubée dans un volume total de 1.8ml du tampon respirant additionné de 10.8 μ l de succinate à 6 mM et 18 μ l de différentes concentrations de l'EEP. Après 1 min d'incubation, 2.25 μ l de $CaCl_2$ à 100 mM sont ajoutés pour induire le gonflement. La décroissance de l'absorbance à 540 nm est suivie chaque minute pendant 5 min.

II.2.5. Mesure de l'activité enzymatique de la Superoxyde Dismutase mitochondriale (Mn SOD)

La SOD est une enzyme antioxydante dont le rôle est la neutralisation de l'anion superoxyde produit par la mitochondrie. La réaction catalysée par la SOD est une dismutation de l' $O_2^{\circ-}$ en peroxyde d'hydrogène et en oxygène selon la réaction :



La mesure de l'activité enzymatique de la Mn SOD est réalisée sur la matrice mitochondriale selon la méthode de Fridovich et Beauchamps (Beauchamps & Fridovich, 1971). Cette méthode mesure la capacité de l'enzyme à inhiber la réduction du NBT par l'anion superoxyde produit suite à la photoréaction de l'oxygène et de la riboflavine en présence d'un donneur d'électron comme la méthionine selon la réaction suivante :



La production du formazan est suivie par spectrophotométrie à 560 nm. Une unité d'activité de la Mn SOD représente la quantité d'enzymes requise pour empêcher la réduction du NBT de 50%.

$$\% \text{ inhibition} = [(A_C - A_E) / A_C] * 100$$

$$\text{Mn SOD UI/ml} = \% \text{ d'inhibition} * 6.35$$

Où :

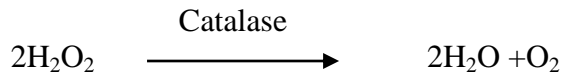
A_C : Absorbance du contrôle

A_E : Absorbance de l'essai

La mesure de l'activité de la SOD est réalisée en préparant un mélange réactionnel contenant le Cyanide de sodium à 2×10^{-5} M, NBT à 1.67×10^{-4} M, EDTA à 6.6×10^{-3} M, la riboflavine à 2×10^{-6} M, et la méthionine à 10^{-2} M (concentrations finales) ensuite 5 μ l de la source enzymatique (matrice mitochondriale ou cytosol) sont ajoutés à 1ml de mélange réactionnel qui est irradié avec une lampe à 15 Watt pendant 10 min. Le contrôle est préparé dans les mêmes conditions sans la source enzymatique. L'absorbance a été mesurée à 560 nm et les valeurs ont été exprimées en UI /mg de protéine.

II.2.6. Mesure de l'activité enzymatique de la Catalase

La détermination de l'activité de la catalase dépend des changements d'absorbance résultant de la décomposition d' H₂O₂ par la catalase.



La disparition de l' H₂O₂ en présence de la source enzymatique est mesurée par spectrophotométrie à 240 nm selon la méthode de Claiborne (Claiborne et Fridovich, 1971). Pour cela dans un volume total de 3 ml, 2.9 ml de tampon phosphate de potassium (0.1M, pH=7.2) contenant du peroxyde d'hydrogène à 0.019 M sont additionnés de 0.1 ml de la source enzymatique diluée au 1/10 dans le tampon de mesure. La lecture de la DO est effectuée à 240 nm chaque minute pendant 2 minutes. Le blanc est préparé dans les mêmes conditions en remplaçant la fraction mitochondriale par 100 µl d'eau distillée. L'activité enzymatique de la catalase est exprimée en unité/mg de protéine.

Une unité de l'activité de la catalase est calculée par la formule:

$$\text{Activité catalase} = \frac{2.303}{T} \log \frac{A1}{A2} \quad (\text{UI / mg protéine})$$

Où :

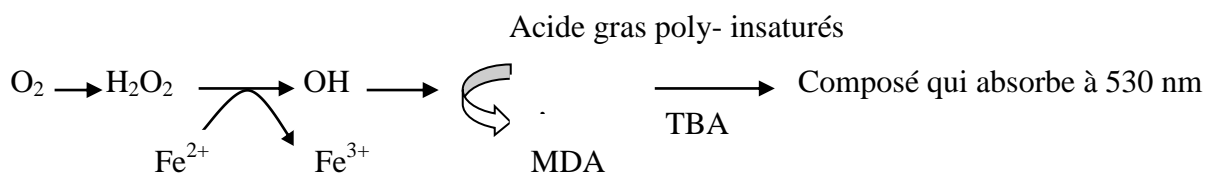
T: l'intervalle de temps en min

A1: absorbance à t = 0

A2: absorption à t =1 min ou 2 min

II.2.7. Mesure de la peroxydation lipidique mitochondriale *in vitro*

Le MDA (Malondialdéhyde) est l'un des produits terminaux formé lors de la peroxydation lipidique. *In vitro*, la peroxydation lipidique des membranes mitochondriales est induite par le FeCl₂/FeCl₃ dont le principe est l'induction de la réaction de Fenton et la formation du radical hydroxyle qui attaque les acides gras poly-insaturés. Le MDA formé en présence de deux molécules de TBA et à chaud, donne un complexe rose qui absorbe à 530 nm, comme le montre la réaction suivante :



Comme cité ci-dessus la suspension mitochondriale servant au dosage du MDA est issue d'un homogénat réalisé dans une solution de KCl à 1.15M. Les mitochondries hépatiques sont suspendues dans le NaCl à 0.9% de façon à obtenir une concentration finale de 0,2 mg/ml. La peroxydation lipidique des membranes de mitochondries hépatiques a été réalisée en utilisant un mélange réactionnel, de volume final 1 ml, contenant 800 µl de la suspension mitochondriale dans 0.9% NaCl, additionnée de 100 µl de la solution oxydante FeCl₂/ FeCl₃ (50µM /50µM). Après une incubation de 30 min dans un bain Marie à 37°C, la réaction est stoppée par l'addition de 1 ml de 3% d'acide trichloracétique et de 1 ml de 1% d'acide thiobarbiturique TBA préparé dans le NaOH à 2N. Le mélange est ensuite chauffé à 100C° pendant 30 min et refroidis dans la glace pendant 5 min. Une centrifugation à 3000 rpm pendant 15 min permet d'avoir un surnageant coloré en rose dont la lecture à 530 nm donne le taux du MDA mitochondrial. Les résultats sont exprimés en µM (MDA)/ mg de protéines membranaires des mitochondries. Le blanc de la réaction est réalisé en présence de la suspension mitochondriale mais en absence de solution oxydante Fe²⁺/Fe³⁺. (Ohkawa *et al.*, 1979).

$$[\text{MDA}] (\mu\text{M}) = \text{DO} / 0.0184$$

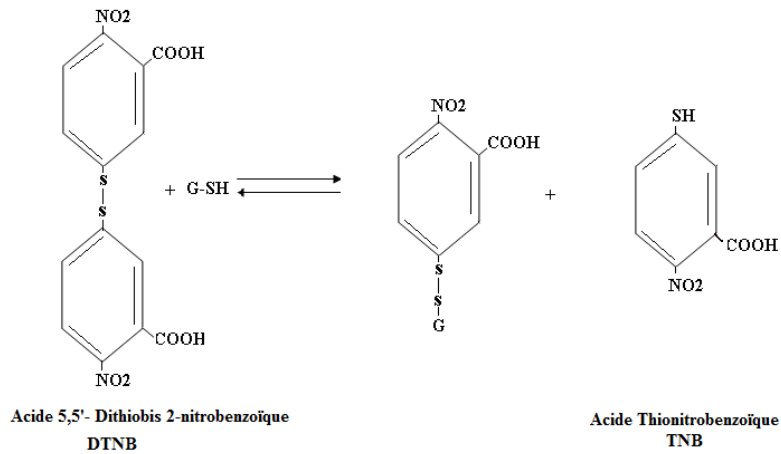
II.2.8. Dosage du glutathion réduit hépatique

Le glutathion est un tripeptide retrouvé dans toutes les cellules animales à des concentrations variables allant de 0.5 à 10 mM et de l'ordre de µM dans le plasma. Il est composé de : l'acide glutamique, la cystéine et la glycine. Le GSH est retrouvé dans la mitochondrie à un taux de 10 à 12 % du glutathion cellulaire c'est pour cela que nous avons dosé le GSH au niveau du cytosol.

Le glutathion est dosé quantitativement dans la fraction cytosolique hépatique par la méthode colorimétrique utilisant le réactif d'Ellman (DTNB).

La réaction non enzymatique consiste à couper la molécule d'Acide 5,5'- DiThioBis 2-NitroBenzoïque (DTNB) par le GSH et en la libération d'acide ThioNitroBenzoïque (TNB) qui, à pH alcalin 8-9, présente une absorbance maximale à 412nm (Ellman, 1959) selon la réaction :





Le dosage du GSH cytosolique est réalisé à partir de l'homogénéisation de 1 g de foie dans 3 volumes de TCA à 5% à l'aide d'un broyeur de DOUNCE. L'homogénat est ensuite centrifugé à 2000 rpm pendant 15 min. 50 µl du surnageant sont dilués dans 10 ml de tampon phosphate (0.1 M, pH 8), 3 ml de ce mélange sont additionnés de 20 µl de DTNB à 0.01 M. La mesure de l'absorbance à 412 nm est réalisée contre un blanc préparé dans les mêmes conditions en utilisant le TCA 5 % après 5 min d'incubation à température ambiante. La concentration en Glutathion réduit est exprimée en mmoles / g de foie utilisé, cette concentration est déduite d'une courbe d'étalonnage réalisée dans les mêmes conditions du dosage en utilisant du GSH (Ellman, 1956).

Deuxième partie

*Etude in vivo et in vitro de l'effet de l'Extrait
Ethanolique de la Propolis algérienne sur la
progression tumorale du mélanome primaire
chez la souris C57Bl6*

La deuxième partie du présent travail de recherche repose sur des études menées en deux étapes.

Une étude *in vitro*, évalue les effets pro-apoptotique et cytotoxique de l'EEP et de la doxorubicine seuls ou combinés sur deux lignées cellulaires de mélanome, la lignée B16F1 (murine) et SKmel (Humaine).

Les résultats obtenus de cette étude nous ont permis d'élucider les mécanismes moléculaires impliqués dans la régression tumorale observée *in vivo* lors de l'étude expérimentale complémentaire effectuée, sur des souris C57BL6 sur lesquelles une tumeur primaire de mélanome a été induite.

III- Etude *in vivo* de l'effet de l'EEP sur la progression tumorale du mélanome primaire chez la souris C57BL6

III.1. Modèle animal de mélanome primaire murin

Nous avons utilisé des souris C57/Bl6 provenant du centre d'élevage Harlan (Gannat, France). Ce sont des souris noires à croissance rapide possédant une bonne homogénéité génétique. Le poids moyen des souris lors des expérimentations est de 18 à 20 g, avec un âge moyen entre 6 et 8 semaines. Les animaux sont hébergés à l'animalerie de la Faculté de Médecine de Reims, dans une pièce à ventilation et température constantes. La boisson et l'alimentation leur sont données *ad libitum* pendant toute la durée des expériences. L'hébergement ainsi que toutes les manipulations sont effectuées en respectant les réglementations et l'éthique pour l'expérimentation animale selon les recommandations du Centre National de la Recherche Scientifique. Les souris ne sont utilisées qu'après une période d'acclimatation d'une semaine depuis leur arrivée à l'animalerie.

III.2. Induction des tumeurs primaires de mélanome murin

Nous avons utilisé une lignée cellulaire de mélanome murin (B16F1). Les cellules conservées congelées dans le milieu de culture adéquat de congélation (DMEM supplémenté de 20% SVF et 10% DMSO), sont mises en suspension dans un volume de 10 mL de milieu DMEM additionné de 20% SVF, 100 UI de pénicilline par mL et 100 µg de streptomycine par mL. Les cellules sont cultivées dans des boîtes de 75 cm² dans un incubateur à 37°C sous atmosphère à 95% en humidité et à 5% (v/v) de CO₂. Après 24h, les cellules adhérentes sont lavées au PBS, le milieu est remplacé par du milieu neuf contenant 10% de SVF. Les cellules sont confluentes au bout de 3 jours, réensemencées par trypsination dans du milieu de culture

DMEM à 10% SVF et 1% d'antibiotique. A 80% de confluence environ les cellules sont récupérées par typsination et centrifugées à 500 rpm pendant 5min, le culot cellulaire est ensuite resuspendu dans du PBS à la densité de 250000 / 100µL qui servira à l'induction tumorale (figure 12). Les souris C57/Bl6 sont réparties en plusieurs lots (n=7). Les tumeurs primaires ont été induites chez tous les animaux. Les animaux sont anesthésiés par injection intrapéritonéale d'un médicament anesthésique l'AVERTINE® (2,2,3-Tribromoethanol, Sigma) à la dose de 400mg/kg. L'effet anesthésiant est observé dans les 2 à 3 min qui suivent l'injection. Les souris anesthésiées sont ensuite rasées sur le flanc gauche et injectées en sous cutané par 100µL de la suspension cellulaire de B16F1 à la densité de 250000 cellules/100µL. La présence d'une tuméfaction visible à la suite de l'injection atteste du caractère sous-cutané de la tumeur. Les animaux sont remis dans les cages et observés (Ramont *et al.*, 2007).

III.3. Traitements des animaux

Au cours de cette étude, nous avons suivi des protocoles de traitements visant à déterminer deux types d'effet thérapeutiques de l'EEP à savoir un effet protecteur de cet extrait seul ou en association avec un anticancéreux de référence (la Doxorubicine) et un effet curatif.

L'extrait de Propolis a été préparé dans le PBS à 0.1% final en Ethanol extemporanément avant chaque traitement. L'EEP est injecté par voie intrapéritonéale à la dose de 10mg/kg Chaque 48 heures selon trois protocoles différents ci-dessous, la doxorubicine est injectée aussi par voie intrapéritonéale à la dose de 4 mg/kg :

III.3.1. Le traitement Préventif par l'EEP seul ou associé à la Doxorubicine

Les lots traités par l'EEP seul en préventif ou en association avec la doxorubicine en traitement curatif :

- Lot 2 traité par l'EEP en préventif, reçoit une dose de 10mg/kg de Propolis chaque 48 heures, une semaine avant l'induction tumorale, ce traitement est poursuivi jusqu'à l'apparition des tumeurs et remplacé par le véhicule jusqu'à la fin de l'étude.
- Les animaux du lot 6 reçoivent le même traitement préventif à l'EEP, il est poursuivi par un traitement à la doxorubicine à la dose de 4mg/kg dès l'apparition de la tumeur en traitement curatif chaque 48 heures jusqu'à la fin de l'étude.

III.3.2. Le traitement Curatif par l'EEP seul ou associé à la Doxorubicine

Les lots traités par l'EEP seul en curatif ou en association avec la doxorubicine :

- Les souris du lot 3 reçoivent L'EEP en traitement curatif seul à la dose de 10mg/kg chaque 48 heures, ce traitement commence dès l'apparition de la tumeur c'est-à-dire au huitième jour après l'induction tumorale et est poursuivi jusqu'à la fin de l'étude.
- Le lot 7 compte les souris recevant le même traitement curatif à l'EEP que le lot 3 mais il est associé à la doxorubicine à la dose de 4mg/kg chaque 48 heures et sont tous les deux poursuivis jusqu'à la fin de l'étude (Schön *et al.*, 2008).

-

III.3.3. Le traitement Préventif- Curatif par l'EEP seul ou associé à la Doxorubicine

- Les souris du lot 4 reçoivent L'EEP en traitement préventif et curatif seul à la dose de 10mg/kg chaque 48 heures, ce traitement commence une semaine avant l'induction de la tumeur et continu jusqu'à la fin de l'étude.
- Les animaux du lot 8 sont traités par l'EEP en préventif et curatif associé à un traitement curatif à la doxorubicine à la dose de 4mg/kg chaque 48 heures dès l'apparition de la tumeur jusqu'à la fin de l'étude.
- Le lot 5 reçoit la doxorubicine seule à la dose de 4mg/kg chaque 48 heures en traitement curatif dès le huitième jour jusqu'à la fin de l'étude (Schön *et al.*, 2008).

La figure 24 et le tableau VIII ci-dessous résumant les protocoles des traitements suivis au cours de cette étude.

Les animaux sont pesés avant chaque traitement ce qui permet d'ajuster les volumes des solutions à administrer en IP.

Ce travail expérimental a été réalisé trois fois, une partie des animaux sont sacrifiés au jour j 21, les autres sont suivies jusqu'à j55. Ceci a permis de recenser les mortalités dans les différents lots, les souris ont reçu les différents traitements jusqu'à ce jour.

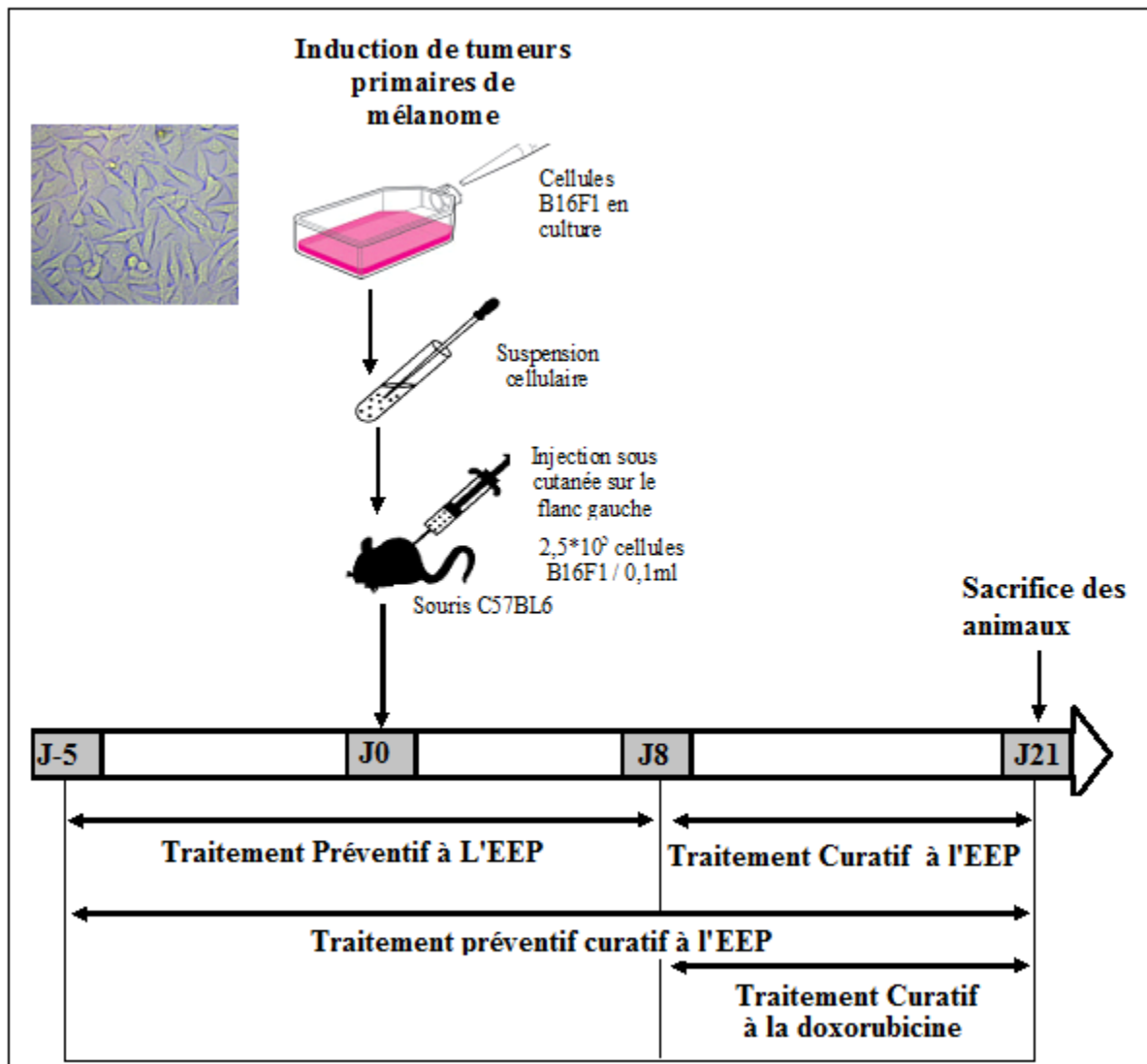


Figure 24: Induction tumorale chez la souris C57BL6 et protocoles de traitement : à J-5 début du traitement préventif à l'EEP (100mg/kg en IP chaque 48h), à J0 injection sous cutanée des cellules B16F1 ($2,5 \cdot 10^5$ cellules), à J8 début du traitement curatif à l'EEP (100mg/kg en IP chaque 48h) et à la doxorubicine (4mg/kg en IP chaque 48h). A J21 sacrifice des animaux.

Tableau VIII : protocoles de traitement des animaux par l'EEP et la doxorubicine

	Lot 1 Contrôle (n=6)	Lot 2 Propolis Préventif (n=6)	Lot 3 Propolis Curatif (n=6)	Lot 4 Propolis Préventif Curatif (n=6)	Lot 5 Doxorubicine Curatif (n=6)	Lot 6 Propolis Préventif + Doxorubicine Curatif (n=6)	Lot 7 Propolis Curatif + Doxorubicine Curatif (n=6)	Lot 8 Propolis Préventif -Curatif + Doxorubicine Curatif (n=6)
J-5	véhicule	EEP10mg/kg	véhicule	EEP10mg/kg	véhicule	EEP10mg/kg	véhicule	EEP10mg/kg
J-3	véhicule	EEP10mg/kg	véhicule	EEP10mg/kg	véhicule	EEP10mg/kg	véhicule	EEP10mg/kg
J-1	véhicule	EEP10mg/kg	véhicule	EEP10mg/kg	véhicule	EEP10mg/kg	véhicule	EEP10mg/kg
J0	Avertine IP							
	Induction de la tumeur primaire (injection SC des cellules B16F1)							
J1	véhicule	EEP10mg/kg	véhicule	EEP10mg/kg	véhicule	EEP10mg/kg	véhicule	EEP10mg/kg
J3	véhicule	EEP10mg/kg	véhicule	EEP10mg/kg	véhicule	EEP10mg/kg	véhicule	EEP10mg/kg
J5	véhicule	EEP10mg/kg	véhicule	EEP10mg/kg	véhicule	EEP10mg/kg	véhicule	EEP10mg/kg
J7	véhicule	EEP10mg/kg	véhicule	EEP10mg/kg	véhicule	EEP10mg/kg	véhicule	EEP10mg/kg
J8	APPARITION DE LA TUMEUR (mesure des volumes tumoraux)							
J9	véhicule	véhicule	EEP10mg/kg	EEP10mg/kg	Doxo 4mg/kg	Doxo 4mg/kg	EEP10mg/kg + Doxo 4mg/kg	EEP10mg/kg + Doxo 4mg/kg
J11	véhicule	véhicule	EEP10mg/kg	EEP10mg/kg	Doxo 4mg/kg	Doxo 4mg/kg	EEP10mg/kg + Doxo 4mg/kg	EEP10mg/kg + Doxo 4mg/kg
J13	véhicule	véhicule	EEP10mg/kg	EEP10mg/kg	Doxo 4mg/kg	Doxo 4mg/kg	EEP10mg/kg + Doxo 4mg/kg	EEP10mg/kg + Doxo 4mg/kg
J15	véhicule	véhicule	EEP10mg/kg	EEP10mg/kg	Doxo 4mg/kg	Doxo 4mg/kg	EEP10mg/kg + Doxo 4mg/kg	EEP10mg/kg + Doxo 4mg/kg
J16	Continuer le traitement chaque 48H avec mesure des poids corporels et volumes tumoraux. Recensement des mortalité.							

III.4. Etude de la progression tumorale de mélanome primaire chez la souris C57Bl6

III.4.1. Mesure du volume tumoral et du SGR

Après induction tumorale par injection sous-cutanée de $2,5 \times 10^5$ cellules B16F1 sur le flanc gauche de chaque souris. La palpation du flanc gauche permet de localiser une tuméfaction brunâtre apparente dès le huitième jour. Le volume tumoral macroscopique est déterminé à partir de deux mesures de diamètre perpendiculaires réalisées chaque 48h au pied à coulisse selon la formule (Mehrara *et al.*, 2007):

$$V = L \times l^2 / 2$$

Où

V : est le volume tumoral donné en mm^3 .

L : est le diamètre le plus grand (mm) (ou la grande longueur).

l : le plus petit diamètre (mm) (ou la petite longueur)

L'appréciation de la croissance tumorale est évaluée par le calcul du taux de croissance spécifique (Specific Growth Rate, SGR) qui reflète le degré de malignité d'une tumeur est calculé selon la formule :

$$\text{SGR} = \ln (V_2/V_1) / (t_2-t_1)$$

Où

V : est le volume de la tumeur (V_1 première mesure et V_2 la seconde avec $V_2 = 2 \times V_1$).

t : est le temps après inoculation des cellules tumorales, correspondant au jour de mesure du volume tumoral (Mehrara *et al.*, 2007).

Mais aussi par le temps de doublement cellulaire (DT ou Doubling Time) estimant le temps imparti pour une la prolifération au double du nombre de cellules au sein de la tumeur primaire.

Après 21 jours (J21), les souris sont en partie sacrifiées par inhalation de CO_2 . Les tumeurs sont excisées pesées et conservées en partie à -80°C pour des études biochimiques, dans le formol pour la réalisation de coupes histologiques et remises en culture pour l'étude du caractère prolifératif et invasif des cellules tumorales.

III.4.2. Evaluation *ex vivo* de l'effet du traitement à l'EEP sur le caractère prolifératif du tissu tumoral

III.4.2.1. Culture *ex vivo* des cellules tumorales et mesure de la prolifération cellulaire

Après excision, une partie des tumeurs est coupée en petits morceaux de 1 mm^3 lavés avec du PBS et homogénéisés à l'aide de la micropipette (p-1000) dans un milieu de culture DMEM supplémenté de 10% SVF et 1% d'antibiotiques, la suspension cellulaire est ensuiteensemencées sur une plaque de 12 puits, les cellules adhérentes sont trypsinées après 48h et remises en culture à 20000 cellules

par puits en triplicata sur une plaque de 12 puits les cellules sont ensuite trypsinées et comptées sur une cellule Malassez (figure 25). L'étude du caractère prolifératif des cellules issues des tumeurs primaires à été réalisé trois fois, les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart type du nombre de cellules comptées à partir des trois études en triplicata.

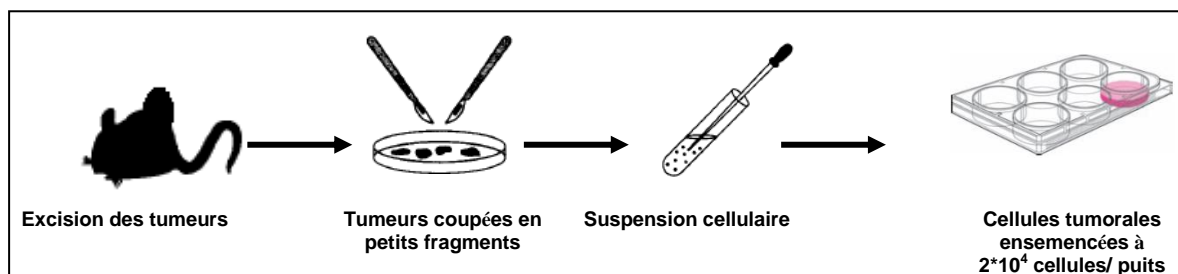


Figure 25: Culture primaires de cellules de mélanome après excision des tumeurs : Après sacrifice des animaux les tumeurs primaires cutanée sont prélevées, une partie de ces tumeurs est dispersée dans du milieu de culture additionné de SVF et d'antibiotiques, la suspension cellulaire est ensuite remise en culture après comptage (20000 cellules /puits) incubée 72 heures puis trypsinée et comptées, l'expérimentation est refaite trois fois en triplicata.

III.4.2.2. Evaluation du taux de prolifération *in situ* du tissu tumoral

L'estimation du taux de prolifération des cellules tumorales est actuellement l'un des paramètres pronostiques les plus importants. Cette estimation est réalisée par les pathologistes à partir des prélèvements tissulaires, biopsies, résections. Deux méthodologies sont disponibles, l'index mitotique et l'index Ki67. La détermination de l'index mitotique se fait par comptage du nombre de mitoses au sein de la prolifération tumorale, à partir d'une coupe tissulaire préparée et colorée selon les techniques conventionnelles, au fort grandissement, dans une surface déterminée. La détermination de l'index Ki67 se fait par une technique immunohistochimique en comptant le pourcentage de cellules tumorales dont le noyau est marqué par un anticorps dirigé contre la protéine nucléolaire reconnue par l'anticorps monoclonal Ki67, actuellement l'anticorps monoclonal MIB-1, le plus utilisé en routine dans la mesure où il peut être utilisé sur des coupes de tissu fixé et inclus en paraffine. La détermination des deux index sur les mêmes coupes est indispensable. Les deux méthodes sont complémentaires car leurs significations sont différentes. L'index mitotique MI permet d'estimer le nombre de cellules effectivement capables de se diviser tandis que l'index Ki67 permet d'évaluer la fraction de cellules tumorales entrées en cycle cellulaire, mais qui ne se diviseront pas forcément. La détermination de l'index mitotique MI ne présente pas de difficultés mais nécessite un échantillon de taille suffisante ce qui est rarement le cas avec une biopsie. L'estimation de l'index Ki67 est plus complexe mais peut s'appliquer à des

échantillons de petite taille. Dans le cas des tumeurs excisées de mélanome primaire le problème de la taille de l'échantillon ne se pose pas.

a. Fixation, inclusion en paraffine des tumeurs excisées :

Les prélèvements de tumeurs excisées ont été fixés dans du formol à 10%, pendant 48 heures et inclus en paraffine. Des coupes sériées de 4 micromètres d'épaisseur de chaque tumeur sont réalisées à l'aide d'un microtome sur des lames en verre, les coupes sont séchées sur plaque chauffante puis à l'étuve à 50°C.

Déparaffinés à l'aide de plusieurs traitements par des solvants organiques, les tissus sont colorés à l'hématoxyline et éosine afin de mettre en évidence les différents types cellulaires de la tumeur.

b. Détermination de l'indice mitotique

Le terme indice ou index mitotique qualifie la proportion de cellules en mitoses dans un tissu à un instant donné. Il peut être estimé par le décompte des images mitotiques par champ observé à fort grossissement. Il est employé en pathologie pour évaluer le taux de prolifération cellulaire de certaines tumeurs malignes. L'indice mitotique est déterminé par l'observation des coupes histologiques sous microscope (Shimadzu) à l'objectif (x40). Le nombre de cellules en mitoses calculé en additionnant les mitoses observés sur 10 champs à un grossissement x400 (méthode de Wilcock) puis rapportées au nombre total des cellules dans les dix champs observés. Toutes les phases de la mitose (métaphase, anaphase, télophase,...) sont prises en considération pour le comptage (Haapasalo, 1989 ; Van Diest, 1992).

c. Analyse immunohistochimique des coupes de tumeurs

Des coupes de 4µm d'épaisseur ont été réalisées sur des lames en verre (superfrost) à partir des blocs de tumeurs incluses en paraffine à l'aide d'un microtome. Les lames ainsi préparées ont été séchées pendant une nuit à 50°C dans une étuve. Les coupes ont ensuite été déparaffinées dans un bain de xylène pendant 20 minutes puis réhydratées dans une série de bains d'éthanol (100°, 95°, 70°) suivie d'un bain à l'eau distillée et enfin lavées au PBS. Les coupes de tumeurs primaires de mélanome sont colorées en brun à cause de la présence de mélanine, ce qui cause un problème de révélation à la fin de l'analyse. Il convient donc de faire un blanchiment des tissus (melanin bleach) qui consiste à incuber les coupes de tumeurs dans un bain de peroxyde d'hydrogène H₂O₂ à 10% pendant 24h à 4°C (Li *et al.*, 1999). Le démasquage des antigènes Ki-67 est réalisé par l'incubation des coupes dans un bain d'une solution de Tris-EDTA à pH9 (10mM Tris Base, 1mM EDTA) à 100°C pendant 30minutes (Hornick et Fletcher, 2002). Le traitement immunohistochimique des coupes de tumeurs commence par l'exposition à l'anticorps primaire Anti-lapin Ki-67 (Millipore,

AB9260) dilué au 1/300 pendant 1 heure à température ambiante après lavage au PBS les coupes sont traitées à l'anticorps secondaire anti-lapin (Dako) couplé à la peroxydase. Il est dilué au 1/200 pendant 30 minutes. La révélation du marquage est réalisée par la DAB (Diaminobenzidine) (Dako) utilisée comme chromogène. La contre coloration des coupes à l'hématoxyline est nécessaire pour mettre en évidence les noyaux. Un contrôle négatif est réalisé avec le PBS remplaçant l'anticorps primaire. Après révélation, une goutte de solution aqueuse de montage est déposée sur chaque lame suivie par le dépôt d'une lamelle.

d. Détermination de l'indice de marquage nucléaire Ki-67

L'indice de marquage nucléaire Ki-67 est défini comme étant le pourcentage de cellules marquées positives sur un nombre total de 500 cellules tumorales. Pour cela, les coupes sont photographiées sous microscope (Paralux) à l'objectif (x40) relié à une caméra vidéo (Paralux MC 3000, 1.3M pixels) le tout connecté à un ordinateur affichant l'image du champ microscopique en temps réel. Dix photos de dix champs successifs différents sont nécessaires pour la détermination de l'indice Ki-67. Le comptage manuel des cellules positives est réalisé grâce au logiciel ImageJ (ImageJ 1.37v, Wayne Rasband, National Institutes for Health, USA). Pour juger de la positivité de l'immunomarquage nucléaire, seuls les marquages intenses et homogènes sont retenus positifs, les marquages nucléaires faibles ou cytoplasmiques sont considérés négatifs. Le nombre de noyaux positifs est rapporté au nombre total de cellules sur dix champs de la même coupe (Smalley *et al.*, 2007), nous avons utilisés trois tumeurs par lot pour déterminer l'indice Ki-67. Les résultats sont exprimés en pourcentage (moyenne \pm écart type) de cellules marquées positives.

III.4.3. Evaluation *ex vivo* de l'effet du traitement à l'EEP sur la densité de la microvascularisation du tissu tumoral.

Une tumeur ne peut pas croître au-delà de 1 à 2 mm sans l'aide d'une riche vascularisation sanguine. Les rapports entre le tissu tumoral proprement dit et sa vascularisation sont donc critiques. Il a été établi que le développement d'une tumeur commence par une phase prévasculaire initiale suivie par l'augmentation du volume de la tumeur 2-3 mm³, soit l'équivalent de 100 à 300 cellules tumorales (Folkman, 1971), c'est la phase de l'angiogenèse tumorale. La formation de nouveaux vaisseaux sanguins traduisant ainsi un phénotype angiogénique tumoral qui peut être contrôlé par des stimulateurs et des inhibiteurs des facteurs de l'angiogenèse, libérer les cellules cancéreuses et les cellules hôtes ou la matrice extracellulaire (Tandle *et al.*, 2004).

Avec cette approche, nous avons voulu savoir si le traitement par l'EEP induisait une inhibition de la néovascularisation intratumorale, pour cela, nous avons utilisé les coupes

histologiques colorées à l'hématoxyline et éosine pour visualiser les vaisseaux angiogéniques. Un comptage de ces vaisseaux a été réalisé sur 10 champs de chaque coupe. Trois coupes de tumeurs issues de trois souris différentes de chaque lot ont servi à cette mesure (Rofstad et Mathiesen, 2010).

III.4.4. Evaluation *in vitro* de l'effet du traitement à l'EEP sur le caractère invasif des cellules tumorales de mélanome primaire

La capacité des cellules tumorales à envahir un tissu ou à migrer est l'une des caractéristiques du phénotype métastatique. Pour élucider les mécanismes par lesquels les cellules tumorales acquièrent un phénotype invasif, des essais *in vitro* ont été développés. Ces derniers miment le processus *in vivo*. Les plus couramment utilisés dans l'essai de l'invasion cellulaire *in vitro* est un essai de la chambre de Boyden modifiée en utilisant une préparation de la matrice de la membrane basale, Matrigel®. Ainsi que des milieux conditionnés comme le facteur chimiotactique. Les résultats obtenus par ce test montrent une forte corrélation entre la capacité des cellules tumorales à envahir *in vitro* et leur comportement invasif *in vivo* qui permet de valider ce test comme une mesure du potentiel invasif (Shaw, 2005)

III.4.4.1. Préparation de la chambre de Boyen modifiée.

L'étude de la capacité invasive des cellules issues des tumeurs de mélanome primaire excisées, a été réalisée en utilisant le modèle *in vitro* de l'invasion cellulaire de la chambre de Boyden modifiée (Transwell®, Greiner Bio-one) qui reproduit la matrice extracellulaire (Matrigel®, Sigma, France) et permet de voir la migration des cellules à travers celle-ci.

La chambre de Boyen modifiée est constituée d'un insert (ThinCert®, avec un diamètre intérieur de 6.5 mm, et le diamètre du pore 8 µm) dont le fond est une membrane PET (PolyEthylene Terephthalate) tapissée de 10 µg (30µg/cm²) de Matrigel® extrait de la tumeur d'Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) de souris, riche en protéines de la matrice extracellulaire. Il est essentiellement constitué de laminine, de collagène IV, de protéoglycannes à héparanne sulfate et d'entactine et permet de reconstituer une pseudo-membrane basale. Le Matrigel® est dilué à la concentration de 50 µg/mL dans une solution de PBS, puis solubilisé une nuit à 4°C sous agitation lente. 200 µL de cette solution sont déposés sur chaque membrane. Les inserts sont ensuite séchés 24 heures, puis réhydratés par 100 µL de milieu.

III.4.4.2. Ensemencement des cellules tumorales dans les chambres de Boyden.

Après excision, une partie des tumeurs est dispersée, remise en suspension et comptées. Cinquante mille cellules en suspension dans le milieu DMEM supplémenté avec 10 % de SVF et 0.2 % de

BSA (m/v) sont ensemencées au fond de l'insert (compartiment supérieur sur le schéma) en contact avec le tapis de Matrigel® (figure 26) dans un volume final de 200 µl.

Le milieu de culture dans le compartiment inférieur est composé de DMEM supplémenté de 10 % SVF et de 2 % BSA (m/v), il est utilisé comme chimio-attractif pour les cellules.

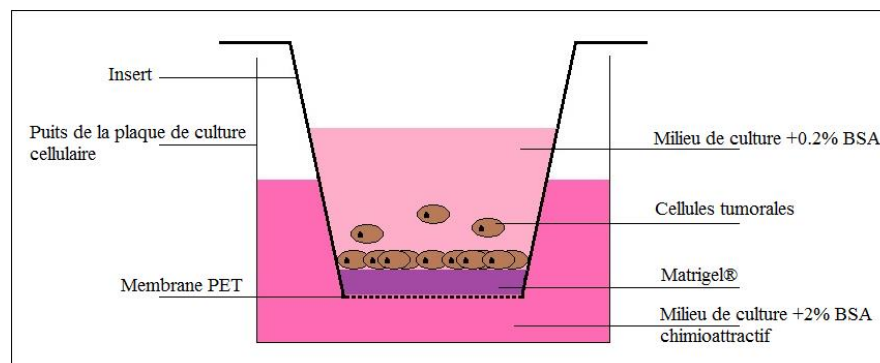


Figure 26: Schéma d'une chambre de Boyden modifiée

Après 24 heures d'incubation à 37°C en présence de 5 % de CO₂, les cellules sont rincées deux fois par de la PBS, fixées au méthanol pendant 20 minutes, puis rincées abondamment à l'eau distillée. Elles sont ensuite colorées à l'aide d'une solution de cristal violet à 0,1 % (m/v) préparé dans le tampon HEPES 0,2 M pH 6,0 (Kueng et coll., 1989) durant 20 minutes. L'excès de colorant est éliminé par plusieurs lavages à l'eau distillée et les inserts sont séchés à l'air. Les cellules de la face supérieure, qui n'ont pas traversé la membrane, sont éliminées par grattage à l'aide de coton tige. La face inférieure ou externe de la membrane de l'insert est photographiée sous microscope optique (Axiovert25, Zeiss) équipé d'un appareil photo numérique. Neuf champs par membrane sont photographiés au grossissement x 80. Le comptage des cellules sur les photographies réalisées a été exécuté dans chacun des champs à l'aide de l'extension Cell Counter du logiciel ImageJ (Rasband, W.S., ImageJ, U.S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>, 1997-2008).

Les cellules comptées correspondent aux cellules qui ont traversé le tapis de Matrigel®, puis la membrane poreuse de la chambre de Boyden ; elles représentent donc les cellules ayant la capacité de migration et d'invasion à travers la matrice extracellulaire la membrane basale, ici reproduite par le Matrigel®. L'expérimentation est réalisée en triplicata pour la même tumeur (issues des souris traitées par l'EEP en préventif, en curatif et en préventif-curatif comparé au souris contrôles). Les tumeurs de trois animaux de chaque lot ont servi à l'étude, les résultats sont présentés en moyennes ± écart type du nombre de cellules invasives pour chaque condition de traitement (Ntayi, 2004)

IV. Etude de l'effet de l'Extrait Ethanolique de Propolis *in vitro* sur les cellules de mélanome

La compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans la régression tumorale de mélanome primaire induit chez la souris C57Bl6 a nécessité de faire des expérimentations *in vitro* sur des cellules en culture.

Ces travaux ont porté sur l'effet de l'EEP sur la viabilité cellulaire, l'évaluation de la cytotoxicité de l'EEP sur deux lignées cellulaires représente l'une des voies permettant d'expliquer les perturbations de la progression tumorale en comparaison avec des traitements conventionnels et largement utilisés dans les protocoles chimiothérapeutiques tel que la doxorubicine.

Nonobstant les phénomènes cytotoxiques, la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans la régression tumorale est indispensable. De ce fait nous nous sommes intéressés à l'évaluation de l'effet pro-apoptotique de l'EEP *in vitro* sur deux lignées cellulaires de mélanome cutané : B16F1, la lignée murine et SkMel 28, la lignée humaine.

IV.1. Etude *in vitro* de l'effet de l'EEP sur la viabilité des cellules cancéreuses de mélanome cutané

IV.1.1. Lignées cellulaires utilisées et culture des cellules

Nous avons utilisé deux lignées cellulaires de mélanome humain (SKmel) et murin (B16F1), Les cellules, conservées congelées dans le milieu de culture adéquat de congélation (DMEM avec 20% SVF et 10% DMSO), sont mises en suspension dans un volume de 10 mL de milieu DMEM contenant 20% SVF 100 UI de pénicilline par mL et 100 µg de streptomycine par mL. Les cellules sont cultivées dans des boîtes de 75 cm² dans un incubateur, à 37°C sous atmosphère humide à 5% (v/v) de CO₂. Après 24h, les cellules adhérentes sont lavées au PBS, et le milieu est remplacé par du milieu neuf contenant 10% de SVF. Les cellules sont confluentes au bout de 2 jours pour les B16F1, 5 jours pour les SKmel et sont alors réensemencées après trypsination.

IV.1.2. Test de viabilité cellulaire

IV.1.2.1. Comptage cellulaire

La stimulation par l'EEP a été étudiée sur les deux lignées cellulaires parallèlement en utilisant différentes concentrations croissante de l'EEP (1, 5 et 10µg/mL avec 0.1% final en Ethanol)

Les cellules SKmel et B16F1ensemencées sur des plaques 12 puits (NUNC) en triplicata à 10⁵ et 5x10⁴ Cellules/puits respectivement, les cellules sont incubées pendant 48h dans le milieu adéquat. A 60% de confluence environ les cellules adhérentes sont lavées deux fois au PBS avant d'être

stimulées avec l'EEP à (1, 5 et 10 μ g/ml 0.1% ethanol), et la doxorubicine à (2, 3 et 4 μ M) seuls ou combinés dans du milieu adéquat sans SVF pendant 24h à 37°C, en atmosphère humide et à 5% V/V de CO₂. A la fin du traitement les cellules adhérentes (vivantes) sont lavées au PBS, trypsinées (100 μ L de trypsine par puits) et comptées à l'aide d'une cellule de malassez.

IV.1.2.2. Test colorimétrique de prolifération cellulaire

C'est un test colorimétrique de cytotoxicité basé sur le clivage des sels de tétrazolium WST-1 (4-[3-(4-Iodophényl)-2-(4-nitrophényl)-2H-5-tétrazolio]-1,3-benzene disulfonate) (Roche) (figure 27) par les déshydrogénases mitochondriales. Sous l'action de ces enzymes on obtient un dérivé formazan de couleur jaune, quantifiable par spectrophotométrie à 420-480 nm.

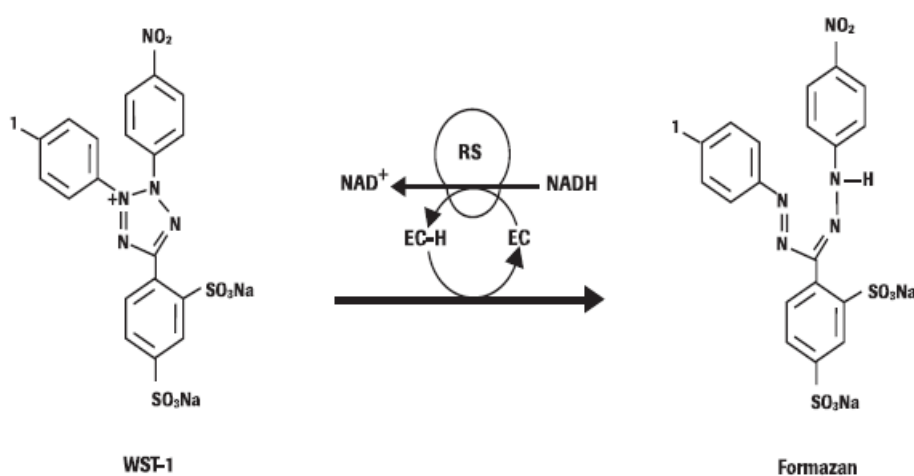


Figure 27 : Clivage du sel de tétrazolium WST-1 (4-[3-(4-Iodophényl)-2-(4-nitrophényl)-2H-5-tétrazolio]-1,3-benzene disulfonate) en formazan. (EC : couplage d'électron, RS : système succinate-tétrazolim-reductase mitochondriale)

Ce test a été réalisé sur les deux lignées cellulaires SKmel et B16F1 ensemencées sur des plaques 12 puits (NUNC) à 10⁵ et 5x10⁴ Cellules/puits respectivement, les cellules sont incubées pendant 24h pour les cellules B16F1 et 48h pour les cellules SkMel28, dans le milieu adéquat. A 60% de confluence environ les cellules adhérentes sont lavées deux fois au PBS avant d'être stimulées avec l'EEP à (1, 5 et 10 μ g/ml), et la doxorubicine à (2, 3 et 4 μ M) seuls ou combinés dans du milieu adéquat sans rouge phénol et sans SVF pendant 24h à 37°C, en atmosphère humide et à 5% V/V de CO₂. A la fin du traitement les cellules sont lavées au PBS et traitées par le réactif WST-1 dilué au 1/10, les cellules sont incubées de 30min à 2h à 37°C, les milieux sont colorés en jaune orange dont l'intensité est proportionnelle à l'activité mitochondriale des cellules en présence. L'absorbance est lue à 450 nm chaque 30min contre un blanc sans cellules pour chaque traitement.

IV.1.3. Etude de l'effet pro-apoptotique de l'Extrait Ethanolique de Propolis

IV.1.3.1. Marquages nucléaires par coloration cytochimique

La technique du marquage nucléaire permet de détecter d'éventuelles modifications morphologiques nucléaires de la cellule en apoptose notamment la formation de corps apoptotiques. Ce phénomène est accompagné d'une condensation et d'une fragmentation de la chromatine. Le marquage au Hoechst 33342 (figure 28) permet de mettre en évidence les cellules de mélanome en apoptose.

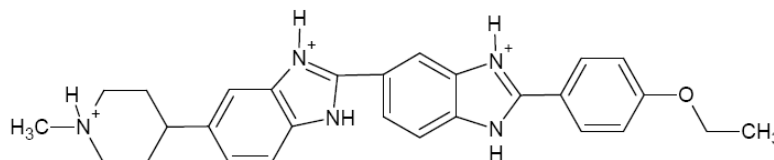


Figure 28: Structure Chimique du Hoechst 33342

Cette molécule est un marqueur fluorescent qui se fixe à l'ADN double brin au niveau de séquences riches en Adénine-Thymine. Son maximum d'excitation se trouve à 340 nm (violet) et son maximum d'émission à 465 nm (bleu).

Le marquage des noyaux a été réalisé sur les deux lignées cellulaires Skmel et B16F1ensemencées sur des plaques 12 puits (NUNC) à 10^5 et 5×10^4 Cellules/puits respectivement, les cellules sont incubées pendant 24h pour les cellules B16F1 et 48h pour les cellules SkMel28 dans le milieu adéquat. A 60% de confluence environ les cellules adhérentes sont lavées deux fois au PBS avant d'être stimulées avec l'EEP à (1, 5 et 10 $\mu\text{g/ml}$), et la doxorubicine à (2, 3 et 4 μM) seuls ou combinés dans du milieu adéquat sans SVF pendant 6 h à 37°C, en atmosphère humide et à 5% V/V de CO_2 .

A la fin de l'incubation, les cellules sont lavées deux fois avec du PBS et traitées avec 200 μL de la solution Hoechst 33342 (invitrogen) (10^{-2}M dans l'eau distillée) diluée au 1/1000^{ème} dans le PBS et incubées 15 min à 37°C. La fluorescence est lue 340 nm/ 465nm longueurs d'onde d'excitation et émission respectivement. Les puits observés sou microscope à fluorescence sont photographiés.

IV.1.3.2. Méthodes d'analyse des protéines

a. Préparation des extraits de protéines cytosoliques et nucléaires

L'investigation des mécanismes moléculaires de l'apoptose nous a incités à choisir les protéines ou effecteurs centraux impliqués dans les voies pro apoptotiques tels que les protéases à cystéine CASPASE et plus spécifiquement le CASPASE-3 dont la localisation est cytosolique et sont substrat PARP de localisation nucléaire. A cet effet nous avons effectués deux extractions protéiques cytosoliques et nucléaires.

Les cellules de mélanome humain et murin sontensemencées dans des flasques à 25cm² et incubées à 37°C, en atmosphère humide et à 5% V/V. A 80% environ de confluence, environ 48h après ensemencement, les cellules sont traitées ou non dans les milieux adéquats sans SVF avec l'EEP à la dose de 10µg/mL et/ou la doxorubicine à 3µM pendant 6 h à 37°C, en atmosphère humide et à 5% V/V de CO₂. A la fin de la stimulation, les milieux sont enlevés et les cellules lavées et grattées dans le PBS froid. Les cellules sont récupérées par centrifugation à 1000xg pendant 5 min à 4°C, le culot est repris dans un volume de 400µL d'un tampon A d'extraction de protéines (HEPES 10mM, KCl 10mM, MgCl₂ 2mM, EDTA 0.1mM et NaF 0.2mM) de l'orthovanadate de sodium (Na₃VO₄) à 0.2mM et de l'inhibiteur de protéase à 1/1000 sont ajouté au tampon avant utilisation. La suspension est incubée dans la glace pendant 20min avant d'y ajouter 25µL de tampon B (10% Nomidet p40). Après agitation vigoureuse les tubes sont centrifugés à 14000xg à 4°C pendant quelques secondes. Le surnageant issu de cette centrifugation représente la fraction de protéines cytosoliques. Les culots sont repris dans un autre tampon (HEPES 50mM, KCl 50mM, NaCl 300mM, EDTA 0.1mM et NaF 0.2mM) de l'orthovanadate Na à 0.2mM et de l'inhibiteur de protéase à 1/1000 sont ajouté au tampon avant utilisation. La suspension est incubée dans la glace pendant 25min avec agitation chaque 5 min. ma centrifugation à 14000xg permet de récupérer les surnageants représentant la fraction de protéines nucléaires.

b. Dosage des protéines selon la méthode de Biuret

Pour le dosage des protéines issues des extractions citées ci-dessus, nous avons utilisé le Kit BC Assay (BC Assay : protein quantitation kit Uptima- Interchim) c'est un dosage colorimétrique dont le principe est basé sur la réduction des ions Cu²⁺ en Cu⁺ par liaison aux protéines. Utilisant l'acide bicinchoninique (BCA) (Smith *et al.*, 1985) qui induit une chélation des ions Cu⁺ avec une grande spécificité pour former un complexe de couleur violette hydrosoluble selon la réaction :

Liaisons peptidiques + Cu^{2+} -----> ([tétradente- Cu^+ complexe]

$\text{OH}^- \text{Cu}^+ + 2 \text{BC Assay}$ [Cu^+ -BC Complexe violet]

La lecture de la DO à 560 nm du complexe final cuivré est effectuée après 30min d'incubation à 37°C.

Les dosages des protéines des différentes fractions cytosoliques et nucléaires pour cela les échantillons sont dilués 5 fois avec l'eau distillée purifiée dans un volume de 25µL auquel sont ajouté 200µL du réactif BC Assay préparé en mélangeant 1v de la solution A avec 50 v de la solution B. Après agitation, la densité optique à 560nm est lue en microplaque 96 puits à l'aide d'un Lecteur de microplaques spectrophotométrique (Multiskan Plus Titertek). La concentration est déterminée par comparaison à une gamme étalon d'albumine sérique bovine (30-1000µg/ml) réalisée dans les mêmes conditions (Smith, 1985)

c. Préparation des échantillons pour l'électrophorèse en conditions dénaturantes (SDS-PAGE).

Les extraits de protéines cytosoliques et nucléaires sont soumis au dosage de protéines par la méthode de Biuret. 20µg de protéines sont préparés dans le tampon échantillon 5X (0,5M Tris pH 6,8, 10% SDS, glycérol, bleu bromophénol) contenant 3% de mercaptoéthanol avant utilisation) la dénaturation est complétée par une incubation à 100°C pendant 3min.

d. Immunodétection des protéines : Electrophorèse en gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) et Western-blot

Les électrophorèses sont réalisées sur un gel de polyacrylamide dont la concentration dépend de la taille des protéines à séparer, en présence de 0.1% de SDS grâce à un appareil d'électrophorèse pour mini-gels (Biorad). Pour mettre en évidence l'expression protéique des CASPASES-3 protéine de poids moléculaire 30KDa, un gel de 1mm d'épaisseur et à 12,5% en acrylamide est préparé. Pour le PARP, protéine qui apparait sous deux bandes de la forme native 116KDa et clivée 85KDa, un gel de séparation à 7,5 % en acrylamide est préparé. Des gels de compression à 4% en acrylamide sont coulés après polymérisation des gels de séparation. Les échantillons préparés à 20µg de protéines cytosoliques et nucléaires dans les conditions dénaturantes sont déposés dans les gels adéquats. La migration des protéines s'effectue sous tension à 100V pendant 15min puis 200V pendant 45min à 4°C dans un tampon de migration (Tris 25 mM pH 8,3 ; SDS 0,1 % (m/v) ; glycine 192 mM). Le transfert des protéines ainsi séparées est réalisé sur une membrane en nitrocellulose (Biorad) sous tension constante de 100V à 4°C pendant 1H30 dans un tampon de transfert (Tris 48 mM pH 8,2,

glycine 39 mM, méthanol 20 % (v/v)). L'efficacité du transfert est vérifiée à l'aide d'une coloration des membranes au rouge ponceau S à 0.2% dilué dans le TCA à 3%. La membrane est ensuite lavée à l'eau distillée pour enlever le surplus du colorant et saturée à température ambiante dans une solution à 5% de Blotto (Biorad) dans du TBS-T (Tris/HCl 50 mM pH 7,5 ; NaCl 150 mM et 0,1% v/v Tween-20) puis elle est incubée pendant une nuit à 4°C avec des anticorps primaires de lapin : anti-CASPASES-3 et anti-PARP (Cell Signalling) les deux préparés selon les instruction du fournisseur au 1/1000 dans solution de TBS à 1% de lait écrémé et 0.1% de tween-20. A la fin de cette incubation les membranes sont lavées 3 fois pendant 5 min avec du TBS-T et incubées pendant 1 heure à température ambiante avec un anticorps secondaire anti-IgG de lapin couplé à la peroxydase de Raifort (1/10000). Les membranes sont encore lavées 3 fois pendant 5 min au TBS-T puis 2 fois 10 min au TBS. Les immunocomplexes sont détectés par chimioluminescence grâce au kit ECL (Biorad) et exposés à un film Kodak BioMax MR. La lecture se fait par prise de photographies numériques des films (Laemmli, 1970).

IV.1.3.2. Les méthodes de biologie moléculaire

a. Extraction des ARN totaux

En respectant les mêmes temps d'incubation, Les cellules de mélanome humain et murin sontensemencées dans des plaques 6 puits (NUNC) à 2×10^5 et 10^5 cellules/ puits respectivement et incubées à 37°C, en atmosphère humide et à 5% V/V. A 80% environ de confluence, environ 48h après ensemencement, les cellules sont traitées ou non dans les milieux adéquats sans SVF avec l'EEP à la dose de 10µg/mL et/ou la doxorubicine à 3µM pendant 6 h. A la fin de l'incubation, les milieux sont retirés et les cellules sont lavées au PBS.

Les ARN totaux sont extraits dans chaque puits par addition du TRIzol® Reagent (Ambion Life Technologies). C'est un réactif prêt à l'emploi, conçu pour isoler l'ARN total de haute qualité (ainsi que les protéines et l'ADN) à partir d'échantillons liquides humain, animal, végétale, levure, bactériens ou d'origine virale en moins d'une heure. TRIzol® est un réactif composé de phénol et de la guanidine isothiocyanate majoritairement, facilitant l'isolement des différentes espèces d'ARN de petite ou grande taille. Ce réactif maintient l'intégrité des ARN grâce à l'inhibition très efficace de l'activité de la RNase durant l'extraction (Chomczynski et Sacchi, 1987).

L'extraction commence par l'addition d'un volume de 500µL de par puits, les cellules sont grattées et récupérées dans des tubes eppendorf (1,5mL Rnase free) la suspension est homogénéisée par des aller/retour à la micropipette puis en vortexant le tube. Pour s'assurer de la bonne qualité des ARN totaux. Après une incubation de 5 min à température ambiante, 200 µl de chloroforme/IAA (24:1 v/v) sont ajoutés. Chaque échantillon est agité vigoureusement deux fois puis incubé 3 min à

température ambiante. Après une centrifugation de 15 min à 12 000 g à 4°C, la phase aqueuse est récupérée. Les étapes à partir de l'ajout de chloroforme sont effectuées une deuxième fois. 500 µl d'isopropanol sont ajoutés à la phase aqueuse récupérée. Les échantillons sont agités doucement par inversion des tubes puis incubés 10 min à température ambiante. Ils sont ensuite centrifugés à 12 000 g pendant 10 min à 4°C. Le surnageant est éliminé et un culot blanc apparaît. Celui-ci est lavé avec 1 ml d'éthanol 75% et subit une centrifugation de 7500 g pendant 5 min à 4°C. Le surnageant est à nouveau éliminé et le culot est séché à température ambiante. Une fois sec, le culot est dissout dans 50 µl d'eau bidistillée (RNase-free). Après l'extraction, une incubation à la DNase I sans ADN (*DNA Free*) pendant 30 min a été effectuée dans le but de dégrader l'ADN contaminant.

b. Vérification de l'intégrité des extraits d'ARN

Pour s'assurer de la bonne qualité des ARN totaux, une aliquote de 1 µl et de 2 µl d'ARN (~100 ng et ~200 ng respectivement) ont été déposées sur gel d'agarose dénaturant pour analyser qualitativement le ratio des bandes des ARNr. Un dosage spectrophotométrique à 260/280 nm a été effectué pour connaître la concentration de l'ARN. En effet, l'absorbance théorique de 1 unité de densité optique d'ARN à 260 nm est de 40 µg/ml d'eau. De plus, le ratio de l'absorbance de 260 nm par rapport à celle de 280 nm doit être inférieur ou égal à 1,8. Si le ratio est supérieur à cette valeur, l'ARN est considéré comme étant contaminé.

La migration des extraits d'ARN dans un gel d'agarose 1% (p/v) permet de vérifier la qualité des ARN et l'absence d'ADN génomique, en présence de bromure d'éthidium (BET). Celui-ci est un agent intercalant des acides nucléiques qui lorsqu'il est exposé à des rayonnements ultraviolets devient fluorescent avec une couleur rouge-orangée. La présence d'ADN génomique est mise en évidence par la présence de bandes ayant peu migré dans le gel.

c. La transcription reverse

Cette méthode consiste en la transformation des ARN extraits en ADN complémentaires (ADNc) avant de faire l'amplification par PCR en point final.

L'une des difficultés de cette méthode concerne la préparation des ARN qui peuvent être très facilement dégradés et contaminés par de l'ADN génomique. La RT est réalisée grâce au kit Invitrogen. Pour cette manipulation, 1 µg d'ARN totaux par échantillon est utilisé. Pour un tube, la réaction de RT est effectuée en utilisant 4 µl de cDNA synthesis buffer 5X, 2 µl de dNTP 5 mM, 0,25 µl d'oligodT, 0,75 µl d'hexamères, 1 µl d'amorces (sens et antisens 10 µM chacun), 0,75 µl de MgCl₂ d'Eurobluetaq® et QSP 24,5 µl d'eau. 0,5 µl de produit de RT est ajouté et sert de matrice de départ.

La réaction est réalisée dans un appareil de type eppendorf Thermocycler®. Les échantillons sont incubés 3 min à 68°C, puis l'enzyme inactivée par incubation à 95°C pendant 5 min. Les échantillons sont conservés à -20°C.

d. PCR de vérification de la RT

En 1983, Kary Mullis inventa un procédé qu'il appela PCR, permettant de résoudre un problème en génétique : copier et amplifier des brins d'ADN (Mullis et coll., 1986). PCR est l'abréviation de l'expression anglaise *Polymerase Chain Reaction* ou réaction en chaîne par polymérase (le terme français équivalent, Amplification en Chaîne par Polymérisation ou ACP, est rarement utilisé).

La PCR utilise les molécules biologiques que la nature utilise pour copier de l'ADN : deux amorces qui balisent le début et la fin de la séquence d'ADN à copier ; une enzyme appelée polymérase qui parcourt la séquence d'ADN, lisant le code génétique et fabriquant une copie ; et les acides nucléiques nécessaires à la polymérase. La réaction se fait en différentes étapes : 1) Dénaturation de l'ADN cible ; 2) Hybridation des amorces ; 3) Extension des amorces. Ces 3 étapes se font à des températures différentes. La PCR consiste à répéter ce cycle de 3 étapes thermiques dans un même tube afin d'obtenir un grand nombre de copies d'ADN.

Afin de vérifier que la RT a été capable de produire les ADNc, nous effectuons une PCR avec des amorces GAPDH. La PCR est réalisée grâce au kit *Eurobluetaq ADN Polymerase* (Eurobio, Les Ulis, France). Pour un tube, la PCR est effectuée en utilisant 2,5 µl de tampon 10X, 0,75 µl de MgCl₂ 50 mM, 0,5 µl de dNTP 10 mM, 1 µl d'amorces (sens et antisens 10 µM chacun avec les séquences citées ci-dessous), 0,1 µl Taq polymérase et QSP 24,5 µl d'eau. 0,5 µl de produit de RT est ajouté et sert de matrice de départ.

Tableau IX : séquences des amorces utilisées.

Gène étudié	Séquence des amorces
GAPDH	sens : 5'-ACG GAT TTG GTC GTA TTG GG-3' antisens : 5'-TGA TTT TGG AGG GAT CTC GC-3'
<i>bax</i>	sens : 5'-GTT TCA TCC AGG ATC GAG CAG-3' antisens : 5'-CAT CTT CTT CCA GAT GGT GA-3'
<i>bcl-2</i>	sens : 5'-CCT GTG GAT GAC TGA GTA CC-3' antisens : 5'-GAG ACA GCC AGG AGA AAT CA-3'
<i>bcl-xL</i>	sens : 5'-TCC TTG TCT ACG CTT TCC ACG-3' antisens : 5'-GGT CGC ATT GTG GCC TTT-3'

La réaction, réalisée dans un appareil de type Eppendorf Mastercycler®, est débutée par une activation de la *Taq* polymérase (de *Thermus aquaticus* YT1, Invitrogen) de 3 min à 94°C suivi de 30 cycles définis comme suit : 1 min à 94°C (dénaturation), 1 min à 60°C (hybridation amorces), 1 min à 72°C (élongation). La réaction est terminée par une étape à 72°C de 10 min. Les produits de

réaction sont observés en présence de BET sous UV après séparation sur un gel d'agarose à 1,8% (p/v). Les gels sont ensuite photographiés et analysés à l'aide de l'appareil d'analyse d'images Vilber Lourmat.

V. Etude Statistique

Toutes les expériences ont été réalisées en triplicata et les résultats sont présentés sous la forme moyenne \pm écart-type.

Les tests statistiques ont été réalisés en utilisant le logiciel Kyplot (version 2.0 beta 13)

Les tests suivants ont été utilisés pour l'analyse statistique :

- Test paramétrique T de Student avec séries appariées (méthode des couples)
- Test non paramétrique de Mann et Whitney pour les résultats obtenus *in vivo*
- les courbes de survie des animaux de Kaplan Meier sont réalisées avec le logiciel Graph Pad Prism, les comparaisons entre les différentes conditions sont réalisées avec les tests Log-rank (Mantel-cox) et Gehan –Breslow-Wilcoxon .

Les niveaux de probabilité sont présentés comme suit :

NS = non significatif

* = $p < 0,05$

** = $p < 0,01$

*** = $p < 0,001$

1 - DISCUSSIONS

I. Activité Antioxydante de l'Extrait Ethanolique de Propolis (EEP) contre le Stress

Oxydatif induit par la Doxorubicine

Ce travail a été réalisé en deux parties, la première étude concerne l'activité antioxydante de l'extrait éthanolique de Propolis *in vitro* et *in vivo* contre le stress oxydatif induit par la doxorubicine et la vinblastine sur des rats wistar albinos. Les deux agents anticancéreux ont des propriétés pro-oxydantes.

I.1. Effet anti-radicalaire ou piègeur des ROS *in vitro* par l'EEP

Pour évaluer le pouvoir antioxydant de l'extrait éthanolique de Propolis, nous avons mesuré sa capacité à piéger les radicaux libres *in vitro* en utilisant la méthode au DPPH où le pourcentage de réduction de ce radical libre stable par l'EEP a été déterminé. La figure 29 ci-dessous montre l'effet scavenger de l'EEP utilisé à la concentration finale de 10^{-4} g/ml comparé à un flavonoïde de référence la quercétine, et à la vitamine E.

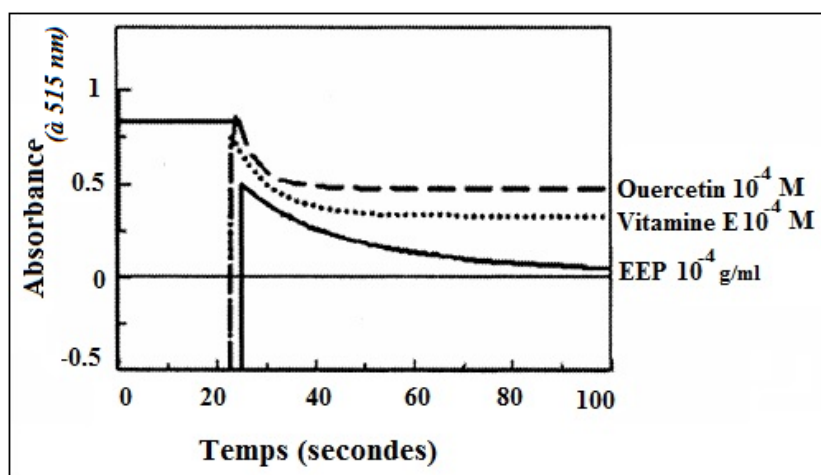


Figure 29 : Effet Scavenger de l'EEP *in vitro* : La réduction du radical libre DPPH° est évaluée en présence de l'EEP à la concentration de 10^{-4} g/ml en comparaison avec la quercétine et la vitamine E utilisées à 10^{-4} M. Les mesures de l'absorbance à 515nm sont réalisées chaque 30 secondes pendant 2 minutes

En présence des piègeurs de radicaux libres, le DPPH (2,2 diphényl 1 picryl hydrazyl) de couleur violette se réduit en 2,2 Diphényl 1 picryl hydrazine de couleur jaune (Maataoui *et al.*, 2006).

A partir des courbes d'absorbance à 515 nm de la solution de DPPH° (figure 29 nous pouvons constater que l'extrait EEP présente une diminution importante au bout des 2 minutes de l'analyse s'approchant même du 0, représentant ainsi un meilleur effet anti-radicalaire comparé aux deux produits quercétine et vitamine E utilisés comme référence dont l'absorbance se stabilise à environ 0.35 et 0.5 respectivement après deux minutes.

Une analyse plus exhaustive de l'effet de l'EEP sur la capacité de piégeage des radicaux libres toujours avec la même méthode au DPPH° a été effectuée en présence de différentes concentrations croissantes de l'EEP comparé à la vitamine E ayant donnée le meilleur effet dans l'analyse précédente, utilisée aussi à différentes concentrations, la figure 30 ci-contre représente le pourcentage de réduction du radical DPPH° :

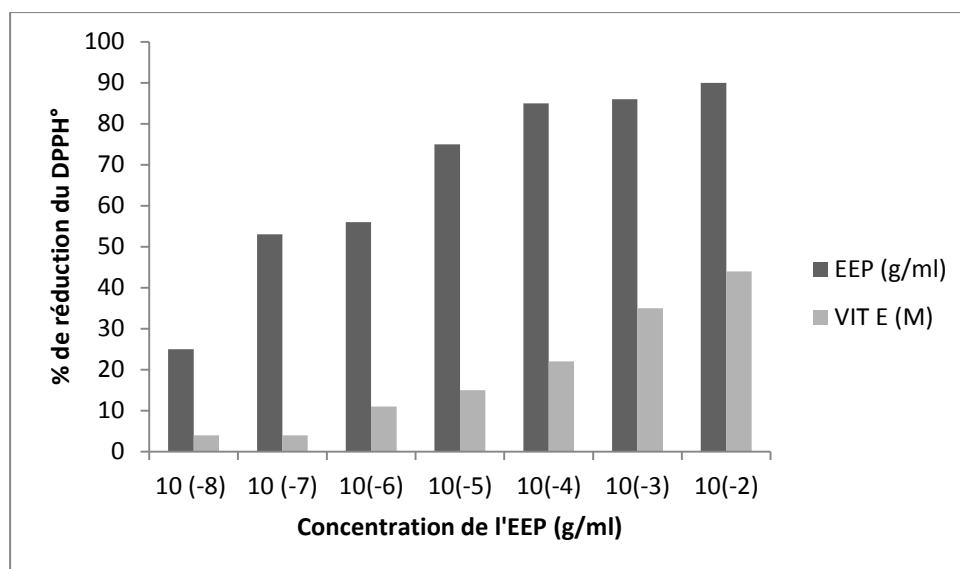


Figure 30 : Effet anti-radicalaire de l'EEP. Le pourcentage de réduction du radical DPPH° en présence de l'EEP (10^{-8} à 10^{-2} g/ml) en comparaison à la Vitamine E (10^{-8} à 10^{-2} M)

Les résultats exprimés en pourcentage de l'activité anti-radicalaire de L'EEP et de la vitamine E utilisés à différentes concentrations. La figure 30 expose une activité anti-oxydante dose dépendante des deux produits avec un meilleur effet pour l'EEP.

I.2. Effet de l'EEP sur la production de l'anion superoxyde ($O_2^{\circ-}$)

La production mitochondriale des radicaux libres oxygénés a été mise en évidence pour l'anion superoxyde $O_2^{\circ-}$, ce radical nocif est un marqueur des fonctions physiologiques de la mitochondrie dont l'altération présente une surproduction. L'augmentation de la génération de l' $O_2^{\circ-}$ est observée lors du stress oxydatif inhérent à plusieurs facteurs exogènes. L'activité anti-oxydante de l'EEP est mise en évidence sur des mitochondries isolées à partir de tissus hépatique et cardiaque.

I.2.1. Effet de l'EEP sur la production de l'anion superoxyde *in vitro*

La mesure de la production de l'anion superoxyde a été effectuée *in vitro* en utilisant des mitochondries isolées de cœurs issus d'animaux sains.

La figure 31 ci-dessous, représente le pourcentage d'inhibition de la production de l'anion superoxyde par l'extrait éthanolique de Propolis.

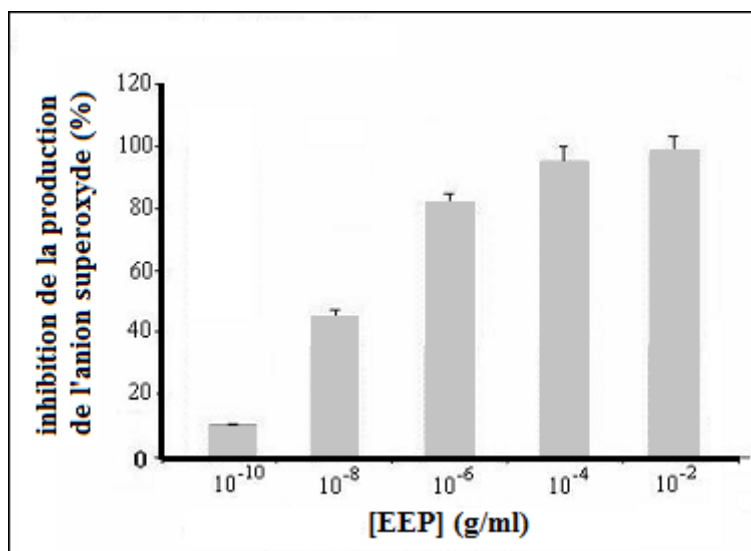


Figure 31 : Inhibition de la production de l'anion superoxyde mitochondrial par l'Extrait Ethanolique de Propolis *in vitro* : l'EEP est utilisé à différentes concentrations (10^{-10} à 10^{-2} g/ml) est testé sur des mitochondries de cœur isolées de rats sains en présence de la doxorubicine à $1\mu\text{M}$ dans un tampon respirant décrit dans matériel et méthodes.

L'EEP inhibe la génération de l'anion superoxyde *in vitro* de manière dose dépendante par des mitochondries cardiaques incubées en présence de la doxorubicine à $1\mu\text{M}$ à partir de faibles concentrations entre 10^{-8} et 10^{-4} g/ml induisant ainsi une diminution de plus de 50% à la dose de 10^{-8} g/ml et entre 85 et 95% à la dose de 10^{-6} et 10^{-4} g/ml respectivement.

I.2.2. Effet de l'EEP sur la production de l'anion superoxyde ($\text{O}_2^{\circ-}$) par les mitochondries hépatocytaires *in vivo*

L'analyse de la production mitochondriale de l'anion superoxyde est réalisée *in vivo* sur des rats wistar prétraités ou non par l'EEP à la dose de 100mg/kg suivie par une dose unique de la doxorubicine à 20mg/kg seule (A) ou combinée à la vinblastine à 2mg/kg (B). Le dosage spectrophotométrique de l'anion superoxyde est effectué sur une suspension de mitochondries hépatiques isolées après sacrifice des animaux. La figure 32 ci-dessous, représente les courbes de la production de l'anion superoxyde en fonction du temps.

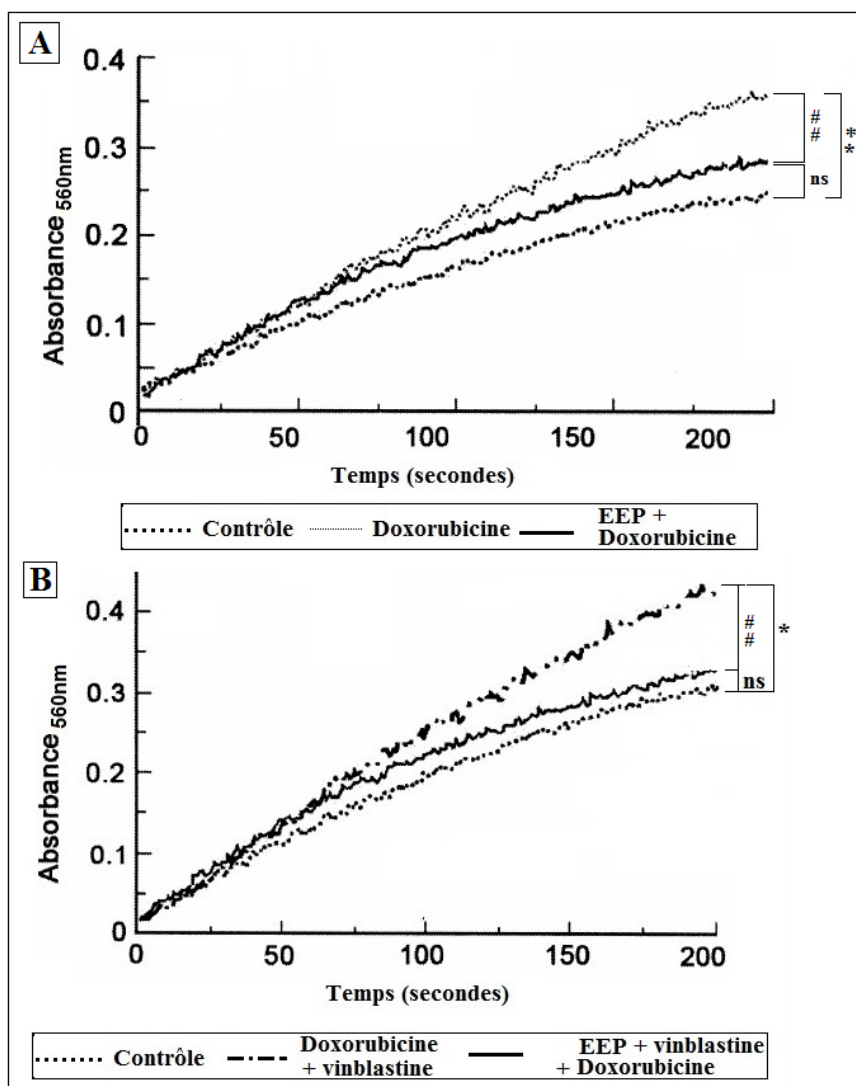


Figure 32 : Effet de l'EEP sur la production mitochondriale de l'anion superoxyde *in vivo* : la mesure de la production de l'anion superoxyde est réalisée par spectrophotométrie sur des suspensions de mitochondries isolées du tissu cardiaque (A) ou hépatique (B) des rats wistar traités par de la doxorubicine (20mg/kg) combiné à la vinblastine (2mg/kg) ou associée à un prétraitement à l'EEP (100 mg/kg), le contrôle reçoit le véhicule. (*) Comparaison avec les animaux témoins, (#) comparaison avec les animaux traités par la doxorubicine. Test de student : (**) ou (##) désigne un effet très significatif ($P < 0.01$).

In vivo, le prétraitement par l'EEP (100 mg/kg) induit une inhibition de la production de l'anion superoxyde par les mitochondries hépatiques (figure 32 A) et cardiaques (figure 32 B) statistiquement significative ($p < 0.01$) comparé au traitement pro oxydant et cardiotoxique à la doxorubicine seule ou combinée à la vinblastine.

I.3. Effet de l'EEP sur le gonflement (mitochondrial swelling) et la respiration mitochondriaux *in vitro*

La consommation d'oxygène sur les mitochondries isolées est mesurée par oxygraphie. L'état 2 est obtenu par l'ajout de l'EEP. L'état 3 représente la consommation d'oxygène en condition phosphorylante et est obtenu par l'ajout d'ADP. L'état 4 représente la consommation d'oxygène en condition non-phosphorylante et est obtenu par l'ajout d'un inhibiteur de l'ATP synthase. L'exploration des fonctions physiologiques mitochondriales au cours du traitement par l'EEP est représentée par la figure 33, qui montre la mesure de la respiration mitochondriale d'une part par le rapport de contrôle respiratoire ou RCR (Respiratory Control Ratio) (V3/V4) qui est obtenu en divisant la consommation d'oxygène à l'état 3 par la consommation d'oxygène à l'état 4. Le RCR est un reflet du couplage de la phosphorylation oxydative. D'autre part, du gonflement mitochondrial (P/O) au cours des différentes situations thérapeutiques.

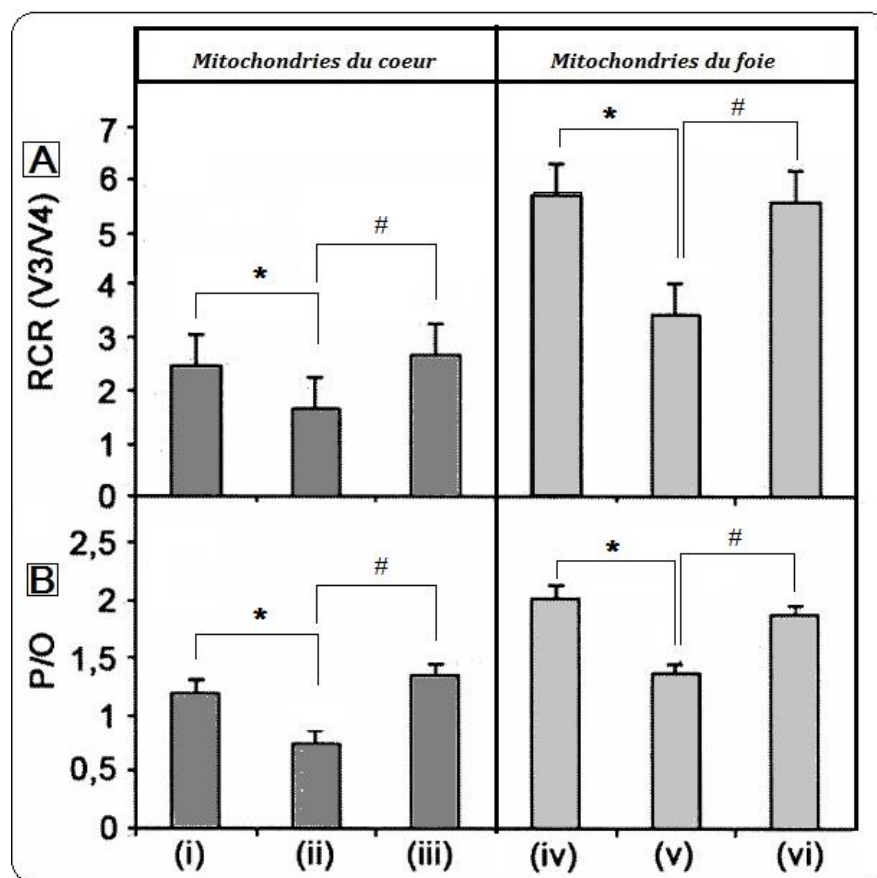


Figure 33 : A- Respiration mitochondriale. B- Gonflement mitochondrial :
 (i): Contrôle cœur, (ii) : Doxorubicine 20mg/kg, (iii) : EEP (100mg/kg)+ Doxorubicine (20mg/kg)
 (iv) : Contrôle Foie, (v) : Doxorubicine 20mg/kg+vinblastine(2mg/kg), (vi) : EEP(100mg/kg+
 Doxorubicine (20mg/kg) + Vinblastine(2mg/kg).
 (*) Comparaison avec les animaux témoins, (#) comparaison avec les animaux traités par la
 doxorubicine. Test T de Student : (**) ou (##) désigne un effet très significatif ($P < 0.01$).

La figure 19 montre qu'en présence de la doxorubicine seule ou associée à la vinblastine une augmentation dans la consommation de l'oxygène (état3) et une inhibition de l'état 4 sont observés, ce qui induit une diminution du ratio ($RCR = V3/V4$). Par contre le prétraitement par l'EEP a contrecarré l'effet des médicaments anticancéreux et a restauré les fonctions physiologiques mitochondriales notamment la respiration mitochondriale par augmentation du RCR et le gonflement.

I.4.Effet de l'EEP sur les activités enzymatiques de la Superoxyde Dismutase mitochondriale (Mn SOD) et de la catalase.

La modification des activités enzymatiques mitochondriales (MnSOD et Catalase) est inhérente à l'effet d'agents pro-oxydants tels que les médicaments anticancéreux (doxorubicine et vinblastine), ces derniers induisent une diminution des activités enzymatique au niveau du foie (figure 34 A) comparé au contrôle.

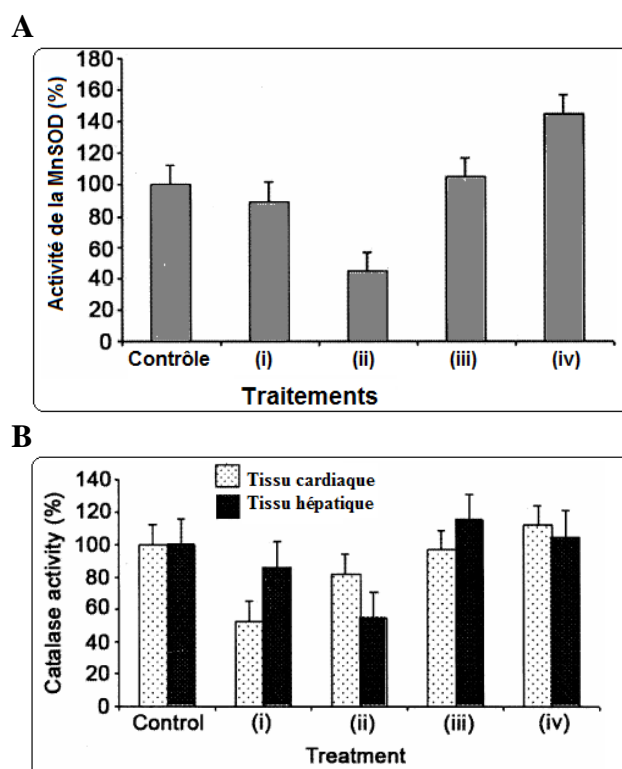


Figure 34 : Effet de la doxorubicine (20mg/kg) associée à la vinblastine (2mg/ml) et l'EEP (100mg/ml) associé à la doxorubicine (20mg/ml) et à la vinblastine (2mg/ml) sur les activités enzymatiques de la MnSOD hépatique (A) et la catalase (B) mitochondriale hépatique et cardiaque. (i)Doxorubicine, (ii) Doxorubicine+vinblastine, (iii) EEP+doxorubicine, (iv) EEP+doxorubicine +vinblastine.

Le prétraitement par l'EEP suivi par les traitements par la doxorubicine seule ou en association à la vinblastine induit une restauration des activités de la catalase et de la MnSOD mitochondriales au niveau du foie et du cœur pour la catalase.

I.5. Effet de l'EEP sur la peroxydation lipidique

le stress oxydant est impliqué dans différentes situations pathologiques. La difficulté est de choisir tel ou tel marqueur pour apprécier son importance *in vivo* car on se heurte à des problèmes analytiques de spécificité et de sensibilité. Les lipides oxydés, formés au cours de la peroxydation lipidique, illustrent bien cette problématique. Parmi ces marqueurs on peut citer des produits primaires comme les hydroperoxydes, ou des produits secondaires terminaux comme le malondialdéhyde (MDA), le 4-hydroxynonéal (4-HNE) et les isoprostanes. Ils sont tous mesurables dans les liquides biologiques et les méthodes analytiques utilisées sont parfois complexes et nécessitent au préalable des phases d'extraction et de purification. Les F₂-isoprostanes sont certainement les marqueurs les plus spécifiques de la peroxydation lipidique mais aussi les plus difficiles à doser. De nombreuses techniques de dosages ont été développées au cours de ces dernières années.

I.5.1. Effet de l'EEP sur la peroxydation lipidique mitochondriale du foie *in vivo*

La production de peroxydes lipidiques, représentés par le MDA, par la cellule sous l'effet d'agents pro-oxydants tels que la doxorubicine a été évalué chez les animaux au cours des différents traitements, la figure 35 ci-dessous montre l'effet de l'EEP sur la peroxydation lipidique mitochondriale et membranaire au niveau de la cellule hépatique *in vivo* par mesure du MDA mitochondrial et cytosolique du foie

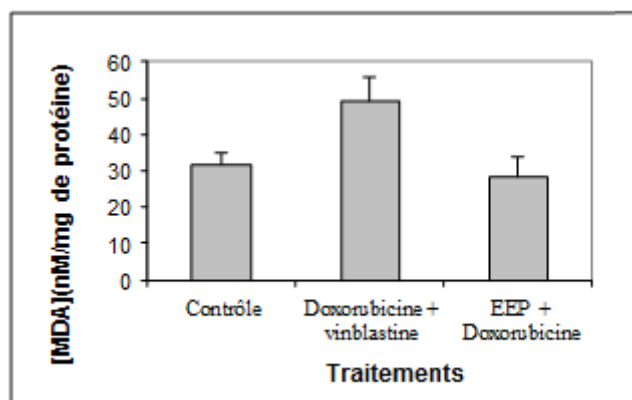


Figure 35 : Taux du MDA mitochondrial au niveau du foie en présence ou non des différents traitements : doxorubicine (20mg/kg) associée à la vinblastine (2mg/ml) ou un prétraitement par l'EEP (100mg/ml) associé à la doxorubicine (20mg/ml) et à la vinblastine (2mg/ml).

I.5.2. Effet de l'EEP sur la peroxydation lipidique cytosolique du foie *in vivo*

Après sacrifice des animaux les mitochondries sont isolées des rats traités L'étude de l'effet de l'EEP sur la peroxydation lipidique mitochondriale et membranaire *in vitro* induit une inhibition dose dépendante qui atteint 90% lorsqu'il est utilisé à 10⁻⁶g/ml (figure 36).

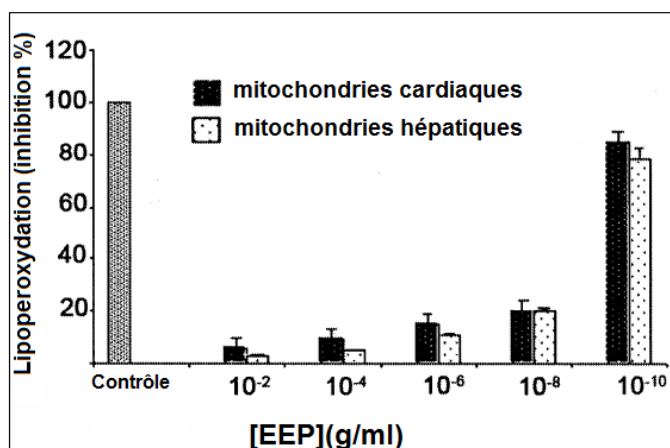


Figure 36 : Variation des taux de MDA mitochondrial (nM/mg de protéines) exprimés en % d'inhibition du contrôle en présence de différentes concentrations de l'EEP (10⁻¹⁰ à 10⁻² mg/ml)

I.6. Effet de l'EEP sur la réserve en GSH cytosolique

Le taux de glutathion réduit a été évalué dans la fraction mitochondriale hépatique au cours de différentes situations thérapeutiques. La figure 37 montre l'effet du prétraitement par l'EEP suivie par le traitement par les médicaments anticancéreux.

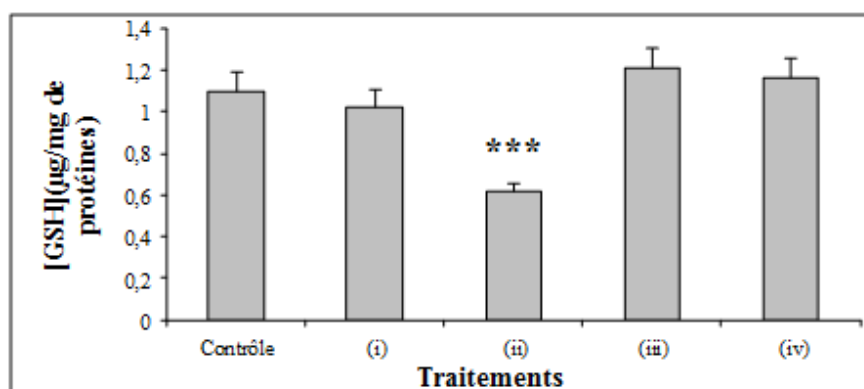


Figure 37 : Effet de la doxorubicine (20mg/kg) associée à la vinblastine (2mg/ml) et l'EEP (100mg/ml) associé à la doxorubicine (20mg/ml) et à la vinblastine (2mg/ml) sur le taux de GSH mitochondrial hépatique. (i) Doxorubicine, (ii) Doxorubicine + vinblastine, (iii)EEP+Doxorubicine (iv)EEP+doxorubicine+vinblastine.

Le traitement *in vivo* par les agents anticancéreux (doxorubicine seule ou associée à la vinblastine) induit une diminution hautement significative ($p < 0,001$) de près de 60% des taux de GSH cellulaires. En revanche, le prétraitement des animaux par l'EEP induit une augmentation notable du taux de GSH *in vivo* chez les animaux recevant l'EEP. La restauration de la réserve en GSH cellulaire est observée chez les animaux ayant reçu le traitement combiné (EEP+Doxorubicine+vinblastine).

II-Etude *in vivo* et *in vitro* des effets de la propolis sur la progression tumorale du mélanome primaire chez la souris C57BL6

Dans cette partie, nous nous sommes intéressés aux activités biologiques de l'Extrait Ethanolique de Propolis *in vivo* sur un modèle murin (souris C57BL6) cancéreux (Mélanome) encore non décrites à ce jour. Nous avons étudié les effets de l'EEP sur la progression tumorale en traitement préventif suivi par un traitement curatif à la doxorubicine ou en traitement curatif seul ou associé à la doxorubicine utilisé comme traitement de référence en clinique. Nous avons tenté d'élucider sur le plan moléculaire et cellulaire l'effet de l'EEP seul ou combiné à la doxorubicine par une étude *in vitro* sur des lignées cellulaires de mélanome murin et humain

II.1. Effet du traitement par l'EEP seul ou combiné à la doxorubicine sur la progression tumorale de mélanomes primaires *in vivo*

Nous avons étudié la croissance tumorale des cellules de mélanome B16F1, *in vivo*, chez la souris. A cet effet, nous avons utilisé le modèle de souris C57/BL6 syngéniques des cellules B16F1. L'injection, par voie sous-cutanée, de $2,5 \cdot 10^5$ cellules au jour J0 entraîne l'apparition d'une tumeur localisée dès le 8^{ème} jour suivant l'injection. La taille de la tumeur est alors mesurée tous les 2 jours. Les animaux sont euthanasiés le 21^{ème} jour suivant l'induction tumorale. Chaque groupe est composé de 7 souris. Dans ce modèle, différents protocoles de traitements sont testés.

La présentation des résultats de cette étude s'oriente selon deux volets, le premier concernant l'effet du traitement par l'EEP seul sur la progression tumorale de mélanome. Le deuxième volet traite les données sur l'effet du traitement par l'EEP en association avec la doxorubicine.

II.1.1. Effet du traitement par L'EEP seul sur le volume tumoral de mélanome primaire chez la souris C57BL6

Le traitement par l'EEP seul, selon le protocole de traitement, a conduit à des différences dans la progression tumorale par rapport au groupe contrôle. En effet, le traitement préventif par l'EEP (J-5 à J8) ou curatif (J8 à J21) ont conduit à une inhibition de la croissance tumorale ($p < 0.05$) cette diminution est observée dès le 12^{ème} jour après induction tumorale (Figure 24) et elle est de près de 70% par rapport au groupe contrôle. En revanche, lorsque les souris sont traitées en continu, c'est-à-dire en préventif-curatif (de J-5 à J21) nous n'avons observé aucun effet significatif sur la croissance tumorale (Figure 38.A). Le taux de croissance spécifique (SGR) varie peut en cas de traitements par la Propolis en préventive ou continu idem pour temps de dédoublement cellulaire (Doubling Time). Par contre le traitement curatif à l'EEP a conduit à une diminution significative ($p < 0.05$) du taux de croissance de plus de 60% contre 16 et 36% les traitements préventif et continu à l'EEP respectivement et une augmentation significative ($p < 0.05$) du DT qui est de plus de 6 jours représentant près du double du temps de dédoublement (3.7 jours) pour le traitement continu et du triple du DT (2.5 jours) pour le traitement préventif.

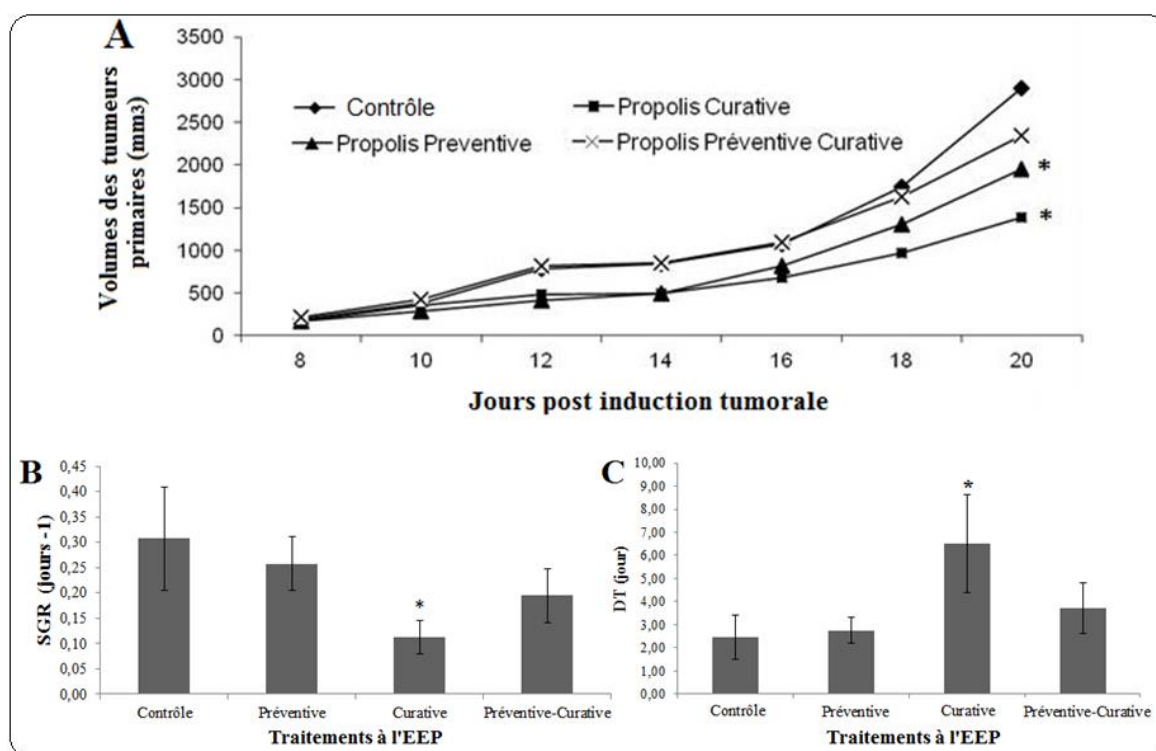


Figure 38 : Effet de l'EEP en traitement préventif seul sur la croissance tumorale de mélanome primaire in vivo : $2,5 \cdot 10^5$ cellules B16F1 sont injectées au jour J0 aux souris C57/Bl6, par voie sous-cutanée, l'EEP est administré en injection intra péritonéale de 10mg/kg chaque 48h de J-5 à J8 pour le traitement préventif, de j8 0 J 21 pour le traitement curatif et de J-5 à J21 pour le traitement préventif curatif. A) La mesure des volumes tumoraux est réalisée chaque 48h au pied à coulisse selon la formule donnée en matériel et méthodes. B) Taux de croissance (SGR : Specific Growth Rate).C) DT(Doubling Time) selon les formules données en matériel et méthodes. * : $p < 0.05$ comparaison au contrôle avec le test de Student.

En outre les mesures de volumes tumoraux au pied de coulisse les tumeurs excisées, après sacrifice des animaux, ont été pesées. La figure 39 montre les différences de poids tumoraux entre les lots de souris traitées ou non par l'EEP.

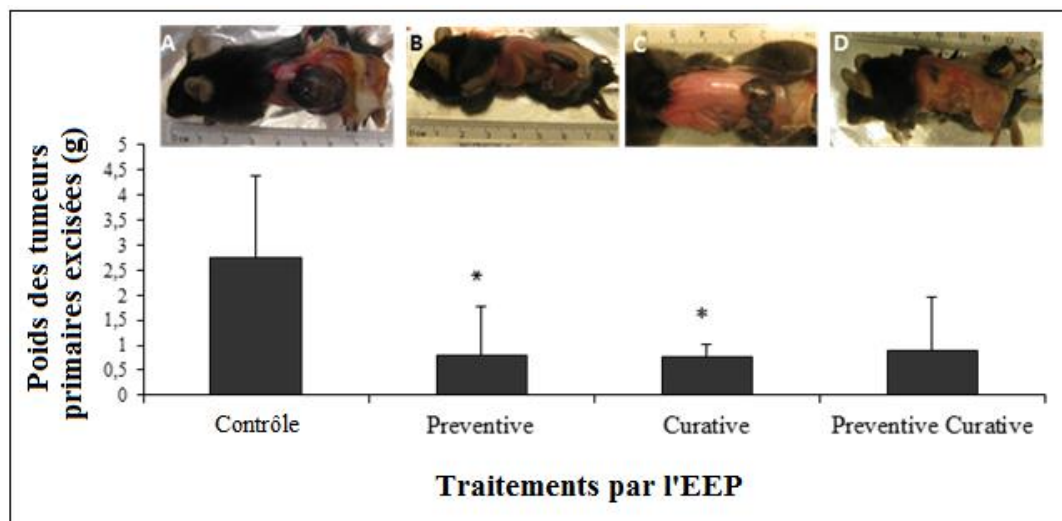


Figure 39 : Poids des tumeurs excisées après sacrifice à J21 des souris C57BL6 :

Nous avons observé une diminution significative des poids des tumeurs dans les lots de souris traitées par l'EEP en traitement préventif ou curatif ($p < 0,05$), ce qui est en accord avec les résultats obtenus pour les volumes tumoraux, le traitement continu n'induit pas de réduction significative dans les poids des tumeurs.

II.1.2. Effet de l'EEP sur la prolifération des cellules tumorale *ex vivo*

La prolifération cellulaire a été mise en évidence au sein des tumeurs primaires par l'appréciation de l'index mitotique et de l'index Ki-67

II.1.2.1. Index mitotique

Les tumeurs excisées ont servi de support pour l'étude *ex vivo* du caractère prolifératif des cellules tumorales. Pour cela, une partie des tumeurs a été fixée dans le formol et soumise à des coupes histologiques, colorées à l'hématoxyline et l'éosine, ces coupes ont été utilisées pour la détermination de l'index mitotique.

La figure 40-A montre des coupes de tumeurs issues des souris traitées par l'EEP seul selon les trois protocoles de traitement utilisés comparés aux contrôles.

Le comptage des cellules en mitose sur 10 champs à l'objectif X40 a été effectué sur l'ensemble des tumeurs fixées. ce nombre est reporté au nombre total de cellules par champs. La figure 40 B

montre les résultats des dénombrements cellulaires présentés en moyenne \pm écart type sont réalisés sur 3 tumeurs pour chaque lot d'animaux.

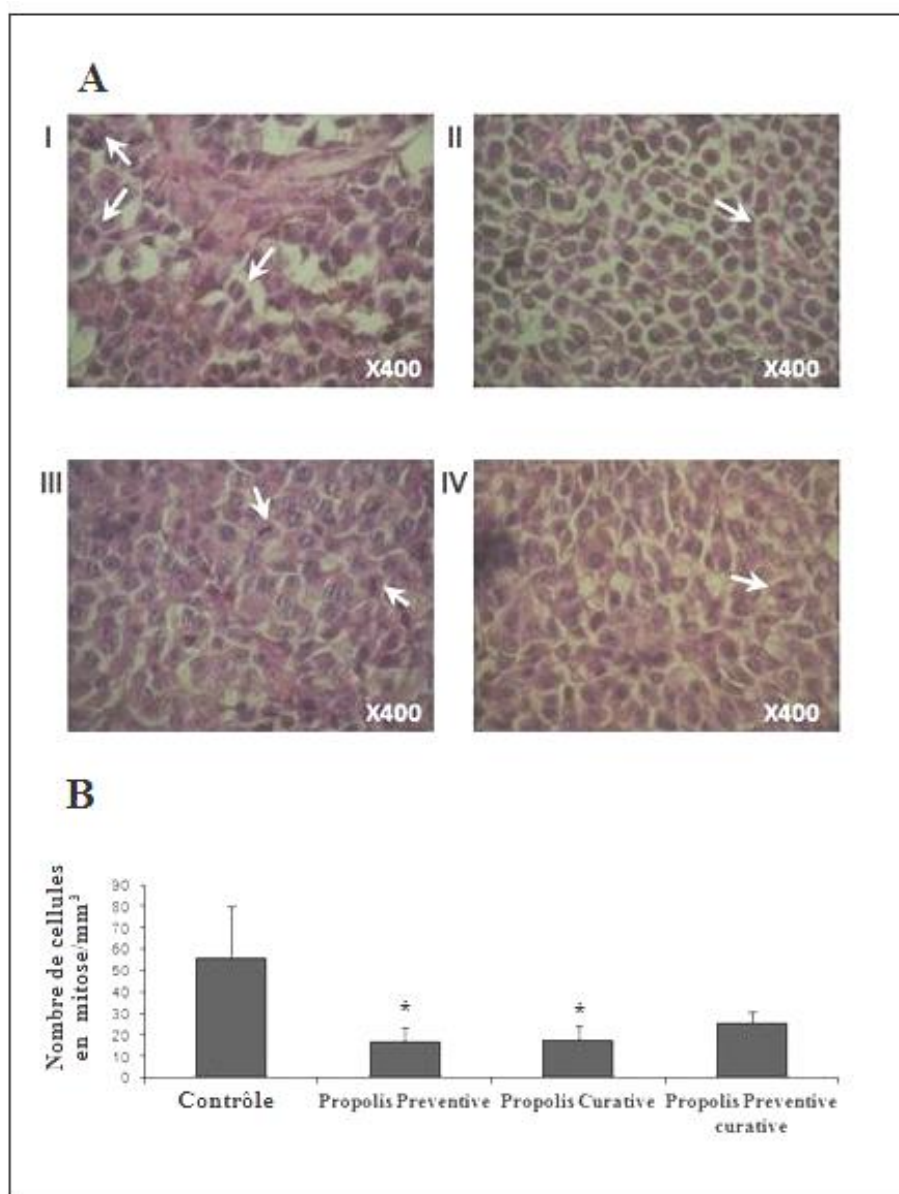


Figure 40 : Index mitotique déterminé à partir des coupes histologiques des tumeurs issues des souris traitées par l'EEP seul :

- A) I: contrôles, II: traitement préventif, III: traitement curatif. IV: traitement préventif curatif. Les coupes de tumeur ont été colorées à l'haematoxyline et éosine.
 B) Le dénombrement des cellules en mitose est effectué sur 10 champs de la même coupe et rapporté au nombre total de cellules. Trois coupes issues de trois tumeurs différentes ont servi à l'analyse.

Le comptage des cellules en mitose a révélé des différences significatives ($p < 0,05$) (figure 40) entre les lots, le traitement préventif par l'EEP ainsi que le traitement curatif présentent un nombre inférieur significatif ($p < 0,05$) de cellules en mitoses comparés aux contrôles qui montrent un caractère prolifératif avancé.

II.1.2.2. Immunomarquage au Ki-67

L'expression de la protéine nucléaire ki-67 révélée par marquage immunohistochimique a été utilisée pour évaluer la prolifération des cellules tumorales entrant en cycle cellulaire.

La figure 41 ci-dessous montre le marquage nucléaire sur les coupes des tumeurs excisées après sacrifice des animaux issues des différentes conditions de traitement à l'EEP ainsi que l'analyse la détermination de l'indice de marquage au Ki-67.

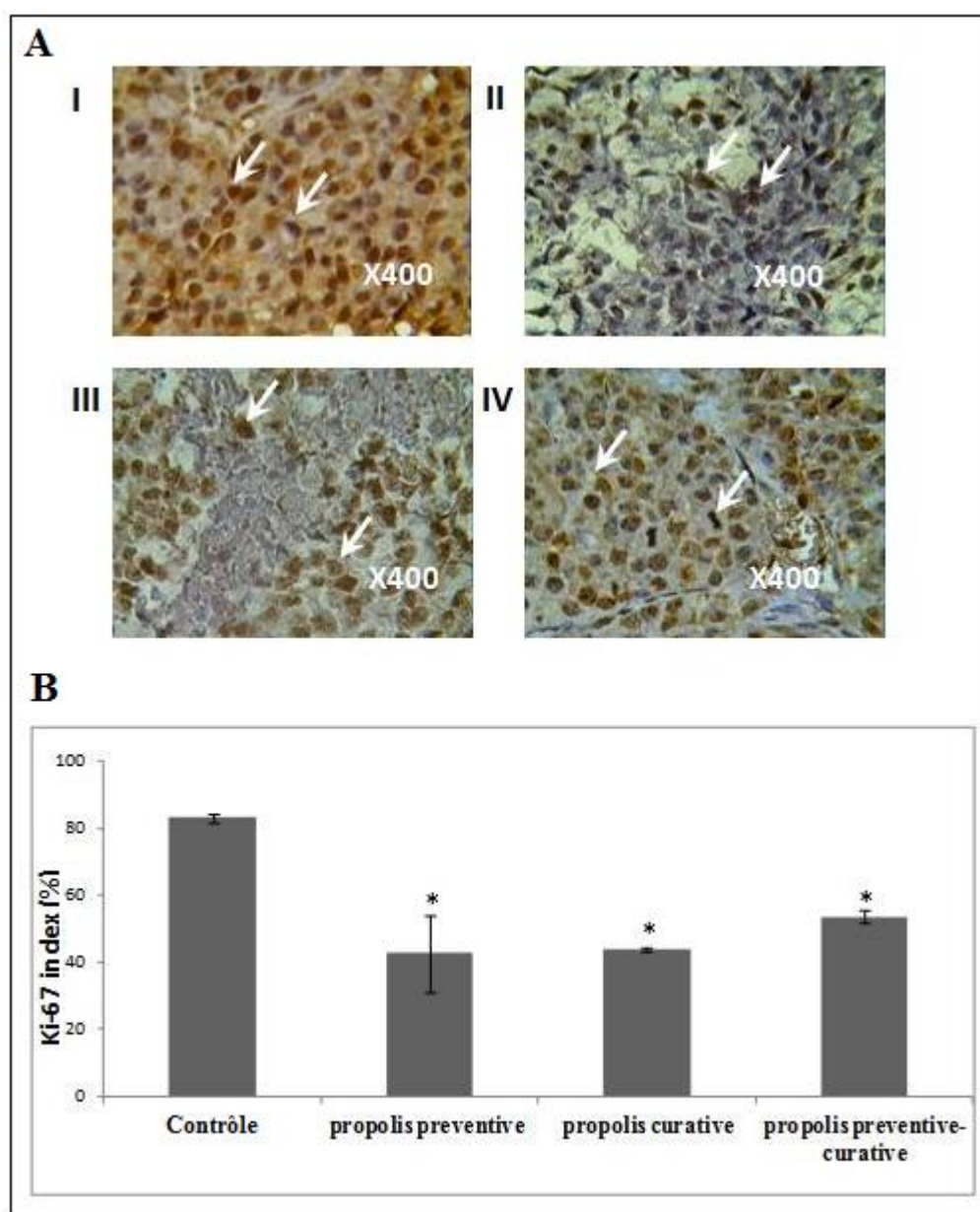


Figure 41: Marquage immunohistochimique au Ki-67 des coupes de tumeurs de mélanome primaire

A). I : Contrôle, II : EEP en préventif, III : EEP en curatif, IV : EEP en préventif et curatif

B). Le dénombrement des cellules marquées positives est effectué sur 10 champs de la même coupe et rapporté au nombre total de cellules après une contre coloration à l'hématoxyline et éosine. Trois coupes issues de trois tumeurs différentes ont servi à l'analyse.

Le marquage immunohistochimique au Ki-67 des tumeurs primaires représentées en partie par la figure 41 ci-dessus a montré un marquage intense sur toutes coupes issues des tumeurs provenant des souris du lot témoin. En revanche, nous avons relevé un faible marquage sur les coupes de tumeurs issue des souris ayant reçues un traitement à l'EEP (quel qu'en soit le protocole) l'absence de marquage par rapport au contrôle est statistiquement significative ($p < 0.05$).

II.I.2.3. Effet du traitement par l'EEP sur la vascularisation du tissu tumoral de mélanome primaire

L'angiogenèse constitue une étape du développement de nombreux cancers, car la capacité pour une tumeur cancéreuse de grossir et de métastaser est étroitement liée à la prolifération des nouveaux vaisseaux sanguins qu'elle induit.

Au cours de l'étude sur la progression tumorale des mélanomes primaires, les volumes tumoraux ont atteint des valeurs supérieures à 1 cm suggérant ainsi le développement angiogénique au sein de la tumeur notamment chez les animaux du lot contrôle.

A cet effet nous nous sommes intéressés au réseau de néo-vascularisation présent au sein des tumeurs excisées fixées et incluses en paraffine sur lesquelles des coupes de 4 μ m ont été colorées à l'hématoxyline et éosine (figure 42,A) ainsi un dénombrement des vaisseaux angiogéniques a été effectué sur dix champs à l'objectif x10. La figure 42 (B) ci-dessous présente le résultat exprimé en pourcentage du nombre de vaisseaux rapporté au dénombrement chez le lot contrôle.

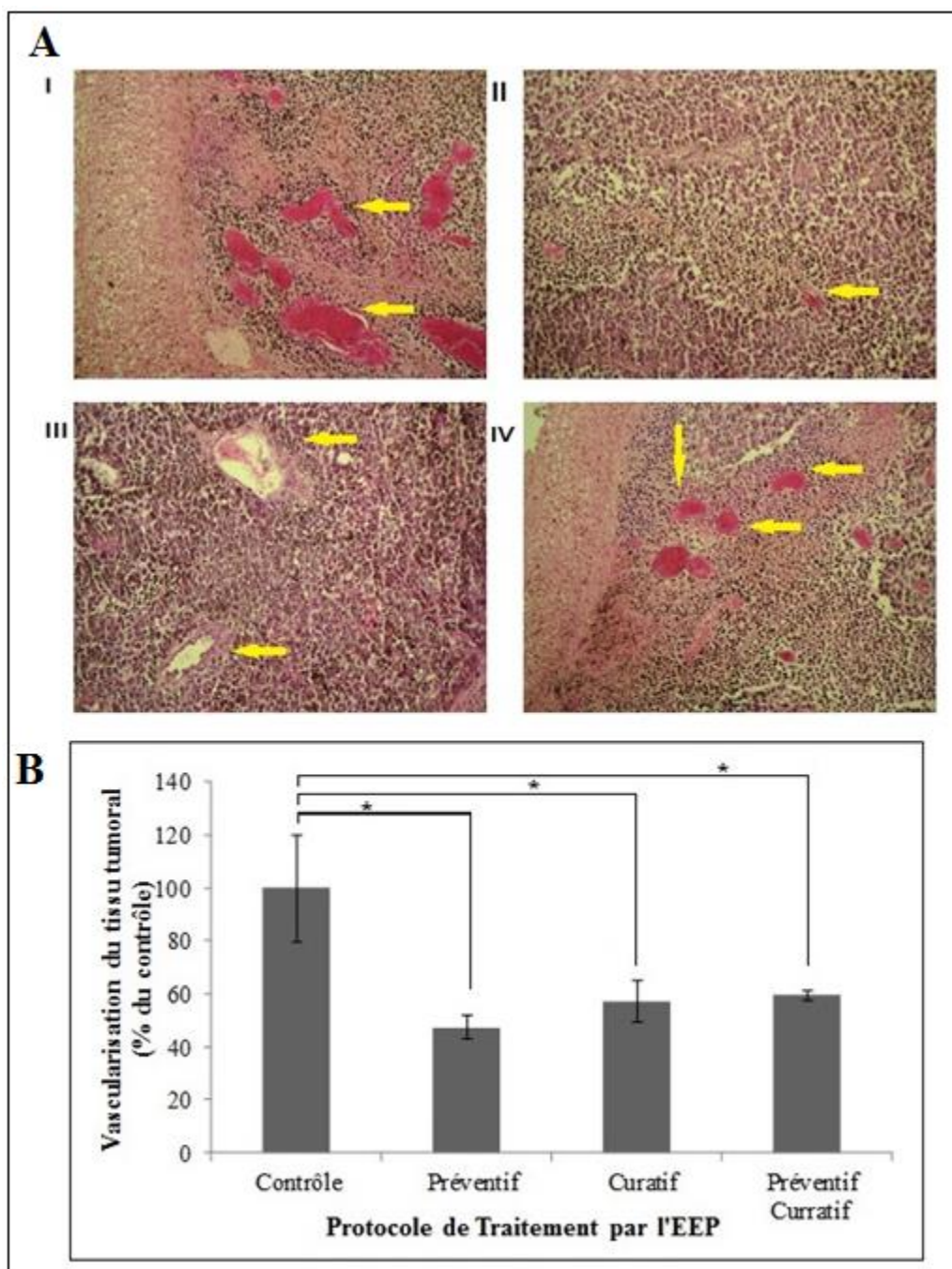


Figure 42 : Effet du traitement par l'EEP sous différents protocoles sur le développement de néo-vaisseaux angiogéniques au sein du tissu tumoral de mélanome primaire. A) tumeurs fixées et incluses en paraffine visualisées sous microscope à l'objectif x10, I : Contrôle, II : Préventif, III : Curatif, IV : Continu. B) le comptage des néo-vaisseaux est réalisé pour chaque type de traitement sur trois coupes différentes du même lot d'animaux. Le test t de student est réalisé pour la comparaison au contrôle.

Sur le plan morphologique, les tumeurs des souris ayant reçu le véhicule (témoin), présentent de nombreuses structures vasculaires de diamètre important (figure 42 A, I), contrairement aux vaisseaux intra-tumoraux des animaux traités par l'EEP qui sont beaucoup plus petits (figure 42

A-II, III, IV). Du point de vue quantitatif, le nombre de vaisseaux comptés par champ, en comparaison au contrôle, a montré une diminution significative ($p < 0,05$) sous les différents protocoles de traitement à l'EEP (préventif, curatif ou préventif-curatif). L'EEP induit une réduction importante de la vascularisation intra-tumorale (Figure 42 B). Cette diminution de néo-vascularisation, par rapport au groupe contrôle, est fortement corrélée à l'index mitotique et à l'index Ki-67 avec les coefficients de corrélation $r=0.986$ et $r=0.983$ respectivement.

II.1.2.4. Effet *ex vivo* du traitement par l'EEP sur la prolifération des cellules tumorale en cultures primaires

Les cellules tumorales en culture primaires issues des tumeurs excisées de souris traitées par l'EEP (10mg/kg) en traitement préventif ou curatif ont montré un retard de prolifération par rapport au contrôles, les comptages cellulaires après 72h d'incubation ont révélé un dénombrement inférieur, statistiquement significatif ($p < 0,05$), de cellules dans les puits correspondants aux deux traitements suscités montrant ainsi la conservation de l'effet de l'EEP *ex vivo* (figure 43).

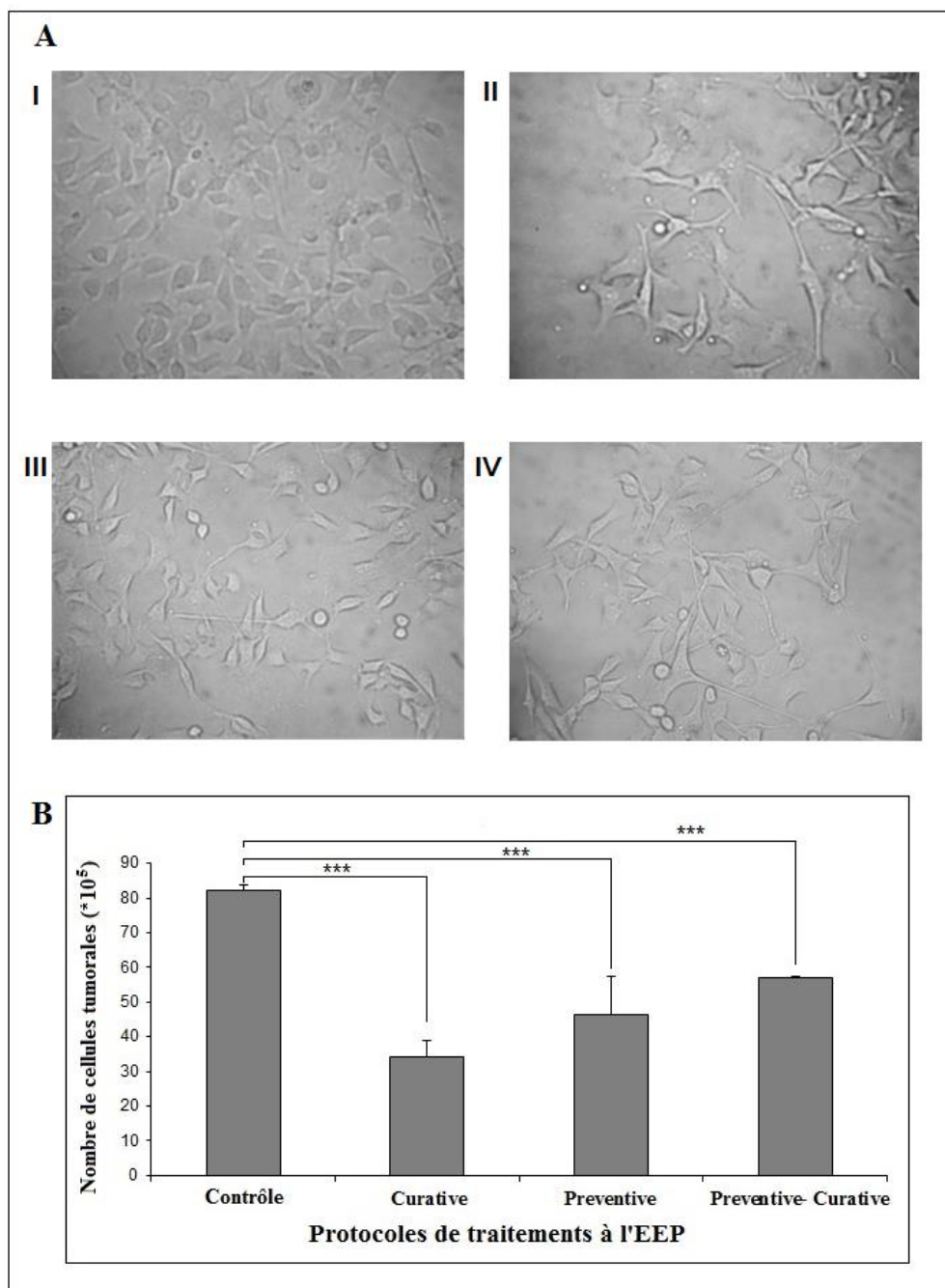


Figure 43: Prolifération des cellules tumorales issues des tumeurs excisées à partir de souris traitées par l'EEP : A) Cellules tumorales en culture primaire visualisées sous microscope à l'objectif x40, I : Contrôle, II : Préventif, III : Curatif, IV : Continu : les tumeurs excisées sont resuspendues dans le milieu de culture adéquat et remise en culture à $2 \cdot 10^4$ cellules par puits en triplicata et incubées 72h. le comptage des cellules est effectué après incubation, l'expérience est refaite trois fois(B).les comparaisons sont effectuées avec le test de Mann et Whitney (***) : $p < 0.0001$)

Le pré-traitement par l'EEP présente *ex vivo* un retard dans la prolifération cellulaire de près de 50% environ contre 30% à 40% pour les traitements curatif et continu respectivement, comparés aux contrôles cette diminution est hautement significative ($p < 0.001$) dans les trois cas.

II.1.2.5. Effet du traitement par l'EEP sur l'invasion des cellules tumorales de mélanome primaire

Nous avons analysé l'effet l'EEP sur l'invasion des cellules de tumeurs de mélanome primaire, dans un système de chambre de Boyden modifiées, recouvertes de Matrigel® (figure 44).

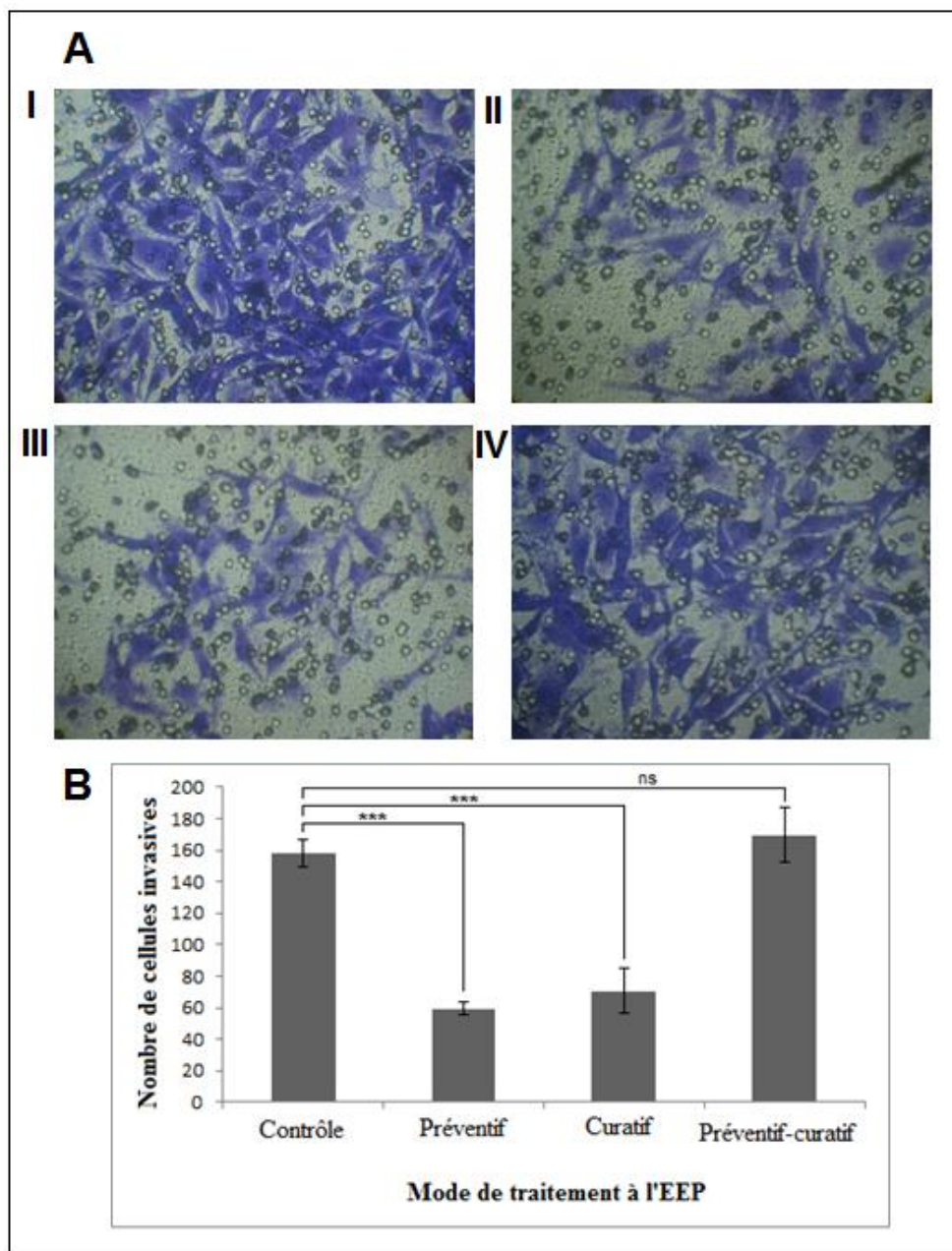


Figure 44: Inhibition de l'invasion cellulaire par l'EEP au sein des tumeurs de mélanome primaire : 5.10^4 cellules issues des tumeurs primaires sontensemencées dans la chambre de Boyden modifiée, recouverte de Matrigel® ($30 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), dans du milieu contenant de la SAB (0,2 %), (A) Après 24heures d'incubation, les cellules sont fixées au méthanol, colorées au violet cristallin, I : Contrôle, II : Préventif, III : Curatif, IV : Continu. B) Les cellules sont comptées sur 9 champs à l'aide d'un microscope inversé (grossissement $\times 200$). Chaque histogramme représente la moyenne du nombre de cellules comptées sur 9 champs, issues des tumeurs de trois souris de chaque lot indépendants réalisées en triplicata.

Comme le montre la figure 44 A, le nombre de cellules fixées et colorées au violet cristallin issues des tumeurs de souris contrôles est supérieure à celui des souris traitées par l'EEP.

Les traitements par l'EEP en curatif et préventif présentent une inhibition de 62 et 55 % de leurs propriétés invasives Après 24 heures d'incubation sur Matrigel®, ce qui est hautement significatif ($p < 0,01$), comparativement aux cellules issues des tumeurs contrôles. Le traitement continu par l'EEP n'a pas été efficace contre l'invasion des cellules de mélanome.

II.1.3. Traitement à l'EEP seul et survie des animaux

Afin d'apprécier l'effet du traitement par l'extrait de Propolis sur la survie des animaux, une série d'animaux de chaque lot ($n=7$) a été maintenu en cage individuelle et observé chaque jour pour en relever les mortalités au cours du traitement.

La figure 45 ci-dessous, montre les courbes de survies des animaux traités par l'EEP sous les différents protocoles.

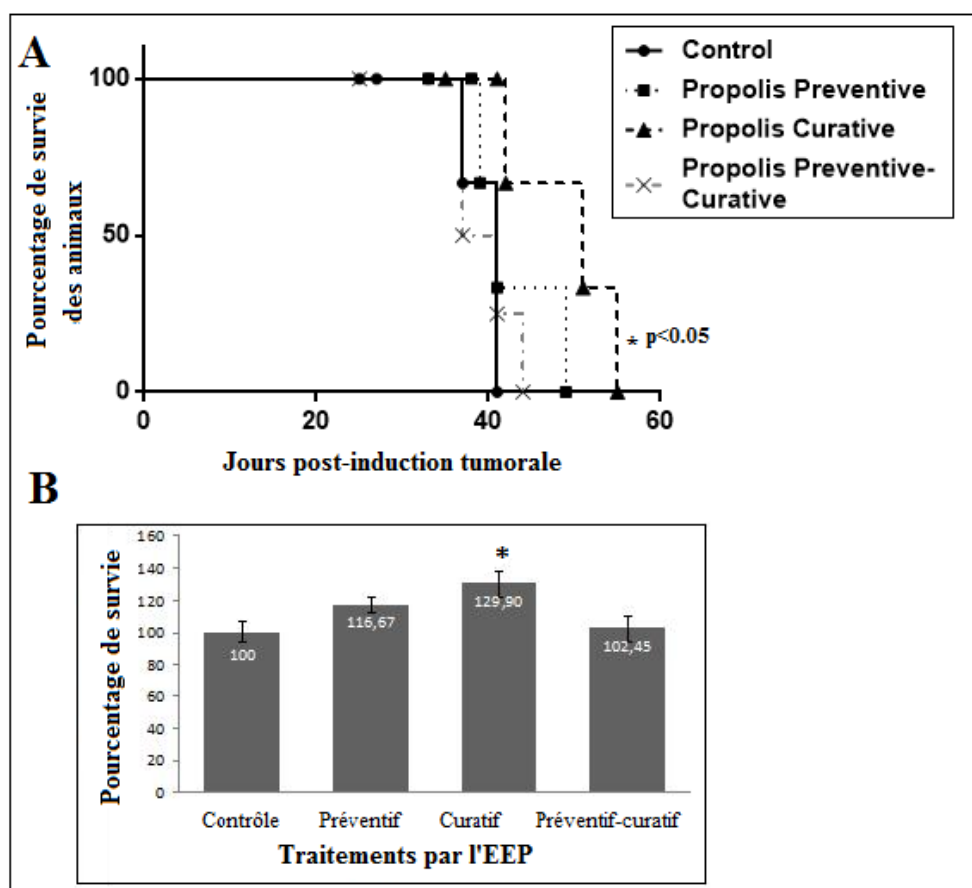


Figure 45. Courbes de survie des animaux traités par les différents protocoles de l'EEP seul. A : courbes de survie (Graphpad) avec probabilité de survie à 50%, B : pourcentage de survie par rapport groupe contrôle. (* : $p < 0.05$)

Les courbes de survie (figure 45, A) réalisées avec la probabilité de survie à 50% des animaux selon Kaplan-Meier ont montré des différences dans la survie des animaux sous les différents traitements à l'EEP. La comparaison des courbes de survie des animaux en utilisant le test log rank de Mantel-cox ou le test Gehan-Breslow –Wilcoxon ont permis d'estimer la

prolongation de la survie à 50% des animaux. Elle est significative pour les souris traitées par l'EEP en curatif ($p < 0.05$) comparées aux contrôles avec un pourcentage de survie de près de 30% ($p < 0.05$) des animaux au-delà de 45 jours post-induction tumorale (figure 45, B), contre 16% pour les animaux traités par l'EEP en préventif. Le traitement continu (préventif-curatif), n'a montré aucune différence significative avec les contrôles, une mortalité à environ 100% à été relevé 2 jours après les contrôles soit à j43 (figure 45, B).

II.2. Effet du traitement par L'EEP en association avec la Doxorubicine sur la progression tumorale de mélanome primaire chez la souris C57BL6

Nous avons voulu savoir si l'effet anti-tumoral du traitement par l'EEP serait comparable à un anticancéreux de référence tel que la doxorubicine, un antracycline utilisé dans le traitement de plusieurs types de tumeurs, ou encore potentialisé par une association des deux traitements en suivant toujours les mêmes protocoles d'administration de l'EEP à savoir en traitement curatif, préventif et continu (préventif-curatif) présentés dans la figure 46 en A, B et C respectivement.

II.2.1. Effet du traitement par L'EEP en association avec la Doxorubicine sur la croissance tumorale de mélanome primaire chez la souris C57BL6

Le suivi de la croissance tumorale est réalisé par la mesure des volumes tumoraux et le calcul des SGR et DT sur les animaux traités par l'EEP seul ou associé à la doxorubicine a été effectuée chaque 48H.

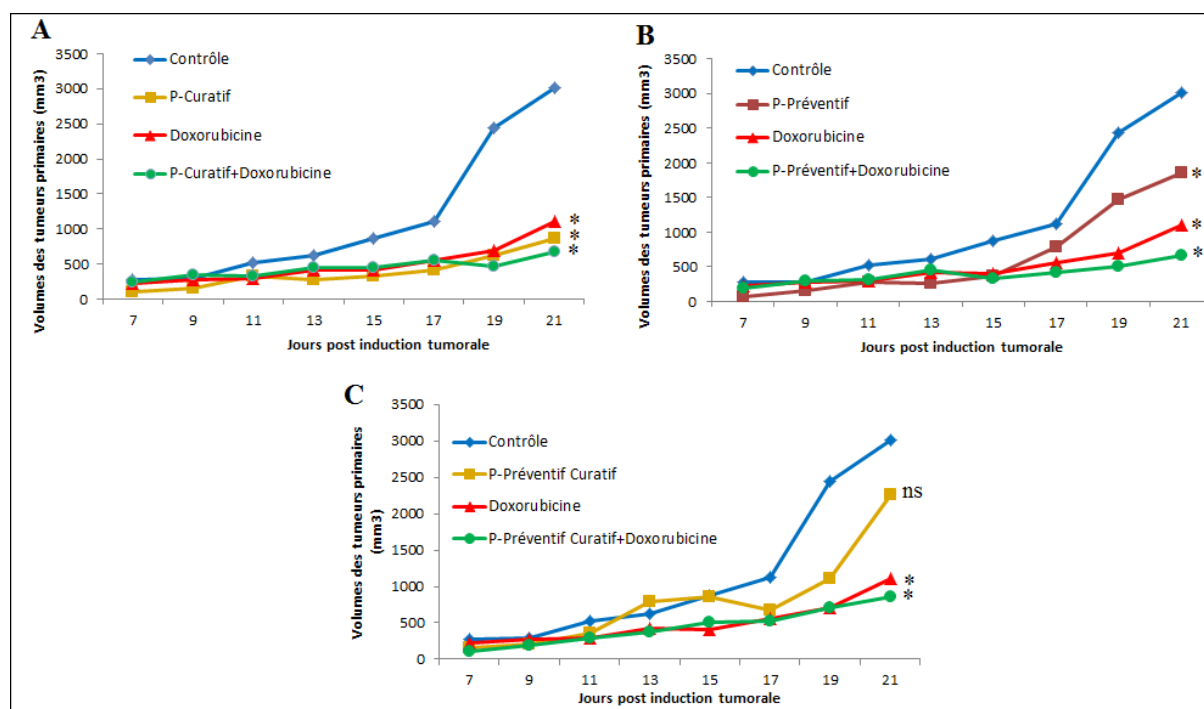


Figure 46 : Effet du traitement par la doxorubicine seule ou en association avec l’EEP sur la progression tumorale de mélanome primaire : les souris C57BL6 sont traitées ou non par la doxorubicine, en traitement curatif à la dose de 4mg/kg chaque 48H (à partir de J8) seule ou associée à un traitement par l’EEP selon les différents protocoles le test statistique de Mann et Whitney est réalisé pour comparer les comparaisons multiples (* : $p < 0.05$)

Le traitement préventif par l’EEP suivi par un traitement à la doxorubicine induit une diminution significative ($p < 0.05$) des volumes tumoraux comparés aux contrôles (figure 46 B). De même pour le traitement par l’EEP en curatif combiné à la doxorubicine, la réduction du volume tumoral est en moyenne de 70% environ (figure 46 A).

Le traitement continu (préventif-curatif) par l’EEP associé à un traitement par la doxorubicine induit une diminution significative ($p < 0,05$) des volumes tumoraux comparés aux contrôles. Cette diminution est vraisemblablement due au traitement par la doxorubicine puisque le traitement par la propolis seule ne présente pas de différences significatives par rapport à la doxorubicine et aux contrôles (figure 46, C).

Le calcul du taux de croissance spécifique a conduit aux résultats présentés dans la figure 47

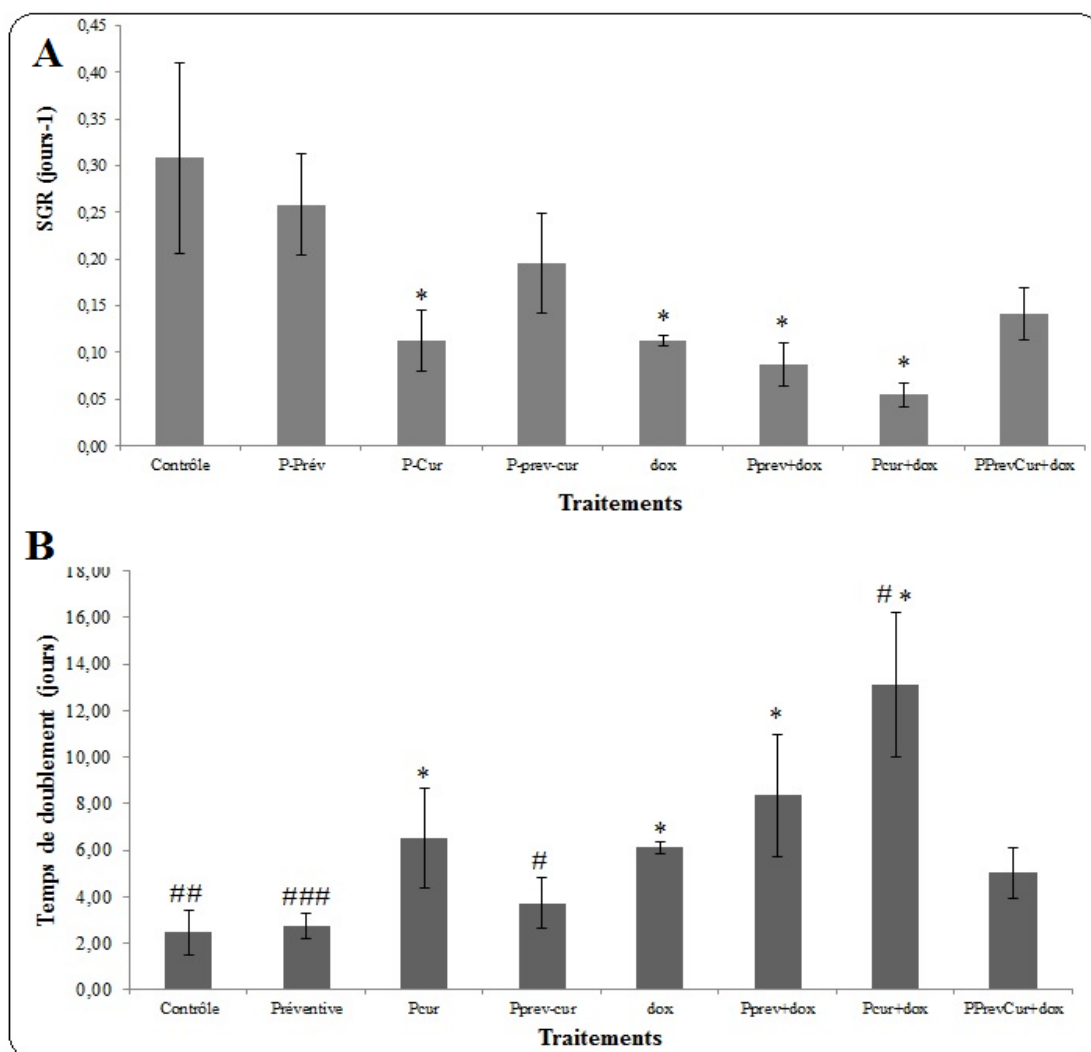


Figure 47 : Effet de l'EEP en association avec la doxorubicine sur la croissance tumorale de mélanome primaire in vivo : l'induction de tumeurs primaires est réalisée comme cité précédemment en matériel et méthodes. B) Taux de croissance (SGR : Specific Growth Rate). C) DT (Doublind Time) selon les formules données en matériel et méthodes. * : $p < 0.05$ comparaison au contrôle avec le test de Student, # : $p < 0.05$, ### : $p < 0.001$ comparaison au groupe doxorubicine avec le test de Student.

La comparaison du taux de croissance spécifique au contrôle (figure 47 A) a montré une diminution significative chez les animaux traités par la doxorubicine seule ou associée aux traitements préventif ou curatif à l'EEP, par contre l'association au traitement continu ne montre aucune différence significative.

La figure 47, B montre les temps de doublement des cellules tumorales *in vivo*. La comparaison de ce paramètre par rapport au traitement à la doxorubicine expose une augmentation significative ($p < 0.05$) chez les souris traitées par l'EEP en curatif associé à la doxorubicine. Ce retard notable dans la croissance tumorale démontre un effet synergique du traitement curatif à l'EEP combiné à la doxorubicine.

Afin de vérifier ces différences des volumes des tumeurs, les poids des tumeurs ont été pesés après excision. La figure 48 ci-dessous montre les différences de poids tumoraux dans les différentes situations thérapeutiques.

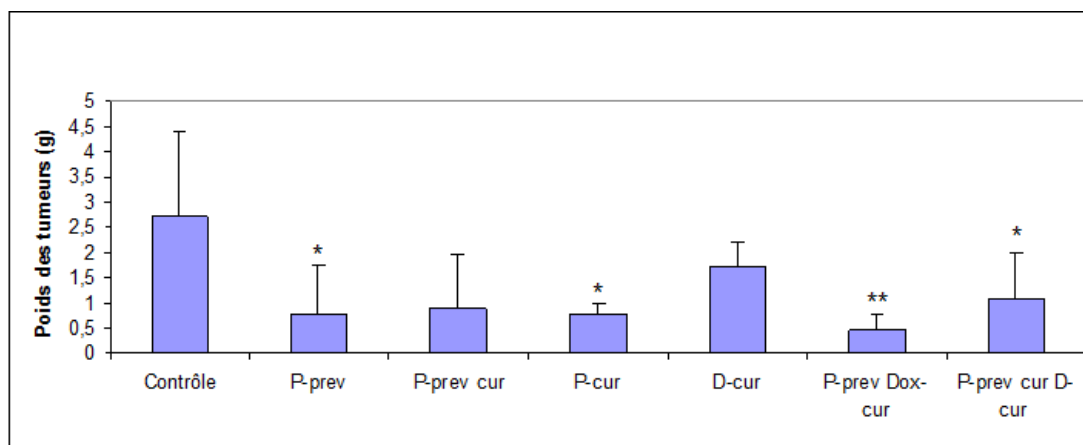


Figure 48 : Poids des tumeurs excisées des souris après sacrifice à J21

Nous avons observé des différences significatives ($p < 0,01$) des poids des tumeurs issues des animaux traités par l'EEP en préventif suivie d'un traitement par la doxorubicine par rapport aux contrôles.

II.2.2. Effet de l'EEP en association avec la doxorubicine sur la survie des animaux

Le suivi des animaux au cours du traitement par la doxorubicine à conduit aux résultats présentés dans la figure 49 ci-dessous :

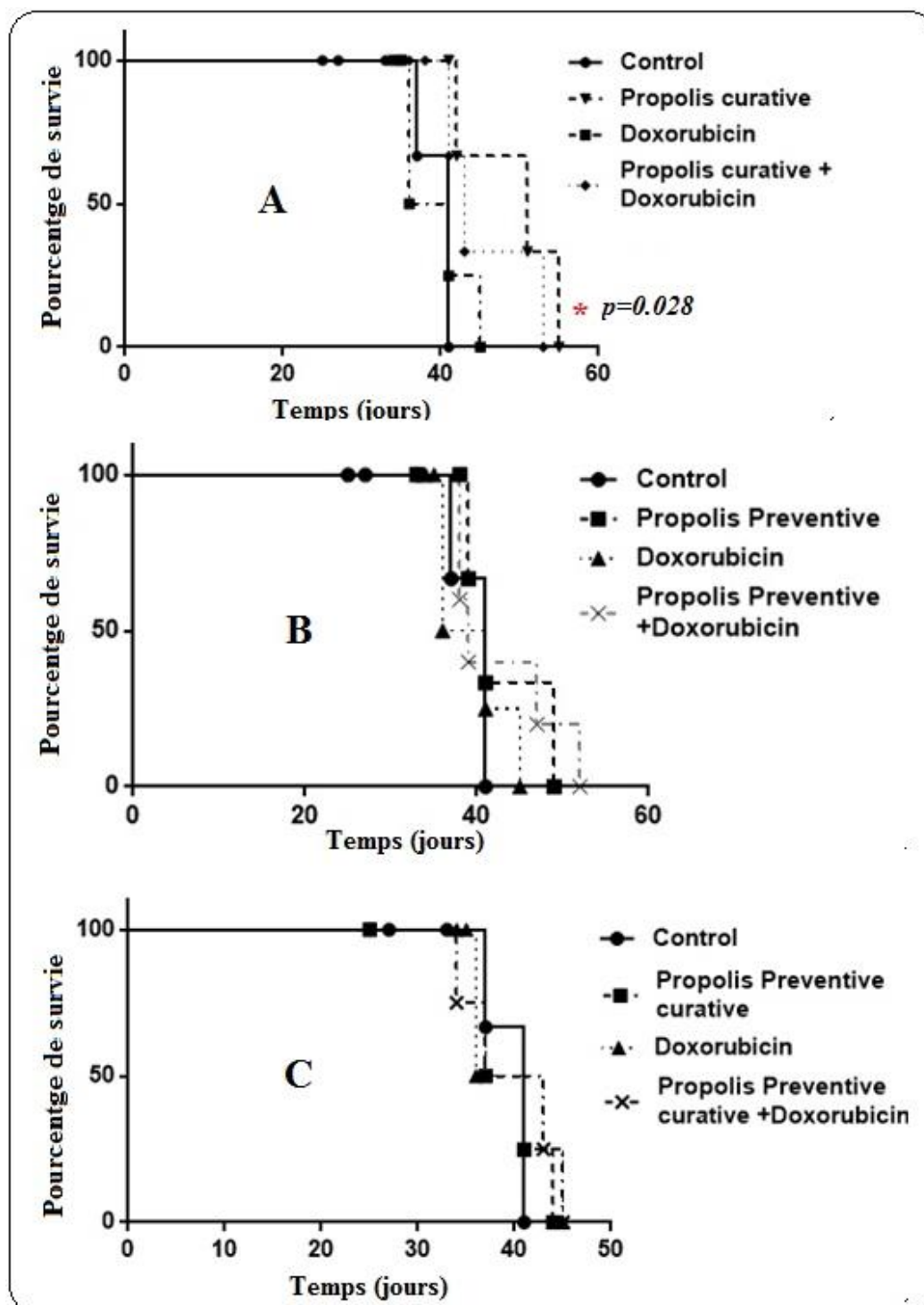


Figure 49 : Courbes de survie des animaux traités par les différents protocoles de traitement par l'EEP seul (A : EEP Curatif, B : EEP Préventif, C : EEP Préventif Curatif) ou associé à la doxorubicine. * : $p < 0.05$, comparaison des courbes de survie avec les deux tests : log-rank(Mantel-cox) et Gehan-Breslow-Wilcoxon.

Le traitement par la doxorubicine seule induit une mortalité à 100% des animaux au jour 45 post-induction tumorale, soit 4 jours après les 100% de mortalité des contrôles. En revanche, l'association du traitement par la doxorubicine au traitement à l'EEP conduit à une prolongation de la survie des animaux cette diminution est significative ($p < 0.05$) dans le cas du traitement

curatif à l'EEP (figure 49 A) ou préventif (figure 49 B) en association avec la doxorubicine conduisent à une prolongation de la survie des animaux au-delà de 45jours. De même pour le traitement continu par l'EEP associé à la doxorubicine (j45) (figure 49 C).

II.3. Effet du traitement par l'EEP seul sur la prolifération et l'apoptose des cellules de mélanome.

Afin d'expliquer au niveau cellulaire les phénomènes observés sur le retard de la progression tumorale *in vivo*, nous nous sommes intéressés à l'étude des effets des traitements par l'EEP et la doxorubicine *in vitro* sur des lignées cellulaires de mélanome murin pour caractériser les évènements cellulaires relatifs à l'étude *in vivo* sur une lignée cellulaire humaine afin de pouvoir comparer comportements cellulaires et les extrapoler ces effets chez l'homme. Avec cette approche nous avons vérifié si l'inhibition de la croissance tumorale chez les animaux traités par l'EEP, exprimée par une diminution significative du volume tumoral, pouvait être imputable à une inhibition de la prolifération cellulaire ou à un effet pro-apoptotique de l'EEP.

II.3.1. Effet des traitements par l'EEP et la Doxorubicine sur la prolifération des cellules de mélanome *in vitro*

II.3.1.1. Effet de l'EEP sur la prolifération des cellules de mélanome *in vitro*

Cette étude est amorcée par les effets de l'EEP sur la viabilité cellulaire et la cytotoxicité des traitements par l'EEP seul ou associé à la Doxorubicine. La prolifération cellulaire est déterminée en utilisant le réactif WST-1 (Roche). Le WST-1 contient un sel de tétrazolium qui est réduit par les oxydo-réductases mitochondriales et permet ainsi d'évaluer en même temps la viabilité des cellules. Sa réduction donne naissance à un dérivé formazan soluble, de coloration jaune permettant de faire un dosage spectrophotométrique.

La prolifération des cellules de mélanome murin (B16F1) et Humain (SKmel 28) a été étudiée en présence ou en absence de l'EEP à différentes concentrations (1µg/mL, 5µg/mL, 10µg/mL), après 24h d'incubation, par réduction du réactif WST-1® (figure 50).

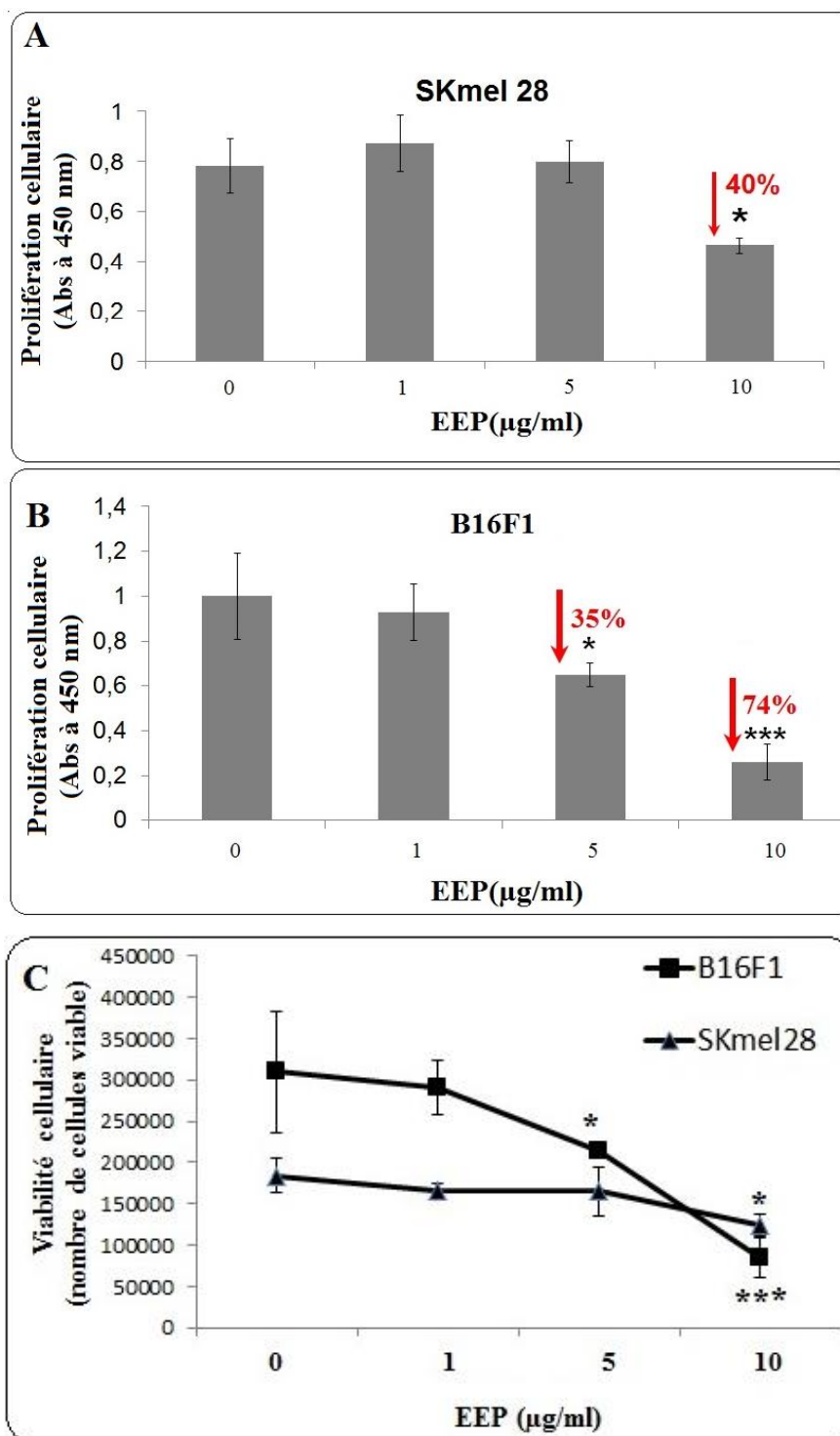


Figure 50 : Effet de l'EEP sur la prolifération des cellules SKmel 28 (A) et B16F1 (B) : après 24h d'incubation à différentes concentrations (1, 5 et 10µg/mL) avec le test WST-1. (C): mesure de la viabilité cellulaire par comptage de cellules viables.les résultats sont présentés en moyenne de trois expériences ± ecart type;* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ comparaison avec le contrôle en utilisant le test T de Student.

In vitro, L'EEP à la dose de 1 µg/mL n'a pas d'effet sur la prolifération des cellules SKmel28 (figure 50-A), en revanche à la dose de 5 et 10µg/mL l'EEP induit une diminution significative de l'activité mitochondriale des cellules comparé au contrôle. Pour la lignée cellulaire B16F1,

l'EEP induit une diminution significative de la prolifération cellulaire de 35% et 70% en utilisant les doses 5 et 10 μ g/mL respectivement.

II.3.1.2. Effet du traitement par la doxorubicine sur la prolifération des cellules de mélanome

Afin de comparer les effets de l'EEP à un agent anticancéreux de référence la doxorubicine, nous avons testé ce dernier à plusieurs doses dans le but de déterminer une dose pro-oxydante mais non cytotoxique sur deux lignées cellulaires de mélanome humain (SKmel28) et murin (B16F1)

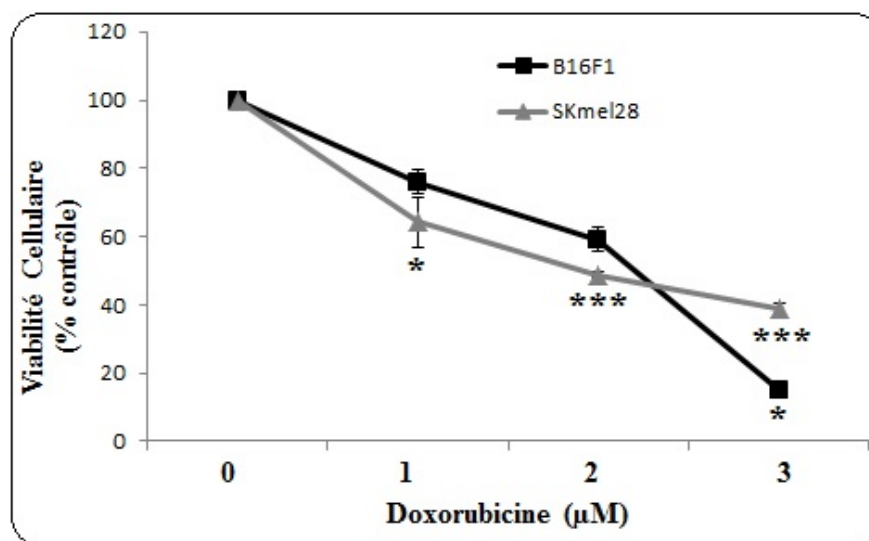


Figure 51 : Effet de la Doxorubicine sur la prolifération des cellules SKmel 28 et B16F1 après 24h d'incubation à différentes concentrations (1, 2 et 3 μ M) Moyenne de trois expériences \pm Ecart type. * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$ pour la comparaison avec le contrôle avec le test T de Student.)

A la dose de 3 μ M la doxorubicine induit une mort cellulaire de plus de 60% et 80% dans les deux lignées cellulaires SKmel28 et B16F1 (figure 51). A 2 μ M la doxorubicine induit une diminution de la prolifération cellulaire de 50 et 40% dans les deux lignées cellulaires SKmel28 et B16F1 respectivement, cette dose a été maintenue pour les traitements combinés de la doxorubicine et l'EEP. En revanche à la dose de 1 μ M il n'y a pas de différences significatives par rapport au contrôle pour la lignée B16F1.

II.3.1.3. Effet du traitement combiné de l'EEP et la Doxorubicine sur la prolifération des cellules de mélanome.

Pour les traitements combinés une dose de 2 μ M de doxorubicine a été choisie pour induire un processus apoptotique, ce traitement est associé à un trois doses différentes de EEP (1, 5 et 10 μ g/mL). La figure 52 ci-dessous montre l'effet des traitements combinés sur la prolifération des deux lignées cellulaires.

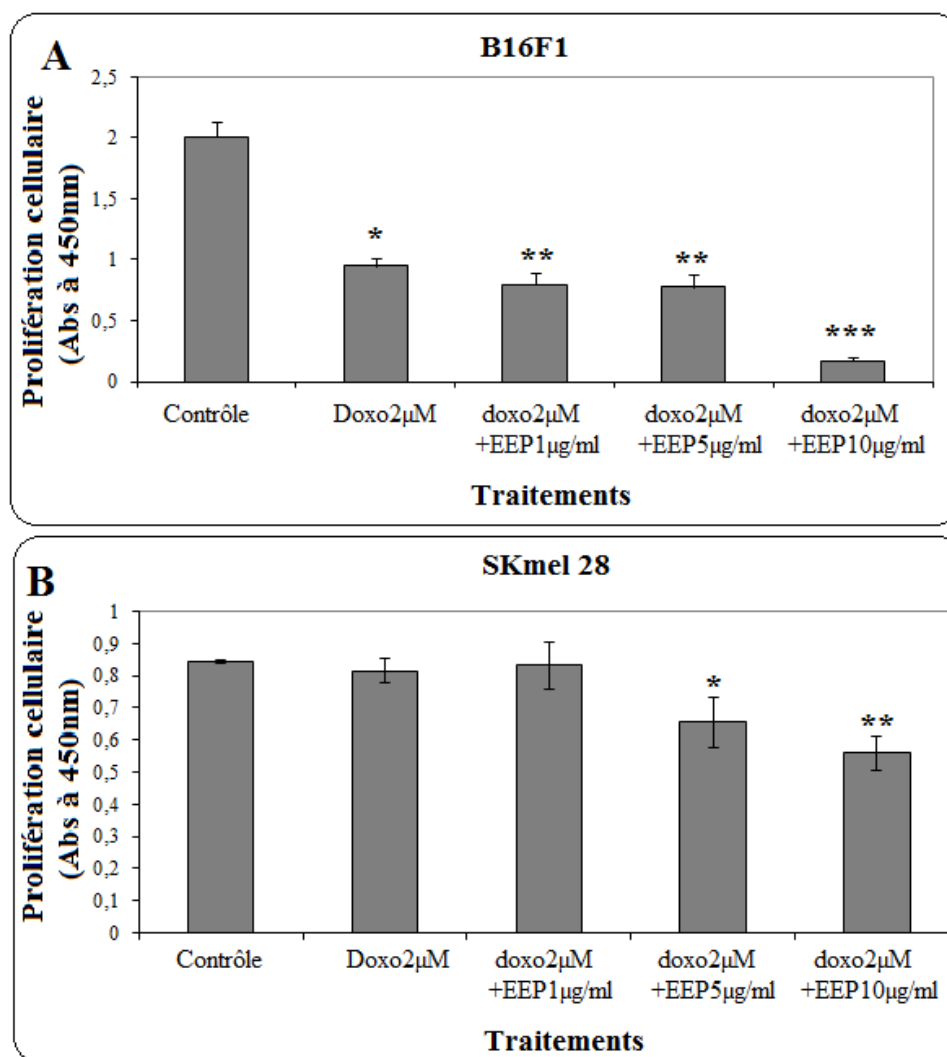


Figure 52 : Effet du traitement combiné de l'EEP et la Doxorubicine sur la prolifération des cellules B16F1 (A) et SKmel 28 (B) après 24h d'incubation à différentes concentrations (1, 5 et 10 μ g/mL) avec le test WST-1. : mesure de la viabilité cellulaire par comptage de cellules viables. les résultats sont présentés en moyenne de trois expériences \pm écart type; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.001$ comparaison avec le contrôle en utilisant le test T de Student.**

La réponse des deux lignées cellulaires est différente aux traitements, les cellules B16F1 sont plus sensibles à ce traitement que les SKmel28 puisqu'à la dose de 2 μ M de doxorubicine combiné à 10 μ g/mL de l'EEP il y a plus de 80% de mort cellulaire chez la lignée des B16F1 contre 40% dans la lignée SKmel28 respectivement.

II.3.2. Effet des traitements à l'EEP et à la doxorubicine sur la morphologie nucléaire : Marquage des noyaux

Afin de caractériser la mort cellulaire provoquée par les traitements par l'EEP, nous avons effectué un marquage des noyaux cellulaires. Le bisbenzimidazole ou Hoechst 33342 est un fluorochrome qui pénètre facilement les membranes cellulaires. Il va se fixer sur l'ADN pour marquer les noyaux cellulaires par émission de fluorescence bleue. Il permet de mettre en évidence les fragmentations nucléaires et les condensations chromatiniennes spécifiques de l'apoptose. Les cellules de mélanome (B16F1 et SKmel) sont incubées en présence ou en absence de l'EEP (10 µg/mL) seul ou combiné à la doxorubicine (2 µM) durant 24 h. Les noyaux cellulaires sont ensuite marqués au Hoechst 33342 (Figure 53).

II.3.2.1. Effet du traitement par la doxorubicine seule sur la morphologie des noyaux des cellules SKmel28 et B16F1

La doxorubicine est connue pour avoir un effet pro-apoptotique sur plusieurs lignées cellulaires en culture, cette expérimentation vise à déterminer une dose de traitement à la doxorubicine qui induit des modifications morphologiques des cellules sans pour autant provoquer une mort cellulaire de plus de 80% chez les deux lignées cellulaires de mélanome SKmel 28 et B16F1 et ce pour l'utiliser dans les traitements combinés avec l'EEP.

La figure 53 ci-dessous illustre les effets du traitement par la doxorubicine à la dose de 2 et 3 µM sur la morphologie cellulaire et nucléaire chez les deux lignées cellulaires SKmel 28 et B16F1.

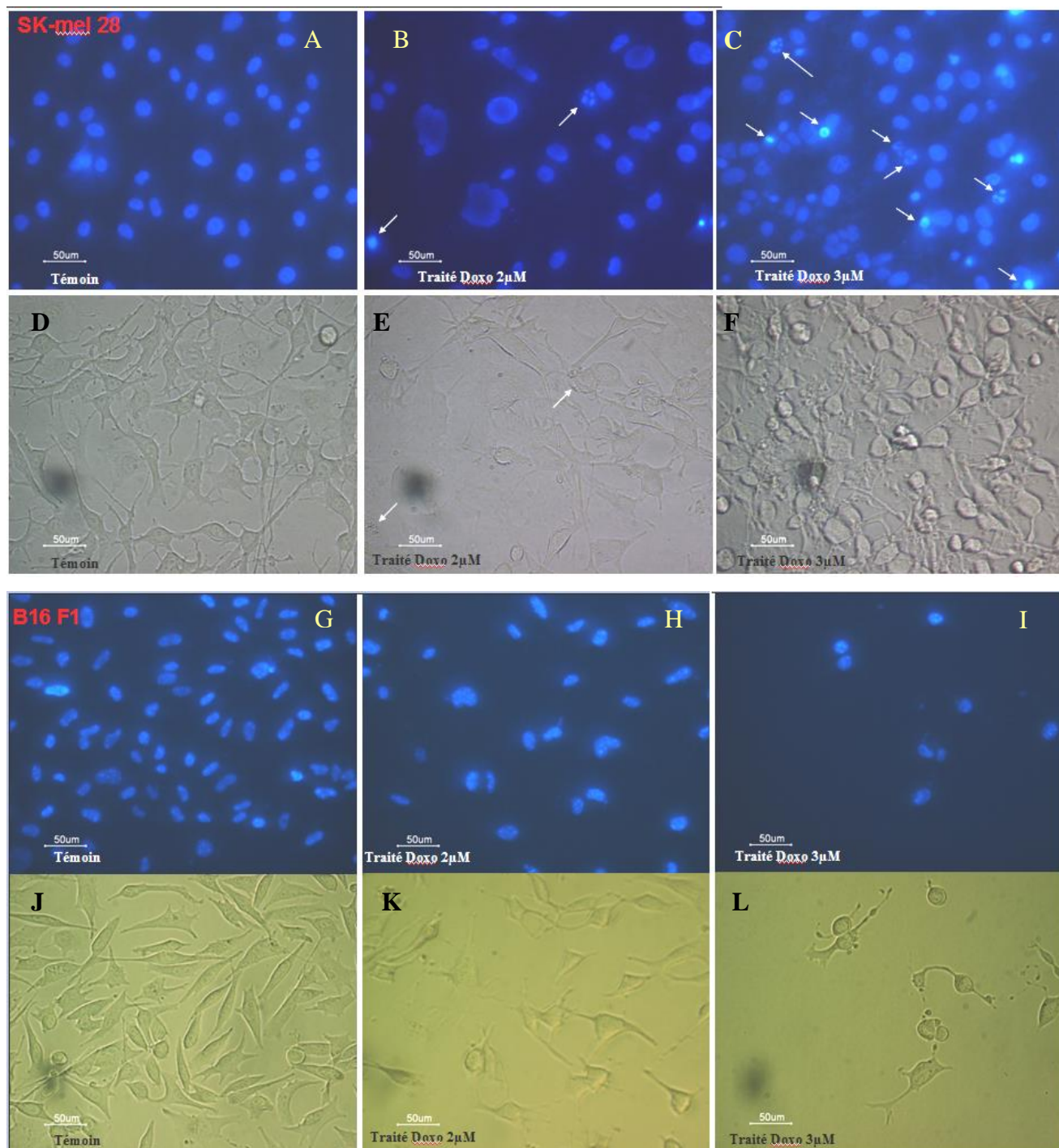


Figure 53 : Effet du traitement à la doxorubicine (2 et 3 μM) et sur la morphologie des noyaux après 24h d'incubation chez les deux lignées cellulaire SKmel28 (A-F) et B16F1(G-L)

Les cellules qui n'ont reçu aucun traitement présentent un aspect et une taille normale et des noyaux non condensés (Figure 53 A et B). Après 24 h, il apparaît que le traitement provoque une condensation et une fragmentation de la chromatine caractéristiques de l'apoptose plus prononcé avec un nombre important de noyaux fragmentés (figure 53 C) et une modification dans la morphologie des cellules (figure 53 D) pour le traitement à 3 μM dans la lignée SKmel 28.

En revanche pour la lignée B16F1 En présence de la doxo (2 μ M), nous observons une forte diminution du nombre de cellules en apoptose (Figure 39K, L) avec une déformation des noyaux (Figure 53H, J).

II.3.2.2. Effet du traitement combiné de l'EEP et la Doxorubicine sur la morphologie des noyaux des cellules B16F1.

Le choix des doses à utiliser en traitement combiné est déterminé à partir des tests préliminaires de prolifération cellulaire et de marquage des noyaux pour la doxorubicine qui est utilisée donc à la dose de 2 μ M, pour l'EEP une dose de 10 μ g/mL a été choisie.

Nous avons incubé les cellules B16F1 pendant 6h qui est un peu plus court en présence des différents traitements afin d'en vérifier les effets pro-apoptotiques.

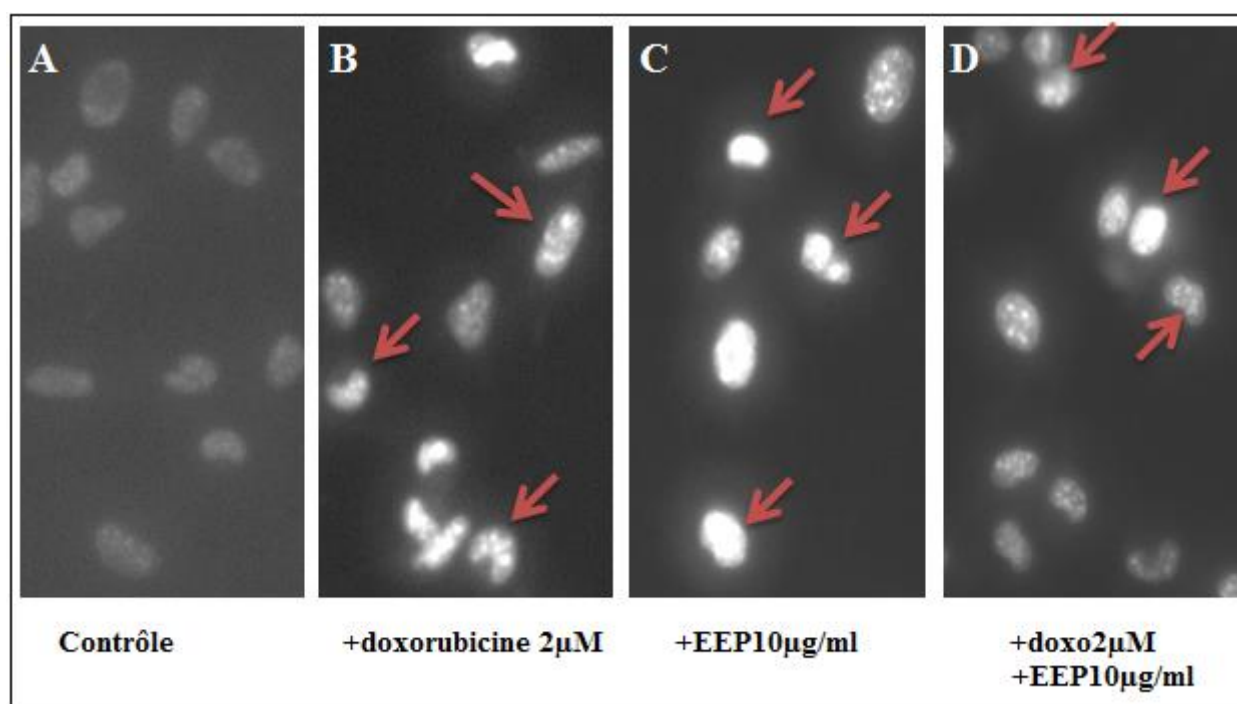


Figure 54 : *Effet du traitement par la doxorubicine (2 μ M)(B), l'EEP (10 μ g/mL) (C), et combiné (D) sur la morphologie des noyaux après 6h d'incubation chez les cellules B16F1*

Le traitement combiné conduit à une potentialisation de l'effet anti-prolifératif suscité dans la lignée B16F1, le marquage des noyaux montre une déformation et fragmentation avec une diminution du nombre de cellules (figure 54D)

II.3.3. Implication des CASPASES-3 dans la régression tumorale du mélanome

Afin de déterminer le mécanisme moléculaire de l'effet pro-apoptotique de l'EEP, nous nous sommes intéressés à la famille des CASPASE. Ces protéines enzymatiques sont impliquées dans

le processus apoptotique et participent à différents niveaux cellulaires dans les phases de l'apoptose. Le génome humain code pour au moins 14 CASPASE. La CASPASE-3 est l'une des protéines effectrices de cette famille et représente la caspase chargée de déclencher le processus apoptotique d'où l'intérêt d'étudier cette enzyme et son activation au cours des traitements par la Doxorubicine et l'EEP.

II.3.3.1. Effet de la Doxorubicine seule sur l'expression de la CASPASE-3

L'investigation de l'implication de la caspase-3 dans la mort cellulaire induite par les différents traitements a été réalisée sur la lignée cellulaire B16F1 après traitement par la doxorubicine à la dose de 3 μ M dose apoptotique pour vérifier l'éventuelle implication de la CASPASE-3. Pour ce faire à la fin de l'incubation les cellules sont lavées et lysées, le lysat cellulaire est soumis à un western blotting pour mettre en évidence l'expression de la forme inactive Pro- CASPASE-3. La vérification de l'activation de cette enzyme est mise en évidence grâce à l'éventuel clivage de son substrat PARP.

La figure 55-A ci-dessous montre des bandes caractéristiques de la pro-caspase-3 (32Kda) sur un traitement à 3h et 6H par la doxorubicine à 3 μ M.

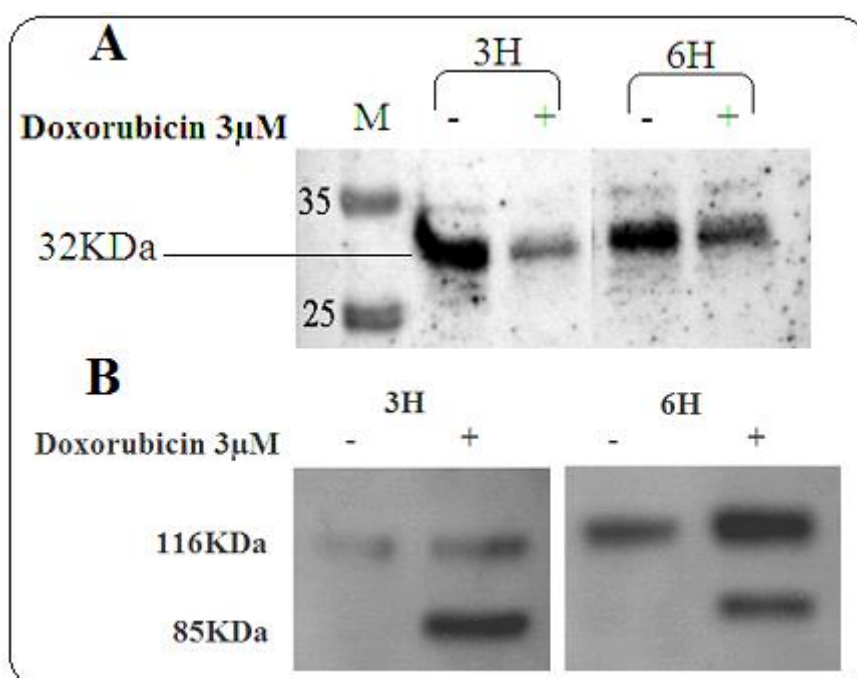


Figure 55 : Expression de la pro-caspase-3 et clivage du PARP sous l'effet du traitement par la doxorubicine à la dose de 3 μ M des cellules B16F1 après deux temps d'incubation (3H et 6H)

La figure 55-A ci-dessus montre une diminution de l'expression de la pro-CASPASE 3 traduisant l'activation de cette dernière en CASPASE -3 active. Le western blot du substrat PARP représenté dans la figure 55-B est caractérisé par la bande de taille 85KDa qui est plus intense à 3H qu'à 6H de traitement. Ceci démontre encore une fois l'activité lytique de la CASPASE-3.

II.3.3.2. Effet du traitement combinés de l'EEP et la Doxorubicine sur l'expression de la CASPASE-3 et son substrat PARP

La figure 55 ci-dessous montre l'expression de la procaspase 3 et le clivage du PARP dans la lignée cellulaire de mélanome murin.

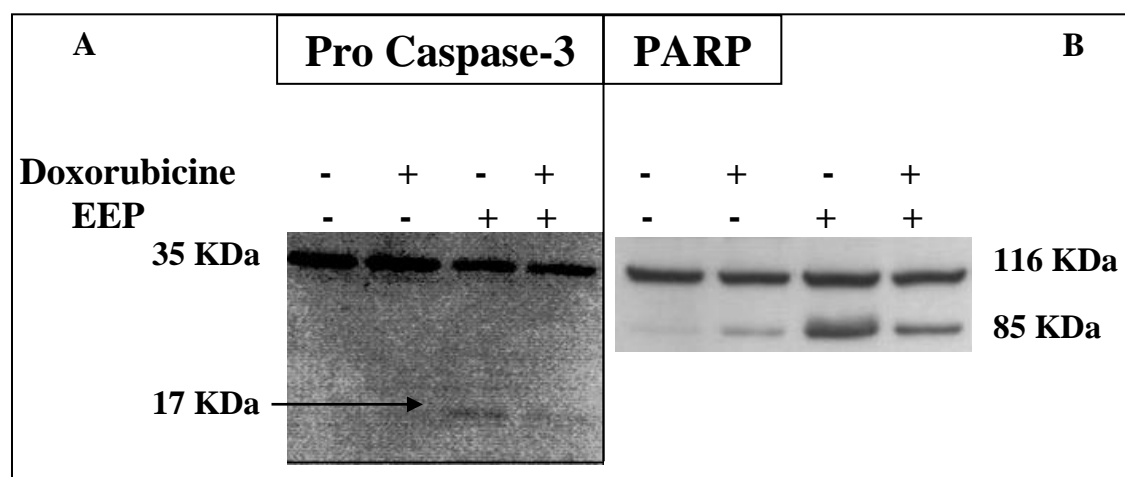


Figure 56 : Expression de la procaspase 3 (A) et le clivage du PARP (B) dans la lignée cellulaire B16F1 traitée par la doxorubicine seule (2µM), l'EEP seul (10µg/mL) ou les deux combinés

La figure 56 montre une diminution de l'expression de la CASPASE 3 en présence de l'EEP à la dose de 10µg/mL seul ou combiné à la doxorubicine (2µM) qui ne montre d'effet notable sur la diminution de l'expression de la pro-caspase 3 comparé à la dose 3µM (figure 44). En revanche, une bande d'activation de la caspase-3 est observée à 17KDa pour le traitement par l'EEP seul ou en association avec la doxo.

Le comportement de la lignée cellulaire de mélanome humain SKmel28 est différent de celui de la lignée murine (figure 57). En effet, il y a une diminution de l'expression de la pro-caspase3 dans le traitement par l'EEP seul ou combiné à la doxorubicine (figure 57 A) mais le clivage du PARP est moins important chez cette lignée cellulaire dans les mêmes conditions (figure 57 B).

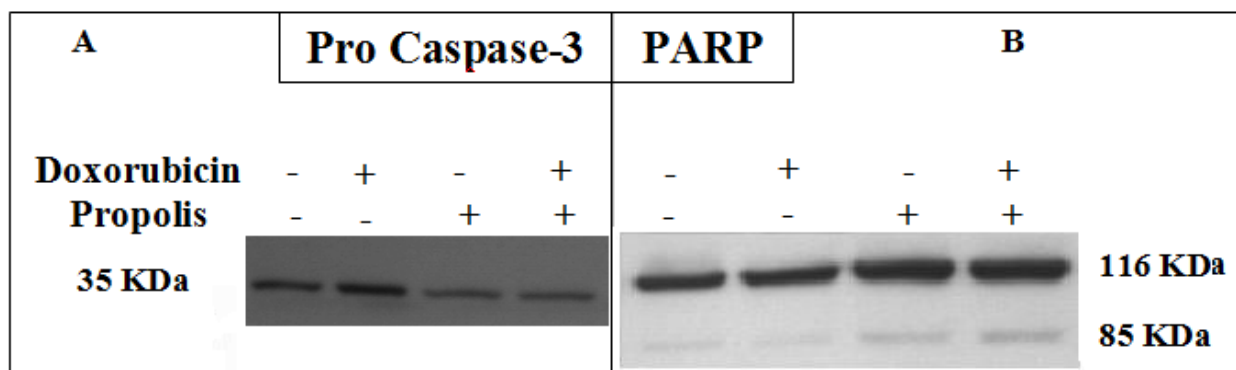


Figure 57 : Expression de la procaspase 3 (A) et le clivage du PARP (B) chez la lignée cellulaire SKmel 28 traitée par la doxorubicine seule (2 μ M), l'EEP seul (10 μ g/mL) ou les deux combinés

II.3.4. Effet des différents traitements à l'EEP et la doxorubicine sur l'expression génique des gènes de la famille des Bcl-2.

Toujours dans les processus apoptotiques liés à la mort cellulaire induite *in vitro* par le traitement à l'EEP, nous nous sommes intéressés au rôle des protéines de la famille Bcl2 impliquées dans le maintien et la propagation de la signalisation cellulaire liée à l'apoptose.

Pour cela, nous avons utilisé des techniques de biologie moléculaire telles que la PCR en point final (classique) pour voir l'expression génétique des protéines pro et anti apoptotiques de la famille des Bcl2.

Les conditions expérimentales *in vitro* avec le traitement par l'EEP seul (10 μ g/mL), la doxorubicine seule (2 μ M) ou combinés, sur les deux lignées cellulaires de mélanome murin et humain.

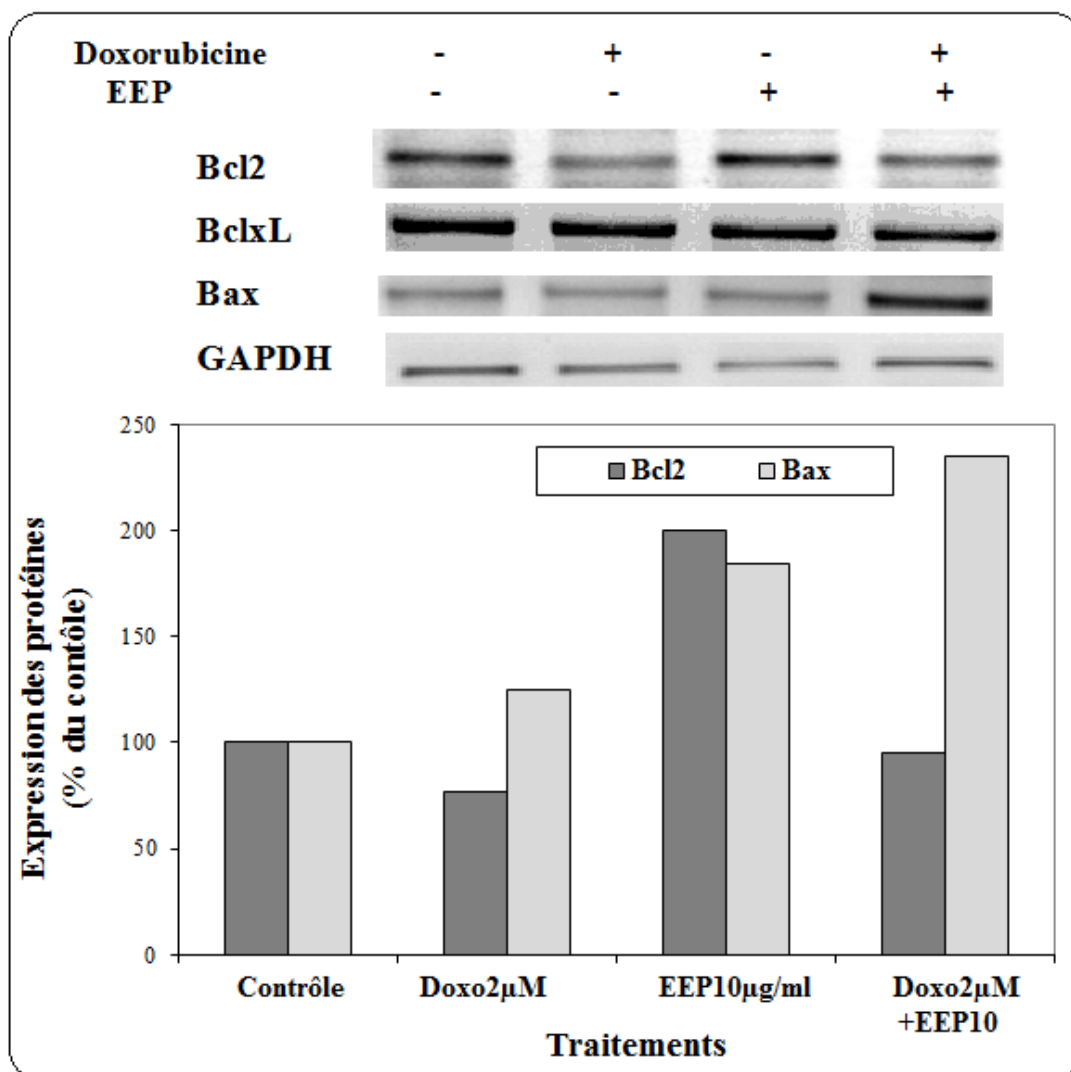


Figure 58: Expressions génétiques de Bcl2, BclxL, Bax dans la lignée cellulaire B16F1 après traitement par la doxo (2µM) seule, l'EEP seul (10µg/mL) ou combinés après une incubation de 6h.

La figure 58 montre les bandes caractéristiques sur gel d'agarose 1,5% des produits de PCR classique des gènes Bcl2, BclxL et Bax comparés au gène de référence GAPDH. Les quantifications des densités des bandes pour chaque gène est rapportée au gène de référence GAPDH.

Il apparaît que l'EEP induit une augmentation de l'expression de Bcl2 contre une diminution de cette expression par la doxorubicine. Une diminution de cette expression est observée par le traitement combiné.

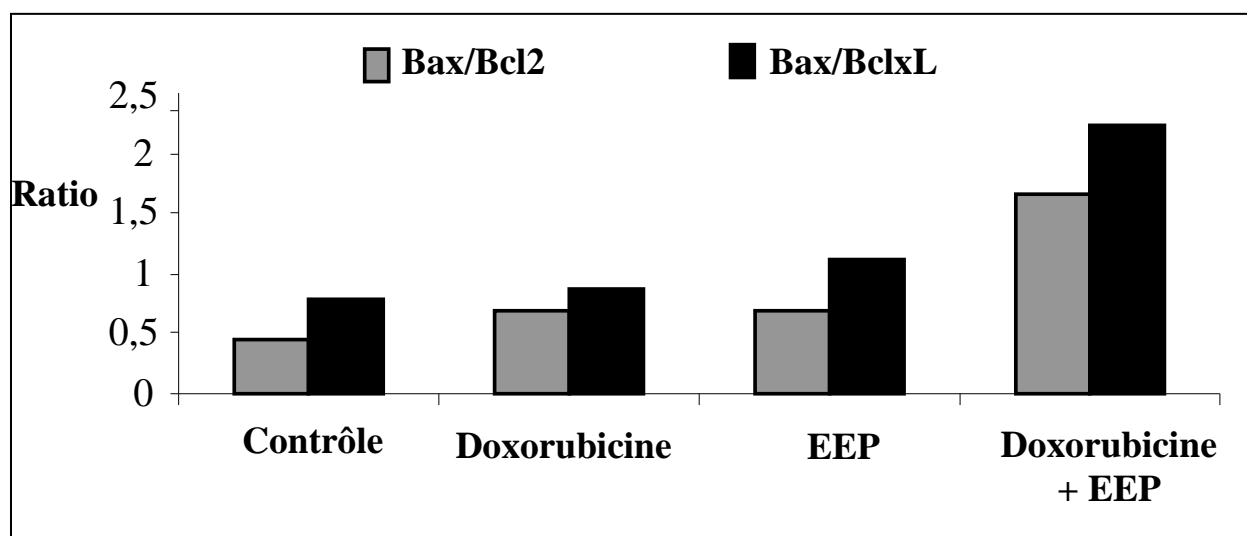


Figure 59 : Rapports pro versus anti- apoptotique des expressions géniques

L'expression génique de BclxL n'est pas affectée par les différents traitements. En revanche l'expression du gène Bax pro apoptotique semble augmentée par le traitement combiné.

Le calcul des ratio pro-versus anti-apoptotiques (figure 59) montrent une augmentation dans le traitement combiné vérifiant ainsi l'effet pro-apoptotique de ce traitement sur cette lignée le mélanome murin.

3- DISCUSSION

I. Activité Antioxydante de l'Extrait Ethanolique de Propolis contre le Stress Oxydatif induit par la Doxorubicine

Plusieurs agents endogènes ou exogènes peuvent provoquer l'état de stress oxydatif. C'est un syndrome au cours duquel les éléments prooxydants dépassent la capacité antioxydante de l'organisme. Il en résulte un déséquilibre entre prooxydants et antioxydants (Temple, 2000). Le métabolisme des médicaments anticancéreux constitue un facteur exogène type conduisant à ces déséquilibre à différents niveaux de l'organisme par la production des espèces réactives de l'oxygène (Coogh *et al.*, 1990).

Il est clairement admis aujourd'hui que le métabolisme de la doxorubicine par le cytochrome P450 génère des métabolites réactifs, ces derniers vont attaquer les constituants cellulaires. La conséquence est la perte de fluidité membranaire, la destruction de la microarchitecture membranaire, la peroxydation lipidique et l'augmentation des niveaux de malondialdéhyde. De plus, ce médicament appartient à la famille des anthracyclines qui présentent une forte affinité pour les phospholipides chargés négativement.

Les mitochondries sont abondantes dans les cardiomyocytes et peuvent prendre jusqu'à 35% du volume de la cellule. Les cellules cardiaques comptent sur l'ATP pour maintenir la fonction contractile et toute atteinte à l'intégrité structurelle ou fonctionnelle des mitochondries est susceptible de causer une toxicité sélective pour le coeur (Wallace, 2007). Par conséquent, les mitochondries ont été considérés comme étant les principales cibles de la cardiotoxicité de la doxorubicine (Wallace, 2007 ; Lebrecht *et al.*, 2005).

Des études ont rapporté que les métabolites réactifs aglycone issus de la biotransformation de la doxorubicine peuvent s'accumuler dans la membrane mitochondriale interne où ils interfèrent avec les transporteurs d'électrons de la chaîne respiratoire et sont de ce fait la cause première de la libération du cytochrome *c* (Clementi *et al.*, 2003). D'autre part, il a été montré *in vitro* que la doxorubicine inhibait l'accumulation du calcium par des mitochondrie isolées de cellules cardiaques (Solem *et al.*, 1996). Il est largement admis que la doxorubicine interfère avec la respiration mitochondriale à plusieurs niveaux de la chaîne de transport d'électrons et ce en déviant les électrons du complexe I de la chaîne respiratoire pour générer des radicaux libres semiquinone, initier un cycle d'oxydo-réduction conduisant à une stimulation de la production de ROS (Davies et Doroshov, 1986 ; Doroshov et Davies, 1986 ; Nohl *et al.*, 1986). La cardiotoxicité de la doxorubicine est dose-dépendante, à savoir une faible concentration de doxorubicine sélectivement provoque des dommages sur la

NADH déshydrogénase par une augmentation du stress oxydatif, tandis qu'à forte concentration de doxorubicine, une inactivation non-oxydante des complexes et de la chaîne respiratoire est induite par la formation d'un complexe de cardiolipine-doxorubicine (Bergh, 2003 ; Berthiaume et Wallace, 2007).

La chaîne respiratoire mitochondriale produit en permanence ces entités qui sont potentiellement toxiques pour l'organisme, car elles peuvent inactiver les protéines, induire des dommages au sein de l'ADN et initier les processus de la peroxydation lipidique (Pincemail, 1996). Des études sur des myoblastes (H9c2) en culture utilisé comme modèle *in vitro* pour étudier les altérations biochimiques induites par la doxorubicine sur les cardiomyocytes ont permis d'évaluer les modifications morphologiques cellulaires induites par ce traitement, s'agissant essentiellement des signes de l'atteinte mitochondriale dont la dépolarisation mitochondriale et de la fragmentation, bourgeonnement de la membrane avec des changements de morphologie de la cellule et pour des concentrations plus élevées en doxorubicine, des modifications plus profondes sont mise en évidence, y compris le gonflement nucléaire avec une perturbation de la structure de la membrane nucléaire, un gonflement mitochondrial, et une vaste vacuolisation ce qui indique que la doxorubicine provoque des modifications morphologiques dans les structures des protéines et des lipides mitochondriaux, nucléaires, et dans les cellules fibreuses H9c2 (Sardão *et al.*, 2009).

Pour se protéger des effets cytotoxiques des radicaux libres, l'organisme a développé des systèmes de défenses qui permettent de contrôler et parfois de réguler la production des ROS. Dans ces systèmes de défenses, on inclut des composés antioxydants, vitamines C et vitamine E, le glutathion, principal antioxydant dans la cellule, les antioxydants enzymatiques, la SOD, la catalase et le glutathion S-transférase (Bacot, 2004).

La protection des fonctions mitochondriales représente le souci des recherches pharmacologiques actuelles, visant à protéger les tissus contre les effets délétères oxydatifs.

Afin de prévenir les maladies provoquées par les radicaux libres, de limiter leurs effets toxiques et de protéger les fonctions mitochondriales, différentes substances anti- oxydantes sont actuellement utilisées, le plus souvent d'origine naturelle, en particulier les flavonoïdes.

L'étude de la propolis a éveillé l'activité de nombreux chercheurs, car elle est riche en propriétés thérapeutiques, liées à la complexité des produits bioactifs entrant dans sa composition, on compte plus de 150 produits isolés à partir de la Propolis. La situation géographique, le climat de la région de collecte et la saison sont des facteurs influençant la composition chimique de ce complexe lui conférant un large spectre d'activités biologiques,

antibactérienne, antivirale, anti-inflammatoire, anticancéreuse et antifongique (Banskota *et al.*, 2001a; Burdock, 1998; Marcucci, 1995) et bien d'autres activités.

Le présent travail consacré en première partie à l'évaluation de l'activité antioxydante d'un extrait éthanolique de Propolis algérienne de la région de Jijel *in vivo* contre un stress oxydatif mitochondrial provoqué par le traitement par la Doxorubicine.

Il est clairement admis aujourd'hui que le métabolisme de la doxorubicine par le cytochrome P450 génère des métabolites réactifs, ces derniers vont attaquer les constituants cellulaires. La conséquence est la perte de fluidité membranaire, la destruction de la microarchitecture membranaire, la peroxydation lipidique et l'augmentation des niveaux de malondialdéhyde. De plus, ce médicament appartient à la famille des anthracyclines qui présentent une forte affinité pour les phospholipides chargés négativement.

Le pouvoir antioxydant de l'extrait éthanolique de propolis a été testé *in vitro* par le test au DPPH estimant la capacité de piégeage des radicaux libres. L'EEP utilisé à faible concentrations (10^{-4} g/ml) possède un effet scavenger comparable à des substances antioxydantes de référence telles que la vitamine E ou le flavonoïde quercétine.

Sur les mitochondries isolées, l'extrait de propolis induit une inhibition de la production de l'anion superoxyde. Nous avons observé cette inhibition *in vivo* sur les mitochondries hépatiques et cardiaques après traitement des animaux par la doxorubicine et la vinblastine. Ces derniers provoquent des altérations des fonctions mitochondriales observées par la diminution de la respiration et une augmentation du swelling avec une surproduction de l'anion superoxyde et une peroxydation lipidique sur les mitochondries cardiaques et hépatiques ces résultats corroborent ceux rapportés par Sardão et collaborateurs (2009).

L'action de l'extrait de propolis face à ces altérations oxydatives s'est avérée bénéfique en atténuant la toxicité induite par les médicaments. En effet, le traitement préventif par l'EEP a conduit à une restauration des fonctions mitochondriales. Sur les mesures effectuées nous avons observé une diminution dose dépendante de la génération de l'anion superoxyde par les mitochondries cardiaques, diminuant ainsi les effets délétères de ce radical nocif sur la morphologie et les fonctions physiologiques mitochondriales, ce résultat est soutenu par la restauration de la respiration mitochondriale et une inhibition du swelling chez les mitochondries cardiaques et hépatiques également diminuant ainsi l'hépatotoxicité des agents anticancéreux.

Les mesures des marqueurs enzymatiques et non enzymatique du système de détoxification a confirmé les capacités protectrices de l'EEP contre le stress oxydatif généré par les deux médicaments anticancéreux. Ces résultats démontrent que l'EEP a conduit à

l'induction de ces enzymes antioxydante telle que la Cu/Zn SOD et la Catalase d'une part et à l'augmentation de la réserve en GSH cellulaire participant ainsi à la neutralisation des radicaux libres générés lors du métabolisme des anticancéreux. La diminution de la peroxydation lipidique est observée sous l'effet de l'EEP conduisant ainsi à la protection des membranes cellulaires.

Ces résultats suggèrent une action préventive de l'extrait de propolis contre le stress oxydatif induit par la doxorubicine et la vinblastine au niveau cardiaque et hépatique.

Ces deux médicaments étant métabolisés au niveau du foie en intermédiaires radicalaires, tel que le radical semiquinone pour la doxorubicine, induisant ainsi une surproduction de l'anion superoxyde et une activation de la peroxydation lipidique membranaire conduisant ainsi à une fragilité cellulaire. Ces effets délétères sont contrecarrés par l'emploi des flavonoïdes contenus dans l'extrait de propolis, ces substances bioactives agissant comme antioxydante.

Cette étude montre que l'extrait de propolis peut être utilisé comme agent protecteur du potentiel membranaire mitochondrial arrêtant ainsi tout processus apoptotique lié à la surproduction de ROS au niveau cellulaire.

Le pouvoir antioxydant de l'EEP est imputable à sa riche composition en flavonoïdes, responsable du piégeage des ROS *in vitro* et *in vivo*. En effet, plusieurs études sur les flavonoïdes évoquent leur efficacité en tant qu'agents antioxydants (Khlebnikov, 2007 ; Wolf et Liu, 2008 ; Mercader *et al.*, 2008) et cette propriété revient à leur structure chimique exposant des radicaux intéressants (J o v a n o v i c , 1 9 9 4) .

II-Etude *in vivo* et *in vitro* des effets de la propolis sur la régression tumorale du mélanome

La prévention du cancer est encore un domaine en constante évolution qui se propage au-delà de la communauté médicale. Comme la population est de plus en plus consciente du danger de cancer, les gens cherchent à réduire leur risque de développer une tumeur. Bien que le principal facteur de risque de mélanome est l'exposition au soleil, en évitant les rayonnements UV, la prévention du cancer n'est pas totalement garantie (Lesage *et al.*, 2013). Outre l'exposition au soleil, il est bien admis que les chances de développer un cancer sont affectés par l'hygiène de vie, mais aussi à l'exposition à des facteurs environnementaux bien nocifs, s'agissant de xénobiotiques (polluants, médicament,...) dispersés dans la nature. Au cours des dernières années, un grand intérêt est porté aux substances naturelles dotées d'activités préventives contre les différents types de cancer. L'intérêt étant de consommer ces substances de manière régulière afin d'éviter le développement de tumeurs au sein de l'organisme.

Dans cette partie, nous nous sommes intéressés aux activités biologiques de l'Extrait Ethanolique de Propolis *in vivo* sur un modèle murin (souris C57BL6) cancéreux (Mélanome) encore non décrites à ce jour. Nous avons étudié les effets de l'EEP sur la progression tumorale en traitement préventif suivi par un traitement curatif à la doxorubicine (utilisé comme traitement de référence en clinique) ou en traitement curatif seul. Nous avons tenté d'élucider, sur les plans cellulaire et moléculaire, l'effet de l'EEP seul ou combiné à la doxorubicine par une étude *in vitro* sur des lignées cellulaires de mélanome murin et humain.

L'investigation de l'effet de l'EEP *in vivo* sur la prévention ou l'inhibition de la progression tumorale de mélanome primaire, a été réalisée sur plusieurs étapes, tant tissulaires, cellulaire ou moléculaires. La survie des animaux étant un facteur pronostique dans la validation de traitement anticancéreux, nous avons complété cette étude expérimentale le suivi des mortalités des animaux pour les différents traitements.

Nous avons démontré au cours de cette étude que l'extrait éthanolique de propolis algérienne avait *in vivo* des propriétés protectrices et curatives contre le mélanome primaire chez la souris C57BL/6, conduisant aussi à une augmentation de la survie des souris. Nous avons également pensé que l'extrait de propolis, lorsqu'il est utilisé comme traitement adjuvant,

pourrait améliorer l'efficacité de la chimiothérapie classique grâce à ses propriétés détoxifiantes. Par conséquent, cette étude montre que l'extrait éthanolique de propolis algérienne présente des effets bénéfiques contre la progression du mélanome.

Au cours de cette étude nous avons observé que la consommation de manière préventive de l'EEP a réduit la croissance tumorale de mélanome.

Des études épidémiologiques ont montré qu'une alimentation riche en fruits et légumes est associée à un moindre risque de développement du cancer colorectal. Des études récentes suggèrent que l'usage prolongé de certaines substances pourrait aussi prévenir l'apparition de polypes adénomateux et leur transformation maligne.

Nous avons trouvé dans la présente étude que la consommation régulière de propolis peut aider à réduire le risque de développement d'un mélanome primaire. Puis, comme beaucoup d'autres produits d'origine végétale à large consommation tels que la curcumine et le thé vert, la propolis pourraient être envisagées pour le développement de nouveaux agents chimiopréventifs (Lao *et al.*, 2006 ; Yusuf *et al.*, 2007).

L'action antitumorale de l'EEP a été mise en évidence *in vivo* sur les souris C57BL/6, pourrait être à l'origine de nombreuses propriétés biologiques telles que l'action immunomodulatrice. En effet, les premières études ont montré que l'administration à court terme de la propolis augmentait la réponse immunologique (Scheller *et al.*, 1988). Cette dernière a été prise en charge par une autre étude montrant que le traitement de 3 jours avec de la propolis augmentait l'activité cytotoxique des cellules NK contre le lymphome murin (Sforcin, 2007). L'activation des cellules NK pourrait résulter de la libération de cytokines comme le TNF- α et d'IL-12 par les macrophages lors de la stimulation par la propolis (Sforcin, 2007), alors que leur activité antitumorale pourrait exiger la chimiokine CXCL10 (Keyser *et al.*, 2004 ; Kawamata *et al.*, 2006; Antonicelli *et al.*, 2011; Hervieu *et al.*, 2013).

Parmi les traitements les plus utilisés dans le traitement du mélanome est citée la dacarbazine, très récemment, il a été montré que l'effet anti-tumoral de la dacarbazine est médié *via* une surexpression du ligand NKG2D chez les cellules tumorale de mélanome, conduisant à l'initiation de la réponse immunitaire par l'intermédiaire de l'activation des cellules NK (Hervieu *et al.*, 2013; Ugurel *et al.*, 2013). Cependant, si la propolis interfère directement sur la qualité des cellules de la réponse immunitaire et / ou sur l'expression de marqueurs moléculaires de mélanome. Ceci doit encore être élucidé.

L'extrait éthanolique de propolis a augmenté les effets bénéfiques de la doxorubicine sur la progression du mélanome. La plupart des tumeurs de mélanome sont résistantes au traitement du cancer communément utilisés tels que la radiothérapie et la chimiothérapie. Par conséquent, les patients atteints de mélanome ont encore un mauvais pronostic, avec des temps de survie médiane comprise entre 7 et 9 mois. Ce pauvre pronostic provient du fait que les agents chimiothérapeutiques classiques comme la dacarbazine, le témozolomide ou fotémustine seul ou en combinaison ont une action limitée (Jilaveanu *et al.*, 2009 ; Garbe *et al.*, 2010; Chartrain *et al.*, 2012) et jusqu'à présent ont peu d'impact sur la survie globale.

Dans ce contexte, nous avons démontré que combinée avec la doxorubicine, la propolis objectivement augmentait le taux de survie des souris porteuses de mélanome par rapport au traitement par la doxorubicine seule ou aux souris contrôles. Cependant, un tel traitement combiné n'a pas réduit la charge tumorale par rapport à un traitement par la doxorubicine seule, ce qui suggère que les effets biologiques de propolis sur la durée de vie diffèrent de ses propriétés anti-tumorales. À côté des effets bénéfiques, les questions de chimiothérapie sont souvent entravées par les effets secondaires délétères des médicaments administrés. Bien que les effets indésirables dépendent du type d'agents antinéoplasiques utilisés, la doxorubicine, comme la plupart des médicaments de chimiothérapie libère des produits de dégradation qui endommagent les cellules normales menant à une cardiotoxicité ou une hépatotoxicité. Nous avons démontré au cours de la première partie de ce travail que l'extrait éthanolique de la Propolis algérienne protégeait le cœur et les tissus du foie contre le stress oxydatif inhérent à un traitement par la doxorubicine et la vinblastine *in vivo*. Les effets protecteurs ont ensuite été attribués aux fractions polyphénoliques de la propolis algérienne, qui a également restauré la fonction rénale chez les animaux traités à la doxorubicine (Alyane *et al.*, 2008; Boutabet *et al.*, 2010).

En effet, l'analyse chimique de la propolis méditerranéenne algérienne de la région de Jijel a révélé que les flavonoïdes sont la composante principale responsable des effets protecteurs contre stress oxydatif induit par la doxorubicine (Boutabet *et al.*, 2010). Il convient de noter ici que nous confirmons nos résultats précédents montrant un effet bénéfique de cette propolis combinée avec la doxorubicine illustrant une reproductibilité de ses activités pharmacologiques (Alyane *et al.*, 2008; Boutabet *et al.*, 2010).

Le mécanisme par lequel le produit naturel propolis agirait en améliorant la survie des souris traitées par la doxorubicine est liée à sa propriété antioxydante induisant une réduction significative du stress oxydatif mitochondrial et des cascades de signalisation associés tels que NF- κ B qui a été en grande partie associés à la progression du cancer , incluant le mélanome (Schön *et al.*, 2008).

Les résultats de cette étude montrent fortement l'efficacité du traitement combiné doxorubicine/propolis. ceci montre clairement que la toxicité liée à la doxorubicine, administrée en monothérapie, est pallié par la supplémentation en Propolis.

L'EEP administré en une seule thérapie à visée curative prolongeait la survie des souris. Malgré la détection précoce des mélanomes principalement à progression horizontale et leur taux de survie améliorés observés dans plusieurs pays, le taux de survie est restée très faible pour les mélanomes à progression verticale (Grange *et al.*, 2012). A cet égard, n'importe quel médicament capable de réduire la croissance tumorale serait donc intéressant. Nous avons constaté que la propolis administrée en traitement curatif après l'apparition de la tumeur primaire de mélanome, induit une réduction de la prolifération des cellules tumorales *in vivo* conduisant à une augmentation de la durée de vie de ces souris traitées. En outre, une diminution significative de la croissance tumorale *in vivo* représentée par une diminution du volume tumoral , une diminution du taux de croissance spécifique et une augmentation de plus de deux tiers du temps de doublement des cellules au sein de la tumeur, ainsi qu'une diminution de l'invasivité des cellules tumorales *ex vivo* réalisée en chambre de Boyden modifiée, une propriété très importante, car la métastase est un facteur prédictif significatif de la progression maligne du mélanome.

Le traitement par l'EEP a conduit à une diminution des propriétés invasives des cellules tumorale, une diminution dans la formation de néovaisseaux et leur taux de survie a été amélioré. Ensuite, en réduisant l'indice mitotique, la propolis contribue à limiter à la fois la croissance des tumeurs de mélanome et par la suite la diffusion de cellules de mélanome, tout en diminuant les caractéristiques dynamiques de pronostic de mélanome. Une étude récente a montré que pour les patients atteints de mélanome de stade III le nombre de métastases ganglionnaires, l'âge du patient, ulcération, et le taux mitotique étaient quatre variables indépendantes associées à la survie des patients (Balch *et al.*, 2013). Selon ces auteurs, plus les tumeurs étaient épaisses plus le nombre de mitose intratumorales étaient élevé, tandis que d'autres ont montré que le taux d'épaisseur du mélanomes augmentait avec le vieillissement (Nikolaou *et al.*, 2014).

L'analyse histologique des tumeurs primaires excisées des souris traitées par l'EEP n'a révélé aucun changement dans le phénotype des cellules tumorales, le nombre de cellules nécrotiques et l'infiltrat immunitaire dans la tumeur ou dans son voisinage immédiat (données non présentées). Néanmoins, en cas de traitement par la propolis, les souris ont montré une inhibition plus efficace de la croissance des cellules de mélanome, représentée par une diminution significative de l'index mitotique et de l'index Ki-67 principaux marqueurs cellulaire et moléculaire de la croissance tumorale et du degré d'agressivité cancéreuse.

La perturbation dans la progression du cycle cellulaire sous l'effet du traitement par l'EEP démontre que ce dernier provoque un arrêt du cycle cellulaire, la diminution significative du nombre de cellules en mitose par rapport aux souris contrôles confirme cette hypothèse. L'expression de la protéine nucléaire Ki-67 au sein des cellules prolifératives, en phase G1, S, G2 et M vient étayer cette voie. En effet, cette protéine non histone ou antigène Ki-67 n'est pas détecté dans des cellules quiescentes ou en phase G0, mais sa présence peut être mise en évidence au cours des différentes phases du cycle cellulaire. Avec une augmentation de son expression à la phase G1 à la phase M et atteint un maximum dès la fin de la phase S (Seigneurin *et al.*, 1991), soit lors des phases G2 et M (Landberg *et al.*, 1991 ; Sawhney *et al.*, 1992). Sa quantité est de toute façon maximale en début de mitose pour décroître ensuite.

La signalisation moléculaire régulant la traversée du cycle cellulaire comprend des Signaux mitogéniques moléculaires. Les CDKs sont connues pour être des complexes enzymatiques et régulateurs clé de la progression du cycle cellulaire. L'altération ou le dérèglement de l'activité des CDKs sont des caractéristiques du tissu néoplasique. Un certain nombre de cancer sont associés à une hyperactivation des CDKs résultant de mutations des gènes ou des inhibiteurs des CDKs, Cependant, leurs inhibiteurs et les modulateurs sont d'un grand intérêt pour l'exploration de nouvelles cibles thérapeutiques du cancer (Senderowicz, 1999, Senderowicz, 2001).

Les flavonoïdes peuvent avoir un effet anticarcinogénique en perturbant la progression du cycle cellulaire ? Les points de contrôles du cycle cellulaire à la phase G1/S et G2/M chez les cellules cancéreuses en culture ont été perturbés par le traitement aux flavonoïdes tels que la silymarine, la génistéine, la quercétine, la daidzéine, la lutéoline, le kaempférol, l'apigénine, l'épigallocatechine et 3 gallate (Zi *et al.*, 1999 ; Choi *et al.*, 2001). Des études issues de différents laboratoires de recherche ont révélé que le flavopiridol pourrait induire l'arrêt du cycle cellulaire au cours de des phases G1 ou G2 / M par l'inhibition des CDK (Wang, 2000 ; Senderowicz, 1999).

L'extrait éthanolique de propolis algérienne montre plusieurs propriétés biologiques prometteuses qui pourraient être d'intérêt dans le traitement du cancer. Un aspect qui devrait clairement être noté est que les variétés dans les propriétés biologiques publiées au cours des dernières décennies pourraient découler de la composition chimique de la propolis testés, comme les constituants actifs dépendent des caractéristiques géographiques et botaniques de la région de la propolis récoltée (Ghisalberti, 1979 ; Ugur & Arslan, 2004 ; Hernandez *et al.*, 2007). Il est proposé que les constituants les plus pharmacologiquement actifs de la propolis sont les flavonoïdes avec un large spectre d'activités biologiques qui varient avec leur composition chimique (Wagh, 2013). En outre, nous et d'autres avons montré l'importance de l'acide caféique et ses dérivés (CAPE), entre autres produits, pour les effets antioxydant, anticancéreux, immunomodulateur, et anti-inflammatoires de la propolis (Nardini *et al.*, 2001; Nagaoka *et al.*, 2002 ; Orsolić *et al.*, 2006; Salomão *et al.*, 2008; Segueni *et al.*, 2011). Notamment, la modulation des activités de métalloprotéases matricielles (Segueni *et al.*, 2011), une famille d'enzymes largement impliqués dans la progression du mélanome (Ntayi *et al.*, 2004; Hornebeck *et al.*, 2005; Debret *et al.*, 2006, Antonicelli *et al.*, 2012).

Sur le plan moléculaire, nous avons investigué les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la régression de la progression tumorale liée au traitement par l'EEP, pour cela nous avons noté que tout comme pour les cellules tumorales de mélanome primaire, l'EEP conduit *in vitro* à une diminution de la prolifération cellulaire de deux lignées cellulaires de mélanome cutané murine (B16F1) et humaine (SKmel28) ce qui est en accord avec d'autres travaux impliquant l'effet anti prolifératif et cytotoxique des flavonoïdes sur plusieurs lignées cellulaires cancéreuses (Ren *et al.*, 2003).

La prolifération cellulaire dérégulée semble être une caractéristique de la sensibilité à la néoplasie. La prévention du cancer est généralement associée à l'inhibition, la réversion ou un retard de hyperprolifération cellulaire. La plupart des flavonoïdes ont été démontrés pour inhiber la prolifération de nombreux types de lignées cellulaires de cancer humain, alors qu'ils étaient peu ou pas toxiques pour les cellules humaines normales (Pouget *et al.*, 2001 ; Wenzel *et al.*, 2000).

Le mécanisme moléculaire anti-prolifératif peut entraîner l'inhibition du processus pro-oxydant qui cause l'apparition de tumeurs. Il est généralement admis que la formation des espèces réactives de l'oxygène (ROS) est importante pour la promotion et la progression tumorale, étapes qui suivent la phase d'initiation (activation métabolique cancérogène aux agents mutagènes). Les enzymes pro-oxydantes sont induites ou activées par différents

promoteurs tumoraux telles que les enzymes du métabolisme de l'acide arachidonique, les cyclooxygénases (COX), et les lipoxygénases (LOX). Les flavonoïdes sont particulièrement efficaces pour l'inhibition de la xanthine oxydase (Chang *et al.*, 1993) COX ou LOX (Mutoh *et al.*, 2000) et donc peuvent inhiber la prolifération des cellules tumorales. En outre, l'inhibition de la biosynthèse des polyamines peut être un mécanisme contribuant à l'activité antiproliférative de flavonoïdes. L'ornithine-décarboxylase est une enzyme limitant la vitesse dans la biosynthèse des polyamines, qui a été corrélée avec le taux de synthèse d'ADN cellulaire et prolifération dans plusieurs tissus. Plusieurs expériences ont montré que les flavonoïdes peuvent inhiber l'ornithine-décarboxylase induite par des promoteurs de tumeurs, et par conséquent entraîner une diminution ultérieure de la polyamine et de l'inhibition de la synthèse d'ADN et des protéines (Tanaka *et al.*, 1997).

Au cours de l'étude *in vitro*, nous avons investigué l'implication du processus apoptotique dans l'efficacité cytotoxique de l'EEP sur les lignées cellulaires de mélanomes murine et humaine, l'EEP s'est révélé avoir une action pro-apoptotique en induisant une diminution de l'expression de la pro-CASPASE -3 accompagnée du clivage de PARP. Ajouté à cela l'expression génique des protéines de la famille Bcl-2 qui montrés un rapport pro versus anti apoptotique plus élevé en présence du traitement combiné entre la doxorubicine et l'EEP justifiant un effet synergique des deux substances.

Dans ce contexte, des études ont montrés que les flavonoïdes peuvent induire l'apoptose dans certaines lignées cellulaires tout en épargnant les cellules normales. Les mécanismes moléculaires par lesquels les flavonoïdes induisent l'apoptose ne sont pas encore claires. Plusieurs mécanismes peuvent être impliqués, y compris l'inhibition de l'activité de l'ADN topoisomérase I / II (Wang *et al.*, 1999 ; Markovits *et al.*, 1989), la régulation de l'expression des protéines de choc thermique (Rong *et al.*, 2000). La modulation des voies de signalisation cellulaires (Yin *et al.*, 1999) et la diminution des espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Lee *et al.*, 2002) ce qui est connu pour ce types de substances.

Les mécanismes liés aux acteurs de l'apoptose sont rapportés pour certains flavonoïdes, libération de cytochrome c avec en suite l'activation de la caspase-9 et 3 et la diminution de l'expression de Bcl-2 et Bcl-X (L), mais une augmentation de l'expression de Bax et Bak, du facteur de transcription nucléaire kappa B (NF-kappa B), l'activation de l'endonucléase, et la suppression de la protéine Mcl-1 (Wenzel *et al.*, 2000 ; Iwashita *et al.*, 2000),

Les propriétés anticancéreuses significatives observées sur les flavonoïdes sont dues à l'apoptose (Yin *et al.*, 1999 ; Sakagami *et al.*, 2000 ; Wenzel *et al.*, 2000). L'apoptose est étroitement régulée par un ensemble de gènes qui, soit favorisent l'apoptose ou la promotion de la survie cellulaire, et est médiée par l'intermédiaire d'un réseau organisé interagissant fortement avec les protéases et leurs inhibiteurs, en réponse à des stimuli nocifs à l'intérieur ou à l'extérieur de la cellule. Le dérèglement de l'apoptose pourrait jouer un rôle crucial dans l'oncogenèse. Une série d'études récentes a démontré que la plupart, sinon la totalité, des agents chimiothérapeutiques exercent leurs effets tumoricides par induction de l'apoptose dans des cellules et des tissus cibles. Les flavonoïdes se sont avérés des inducteurs de l'apoptose dans des lignées cellulaires de cancer, tout en épargnant les cellules normales.

Les mécanismes moléculaires par lesquels les flavonoïdes induisent l'apoptose n'ont pas encore été clarifié. Plusieurs mécanismes peuvent être impliqués, y compris l'inhibition de l'activité de l'ADN topo-isomérase I / II (Wang *et al.*, 1999), diminution des espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Lee *et al.*, 2002), la régulation de l'expression des HSP (Heat Shock Proteins) (Rong *et al.*, 2000), modulation des voies de signalisation (Yin *et al.*, 1999), libération du cytochrome *c* avec une activation subséquente de la caspase-9 et de la caspase-3 et une régulation à la baisse de Bcl-2 et Bcl-X (L), mais une induction de l'expression de de Bax et Bak, et du facteur de transcription nucléaire kappa B (NF-kB), l'activation de l'endonucléase, et la suppression de l'expression de la protéine Mcl-1 (Iwashita *et al.*, 2000 ; Wenzel *et al.*, 2000 ; Lee *et al.*, 2002).

Nous avons montré quelques effets biologiques et biochimiques de l'extrait éthanolique de propolis algérienne sur un modèle pathologique de cancer primaire (mélanome cutané). Cet extrait a exposé des effets pro-apoptotiques, antiprolifératif, anti-angiogénique, anti-invasif, et bien plus important la prolongation du temps de survie des animaux. Les mécanismes proposés pour l'explication de ces activités anti-cancéreuses reviennent à la composition flavonoidique de cet extrait. Ces substances retrouvées dans l'alimentation sont connues pour être d'excellents antioxydants naturels (Kandaswami & Middleton, 1994). Ils peuvent être des agents anticancéreux grâce la limitation des réactions d'oxydation pouvant endommager les cellules qui peuvent devenir par la suite cancéreuses. Les radicaux libres oxygénés semblent avoir la disposition à initier ainsi que promouvoir la carcinogenèse. Les produits de peroxydation des lipides provenant de cellules en apoptose pourraient également exercer une oxydation pouvant déclencher une carcinogénèse. (Halliwell & Gutteridge, 1990).

L'oxydation de l'ADN est susceptible d'être une cause importante de mutations qui peuvent potentiellement être réduites par des agents antioxydants (Duthie & Dobson, 1999).

Spitz et ses collègues ont confirmé que la production de l'anion superoxyde est augmentée chez un certain nombre de lignées cellulaires de cancer, et ont démontré que la plupart de ces superoxyde est d'origine mitochondriale (Aykin-Burns *et al.*, 2009). Dans ce même contexte, des chercheurs ont découvert au cours d'une thérapie à l'acide ascorbique que les cellules de mésothéliome (cancer du poumon) généraient plus d'anion superoxyde que les cellules mésothéliales normales. Ils ont donc émis l'hypothèse que la réaction de Haber-Weiss, dans laquelle le peroxyde d'hydrogène généré dans le milieu extracellulaire interagirait avec le superoxyde produit dans les cellules cancéreuses afin de générer des radicaux hydroxyles, médiateur clé de l'effet létal de l'exposition à l'ascorbate sur les cellules cancéreuses. Ce modèle est en accord avec un précédent rapport, que le prétraitement des cellules cancéreuses avec un chélateur de fer, la déféroxamine protégeait ces cellules de l'exposition de l'ascorbate ultérieure (Mc Carty *et al.*, 2007); le fer est bien sûr un catalyseur pour la réaction de Haber-Weiss. La sensibilité sélective de nombreuses lignées cellulaires de cancer à certains traitements anti-oxydants connus tels que la vitamine C reflète, dans une large mesure, la tendance de ces cancers à générer à une vitesse accrue l'anion superoxyde mais accompagnée dans certains, mais pas tous les cas, par une déficience dans les activités enzymatiques de la superoxyde dismutase et / ou peroxydases (McCarty et Contreras, 2014) .

Les flavonoïdes sont chimiquement des donneurs d'électron. Leur structure chimique en tant que dérivés cycliques conjugués chargés de groupes hydroxyle leur confère le potentiel antioxydant *in vitro* sur des cellules en culture par exemple, piégeant l'anion superoxyde, l'oxygène singulet, les peroxydes radicaux lipidiques et / ou des radicaux libres de stabilisation impliquées dans les processus d'oxydation par hydrogénation ou complexant avec des espèces oxydantes. Les études *in vitro* sont en mesure de démontrer pour les flavonols, les flavones, et pour les anthocyanes une activité antioxydante considérable, principalement basée sur le piégeage des radicaux libres oxygénés (effet scavenger) (Duthie et Dobson, 1999).

Il faut noter que les effets protecteurs de l' extrait de propolis contre la progression du mélanome ont été révélés lors de l'administration à distance de la tumeur (située dans le flanc gauche de la souris) par injection intrapéritonéale. Ces effets étaient similaires avec de la propolis donnée soit à titre préventif ou en curatif, ce qui suggère que les molécules impliquées doivent avoir une longue demi- vie, qui est d'intérêt pharmaceutique. Cependant, si l'activité anti-proliférative et les effets de détoxification ont été attribués à des éléments isolés ou à l'interaction de plusieurs molécules à action synergique peut-être encore investigué.

4- CONCLUSION

ET

PERSPECTIVES

Au cours de la première partie de notre étude, nous avons mis en évidence l'activité antioxydante de l'extrait éthanolique propolis algérienne de la région de Jijel. Ainsi, nous avons montré *in vitro* et *in vivo* le pouvoir scavenger de cet extrait et son activité protectrice de la morphologie et des fonctions physiologiques des mitochondries hépatique et cardiaques face au stress oxydatif induit par le traitement par des médicaments anti-cancéreux tel que la doxorubicine et la vinblastine connues pour leur caractère hautement pro-oxydant.

L'ensemble des résultats nous a confirmé l'effet protecteur de l'EEP des tissus cardiaque et hépatique chez le rat contre la toxicité induite par la doxorubicine et ce par la préservation de l'intégrité mitochondriale. Cet effet revient à la composition flavonoïdique de ce complexe apicole.

La deuxième partie de notre travail s'est intéressée à l'effet de l'EEP sur la progression tumorale *in vivo*, pour cela, nous avons utilisé un modèle expérimental de cancer de la peau, le mélanome primaire. Nous avons utilisé les cellules B16F1 pour induire le mélanome primaire chez la souris syngénique C57BL/6. Sous différents protocoles de traitements (préventif, curatif ou préventif-curatif), l'EEP a montré une inhibition de la progression tumorale exprimées par la diminution de la croissance tumorale. Les mesures réalisées dans ce but sont portées sur le volume tumoral, le calcul du taux de croissance spécifique et du temps de dédoublement cellulaire au cours de l'étude.

Nous avons ensuite tenté d'expliquer ce retard de la progression tumorale sous l'effet du traitement par l'EEP seul ou combiné avec un anticancéreux de référence largement évoqué au cours de travail, la doxorubicine. Pour cela une étude *ex vivo* a permis une étude comparative des tissus tumoraux excisées issues des souris recevant les différents traitements.

Nous avons montré au cours de cette étude histologique et immunohistochimique que l'EEP agirait au niveau du cycle de prolifération cellulaire, la détermination de l'index mitotique et l'index Ki-67 (immunomarquage nucléaire) on confirmé que le retard de la progression tumorale est imputable à un arrêt du cycle cellulaire. Nous pourrions compléter cette étude par la vérification de l'expression des Cdk-4 ou Cdk-6 intervenant dans l'étape clé du cycle cellulaire ainsi que celle du complexe cycline Cdk-2, nécessaire et suffisant pour entrer en phase S du cycle cellulaire.

Nous avons aussi montré que la néovascularisation intratumorale est réduite voire inhibée dans les tumeurs issues des souris traitées par l'EEP proposant cde ce faite un effet anti-angiogénique de la propolis, dans cette visée, nous pourrons complétée cette étude par la vérification de l'expression, au sein des tumeurs, de l'un des facteurs inducteurs de l'angiogénèse tumorale tels que le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor).

Nous avons mis en évidence, par les cultures primaires *in vitro* des cellules tumorales, un retard dans la prolifération cellulaire sous l'effet du traitement par l'EEP, expliquant sur le plan cellulaire, le retard dans la progression tumorale.

L'exploration du caractère invasif des cellules tumorales de mélanome a permis de mettre en évidence *in vitro* sur un modèle expérimentale de l'invasion cellulaire, une inhibition de l'invasion tumorale acquise au cours du traitement par l'EEP. Plusieurs mécanismes moléculaires sont impliqués dans l'invasion cellulaire cancéreuses, nous pourrons dans le future mettre en évidence l'expression des métalloprotéinases matricielles MMP-2 et 9 impliquées dans le phénotype invasif des tumeurs.

Dans une autre étape du présent travail, nous avons mis en évidence l'effet anti-prolifératif l'EEP et pro-apoptotique de l'EEP sur deux lignées cellulaires de mélanome humaine (SKmel28) et murine (B16F1) en explorant les protéines clés des voies de l'apoptose expliquant ainsi les résultats de viabilité de ces cellules et montrant l'implication de la voie

Dans cette étude, nous avons établi le fait que l'extrait éthanolique de propolis algérienne naturelles a affiché des propriétés anti-tumorales et réduit la morbidité liée aux effets néfastes de la doxorubicine. Pour démontrer davantage ces résultats prometteurs pré-cliniques *in vivo* sur la progression du mélanome, et donc de savoir si la propolis algérienne pourraient apporter une contribution alternative pour les patients atteints de mélanome, il serait intéressant de profiter des avantages de l'intérêt de combiner la propolis avec de nouvelles thérapies pour mélanome tels que les inhibiteurs de BRAF ou MAPK ou même avec PD- 1 anticorps bloquants.

RÉFÉRENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

A

- Abraha HD, Fuller LC, Du Vivier AW & Higgins EM, Sherwood RA. Serum S-100 protein: a potentially useful prognostic marker in cutaneous melanoma. *Br J Dermatol* (1997), **137** (3) : 381-385.
- Agarwal R. Cell signaling and regulators of cell cycle as molecular targets for prostate cancer prevention by dietary agents. *Biochem Pharmacol* (2000), **60**:1051–1059.
- Agarwala SS, Kirwood JM, Gore M, Dreno B, Thatcher N, Czarnetski B, Atkins M, Buzaid A, Skarlos D & Rankin EM. Temozolomide for the treatment of brain metastases associated with metastatic melanoma: a phase II study. *J Clin Oncol* (2004), **22**: 2101-2107.
- Akagi K, Hirose M, Hoshiya T, Mizoguchi Y, Ito N & Shirai T. Modulating effects of ellagic acid, vanillin and quercetin in a rat medium term multi-organ carcinogenesis model. *Cancer Lett* (1995), **94**:113–121.
- Alba E, Ribelles N, Anton A, Perez-Carrion R, Lopez-Vega JM, Llanos M, et al. Sequential doxorubicin and docetaxel as first-line treatment in metastatic breast cancer: A GEICAM-9801 Phase II Study. *Breast Cancer Res Treat* (2003), **77**:1–8.
- Almeida ECD & Menezes H. Anti-inflammatory activity of propolis extracts: a review. *Journal of Venomous Animals and Toxins* (2002), **8** : 191–212.
- Alyane M, Benguedouar L, Kebsa W, Boussenane HN, Rouibah H & Lahouel M. Cardioprotective effect and mechanism of action of polyphenols extracted from Propolis against Doxorubicin toxicity. *Pak. J. Pharm. Sci.* (2008), **21**(3):201-209.
- AICR American Institute for Cancer Research? Skin Cancer: How diet, nutrition and physical activity affect skin cancer risk
- Ancerewicz J, Migliavacca E, Carrupt PA, Testa B, Brée F, Zini R, Tillement JP, Labidalle S, Guyot D, Chauvet-Monges AM, Crevat A & Le Ridant A. Structure-property relationships of trimetazidine derivatives and model compounds as potential antioxidants. *Free Radic Biol Med.*(1998), **1;25**(1):113-20.
- Andreassi L, Flori ML & Rubegni P. Sun and skin. Role of phototype and skin colour. *Adv Exp Med Biol* (1999), **455** : 469-475.
- Antolovich M, Prenzler PD, Patsalides E, McDonald S & Robards K. Methods for testing antioxidant activity. *Analyst* (2002), **127**: 183-198.
- Antonicelli F, Lorin J, Kurdykowski S, Gangloff SC, Le Naour R, Sallenave JM, Hornebeck W, Grange F & Bernard P. CXCL10 reduces melanoma proliferation and invasiveness *in vitro* and *in vivo*. *Br J Dermatol* (2011), **164**: 720–728.
- Antonicelli F, Valleran D, Trussardi-Renier A, Grange F, Hornebeck W & Bernard P. Regulation of MMPs during melanoma progression: from genetic to epigenetic. *Anticancer Agents Med Chem* (2012), **12**: 773–82.
- Antonsson B, Conti F, Ciavatta A, Montessuit S, Lewis S, Martinou I, Bernasconi L, Bernard A, Mermod JJ, Mazzei G, Maundrell K, Gambale F, Sadoul R & Martinou JC. Inhibition of Bax channel-forming activity by Bcl-2. *Science* (1997), **277**:370-72.
- Aparecida Lima de Moura IS, Negri G, Salatino A, Dias da Cunha Lima L, Pereira Antunes Dourado L, Barros Mendes J, Passos Andrade S, Alves Neves Diniz Ferreira M & Carmona Cara D. Aqueous

Extract of Brazilian Green Propolis: Primary Components, Evaluation of Inflammation and Wound Healing by Using Subcutaneous Implanted Sponges. *eCAM* (2009), pp1-9.

Armstrong JS. Mitochondrial membrane permeabilization: the sine qua non for cell death. *Bioessays* (2006), **28**: 253-60.

Atallah E & Flaherty L. Treatment of metastatic melanoma. *Curr Treat Options Oncol* (2005), **6**: 185-193.

Cushman M, Nagarathnam D. Cytotoxicities of some flavonoid analogues. *J Nat Prod* 1991;54:1656–1660.

Aykin-Burns N, Ahmad IM, Zhu Y, Oberley LW & Spitz DR. Increased levels of superoxide and H₂O₂ mediate the differential susceptibility of cancer cells versus normal cells to glucose deprivation. *Biochem J* (2009) **418**(1):29–37.

B

Babior BM, Lambeth JD & Nauseef W. The neutrophil NADPH oxidase. *Arch Biochem Biophys* (2002), **15**;397(2):342-4.

Bai F, Matsui T, Ohtani-Fujita N, Matsukawa Y, Ding Y & Sakai T. Promoter activation and following induction of the p21/WAF1 gene by flavone is involved in G1 phase arrest in A549 lung adenocarcinoma cells. *FEBS Lett* (1998), **437**:61–64.

Baisch H & Gerdes J. Simultaneous staining of exponentially growing versus plateau phase cells with the proliferation-associated antibody Ki-67 and propidium iodide: analysis by flow cytometry. *Cell Tissue Kinet.* (1987), **20**(4) :387-91.

Balasubramanian S & Govindasamy S. Inhibitory effect of dietary flavonol quercetin on 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced hamster buccal pouch carcinogenesis. *Carcinogenesis* (1996), **17**: 877–879.

Balch CM, Thompson JF, Gershenwald JE, Soong SJ, Ding S, McMasters KM, Coit DG, Eggermont AM, Gimotty PA, Johnson TM, Kirkwood JM, Leong SP, Ross MI, Byrd DR, Cochran AJ, Mihm MC Jr, Morton DL, Atkins MB, Flaherty KT & Sondak VK. Age as a Prognostic Factor in Patients with Localized Melanoma and Regional Metastases. *Ann Surg Oncol* (2013), **20**(12) : 3961-3968.

Bartosz G. Generation of reactive oxygen species in biological systems. *Comments on Toxicology* (2003), **9**: 5-21.

Beauchamp C & Fridovich I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal Biochem* (1971), **44**(1):276-87.

Benzie IF & Strain J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: The FRAP assay. *Analytical Biochemistry* (1996), **239**: 70-76.

Berger G & Benjamin LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer* (2003), **6** : 401-410.

Bergh J. Best use of adjuvant systemic therapies II, chemotherapy aspects: dose of chemotherapycytotoxicity, duration and responsiveness. *Breast* (2003), **12**:529–537.

Berthiaume JM & Wallace KB. Adriamycin-induced oxidative mitochondrial cardiotoxicity. *Cell Biol Toxicol* (2007), **23**:15–25

Bhatia N & Agarwal R. Detrimental effect of cancer preventive phytochemicals silymarin, genistein and epigallocatechin 3-gallate on epigenetic events in human prostate carcinoma DU145 cells. *Prostate* (2001), **46**:98–107.

Blood CH & Zetter BR. Tumor interactions with the vasculature : angiogenesis and tumor metastasis. *Biochim Biophys Acta* (1990), **1032** : 89-118.

Borrelli F, Maffia P, Pinto L, Ianaro A, Russo A, Capasso F & Ialenti A. Phytochemical compounds involved in the anti-inflammatory effect of propolis extract. *Fitoterapia* (2002), **73**(1) :S53–S63.

Boutabet K, Kebsa W, Alyane M & Lahouel M. Polyphenolic fractions of Algerian propolis reverses doxorubicin induced acute renal oxidative stress. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* (2010), **4**(10):712-720

Breslow A. Cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. *Ann Surg* (1970), **172**: 902-908.

Burda S & Oleszek W. Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2001), **49** : 2774-2779.

Burdock GA. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). *Food and Chemical Toxicology* (1998), **36** (4) : 347–363.

Bystryń JC & Rudolph JL. Emerging melanoma vaccines. *Expert Opin Emerg Drugs* (2005), **10**: 393-402.

C

Cadet J, Douki T, Gasparutto D & Ravanat JL. Oxidative damage to DNA: formation, measurement and biochemical features. *Mutat Res* (2003), **29;531(1-2)**:5-23.

Caltagirone S, Ranelletti FO, Rinelli A, Maggiano N, Colasante A, Musiani P, Aiello FB & Piantelli M. Interaction with type II estrogen binding sites and antiproliferative activity of tamoxifen and quercetin in human non-small-cell lung cancer. *Am J Respir Cell Mol Biol* (1997), **17**:51–59.

Caltagirone S, Rossi C, Poggi A, Ranelletti FO, Natali PG, Brunetti M, Aiello FB & Piantelli M. Flavonoids apigenin and quercetin inhibit melanoma growth and metastatic potential. *Int J Cancer* (2000), **87**:595– 600.

Canova S., Degan P., Peters L.D., Livingstone D.R., Voltan R. and Venier P. Tissue dose, DNA adducts, oxidative DNA damage and CYP1A-immunopositive proteins in mussels exposed to waterborne benzo(a)pyrene, *Mutation Research*, (1998) **399**, 17- 30.

Capon F, Emonard H, Hornebeck W, Maquart FX & Bernard P. Expression and activation of pro-gelatinase A by human melanoma cell lines with different tumorigenic potential. *Clin Exp Metastasis* (1999), **17** (6) : 463-469

Chang WS, Lee YJ, Lu FJ & Chiang HC. Inhibitory effects of flavonoids on xanthine oxidase. *Anticancer Res* (1993), **13**:2165–2170.

Chartrain M, Riond J, Stennevin A, Vandenberghe I, Gomes B, Lamant L, Meyer N, Gairin JE, Guilbaud N & Annereau JP. Melanoma chemotherapy leads to the selection of ABCB5-expressing cells. *Plos One* (2012), **7**: e36762.

Chérié-Challine L, Halna M & Remontet TL. Situation épidémiologique du mélanome cutané en France et impact en termes de prévention. *Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire* (2004), **2** :6.

Choi JA, Kim JY, Lee JY, Kang CM, Kwon HJ, Yoo YD, Kim TW, Lee YS & Lee SJ. Induction of cell cycle arrest and apoptosis in human breast cancer cells by quercetin. *Int J Oncol* (2001), **19**:837–844.

Chomczynski P & Sacchi N. Single Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction. *Anal. Biochem* (1987), **162** : 156-159.

Chung HS, Chang LC, Lee SK, Shamon LA, van Breemen RB, Mehta RG, Farnsworth NR, Pezzuto JM & Kinghorn AD. Flavonoid constituents of *Chorizanthe diffusa* with potential cancer chemopreventive activity. *J Agric Food Chem* (1999), **47** : 36–41.

Circu M L & Aw TY. Glutathione and apoptosis. *Free Radic Res* (2008), **42(8)**: 689–706.

Claiborne A & Fridovich I. Purification of the o-dianisidine peroxidase from *Escherichia coli* B. Physicochemical characterization and analysis of its dual catalytic and peroxidatic activities. *J Biol Chem*. (1979), **25;254(10)**:4245-52.

Clark WH JR, From L, Bernardino EA & Mihm MC. The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin. *Cancer Res*; (1969), **29** (3) : 705-727.

Clementi ME, Giardina B, Di Stasio E, Mordente A & Misiti F. Doxorubicin-derived metabolites induce release of cytochrome c and inhibition of respiration on cardiac isolated mitochondria. *Anticancer Res*. (2003), **23**:2445–2450.

Cotelle N, Bernier JL, Catteau JP, Pommery J, Wallet JC & Gaydou EM. Antioxidant properties of hydroxy-flavones. *Free Radic Biol Med*. (1996), **20(1)**:35-43.

Cregan SP, Dawson VL & Slack RS. Role of AIF in caspase-dependent and caspase independent cell death. *Oncogene* **23**:2785-96.

Csokay B, Prajda N, Weber G & Olah E. Molecular mechanisms in the antiproliferative action of quercetin. *Life Sci* (1997), **60**:2157–2163.

D

Danial NN & Korsmeyer S. Cell death: critical control points. *Cell* (2004), **116**:206-19.

Davies KJ & Doroshow JH. Redox cycling of anthracyclines by cardiac mitochondria. I Anthracycline radical formation by NADH dehydrogenase. *J Biol Chem* (1986), **261**:3060–3067.

Debret R, Le Naour RR, Sallenave JM, Deshorgue A, Hornebeck WG, Guenounou M, Bernard P & Antonicelli F. Elastin fragments induce IL-1beta upregulation via NFkappaB pathway in melanoma cells. *J Invest Dermatol* (2006), **126**: 1860–8.

De Castro SL. Propolis: biological and pharmacological activities. Therapeutic uses of this bee-product. *Annual Review of Biomedical Sciences* (2001), **3** : 49–83.

Dejean LM, Martinez-Caballero S, Manon S & Kinnally KW. Regulation of the mitochondrial apoptosis-induced channel, MAC, by BCL-2 family proteins. *Biochim Biophys Acta* (2006), **1762**:191-201.

Delattre J, Beaudeau JL & Bonnefont-Rousselot D. Radicaux libres et stress oxydant: aspects biologiques et pathologiques *Editions Tec & Doc, Lavoisier* (2005), pp : **45**, 261-65, 475-92 .

Deschner EE, Ruperto J, Wong G & Newmark HL. Quercetin and rutin as inhibitors of azoxymethanol induced colonic neoplasia. *Carcinogenesis* (1991), **12**:1193–1196.

De Vincenzo R, Ferlini C, Distefano M, Gaggini C, Riva A, Bombardelli E, Morazzoni P, Valenti P, Belluti F, Ranelletti FO, Mancuso S & Scambia G. *In vitro* evaluation of newly developed chalcone analogues in human cancer cells. *Cancer Chemother Pharmacol* (2000), **46**:305–312.

Dimov V, Ivanovska N, Popov S & Bankova V. Immunomodulatory action of propolis: IV. Prophylactic activity against Gram-negative infections and adjuvant effect of the water-soluble derivative. *Vaccine* (1992), **10(12)** : 817–823.

Doroshov JH & Davies KJ. Redox cycling of anthracyclines by cardiac mitochondria. II Formation of superoxide anion, hydrogen peroxide, and hydroxyl radical. *J Biol Chem* (1986), **261**:3068–3074.

Duguet M & Riou JF. De la topologie de l'ADN aux médicaments antibiotiques et anticancéreux. *Médecine Sciences* (1994), **10** : 962-72.

Duthie SJ & Dobson VL. Dietary flavonoids protect human colonocyte DNA from oxidative attack *in vitro*. *Eur J Nutr* (1999), **38**:28–34.

Du Toit K, Buthelezi S & Bodenstien J. Anti-inflammatory and antibacterial profiles of selected compounds found in south african Propolis. *South African Journal of Science* (2009), **105(11-12)** : 470–472.

E

Elattar TM & Virji AS. Effect of tea polyphenols on growth of oral squamous carcinoma cells *in vitro*. *Anticancer Res* (2000), **20**:3459–3465.

Elattar TM & Virji AS. The inhibitory effect of curcumin, genistein, quercetin and cisplatin on the growth of oral cancer cells *in vitro*. *Anticancer Res* (2000), **20**:1733–1738.

Ellman G L. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* (1959), **82(1)**:70-77.

Enoksson M, Robertson JD, Gogvadze V, Bu P, Kropotov A, Zhivotovsky B & Orrenius S. Caspase-2 permeabilizes the outer mitochondrial membrane and disrupts the binding of cytochrome c to anionic phospholipids. *J Biol Chem* (2004), **279** : 49575-78.

F

Falkson CI, Ibrahim J, Kirkwood JM, Coates AS, Atkins MB & Blum RH. Phase III trial of dacarbazine versus dacarbazine with interferon alpha-2b versus dacarbazine with tamoxifen versus dacarbazine with interferon alpha-2b and tamoxifen in patients with metastatic malignant melanoma: an Eastern Cooperative Oncology Group study. *J Clin Oncol* (1998), **16**: 1743-1751.

Faries MB & Morton DL. Therapeutic vaccines for melanoma: current status. *Bio Drugs* (2005), **19**: 247- 260.

Farnesi AP, Aquino-Ferreira R, De Jong D, Bastos JK & Soares AEE. Effects of stingless bee and honey bee propolis on four species of bacteria. *Genetics and Molecular Research* (2009), **8**(2) : 635–640.

Fidler IJ. The pathogenesis of cancer metastasis: the seed and soil hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer* (2003), **3**: 453-458.

Flaherty KT, Puzanov I, Kim KB, Ribas A, McArthur GA, Sosman JA, O'Dwyer PJ, Lee RJ, Grippo JF, Nolop K & Chapman PB. Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma [archive], *N Engl J Med* (2010), 26 ;**363**(9):809-819.

Force T. Introduction to cardiotoxicity review series. *Circ Res* (2010), **106**(1):19–20.

Fortune JM & Osheroff N. Topoisomerase II as a target for anticancer drugs: when enzymes stop being nice. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* (2000), **64**:221–253.

Frelon S, Douki T, Favier A & Cadet J. Hydroxyl radical is not the main reactive species involved in the degradation of DNA bases by copper in the presence of hydrogen peroxide. *Chem Res Toxicol.* (2003), **16**(2):191-7.

Fukai T, Sakagami H, Toguchi M, Takayama F, Iwakura I, Atsumi T, Ueha T, Nakashima H & Nomura T. Cytotoxic activity of low molecular weight polyphenols against human oral tumor cell lines. *Anticancer Res* (2000), **20**:2525–2536.

G

Garbe C, Peris K, Hauschild A, *et al.*. Diagnosis and treatment of melanoma: European consensus-based interdisciplinary guideline. *Eur J Cancer Oxf Engl.* (2010), **46**:270–83.

Gallagher RP¹, Macarthur AC, Lee TK, Weber JP, Leblanc A, Mark Elwood J, Borugian M, Abanto Z, Spinelli JJ. Plasma levels of polychlorinated biphenyls and risk of cutaneous malignant melanoma: a preliminary study. *Int J Cancer.* (2011) 15;128(8):1872-80.

Garrido C, Galluzzi L, Brunet M, Puig PE, Didelot C & Kroemer G. Mechanisms of cytochrome *c* release from mitochondria. *Cell Death Differ* (2006), **13**:1423-33.

Gerdes J, Schwab U, Lemke H & Stein H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer* (1983), **15** : **31**(1):13-20.

Gewirtz DA. A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. *Biochem Pharmacol* (1999), **57**(7):727–741.

Ghisalberti EL. Propolis : a review, *Bee World*, (1979), **60**:59– 84.

Gilchrest BA, Eller MS, Geller AC & Yaar M. The pathogenesis of melanoma induced by ultraviolet radiation. *N Engl J Med.* (1999), **340** (17) : 1341-1348.

GLOBOCAN database, *The cancer statistics quoted in the Third Expert Report 2012.*

- Grange F, Barbe C, Aubin F, *et al.*. Clinical and Sociodemographic Characteristics Associated With Thick Melanomas: A Population-Based, Case-Case Study in France. *Arch Dermatol* (2012), **17**: 1–7.
- Grange JM & Davey W. Antibacterial properties of propolis (bee glue). *Journal of the Royal Society of Medicine* (1990), **83**(3) : 159–160.
- Gray-Schopfer V, Wellbrock C & Marais R. Melanoma biology and new targeted therapy. *Nature* (2007), **445** (7130): 851-857.
- Green DR & Kroemer G. The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science* (2004), **305**:626-29.
- Gruhagen DJ, De Wilt JH, Van Geel AN & Eggermont AM. Isolated limb perfusion for melanoma patients – a review of its indications and the role of tumor necrosis factor-alpha. *Eur J Surg Oncol* (2006), **32**(4):371-80.
- Gutteridge JM. free radicals in disease processes: a complication of cause and consequence. *Free Radic. Res. Commun* (1993), **19**: 141-158.

H

- Halliwell B & Gutteridge JM. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview. *Methods Enzymol* (1990), **186**:1–85.
- Han D, Tachibana H & Yamada K. Inhibition of environmental estrogen-induced proliferation of human breast carcinoma MCF-7 cells by flavonoids. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* (2001), **37**:275–282.
- Hanahan D & Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* (2000), **100**(1) : 57–70.
- Hanahan D & Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* (2011), **144**: 646 – 674.
- Hatzidimitriou Ef, Nenadis N & Tsimidou MZ. Changes in the catechin and epicatechin content of grape seeds on storage under different water activity (aw) conditions. *Food Chemistry* (2007), **105**: 1504-1511.
- Hauschild A, Grob JJ, Demidov LV *et al.* Dabrafenib in BRAF-mutated metastatic melanoma: a multicentre, open-label, phase 3 randomised controlled trial. *Lancet* (2012), **380**:358-365
- Haute autorité de santé, Service évaluation médico-économique et santé publique 2006. Stratégies de diagnostic précoce du mélanome. Recommandation en santé publique. Rapport d'évaluation. [Consulté le 08/10/2007] Disponible à partir de : URL : http://www.has-sante.fr/portail/display.jsp?id=c_452354.
- Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature* (2000), **407**:770-76.
- Hernandez J, Goycoolea FM, Quintero J, Acosta A, Castañeda M, Dominguez Z, Robles R, Vazquez-Moreno L, Velazquez EF, Astiazaran H, Lugo E & Velazquez C. Sonoran Propolis: chemical composition and antiproliferative activity on cancer cell lines. *Planta Med* (2007), **73**:1469–74.
- Hervieu A, Mignot G & Ghiringhelli F. Dacarbazine mediate antimelanoma effects *via* NK cells. *Oncoimmunology* (2013), **2**: e23714
- Hirano T, Gotoh M & Oka K. Natural flavonoids and lignans are potent cytostatic agents against human leukemic HL-60 cells. *Life Sci* (1994), **55**:1061–1069.

Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF et al. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma [archive], *N Engl J Med* (2010), **363**:711-723.

Hofmann UB, Westphal JR, Van Muijen GN & Ruiter DJ. Matrix metalloproteinases in human melanoma. *J Invest Dermatol* (2000a), **115** (3) : 337-344.

Hofmann UB, Westphal JR, Van Kraats AA, Ruiter DJ & Van Muijen GN. Expression of integrin alpha (v) beta (3) correlates with activation of membrane-type matrix metalloproteinase-1 (MT1-MMP) and matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) in human melanomacells *in vitro* and *in vivo*. *Int J Cancer* (2000b), **87** (1) : 12-19.

Hofmann UB, Houben R, Brocker EB, Becher JC. Role of matrix metalloproteinases in melanoma cell invasion. *Biochimie* (2005), **87** (3-4) : 307-314.

Hornebeck W, Robinet A, Duca L, Antonicelli F, Wallach J & Bellon G. The elastin connection and melanoma progression. *Anticancer Res* (2005), **25**:2617-25.

Hornick JL & Fletcher CD. Immunohistochemical staining for KIT (CD117) in soft tissue sarcomas is very limited in distribution. *Am J Clin Pathol* (2002), **117**(2):188-93.

I

Iqbal M, Sharma SD, Okazaki Y, Fujisawa M & Okada S. Dietary supplementation of curcumin enhances antioxidant and phase II metabolizing enzymes in ddY male mice: possible role in protection against chemical carcinogenesis and toxicity. *Pharmacol Toxicol* (2003), **92**(1):33-8.

Itoh T, Tanioka M, Yoshida H, Yoshioka T, Nishimoto H, Itohara S. Reduced angiogenesis and tumor progression in gelatinase A-deficient mice. *Cancer Res* (1998), **58** : 1048-1051.

Ives NJ, Stowe RL, Lorigan P & Wheatley K. Chemotherapy compared with biochemotherapy for the treatment of metastatic melanoma: A meta-analysis of 18 trials involving 2,621 patients. *J Clin Oncol* (2007), **25**:5426-34.

Iwashita K, Kobori M, Yamaki K & Tsushida T. Flavonoids inhibit cell growth and induce apoptosis in B16 melanoma 4A5 cells. *Biosci Biotechnol Biochem* (2000), **64**:1813-1820.

J

Januel C, Fay LB, Ruggiero D, Lagarde M & Véricel E. Covalent coupling of reduced glutathione with ribose: loss of cosubstrate ability to glutathione peroxidase. *Biochim Biophys Acta* (2003), **17**:1620(1-3):125-32.

Jiang X & Wang X. Cytochrome *c*-mediated apoptosis. *Annu Rev Biochem* (2004), **73**:87-106.

Jilaveanu LB, Aziz SA & Kluger HM. Chemotherapy and biologic therapies for melanoma: do they work? *Clin Dermatol* (2009), **27**:614-25.

Jones BA & Gores GJ. Physiology and pathophysiology of apoptosis in epithelial cells of the liver, pancreas and intestine. *Am J Physiol* (1997), **273**:1174-88.

Jovanovic SV, Steenken S, Tomic M, Marjanovic B & Simic MG. Flavonoids as antioxidants. *J. Am. Chem. Soc.* (1994), **116**: 4846-4851.

Jung K & Reszka R. Mitochondria as subcellular targets for clinically useful anthracyclines. *Adv Drug Deliv Rev* (2001), **2;49(1-2)**:87-105.

K

Kalogeropoulos N, Konteles SJ, Troullidou E, Mourtzinou I & Karathanos VT. Chemical composition, antioxidant activity and antimicrobial properties of propolis extracts from Greece and Cyprus. *Food Chemistry* (2009), **116(2)** : 452–461.

Kamei H, Koide T, Kojimam T, Hasegawa M, Terabe K, Umeda T & Hashimoto Y. Flavonoid-mediated tumor growth suppression demonstrated by *in vivo* study. *Cancer Biother Radiopharm* (1996), **11**:193–196.

Kampa M, Hatzoglou A, Notas G, Damianaki A, Bakogeorgou E, Gemetzi C, Kouroumalis E, Martin PM & Castanas E. Wine antioxidant polyphenols inhibit the proliferation of human prostate cancer cell lines. *Nutr Cancer* (2000), **37**:223–233.

Kandaswami C & Middleton E, Jr. Free radical scavenging and antioxidant activity of plant flavonoids. *Adv Exp Med Biol* (1994), **366**:351–376.

Karasarides M, Chiloeches A, Hayward R, Niculescu-Duvaz D, Scanlon I, Friedlos F, Ogilvie L, Hedley D, Martin J, Marshall CJ, Springer CJ, Marais R. B-RAF is a therapeutic target in melanoma. *Oncogene* (2004), **23**: 6292-6298.

Kastan MB, Onyekwere O, Sidransky D, Vogelstein B & Craig RW. Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res* (1991), **1;51(23 Pt 1)**:6304-11.

Kataoka T. The caspase-8 modulator c-FLIP. *Crit Rev Immunol* (2005), **25**:31-58.

Kawaii S, Tomono Y, Katase E, Ogawa K & Yano M. Antiproliferative activity of flavonoids on several cancer cell lines. *Biosci Biotechnol Biochem* 1999;63:896–899.

Kawamata A, Ito D, Odani T, Isobe T, Iwase M, Hatori M & Nagumo M. Thalidomide suppresses melanoma growth by activating natural killer cells in mice. *Oncol Rep* (2006), **16**:1231–1236

Keilholz U, Punt CJ, Gore M, Kruit W, Patel P, Lienard D, Thomas J, Proebstle TM, Schmittel A, Schadendorf D, Velu T, Negrier S, Kleeberg U, Lehman F, Suci S & Eggermont AM. Dacarbazine, cisplatin, and interferon- α -2b with or without interleukin-2 in metastatic melanoma: a randomized phase III trial (18951) of the European Organisation for Research and Treatment of Cancer Melanoma Group. *J Clin Oncol* (2005), **23**: 6747-6755.

Kemp M, Go YM & Jones DP. Nonequilibrium thermodynamics of thiol/disulfide redox systems: a perspective on redox systems biology. *Free Radic Biol Med* (2008), **44**:921–937.

Keyser J, Schultz J, Ladell K, Elzaouk L, Heinzerling L, Pavlovic J & Moelling K. IP-10-encoding plasmid DNA therapy exhibits anti-tumor and anti-metastatic efficiency. *Exp Dermatol* (2004), **13**:380–390.

Khanduja KL, Gandhi RK, Pathania V & Syal N. Prevention of N-nitrosodiethylamine-induced lung tumorigenesis by ellagic acid and quercetin in mice. *Food Chem Toxicol* (1999), **37**:313–318.

Kim R, Emi M, Tanabe K, Murakami S, Uchida Y & Arihiro K. Regulation and interplay of apoptotic and non-apoptotic cell death. *J Pathol* (2006), **208**:319-26.

- Knowles LM, Zigrossi DA & Tauber RA, Hightower C, Milner JA. Flavonoids suppress androgenin dependent human prostate tumor proliferation. *Nutr Cancer* (2000), **38** :116–122.
- Koc AN, Silici S, Multu-Sariguzel F & Sagdic O. Antifungal activity of propolis in four different fruit juices,” *Food Technology and Biotechnology* (2007), **45** : 57–61.
- Koc AN, Silici S, KasapF, H`ormet-` Oz HT, Mavus-Buldu H & BD Ercal, “Antifungal activity of the honeybee products against *Candida* spp. and *Trichosporon* spp,” *Journal of Medicinal Food* (2011), **14(1-2)** : 128–134.
- Kochilin-Ramonatxo C. Oxygen, oxidative stress and antioxidant supplementation, or other 2006
- Kohen R & Nyska A. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol Pathol* (2002), **30(6)**:620-50.
- Koike T, Vernon RB, Hamner MA, Sadoun E & Reed MJ. MT1-MMP, but not secreted MMPs, influences the migration of human microvascular endothelial cells in 3-dimensional collagen gels. *J Cell Biochem* (2002), **86 (4)** : 748-758.
- Kosalec I, Pepeljnjak S, Bakmaz M & Vladimir-Kne`zevi`c M. Flavonoid analysis and antimicrobial activity of commercially available propolis products. *Acta Pharmaceutica* (2005), **55(4)** : 423–430.
- Kristal BS, Park BK & Yu BP. 4-Hydroxyhexenal is a potent inducer of the mitochondrial permeability transition. *J Biol Chem* (1996), **15;271(11)**:6033-8.
- Kuby J. *Immunology* 3rd Edition. W.H. Freeman and company, New York. (1997).
- Kujumgiev A, Tsvetkova I, Serkedjieva Y, Bankova V, Christov R, Popov S. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *Journal ofEthnopharmacology* (1999), **64(3)** : 235–240.
- Kumar N, Ahmad MKK, Dang R & Husain A. Antioxidant and antimicrobial activity of propolis from Tamil Nadu Zone. *Journal of Medicinal Plants Research* (2008), **2(12)** : 361–364.
- Kumazawa S, Hayashi K, Kajiya K, Ishii T, Hamasaka T & Nakayama T. Studies of the constituents of Uruguayan propolis, *Journal ofAgricultural and Food Chemistry* (2002), **50(17)** : 4777–4782.
- Kuntz S, Wenzel U & Daniel H. Comparative analysis of the effects of flavonoids on proliferation, cytotoxicity, and apoptosis in human colon cancer cell lines. *Eur J Nutr* (1999), **38**:133–142.
- Kuo SM. Antiproliferative potency of structurally distinct dietary flavonoids on human colon cancer cells. *Cancer Lett* (1996), **110**:41–48.
- Kuo SM, Morehouse HF, Jr. & Lin CP. Effect of antiproliferative flavonoids on ascorbic acid accumulation in human colon adenocarcinoma cells. *Cancer Lett* (1997), **116**:131–137.

L

- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. (1970) **15;227(5259)**:680-5.

- Lahouel M, Boulkour S, Segueni N, Fillastre JP. The flavonoids effect against vinblastine, cyclophosphamide and paracetamol toxicity by inhibition of lipid-peroxydation and increasing liver glutathione concentration. *Pathol Biol (Paris)*. (2004) **52(6)**:314-22. French.
- Lao CD, Demierre MF & Sondak VK. Targeting events in melanoma carcinogenesis for the prevention of melanoma. *Expert Rev Anticancer Ther* (2006), **6**: 1559–68.
- Lebrecht D, Kokkori A, Ketelsen UP, Setzer B & Walker UA. Tissue-specific mtDNA lesions and radical-associated mitochondrial dysfunction in human hearts exposed to doxorubicin. *J Pathol* (2005), **207**:436–444.
- Lee Y.H.P E and Muller W. Oncogenes and Tumor Suppressor Genes. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, (2010) **2**: a 003236.
- Lee WR, Shen SC, Lin HY, Hou WC, Yang LL & Chen YC. Wogonin and fisetin induce apoptosis in human promyeloleukemic cells, accompanied by a decrease of reactive oxygen species, and activation of caspase 3 and Ca(2p)-dependent endonuclease. *Biochem Pharmacol* (2002), **63**:225–236.
- Lehucher-Michel MP¹, Lesgards JF, Delubac O, Stocker P, Durand P, Prost M. Oxidative stress and human disease. Current knowledge and perspectives for prevention. *Presse Med* (2001), **16-23;30(21)**:1076-81.
- Lens MB & Eisen TG. Systemic chemotherapy in the treatment of malignant melanoma. *Expert Opin Pharmacother* (2003), **4**: 2205-2211.
- Lesage C, Barbe C, Le Clainche A, Lesage FX, Bernard P & Grange F. Sex-related location of head and neck melanoma strongly argues for a major role of sun exposure in cars and photoprotection by hair. *J Invest Dermatol* (2013), **133**:1205–11.
- Li XL, Crotty KA, Kril J, Palmer AA, Stanley W & McCarthy SW. Method of melanin bleaching in MIB1-Ki67 immunostaining of pigmented lesions: A quantitative evaluation in malignant melanomas. *The Histochemical Journal* (1999), **31**:237–240
- Lin JY & Fisher DE. Melanocyte biology and skin pigmentation. *Nature* (2007), **22;445(7130)**:843-50.
- Linden MD, Torres FX, Kubus J & Zarbo RJ. Clinical application of morphologic and immunocytochemical assessments of cell proliferation. *Am J Clin Pathol* (1992), **97(5 Suppl 1)**:S4-13.
- Liu X, Sun Y, Ehrlich M, Lu T, Kloog Y, Weinberg RA, Lodish HF & Henis YI. Disruption of TGF-beta growth inhibition by oncogenic ras is linked to p27Kip1 mislocalization (2000), **30;19(51)**:5926-35.
- Lorenzo HK, Susin SA, Penninger J & Kroemer G. Apoptosis inducing factor (AIF): a phylogenetically old, caspase-independent effector of cell death. *Cell Death Differ* (1999), **6**:516-24.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL & Randall RJ. "Protein measurement with the Folin phenol reagent". *J. Biol. Chem* (1951), **193 (1)**: 265–75.
- Lundblad D, Landberg G, Roos G & Lundgren E. Ki-67 as a marker for cell cycle regulation by interferon. *Anticancer Res* (1991), **11(6)**:2131-6.

M

- Makita H, Tanaka T, Fujitsuka H, Tatematsu N, Satoh K, Hara A & Mori H. Chemoprevention of 4-nitroquinoline 1-oxide-induced rat oral carcinogenesis by the dietary flavonoids chalcone, 2-hydroxychalcone, and quercetin. *Cancer Res* (1996), **56**:4904–4909.
- Marcucci M. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie* (1995), **26** (2) : 83–99.
- Markovits J, Linassier C, Fosse P, Couprie J, Pierre J, Jacquemin-Sablon A, Saucier JM, Le Pecq JB & Larsen AK. Inhibitory effects of the tyrosine kinase inhibitor genistein on mammalian DNA topoisomerase II. *Cancer Res* (1989), **49**:5111–5117.
- Marfak A, Trouillas P, Allais DP, Calliste CA, Cook-Moreau J & Duroux JL. Mechanisms of transformation of the antioxidant kaempferol into depsides. Gamma-radiolysis study in methanol and ethanol. *Radiat Res* (2003), **160**(3):355-65.
- Marnitz S, Hoecht S & Hinkelbein W. The role of radiotherapy in the management of malignant melanoma. *Front Radiat Ther Oncol* (2006), **39**: 140-148.
- Martínez-Cayuela M. Oxygen free radicals and human disease. *Biochimie.* (1995), **77**(3):147-61.
- Martinon F & Tschopp J. Inflammatory caspases: linking an intracellular innate immune system to autoinflammatory diseases. Review Article, *Cell* (2004), **28;117**(5):561-74.
- Mates JM, Segura JA, Alonso FJ & Marquez J. Intracellular redox status and oxidative stress: Implication for cell proliferation, apoptosis and carcinogenesis. *Arch Toxicol* (2008) , **82**:273–99.
- Mc Carty MF, Barroso-Aranda J & Contreras F. A two-phase strategy for treatment of oxidant-dependent cancers. *Med Hypotheses* (2007), **69**(3):489–96.
- Mc Carty MF & Contreras F. Increasing superoxide production and the labile iron pool in tumor cells may sensitize them to extracellular ascorbate. Review Article, *Front Oncol* (2014), **16;4**:249.
- Meijer L. Le cycle de division cellulaire et sa régulation. Équipe Cycle Cellulaire, CNRS, Station Biologique, F-29680 Roscoff, France. *Oncologie* (2003) **5**: 311-326.
- Miguel MG, Nunes S, Dandlen SA, Cavaco AM & Antunes MD. Phenols and antioxidant activity of hydro-alcoholic extracts of propolis from Algarve, South of Portugal. *Food and Chemical Toxicology* (2010), **48**(12) : 3418–3423.
- Mirzoeva OK & Calder PC. The effect of propolis and its components on eicosanoid production during the inflammatory response. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids* (1996), **55**(6) :441–449.
- Miyagi Y, Om AS, Chee KM & Bennink MR. Inhibition of azoxymethane-induced colon cancer by orange juice. *Nutr Cancer* (2000), **36**:224–249.
- Mohamad N, Gutierrez A, Nunez M, Cocca C, Martin G, Cricco G, Edina V, Rivera E & Bergoc R. Mitochondrial apoptotic pathways. *Biocell* (2005), **29**:149-61.
- Monti M, Berti E, Carminati G & Cusini M. Occupational and cosmetic dermatitis from propolis. *Contact Dermatitis* (1983), **9**(2) : 163.

Mukhtar H & Agarwal R. Skin cancer chemoprevention. *J Invest Dermatol Symp Proc* (1996), **1**:209–214.

Muindi J, Sinha BK, Gianni L & Myers C. Thiol-dependent DNA damage produced by anthracycline-iron complexes. The structure-activity relationships and molecular mechanisms. *Mol Pharmacol* (1985), **27(3)**:356-65

Mutoh M, Takahashi M, Fukuda K, Komatsu H, Enya T, Matsushima-Hibiya Y, Mutoh H, Sugimura T & Wakabayashi K. Suppression by flavonoids of cyclooxygenase-2 promoter-dependent transcriptional activity in colon cancer cells: Structure-activity relationship. *Jpn J Cancer Res* (2000), **91**:686–691.

N

Nardini M, Leonardi F, Scaccini C & Virgili F. Modulation of ceramide-induced NF-kappaB binding activity and apoptotic response by caffeic acid in U937 cells: comparison with other antioxidants. *Free Radic Biol Med* (2001), **30**: 722–33.

Nagaoka T, Banskota AH, Tezuka Y, Saiki I & Kadota S. Selective antiproliferative activity of caffeic acid phenethyl ester analogues on highly liver-metastatic murine colon 26-L5 carcinoma cell line. *Bioorg Med Chem* (2002), **10**:3351–9.

Nagaoka T, Banskota AH, Tezuka Y, Harimaya Y, Koizumi K, Saiki I & Kadota S. Inhibitory effects of caffeic acid phenethyl ester analogues on experimental lung metastasis of murine colon 26-L5 carcinoma cells. *Biol Pharm Bull* (2003), **26**: 638–64.1

Nicholson DW. Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ* (1999), **6**:1028-42.

Nohl H, Gille L, Staniek K. The exogenous NADH dehydrogenase of heart mitochondria is the key enzyme responsible for selective cardiotoxicity of anthracyclines. *Z Naturforsch C* (1998), **53**:279–285.

Nowell PC. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* (1976), **194**: 23-8.

Ntayi C, Labrousse AL, Debret R, Birembaut P, Bellon G, Antonicelli F, Hornebeck W & Bernard P. Elastin-derived peptides upregulate matrix metalloproteinase-2-mediated melanoma cell invasion through elastin-binding protein. *J Invest Dermatol* (2004), **122**: 256–65.

Nikolaou V & Stratigos AJ (2014). Emerging trends in the epidemiology of melanoma. *Br J Dermatol*.170(1):11-19

O

O'Brien M L & Tew KD. Glutathione and related enzymes in multidrug resistance. *Eur. J. Cancer* (1996), **32A**:967– 978.

Ohta T, Nakatsugi S, Watanabe K, Kawamori T, Ishikawa F, Morotomi M, Sugie S, Toda T, Sugimura T & Wakabayashi K. Inhibitory effects of bifidobacterium-fermented soy milk on 2-amino-1-methyl-6-phenylimidaz[4,5-b]pyridine-induced rat mammary carcinogenesis, with a partial contribution of its component isoflavones. *Carcinogenesis* (2000), **21**:937–941.

Orsolić N, Saranović AB & Basić I (2006). Direct and indirect mechanism(s) of antitumour activity of Propolis and its polyphenolic compounds. *Planta Med* (2006), **72(1)**:20-7.

Ono Pharmaceutical Co., Ltd., « Communiqué de presse » [archive] [PDF], 4 juillet 2014 (consulté le 14 juillet 2014).

P

Park YK, Alencar SM & Aguiar CL. Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2002), **50**(9) : 2502–2506.

Paul Smith, 1985

Petrova A, Popova M, Kuzmanova C, Tsvetkova I, Naydenski H, Muli E & Bankova V. New biologically active compounds from Kenyan propolis. *Fitoterapia* (2010),

Pincemail J, Defraigne JO & Limet R. Oxidative stress in clinical situations--fact or fiction?. *Eur J Anaesthesiol* (1996), **13**(3):219-34.

Pierce GB. Relationship between differentiation and carcinogenesis. *J Toxicol Environ Health* (1977), **2**(6):1335-42.

Pietta PG, Gardana C & Pietta AM. Analytical methods for quality control of propolis. *Fitoterapia* (2002), **73**(1) : S7–S20.

Pouget C, Lauthier F, Simon A, Fagnere C, Basly JP, Delage C & Chulia AJ. Flavonoids: Structural requirements for antiproliferative activity on breast cancer cells. *Bioorg Med Chem Lett* (2001), **11**: 3095– 3097.

R

Rathmell JC & Thompson CB. Pathways of apoptosis in lymphocyte development, homeostasis, and disease. *Cell* (2002), **109**:97-107.

Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M & Rice- Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine* (1999), **26**: 1231-1237.

Ré DB, Nafia I, Nieoullon A, Le Goff LK & Had-Aissouni L. Cerebral oxidative stress: are astrocytes vulnerable to low intracellular glutamate concentrations? Consequences for neuronal viability. *Ann Fr Anesth Reanim* (2005), **24**(5):502-9.

Remontet L, Esteve J, Bouvier AM, Gorsclaude P, Launoy G, Menegoz F, *et al.* Cancer incidence and mortality in France over the period 1978-2000. *Rev Epidemiol Santé Publique* (2003), **51** : 3-30.

Ren W, Qiao Z, Wang H, Zhu L & Zhang L. FLAVONOIDS: PROMISING ANTICANCER AGENTS. *Medicinal Research Reviews* (2003), **23** (4) : 519-534.

Requena JR, Fu MX, Ahmed MU, Jenkins AJ, Lyons TJ & Thorpe SR. Lipoxidation products as biomarkers of oxidative damage to proteins during lipid peroxidation reactions. *Nephrol Dial Transplant* (1996), **5**:48-53.

Ricardo da Silva JM, Darmon N, Fernandez Y & Mitjavila S. Oxygen free radical scavenger capacity in aqueous models of different procyanidins from grape seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (1991), **39**: 549-1552.

Rice-Evans CA, Miller NJ, Bolwell PG, Bramley PM & Pridham JB. The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radical Research* (1995), **22** : 375-383.

Rong Y, Yang EB, Zhang K & Mack P. Quercetin-induced apoptosis in the monoblastoid cell line U937 in vitro and the regulation of heat shock proteins expression. *Anticancer Res* (2000), **20**: 4339–4345.

Rustin P, Chretien D, Bourgeron T, Wucher A, Saudubray JM, Rotig A & Munnich A. Assessment of the mitochondrial respiratory chain. *Lancet* (1991), **338**:60.

S

Saelens X, Festjens N, Vande Walle E L, Van Gurp M, Van Loo G & Vandernabeele P. Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene* (2004), **23**:2861-74

Sakagami H, Jiang Y, Kusama K, Atsumi T, Ueha T, Toguchi M, Iwakura I, Satoh K, Fukai T & Nomura T. Induction of apoptosis by flavones, flavonols (3-hydroxyflavones) and isoprenoid-substituted flavonoids in human oral tumor cell lines. *Anticancer Res* (2000), **20**:271–277.

Salah N, Miller NJ, Paganga G, Tijburg L, Bolwell GP & Rice-Evans CA. Polyphenolic flavanols as scavengers of aqueous phase radicals and as chain-breaking antioxidants. *Archives of Biochemistry and Biophysics* (1995), 339-346.

Salomão K, Pereira PRS, Campos LC, Borba CM, Cabello PH, Marcucci MC & de Castro SL. Brazilian Propolis: correlation between chemical composition and antimicrobial activity. *Evid-Based Complement Altern Med Ecam* (2008), **5**: 317–24.

Sardão VA, Oliveira PJ, Holy J, Oliveira CR & Wallace KB. Morphological alterations induced by doxorubicin on H9c2 myoblasts: nuclear, mitochondrial, and cytoskeletal targets. *Cell Biol Toxicol* (2009), **25**(3):227-43.

Sardão VA, Oliveira PJ, Holy J, Oliveira CR & Wallace KB. Doxorubicin-induced mitochondrial dysfunction is secondary to nuclear p53 activation in H9c2 Cardiomyoblasts. *Cancer Chemother Pharmacol* (2009), **64**(4):811-27.

Sato H, Takino T & Miyamori H. Roles of membrane-type matrix metalloproteinase-1 in tumor invasion and metastasis. *Cancer Sci* (2005), **96** : 212–217.

Scheller S, Gazda G, Pietsz G, Gabrys J, Szumilas J, Eckert L & Shani J. The ability of ethanol extract of Propolis to stimulate plaque formation in immunized mouse spleen cells. *Pharmacol Res Commun* (1988), **20**:323–328

Schmitz I, Kirchhoff S & Krammer PH. Regulation of death receptor-mediated apoptosis pathways. *Int J Biochem Cell Biol* (2000), **32**:1123-36.

Schön M, Wienrich BG, Kneitz S, Sennefelder H, Amschler K, Vöhringer V, Weber O, Stiewe T, Ziegelbauer K & Schön MP. KINK-1, a novel small-molecule inhibitor of IKKbeta, and the susceptibility of melanoma cells to antitumoral treatment. *J Natl Cancer Inst* (2008), **100**:862–875.

Segueni N, Magid AA, Decarme M, Rhouati S, Lahouel M, Antonicelli F, Lavaud C & Hornebeck W. Inhibition of stromelysin-1 by caffeic acid derivatives from a Propolis sample from Algeria. *Planta Med* (2011), **77**: 999–1004.

- Seigneurin D & Guillaud P. Ki-67 antigen, a cell cycle and tumor growth marker. *Pathol Biol (Paris) Review* (1991), **39(10)**:1020-8.
- Sell S & Pierce GB. Maturation arrest of stem cell differentiation is a common pathway for the cellular origin of teratocarcinomas and epithelial cancers. *Lab Invest* (1994), **70(1)**:6-22.
- Senderowicz AM. Flavopiridol: The first cyclin-dependent kinase inhibitor in human clinical trials. *Invest New Drugs*. (1999), **7**:313–320.
- Senderowicz AM. Development of cyclin-dependent kinase modulators as novel therapeutic approaches for hematological malignancies. *Leukemia* (2001), **15**:1–9.
- Sforcin JM. Propolis and the immune system: a review. *J Ethnopharmacol* (2007), **113**: 1–14
- Sharma Om P & Bhat TK. DPPH antioxidant assay revisited. *Food chemistry* (2009), **113 (4)**:1202.
- Shaw LM, Tumor cell invasion assays. *Methods Mol Biol* (2005), **294**:97-105.
- Shi YQ, Fukai T, Sakagami H, Chang WJ, Yang PQ, Wang FP & Nomura T. Cytotoxic flavonoids with isoprenoid groups from *Morus mongolica*. *J Nat Prod* (2001), **64**:181–188.
- Siegel RM. Caspases at the crossroads of immune-cell life and death. *Nat Rev Immunol* (2006), **6**:308-17.
- Siegfried JA, Kennedy KA, Sartorelli AC & Tritton TR. The role of membranes in the mechanism of action of the antineoplastic agent adriamycin. Spin-labeling studies with chronically hypoxic and drug-resistant tumor cells. *J Biol Chem* (1983), **10;258(1)**:339-43.
- Siess MH, Le Bon AM, Canivenc-Lavier MC & Suschetet M. Mechanisms involved in the chemoprevention of flavonoids. *Biofactors* (2000), **12**:193–199.
- Simon S, Roy D & Schindler M. Intracellular pH and the control of multidrug resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1994), **91**:1128– 1132.
- Smalley KSM, Contractor R, Haass NK, Lee JT, Nathanson KL, Medina CA, Flaherty KT & Herlyn M. Ki67 expression levels are a better marker of reduced melanoma growth following MEK inhibitor treatment than phospho-ERK levels. *British Journal of Cancer* (2007), **96**: 445 – 449.
- Solem LE, Heller LJ & Wallace KB. Dose-dependent increase in sensitivity to calcium-induced mitochondrial dysfunction and cardiomyocyte cell injury by doxorubicin. *J Mol Cell Cardiol* (1996), **28**:1023–1032.
- Sounni NE & Noel A. Membrane type-matrix metalloproteinases and tumor progression. *Biochimie* (2005), **87 (3-4)** : 329-342.
- Stadtman ER & Berlett BS. Reactive oxygen-mediated protein oxidation in aging and disease. *Chem Res Toxicol* (1997), **10(5)**:485-94.
- Stennike HR, Deveraux QL, Himke EW, Reed JC, Dixit VM & Salvesen GS. Caspase-9 can be activated without proteolytic processing. *J Biol Chem* (1999), **274**:8359–62.
- Swerdlow AJ, English JS & Qiao Z. The risk of melanoma in patients with congenital nevi: a cohort study. *J Am Acad Dermatol* (1995), **32 (4)**: 595-599.

Szatrowski TP & Nathan CF. Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells. *Cancer Res* (1991), **51**:794-98

T

Talanian RV, Quinlan C, Trautz S, Hackett MC, Mankovich JA, Banach D, Ghayur T, Brady KD & Wong WW. Substrate specificities of caspase family proteases. *J Biol Chem* (1997), **272**:9677–82.

Tanaka T, Makita H, Kawabata K, Mori H, Kakumoto M, Satoh K, Hara A, Sumida T, Tanaka T & Ogawa H. Chemoprevention of azoxymethane-induced rat colon carcinogenesis by the naturally occurring flavonoids, diosmin and hesperidin. *Carcinogenesis* (1997), **18**:957–965.

Tanaka T, Makita H, Ohnishi M, Mori H, Satoh K, Hara A, Sumida T, Fukutani K, Tanaka T & Ogawa H. Chemoprevention of 4-nitroquinoline 1-oxide-induced oral carcinogenesis in rats by flavonoids diosmin and hesperidin, each alone and in combination. *Cancer Res* (1997), **57** : 246–252.

Tandle A, Blazer DG 3RD & Libutti SK. Antiangiogenic gene therapy of cancer: recent developments. *J Transl Med* (2004), **2** (1) : 22.

Thomas L. Tumeurs cutanées, épithéliales et mélaniques. *La revue du praticien* (1998) ; **16** : 437-445.

Thornberry NA, Rano TA, Peterson EP, Rasper DM, Timkey T, Garcia-Calvo M, Houtzager VM, Nordstrom PA, Roy S, Vaillancourt JP, Chapman KT & Nicholson DW. Combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis. *J Biol Chem* (1997), **272**:17907–11.

Thornberry NA, Chapman KT & Nicholson DW. Determination of caspase specificities using a peptide combinatorial library. *Methods Enzymol* (2000), **322**:100–10.

Tinel A & Tschopp J. The PIDDosome, a protein complex implicated in activation of caspase-2 in response to genotoxic stress. *Science* (2004), **7;304(5672)**:843-6.

Triton TR & Yee G. The anticancer agent adriamycin can be actively cytotoxic without entering cells. *Science* (1982), **16;217(4556)**:248-50.

Trusheva B, Popova M, Bankova V, Tsvetkova I, Naydensky C & Sabatini AG. A new type of European propolis containing bioactive labdanes. *Rivista Italiana EPPOS* (2003), **36** : 3–7.

Tsujimoto Y, Cossman J, Jaffe E & Croce CM. Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science* (1985), **228**:1440-43.

U

Ugur A & Arslan T. An *in vitro* study on antimicrobial activity of propolis from Mugla province of Turkey. *Journal of Medicinal Food* (2004), **7(1)**:90–94.

Ugurel S, Paschen A & Becker JC. Dacarbazine in melanoma: from a chemotherapeutic drug to an immunomodulating agent. *J Invest Dermatol* (2013), **133**:289–92.

V

Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M & Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* (2006), **160**:1-40.

Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M & Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* (2007), **39(1)**:44-84.

Van Dierendonck JH, Wijsman JH, Keijzer R, van de Velde CJ & Cornelisse CJ. Cell-cycle-related staining patterns of anti-proliferating cell nuclear antigen monoclonal antibodies. Comparison with BrdUrd labeling and Ki-67 staining. *Am J Pathol* (1991), **138(5)**:1165-72.

Veness MJ, Quinn DI, Ong CS, Keogh AM, Mac Donald PS, Cooper SG & Morgan GW. Aggressive cutaneous malignancies following cardiothoracic transplantation: the Australian experience. *Cancer* (1999), **85** (8) : 1758-1764.

Verma AK, Johnson JA, Gould MN & Tanner MA. Inhibition of 7,12 dimethylbenz(a) anthracene and N-nitrosomethylurea induced rat mammary cancer by dietary flavonol quercetin. *Cancer Res* (1988), **48**:5754–5758.

Verrax J & Calderon PB. Pharmacologic concentrations of ascorbate are achieved by parenteral administration and exhibit antitumoral effects. *Free Radic Biol Med* (2009), **47(1)**:32–40.

Volkova TO and Poltorak AN. Cellular Caspases: New Targets for the Action of Pharmacological Agents. *Apoptosis and Medicine*, Chapter 7:176-178.

W

Wagh VD. Propolis: A Wonder Bees Product and Its Pharmacological Potentials. Review article. *Advances in Pharmacological Sciences* (2013) -11

Walker P & Crane E. Constituents of propolis. *Apidologie* (1987), **18** : 327–334.

Wallace KB. Adriamycin-induced interference with cardiac mitochondrial calcium homeostasis. *Cardiovasc Toxicol* (2007), **7**:101–107.

Wandel E, Grasshoff A, Mittag M, Hausteil UF & Saalbach A. Fibroblasts surrounding melanoma express elevated levels of matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) *in vitro*. *Exp Dermatol* (2000), **9** (1) : 34-41.

Wang HK. The therapeutic potential of flavonoids. *Expert Opin Invest Drugs* (2000), **9**:2103–2119

Wang IK, Lin-Shiau SY & Lin JK. Induction of apoptosis by apigenin and related flavonoids through cytochrome c release and activation of caspase-9 and caspase-3 in leukaemia HL-60 cells. *Eur J Cancer* (1999), **35**:1517–1525.

Wang W & Goodman MT. Antioxidant property of dietary phenolic agents in a human LDL-oxidation *ex vivo* model: Interaction of protein binding activity. *Nutr Res* (1999), **19**:191–202.

Wang IK, Lin-Shiau SY & Lin JK. Induction of apoptosis by apigenin and related flavonoids through cytochrome c release and activation of caspase-9 and caspase-3 in leukaemia HL-60 cells. *Eur J Cancer* (1999), **35**:1517–1525.

Wenzel U, Kuntz S, Brendel MD & Daniel H. Dietary flavone is a potent apoptosis inducer in human colon carcinoma cells. *Cancer Res* (2000), **60**:3823–3831.

Wilcock BP & Peiffer RL Jr. Morphology and behavior of primary ocular melanomas in 91 dogs. *Vet Pathol* (1986), **23**(4):418-24.

Winslow T, LLC, Medical and Scientific Illustration, 2008.
<https://www.teresewinslow.com/skin/rrw12kvqo9r3oxymwqo5a6tywltxnb>

Wood ZA, Poole LB & Karplus PA. Peroxiredoxin evolution and the regulation of hydrogen peroxide signaling. *Science* (2003), **25**; **300**(5619):650-3.

Wrzesien-Kus A, Smolewski P, Sobczak-Pluta A, Wierzbowska A & Robak T. The inhibitor of apoptosis protein family and its antagonists in acute leukemias. *Apoptosis* (2004), **9**:705-15.

Wyllie AH, Kerr JFR & Currie AR. Cell Death: The Significance of Apoptosis. *Int Rev Cytol.* (1980), **68**:251-306.

Y

Yang M, Tanaka T, Hirose Y, Deguchi T, Mori H & Kawada Y. Chemopreventive effects of diosmin and hesperidin on N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine-induced urinary-bladder carcinogenesis in male ICR mice. *Int J Cancer* (1997), **73**:719–724.

Ye H, Cande C, Stephanou NC, Jiang S, Curbuxani S, Larochette N, Daugas E, Garrido C, Kroemer G & Wu H. DNA binding is required for the apoptogenic action of apoptosis inducing factor. *Nat Struct Biol* (2002), **9**:680-84.

Yin F, Giuliano AE, Van Herle AJ. Growth inhibitory effects of flavonoids in human thyroid cancer cell lines. *Thyroid* 1999;9:369–376.

Yin F, Giuliano AE & Van Herle AJ. Signal pathways involved in apigenin inhibition of growth and induction of apoptosis of human anaplastic thyroid cancer cells (ARO). *Anticancer Res* (1999), **19**: 4297–4303.

Yi-Zhong C, Sun M, Xing J, Luo Q, Corke H. Structure-radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants. *Life Sciences* (2006), **78**(25): 2872-2888.

Yoshida K, Wang HG, Miki Y & Kufe D. Protein kinase Cdelta is responsible for constitutive and DNA damage-induced phosphorylation of Rad9. *EMBO J.* (2003), **17**;22(6):1431-41.

Youssef G & Links M. The prevention and management of cardiovascular complications of chemotherapy in patients with cancer. *Am J Cardiovasc Drugs* (2005), **5**:233–243.

Yusuf N, Irby C, Katiyar SK & Elmetts CA. Photoprotective effects of green tea polyphenols. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* (2007), **23**: 48–56.

Z

Zamzami N & Kroemer G. The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens. *Nat Rev Mol Cell Biol* (2001), **2**:67-71.

Zhang J, Chen Y-H & Lu Q. Pro-oncogenic and anti-oncogenic pathways: opportunities and challenges of cancer therapy. Review Article, *Future Oncol* (2010), **6**(4): 587–603

Zhang R, Al-Lamki R, Bai L, Streb JW, Miano JM, Bradley J & Min W. Thioredoxin-2 inhibits mitochondria-located ASK1-mediated apoptosis in a JNK-independent manner. *Circ Res* (2004), **94**:1483–1491

Zhao JQ, Wen YF, Bhadauria M, Nirala SK, Sharma A, Shrivastava S, Shukla S, Agrawal OP & Mathur R. Protective effects of propolis on inorganic mercury induced oxidative stress in mice. *Indian Journal of Experimental Biology* (2009), **47**(4) : 264–269

Zeiss CJ. The Apoptosis-Necrosis Continuum: Insights from Genetically Altered Mice. Review Article. *Vet Pathol* (2003), **40**:481–495.

Zi X, Feyes DK & Agarwal R. Anticarcinogenic effect of a flavonoid antioxidant, silymarin, in human breast cancer cells MDA-MB 468: Induction of G1 arrest through an increase in Cip1/p21 concomitant with a decrease in kinase activity of cyclin-dependent kinases and associated cyclins. *Clin Cancer Res* (1998), **4**:1055–1064.

Zimmermann AK, Loucks FA, Schroeder EK, Bouchard RJ, Tyler KL & Linseman DA. Glutathione binding to the Bcl-2 homology-3 domain groove: a molecular basis for Bcl-2 antioxidant function at mitochondria. *J Biol Chem* (2007), **282**:29296–29304.

Zini R, Morin C, Bertelli A, Bertelli AA & Tillement JP. Effects of resveratrol on the rat brain respiratory chain. *Drugs Exp Clin Res* (1999), **25**(2-3):87-97.

(Disponible à partir de : URL :

<http://www.cnrs.fr/dissiers/doschim/imArt:peau:derme01.html>)

ARTICLES

Ethanollic Extract of Algerian Propolis and Galangin Decreased Murine Melanoma Tumour Progression

L. Benguedouar^{1,2}, M. Lahouel², S.C. Gangloff³, A. Durlach⁴, F. Grange^{1,5}, P. Bernard^{1,5} and F. Antonicelli^{1,*}

¹Laboratoire de Dermatologie, UFR Médecine, EA-7319 Derm-I-C, 51 rue Cognacq Jay, 51095 REIMS Cedex;

²Laboratoire de Toxicologie Moléculaire, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université de Jijel BP: 98, Ouled Aissa, Jijel 18000, Algérie; ³EA 4691 «Biomatériaux et inflammation en site osseux», UFR de Pharmacie, Pôle Santé, SFR CAP-Santé (FED 4231), Université de Reims Champagne-Ardenne, 1 Avenue du Maréchal Juin, 51095, Reims Cedex, France; ⁴Laboratoire Anato-Pathologie Department of Reims Hospital, CHU Reims, 45, rue Cognacq-Jay 51092 REIMS Cedex; ⁵Service de Dermatologie, Hôpital Robert Debré, CHU Reims, avenue du Général Koenig, 51092 REIMS Cedex

Please provide
corresponding author(s)
photograph
size should be 4" x 4" inches

F. Antonicelli

Abstract: Melanoma is the more dangerous skin cancer, and metastatic melanoma still carries poor prognosis. Despite recent therapeutic advances, prolonged survival remains rare and research is still required. Propolis extracts from many countries have attracted a great deal of attention for their biological properties. We here investigated the ability of an ethanolic extract of Algerian propolis (EEP) to control melanoma tumour growth when given to mice bearing B16F1 melanoma tumour either as preventive or as therapeutic treatment. EEP given after tumour occurrence increased mice survival (+30%) and reduced tumour growth (-75%). This was associated with a decrease of the Mitotic Index (-75%) and of Ki-67 (-50%) expression. When given either before or both before and after tumour occurrence, EEP reduced tumour growth but without prolonging mice life. Isolation of B16F1 melanoma cells from resected tumour showed that preventive and curative EEP treatments reduced invasiveness by 55% and 40% respectively compared to control. Galangin, one of the most abundant flavonoids in propolis, significantly reduced the number of melanoma cells *in vitro* and induced autophagy/apoptosis dose dependently. In conclusion, we showed that EEP reduced melanoma tumour progression/dissemination and could extend mice lifespan when used as therapeutic treatment. Then, EEP may help patients with melanoma when used as a complementary therapy to classical treatment for which autophagy is not contraindicated.

Keywords: Melanoma, propolis, complementary medicine, galangin, dermatology.

Received: October 30, 2015

Revised: January 27, 2016

Accepted: February 10, 2016

INTRODUCTION

Melanoma is the most dangerous skin cancer worldwide and metastatic melanomas still have a poor median survival time despite recent advanced therapeutic options [1]. Compared to traditional chemotherapy, new therapies for metastatic melanoma, such as MAPK pathway inhibitors, anti-cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen-4 (CTLA-4), and programmed cell death protein 1 (PD-1)/programmed cell death ligand 1 (PD-L1) pathway blocking antibodies, as well as combination strategies, have all contributed to limit melanoma progression [2-5]. Although melanoma treatments have made significant progress, there is still a need of research to improve treatment effectiveness and safety, and long-term outcome in patients with advanced melanoma.

Modern drug discovery uses a number of natural product sources in different therapeutic ways [6-8]. In this line, a number of studies have sought dietary medicine to reduce either cancer risks or adverse effects bound to classical chemotherapy, notably in dermatology [9]. Propolis extracts have been used as a folk medicine to improve human health and prevent diseases occurrence. Propolis is a chemically complex resinous honeybee product, which has gained worldwide popularity as an anti-oxidant agent [10, 11], and which over the last decades has shown many other biological properties such as anti-inflammatory, immunomodulatory, anti-oxidative and antitumoral effects. However, most of these effects were shown with propolis collected from different geographic

region, and the ethnopharmacological approaches highlighted that the highly variable chemical composition of the different propolis extracts tested was responsible for the different effects observed from one propolis to another.

The chemical composition of propolis depends on several factors bound to the phylogeographic characteristics of the site where it is collected, therefore highlighting the difficulties to standardize the biological effects over time, as it depends on the type of plants and the soils from which bees collect bud exudates. Furthermore, presence of heavy metal and pesticides may also interfere with biological properties attributed to propolis. Then, a critical step in determining the proper antitumoral properties of propolis extract is to eliminate such variables by using propolis collected in a unique area, in the same non-polluted environment, and from the same kind of plants over the years. In this study, we used an ethanolic extract of propolis (EEP) from a protected area of Algeria supplied by a honeybee keeper of the region of Kaous - Jijel (Algerian eastern Mediterranean coast) to investigate whether propolis actually displays *in vivo* anticancer activities in a model of murine melanoma.

Chemical analysis of this Algerian propolis allowed identification of several anti-cancer phenolic compounds such as galangin (Table 1) [12]. Galangin was shown to induce melanoma cell apoptosis *in vitro* [13] and to inhibit *in vivo* tumour growth and metastasis in a mice melanoma model [14]. Like propolis extracts, galangin (3,5,7-trihydroxyflavone), possesses various biological activities including antioxidant and radical scavenging activities [15], antimutagenic and anticlastogenic effect, and modulation of cytochrome P450 enzymes [16]. However, the complex composition of propolis could interfere on the global activities of this natural product.

*Address correspondence to this author at the Laboratoire de Dermatologie, Unité de Formation et de Recherche de Médecine, 51 rue Cognacq-Jay, 51095 REIMS Cedex; Tel: ??????????????????; Fax: ??????????????????; E-mail: frank.antoncelli@univ-reims.fr



Table 1. Main chemicals of the Algeria propolis.

Compounds	%
Aliphatic acids	
9,12- Octadecadienoic acid (Z/Z)	1.89
2- Propenoic acid, 3- (4-hydroxyphenyl)	0.77
4- (Methylamino)butyric acid	0.92
Aromatic acids	
Benzene acetic acid, alpha- (hydroxymethyl)-, (+/-).	2.39
p-Hydroxycinnamic acid	5.02
5-O-Methyl-d-gluconic acid dimethylamide	0.03
Esters	
p-Hydroxycinnamic acid, ethyl ester	0.91
Hexanoic acid, 2-phenyl ester	0.62
Hexadecanoic acid, 15-methyl-,methylester	0.90
6-Octadecanoic acid, methyl ester	0.70
1,2-Benzenedicarboxylic acid, diisooctyl ester	0.41
4-Fluoro-1-methyl-5-carboxylic acid, ethyl ester	0.07
Chloromethyl 2-chlorododecanoate	0.15
Flavonoids	
Pinostrobin chalcone	0.67
Pinocembrin	0.33
Tectochrysin	1.00
Sesquiterpenes	
1,4-Methanoazulen-7 (1H)-one, octahydro-4,8,8,9-tetramethyl	1.00
Alcohols	
6-Phenyl-n-hexanol	0.94
1,4-Benzenediol,2,5-bis (1,1-dimethylethyl)	2.52
1-Octadecanol	0.14
Cyclohexanol, 2,3,dimethyl	
Others	
Cyclopropane,1,1,2-trimethyl-3- (2-methyl-1-propenyl)	1.28
Benzene, 3-cyclohexan-1-yl	1.20
Benzene, 3-cyclohexan-1-yl	1.07
3 (2H)-Furanone, dihydro-2,2-dimethyl-5-phenyl	0.35
Benzene, 1,1'- (1,2-cyclobutanediyl)bis-,cis	2.68
1H-1,2,3-Triazole-1,5-diamine,3-nitro	0.29
3-[4-Cyano-1,2,3,4-tetrahydronaphthyl]	0.16
propanenitrile	2.20
Chathine	0.13
2-Chloropropionamide	
Cyclopentadecanone, 2-hydroxy	
5-Iodohistidine	
Acetamide, 2-cyano	0.13

Data from Boutabet K *et al.* Indian J Nephrol. 2011 [12].

Because people tend to use dietary medicine rather than chemical drugs to prevent disease occurrence, EEP was evaluated as a chemopreventive drug on melanoma development. However, as natural products are a classical source of therapeutic compounds, we also investigated the curative potential of EEP in combination or not to the preventive treatment. In this study, we demonstrated the beneficial effects of EEP in a mouse bearing melanoma tumour model. The best results on disease survival and on tumour progression were obtained when EEP was given as a curative treatment. Furthermore, we also showed that among the different phenolic compounds of this natural honey bee product, galangin was the main flavonoid that reduced tumour growth by inducing autophagy of melanoma cell.

MATERIAL AND METHODS

Propolis Collection

Crude propolis extract was supplied by an Algerian honeybee keeper from the region of Jijel (Algerian eastern Mediterranean coast). The EEP was prepared as previously described [10].

In Vitro Cell Culture

The murine (B16F1) and human (SKMEL-28) melanoma cell lines were cultured in our laboratory as previously described [17]. Human dermal fibroblasts were purchased from PromoCell (France). Briefly, cell lines were grown in DMEM supplemented with 10% foetal calf serum (FCS) and 1% penicillin-streptomycin (Gibco, Karlsruhe, Germany). Cells were maintained at 37°C in a humidified atmosphere at 95% and 5% CO₂.

Animal Studies and Ethical Statement

This study was carried out in strict accordance with the recommendations in the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the French Health government. The protocol was approved by the Committee on the Ethics of Animal Experiments of Reims Champagne-Ardenne (C2EA-56). Healthy (6 to 8 weeks, average body weight 18-20 g) C57BL/6 female mice (Harlan Sprague Dawley Inc., France) were housed (6 mice/cage) in a classical animal facility (B51-454-3) and acclimated for at least one week, 12:12 light:dark cycle with lights on at 7am and off at 7pm before experiments. Animals were housed in 365x 207x 140 mm cages (Techniplast, 1284L, Eurostandard Type IV) and given access to food and water ad libitum. To minimize mouse discomfort, environmental enrichment included one handful of paper wool nesting material. During housing, animals were monitored daily. No adverse events were observed.

Tumours were established by subcutaneous injections of 2.5 x 10⁵ B16F1 melanoma cells in 100 µL of PBS in the left flank of mice anesthetized by Avertin (0.4 mL at 1.2% /mouse) (T4840-2, Sigma-Aldrich). Animals were kept at 21°C under a heating lamp until full recovery. Tumour formation was detected by palpation of the flank of the animals around 8 days after cells subcutaneous injection. This was considered as day 0 of treatment. Weight and stress behaviour (spikey-fur) were checked every two days for up to 21 days. Tumour volumes were calculated as follows: $v = 1/2 A \times B^2$ with A = largest and B = smallest tumour dimension [17]. An end-point tumour volume was defined as 4000mm³. Mice were distributed randomly (1 mouse/cage) and divided into 4 groups of 7 animals each for statistical analysis. Mice were treated intraperitoneally with PBS containing an equal volume of ethanol with respect to the EEP preparation (control) or with the EEP at doses of 10mg/Kg every 48 hours either before (preventive, starting 5 days before tumour induction and until the day of tumour detection) or after (curative, starting the day after tumour occurrence) or both (preventive + curative). Apart from the survival experiments, mice were euthanized by cervical dislocation under isoflurane anesthesia at day 21. Not one animal died before the end of the experiments. For the survival experiments, death as an endpoint experiments had been clearly exposed before acceptance by the local ethical comity. When animals had heavy tumours, food was placed at animal close disposal. With respect to the end-point volume defined as 4000mm³ and the welfare of the animals, none had to be excluded or euthanized before the end of the experiments. All experiments had been reproduced twice.

Mitotic Index (MI)

Paraffin embedded tumours were cut into thin sections (4µm) and stained with haematoxylin and eosin. MI corresponded to the number of mitoses observed in 10 successive high power fields (HPF) using a Shimadzu microscope with a 40x objective and a 10x ocular, each field corresponding to a surface of 1mm². Criteria of Van Diest *et al.* [18] were used to define mitotic figures. In all cases, the sample size allowed to achieve the mitotic count on 10 HPF. Mitotic figures were identified using strict criteria, and only nuclei with definite morphologic features of metaphase, anaphase, or telophase were counted. Three slides from each animal group were used.

Immunohistological Analysis

Sections of 4 μm from melanoma tumours blocks were coated on superfrost slides. Antigen retrieval from dewaxed section [19] was achieved by a 30 minutes heat treatment in boiling water bath emerged in Tris-EDTA pH 9. Immunohistochemical staining was performed on these sections using a rabbit anti-mouse Ki-67 antibody (Millipore, AB9260) for 1 hour at room temperature with 1:300 dilution followed by the anti-rabbit secondary antibody (Dako) at 1:200 for 30 min. Diaminobenzidine (Dako) was used as the chromogen and hematoxylin as the nuclear counterstain. As a negative control, adjacent tissue sections were incubated with PBS, replacing the primary antibody.

Ki-67 Index Determination

The Ki-67 labelling index (Ki-67LI) was defined as the percentage of cells immunohistochemically positive among 500 neoplastic cells. Sections were counted manually at high magnification (X 400) with ImageJ counting software in the areas with high number of stained cells and homogeneous immunostaining. For judging positivity of immunostaining, only strong nuclear immunostaining was regarded as positive. The number of positive nuclei was reported to the total number of nuclei in 10 fields of the same section [20]. Three slides from each group were used to assess Ki-67LI. The results were expressed as mean \pm standard deviation.

Ex Vivo Proliferative Behaviour of B16F1-Tumour Melanoma Cells

Excised tumours were weighted and cut into small fragments, washed twice in PBS and homogenized to single cell suspension. Two days after culture, adherent cells were washed twice with PBS, trypsinized and seeded at 20000 cells/well (12 wells plate). After 72 hours incubation, cells were counted on a Malassez cell. Results are reported as mean of cell number in three wells. This experiment was repeated three times.

In Vitro Invasion Assay

B16F1 melanoma invasiveness issued from resected tumour was measured *in vitro* using Transwell[®] chambers (Sigma-Aldrich, Saint Quentin, Fallavier, France) coated with Matrigel[®] (30 $\mu\text{g cm}^2$, BD Biosciences, France). Briefly, the *in vitro* invasion tests were performed as follows: 50 000 tumour cells were suspended in serum-free DMEM containing 0.2% bovine serum albumin (BSA) and seeded on coated-membranes. DMEM supplemented with 2% FBS and 2% BSA was used as a chemoattractant. After an overnight incubation, cells were fixed with methanol and stained with crystal violet. Cells remaining on the upper side of the membranes were eliminated, and those on the lower side counted.

Western-Blot

B16F10 and SKMEL-28 melanoma cells were treated with galangin for 24 h. Equal amounts of protein were electrophoresed on a 10% SDS-PAGE gel and transferred to nitrocellulose. The proteins were probed with primary antibodies to PARP (46D11) (cell signaling #9532). Anti-rabbit antibody was purchased from Millipore.

PCR Arrays Analysis

Total RNA from melanoma cells was prepared using a phenol-based method (TRIzol[®] Reagent) and further purified using the RNeasy MiniKit (Qiagen). Prior to performing real-time PCR, cDNA synthesis was reverse transcribed using purified RNA and the RT²First Strand Kit. Real-Time PCR was then performed using the human cancer pathway finder PCR Arrays (PAHS-033, Qiagen SaBiosciences) following the instructions of the manufacturer.

Autophagy Analysis

Rapamycin (500 nmol/L) treated cells (2 h) were used as positive control of autophagy induction. Galangin induced autophagy was analysed with the autophagy detection kit (ab139484, Abcam, France). The cells were stained following the manufacturer's instruction to reveal the vacuoles in the cytoplasm under fluorescence microscope.

Statistical Analyses

Statistical analyses were performed using Kyplot software (version 2.0 beta 13). Data are presented as means \pm SEM and analysed by Wilcoxon (Mann-Whitney) test for tumour volumes, Mitotic index and Ki-67LI comparison followed by test for multiple comparisons. Survival curves were performed using GraphPad Prism software (version 6.04, 1992-2014) and compared using Log-rank (Mantel-cox) and Gehan-Breslow Wilcoxon test. A *p* value of less than 0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

Effects of Propolis on Mice Bearing Melanoma Tumour Survival

Mice survival was conducted on the classical syngenic model C57BL/6 mouse inoculated subcutaneously with B16F1 cells, and treated or not intraperitoneally with EEP either before (preventive group) or after (curative group) tumour occurrence, or even both before and after (preventive + curative group). None of the mice in either group displayed any toxicity following the repeated injections as estimated by mice welfare and weight survey throughout the treatment. We first tested whether EEP increased the time of host survival in mice bearing melanoma tumour. As shown in Fig. 1A, only a treatment with curative EEP significantly prolonged the survival of treated mice by 30% as compared to untreated mice.

In Vivo Effects of Propolis on Melanoma Tumour Progression

For these studies, the same treatment schedules as described above were used, except that mice were euthanized after 21 days. In the control group that received only a vehicle solution, tumours volume reached a volume of approximately 3 cm^3 at day 21 after inoculation (Fig. 1B). EEP-treated mice showed significantly reduced tumour growth compared with control. Beneficial effects were observed when EEP was administered both in curative (55% inhibition) and in preventive treatments (40% inhibition), whereas a long run treatment (preventive and curative) did not significantly affect tumour growth. At day 21, tumour resection showed that tumour weight was significantly reduced in both preventive and curative groups compared with control, whereas again a dual preventive plus curative treatment was less effective (Fig. 1C).

Effects of Propolis on Tumour Cell Proliferation

The mitotic index (MI) was then determined on primary tumour section (Fig. 2A). The upper part of the figure is a representative picture of tumour section from each group. The statistical analyses of 3 independent experiments showed that both EEP curative and EEP preventive treatments significantly reduced melanoma cell proliferation as compared with control. Ki-67LI was further used for evaluating tumour cell proliferation (Fig. 2B). The corresponding Ki-67LI revealed that all EEP treatments decreased tumour cell proliferation compared with control. Finally, to test melanoma cells growth, isolated cells from freshly resected tumour were seeded at the same density for further *ex vivo* culture. Compared to cells isolated from the control group, melanoma cells issued from all three EEP-treated mice groups exhibited significant reduced-cell count numbers after 3 days culture (Fig. 3A). Concomitantly these

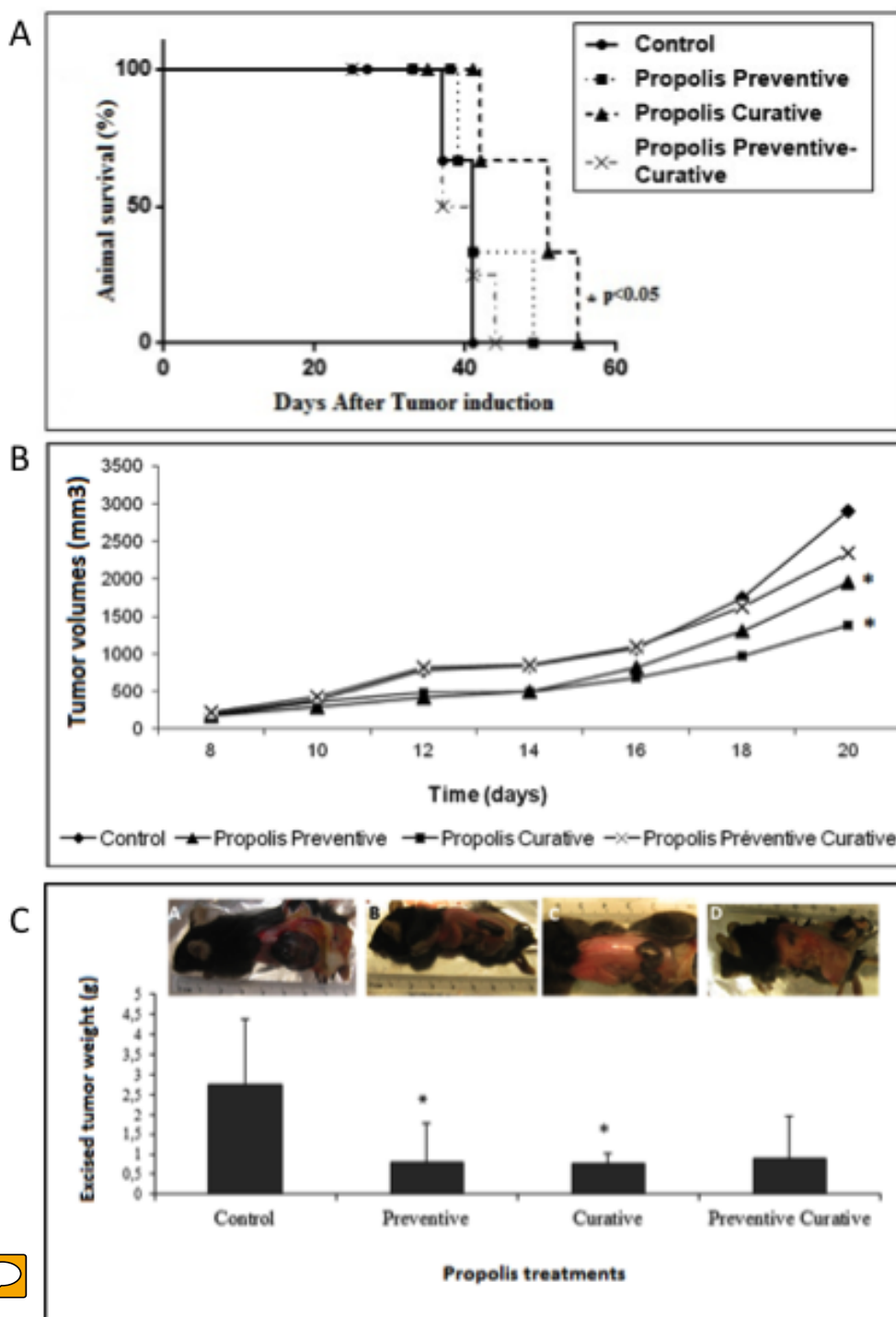


Fig. (1). *In vivo* effects of propolis on life span and tumour progression of mice bearing melanoma tumour. Animals were injected subcutaneously with B16F1 cells at day 0. Treatment by propolis (10mg/kg) or vehicle was given intraperitoneally every 48h. **A-** Kaplan Meier survival curves were measured over a period of 55 days. The survival rate was increased in mice receiving propolis as a curative treatment (**: $p < 0.01$, logrank analysis). **B-** Effects of propolis treatments on tumour growth rate. Tumour volumes were measured every 48h after tumour occurrence at day 8. Animal sacrifice has been performed at day 21. (*: $p < 0.05$). **C-** Weight of excised tumours at day 21. Significant diminution in tumour burden was observed in both preventive and curative treatments (*: $p < 0.05$).

cells were also tested for their invasive ability using a Transwell® chamber coated with Matrigel®. *Ex vivo* melanoma cells invasion was significantly reduced when issued from EEP-treated mice, when EEP was given both before and after tumour occurrence (Fig. 3B). Finally, the vascular structures, required for *in vivo* tumour growth and dissemination, were reduced upon all EEP treatments (Fig. 4).

PHENOLIC COMPOUNDS INHIBITED B16F1 CELL SURVIVAL

To examine the effects of phenolic compounds on melanoma cells viability, different concentrations (10, 50 and 100 μM) of galangin, naringenin, chrysin and pinostrobin were tested (Table 2). Compared to control, galangin strongly decreased B16F1 cells

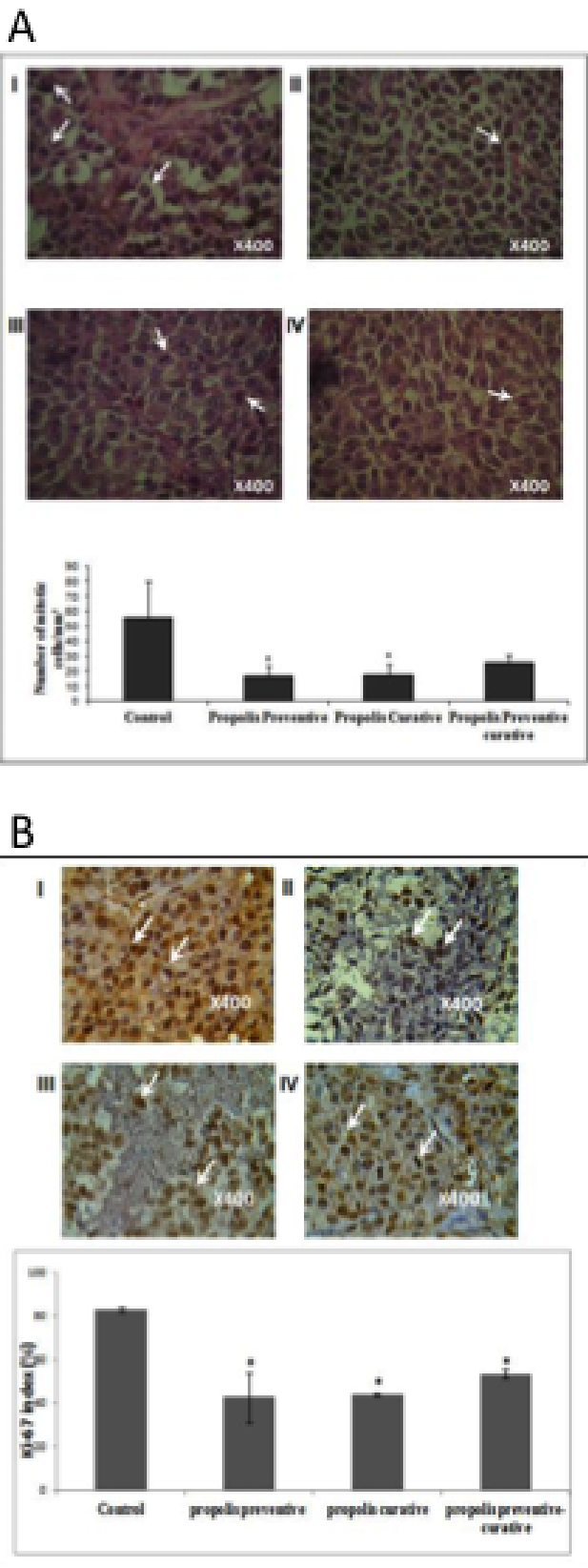


Fig. (2). *In vivo* effects of propolis on tumour cell proliferation. Sections from primary melanoma tumours were excised from mice treated or not with propolis. I: control, II: preventive treatment, III: Curative treatment. IV: Preventive-curative treatment. **A-** Tumour sections were stained with haematoxylin and eosin. Number of mitotic cells counted in 10 fields of the same section with respect to the total number of cells. Three sections per group were analysed. Variation in the number of mitotic cells according to treatment is shown in the histogram. **B-** Ki-67LI was determined by counting positive cells relatively to the total number of cells in 10 fields of the same section. Haematoxylin and eosin were used as counterstain solutions. The histogram displays variation in the Ki-67LI according to treatment.

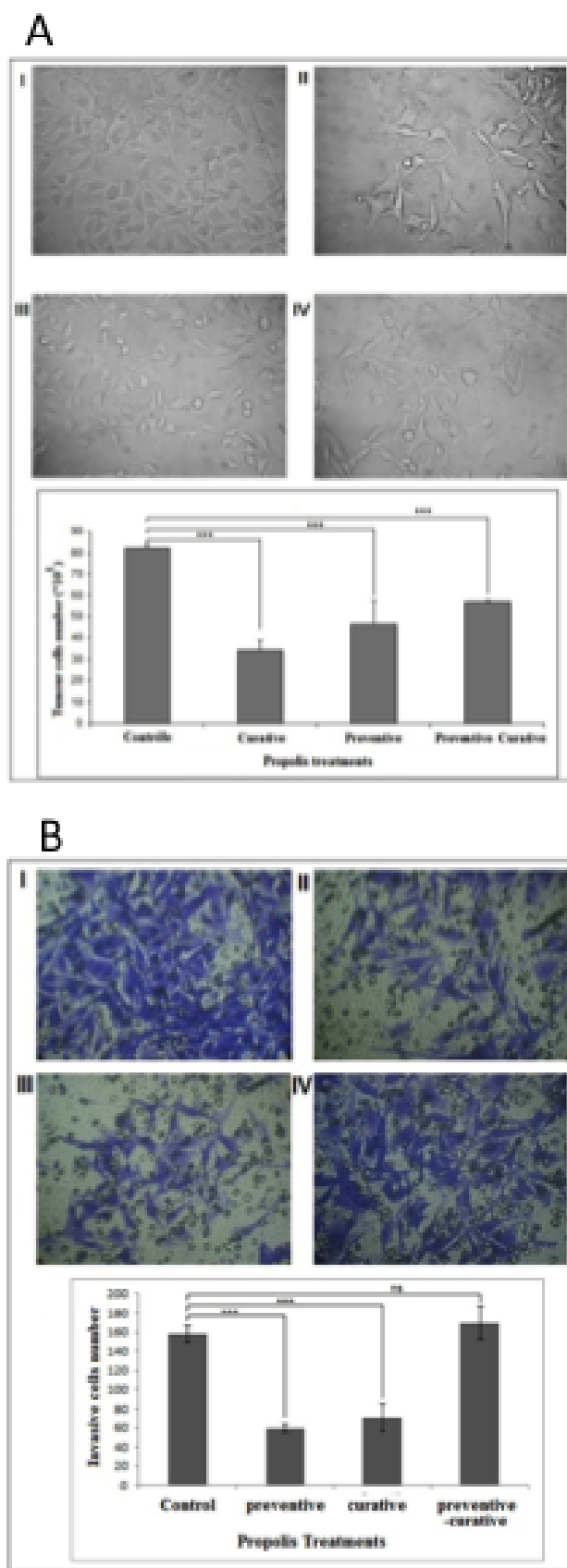


Fig. (3). *Ex vivo* effects of propolis on tumour cell proliferation and invasion. Melanoma cells isolated from tumours resected from mice treated or not with propolis. The experiences were repeated three times from 3 different tumours for each group. a- Cell proliferation was determined by cell counting after a period of 72h as described in the Materials and Methods section. b- Melanoma cell invasiveness was measured *in vitro* using Transwell® chambers coated with Matrigel®.

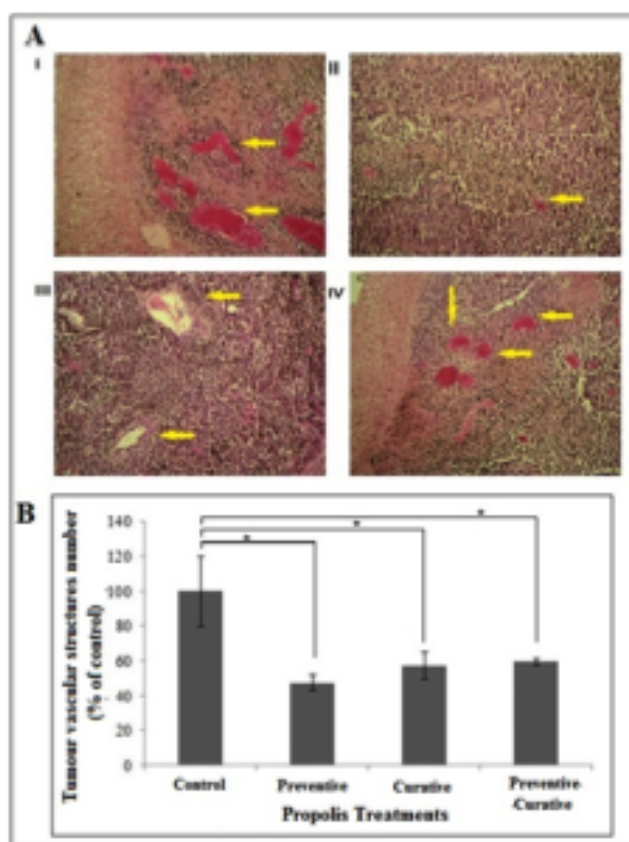


Fig. (4). *In vivo* effects of propolis on vascular structures within melanoma tumours. a- Tumour sections from each group were stained with haematoxylin and eosin solutions. Number of blood vessels was counted on 3 different sections. b- Variation in the number blood vessels according to treatment is shown in the histogram.

survival from the first dose used, naringenin displayed a dose-dependent effect, whereas neither pinostrobin nor chrysin altered

Table 2. Chemical structure of flavonoids.

Galangin (Sigma, 282200)	
Naringenin (Sigma, N5893)	
Chrysin (Sigma, 95082)	
Pinostrobin Chalcone (Sigma, 38790)	

melanoma cell viability at the concentrations analysed (Fig. 5A). Upon galangin treatment, the number of viable cell was around 30% at 10 μ M and 10% at 50 μ M and 100 μ M, respectively. Galangin treatment reduced cell survival within the same proportion when tested on the human melanoma cells SKMEL-28 (Data not shown). Kinetics experiments showed that combination of galangin with the other phenolic compounds did not improve its efficacy to reduce melanoma cells viability (Fig. 5B). Meanwhile, compared to untreated cells, galangin did not induce *in vitro* fibroblast cell death when used up to 40 μ M for 24hours (Fig. 5C).

GALANGIN CONTROLLED MELANOMA CELL PROLIFERATION, ADHESION, APOPTOSIS AND AUTOPHAGY

Galangin-induced apoptosis was evaluated by detection of 116 kDa PARP cleavage into its 89 kDa subunit in both mouse and human melanoma cells treated with 10, 20 and 40 μ M of galangin during 8 hours. In both cell types, PARP cleavage was observed when cells were treated with galangin at concentrations of 20 and 40 μ M but not with the dose of 10 μ M (Fig. 6A). To test the hypothesis that reduced cell growth upon galangin treatment involving several mechanisms associated or not with the induction of the apoptotic process, we used the Human Cancer Pathway Finder PCR Array to determine changes in the specific genes encoding proteins related to the main hallmarks of cancer. Among the 84 genes analysed, 28 showed an affected expression in response to galangin (10, 20 and 40 μ M) with regard to resting B16F1 cells (Fig. 6B). Both protease genes (PLAU, MMP-2, MMP-9), anti-protease and protease receptors genes (PLAUR, SERPINB5, TIMP-1) were up-regulated. Several cell adhesion molecules were down regulated (MCAM, ITGA4, ITGB3, ITGB5). Genes corresponding to molecules involved in cell cycle, cell signalling and transcription factors were

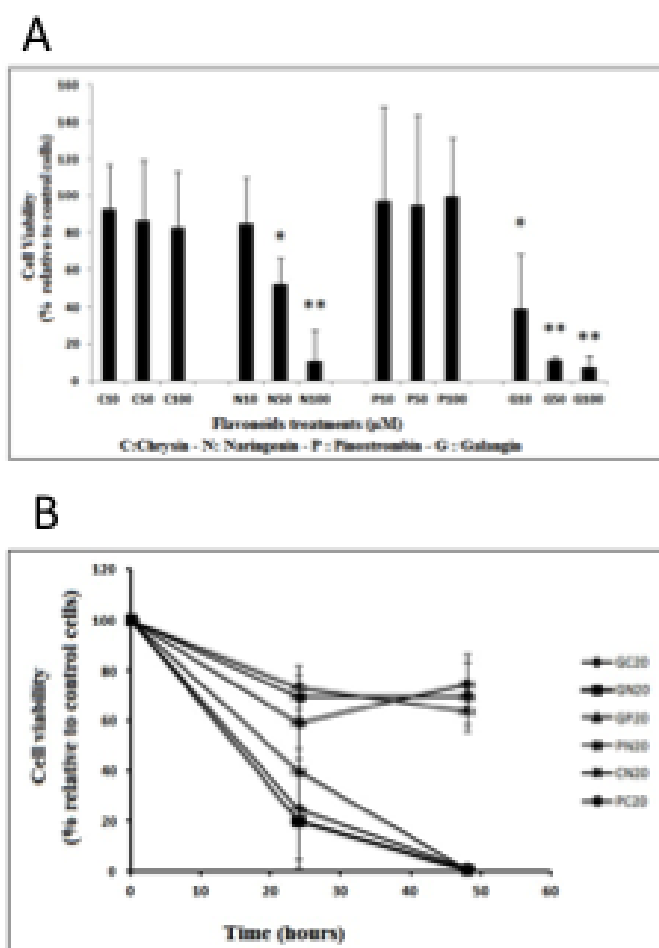


Fig. (5). *In vitro* effects of phenolic compounds on cell survival. **A-** Dose response effects on melanoma cell viability determined by cell counting after a period of 24h. **B-** Kinetics effects of flavonoids combination on melanoma cell viability was evaluated after 24 and 48 h by cell counting. **C-** Dose response effects on human fibroblast cell viability determined by cell counting after a period of 24h.

also down regulated (AKT1, CDC25A, E2F1, RB1, TP53, TWIST1). Also, anti-apoptotic gene (BCL2, BCL2L1) was down-regulated, while gene involved in the extrinsic pro-apoptotic signalling was up-regulated (CASP8, TNF, TNFRSF25). As this later cascade has also been implicated in the induction of the autophagy process, we analysed the capacity of low concentration of galangin to induce autophagosome formation within the early phase of treatment. As a positive control, melanoma cells were treated with Rapamycin (0.5µM) a typical autophagy inducer. Untreated cells did not display green staining, while galangin-treated cells displayed intense punctuate structures identical to Rapamycin-treated cells after 2 hours (Fig. 6C).

DISCUSSION

We here provided several evidences that the ethanolic extract from Algerian propolis increased the median lifespan in mice when given as an *in vivo* curative treatment to melanoma. Besides, EEP displayed multiple beneficial influences on melanoma progression that were shared by galangin, one of the most abundant flavonoid present in its constitution.

Preventive treatment of EEP also reduced melanoma tumour growth. Cancer prevention is still a major challenge for the medical and general community. As the population is becoming more and more aware of the danger of cancer, people seek to reduce their risk of developing malignancy. Although the main environmental risk factor for melanoma is sun exposure, avoiding UV radiation

exposure is not only unrealistic but also unable to totally prevent the risk of melanoma occurrence [21]. Besides, it is well accepted that the risk of developing a cancer is affected by various individual lifestyle choices, and nowadays people tend to have more concerns about environmental factors and personal behaviours. We previously published that consumption of propolis extract helped against mitochondrial stress induced by anti-neoplastic agent [10]. Thus, a number of people opt for dietary medicine, as natural products are thought to display a large variety of healthy properties. In this setting, our *in vivo* study on mice suggested that propolis extract might help to limit melanoma development in human beings. Indeed, like many other phytochemicals currently ingested by individual such as curcumin and green tea [6, 22], propolis demonstrated its beneficial effects with respect to melanoma progression.

Propolis given after tumour occurrence not only reduced melanoma tumour cell proliferation *in vivo* but also prolonged mice survival. Tumour growth reduction went along with an *ex vivo* decrease of tumour cell invasiveness, a very important effect as invasiveness and metastasis represent a major risk of death in patients with melanoma. Accordingly, mice tissues analysis did not reveal any metastasis in the four groups of mice. Prognostic studies in patients with stage III melanoma showed that an older age, the number of nodal metastases, presence of ulceration, and the mitotic rate were independent variables associated with death [23, 24]. In the present study, histological analysis of tumours from propolis-treated mice revealed a decrease of the mitotic index without any

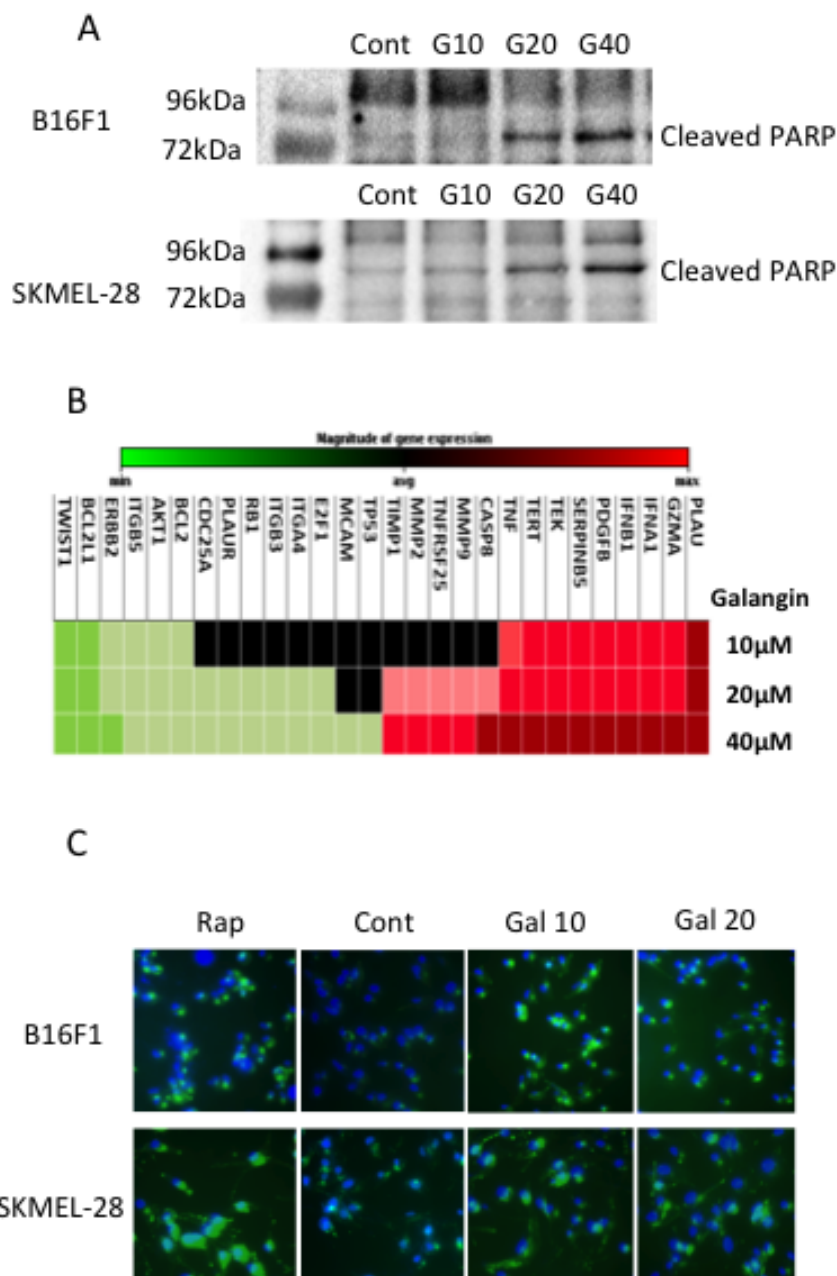


Fig. (6). *In vitro* effects of galangin on B16F1 melanoma cell. a- Apoptosis was evaluated through PARP cleavage in melanoma cells treated with 10, 20 and 40 μM of galangin for 24h. b- Variation in genes expression determined by PCR Array in B16F1 melanoma cells treated with 10, 20 and 40 μM of galangin for 24h. c- Galangin elicits autophagy in B16F1 cells. A Representative photographs of melanoma cells visualized by fluorescence microscopy

change in both the tumour cells phenotype, the number of necrotic cells and the immune infiltrate within the tumour or at close vicinity suggesting that tumour growth reduction involved other mechanisms than cell death. Accordingly, propolis treatments also reduced tumour vascularisation and the mitotic index. Then, by reducing the proliferative and invasive properties, propolis helps in limiting both melanoma tumour growth and subsequently melanoma cell dissemination. Altogether, the curative propolis treatment decreased melanoma aggressiveness and favoured mice survival. Of note, the preventive propolis treatment also reduced tumour growth and invasion but did not prolong mice survival, suggesting that the propolis curative treatment displayed short term effects on other vital mechanisms that still need to be determined.

It is proposed that the most important pharmacologically active constituents in propolis are flavonoids, which display a broad

spectrum of biological activities according to their chemical composition [25]. For instance, we and others have shown the importance of caffeic acid and its derivatives, among other products, for the antioxidant, anticancer, anti-immunomodulatory, and anti-inflammatory properties of propolis [26-31]. Notably, propolis extracts modulate the matrix metalloprotease activities [31], an enzyme family largely involved in melanoma progression [32-35]. In this study, the antitumoral function of the EEP was further supported by the fact that galangin, an active flavonoid present in this natural product [12], also reduced melanoma cell viability while normal human dermal fibroblasts viability was not affected. Accordingly, galangin was shown to inhibit the formation of tumour colonies in the lung tissue on C57BL/6J mouse lung metastatic model using B16F10 melanoma cells [14], thereby supporting the *in vivo* anticancer properties of propolis. Of note, the

effects of galangin on cell proliferation were reduced by approximately 50% and 85% in the presence of 5% and 10% of serum respectively, suggesting that galangin more likely impaired the primary tumour growth within the tissue rather than within the blood. Also, PCR array experiments showed that galangin reduced the expression of many integrins, a protein family that plays a key role in regulating both mitogenic signalling, cell adhesion and cell migration [36]. In this line, Zhang and collaborators demonstrated that galangin inhibited FAK gene expression, a key mediator involved in aggressive melanoma phenotype [14]. Propolis also reduced melanoma cell invasion properties, thereby suggesting that different functions could be affected according to tumour staging. Noteworthy, the same group showed that galangin effectively inhibited formation and growth of metastatic loci *in vivo* [14]. Gene expression analysis also showed that galangin drove melanoma cells towards autophagy and apoptosis in a dose dependent fashion, confirming recent results linking autophagy to melanoma tumour development [37]. Under low concentrations of galangin, both human and murine melanoma cells became elongated and flattened, while high concentration (40 μ M) induced cell apoptotic morphological features. As mentioned above, such cell phenotype alteration was not observed when fibroblasts were treated with galangin at concentrations up to 40 μ M, suggesting that galangin preferentially targets tumour cells. Galangin-induced TNF, TNFR and Caspase-8 gene overexpression argued for the idea that autophagy prompted melanoma cell towards apoptosis by activation of the extrinsic pathway. In line with this, co-incubation with the ROS inhibitor N-acetyl-L-cysteine up to 10 mM did not antagonize the effects of galangin (data not shown).

The role of autophagy in tumorigenesis and cancer treatment is complex. Although numerous signalling pathway overlaps have been demonstrated between autophagy and apoptosis, autophagy can also stand for tumour survival. Indeed, autophagy was initially reported to protect cells from metabolic stress, thus preventing tumorigenesis [38]. However, established tumour cells may also employ autophagy to survive stresses such as nutrient limitation and hypoxia. Thus, in such conditions, a treatment with either propolis or galangin would not be of interest. However, we noticed in our study that intra-tumoral vascular structures were reduced in number and in size in mice treated with propolis. Concomitantly, the mitotic index of propolis-treated tumour was reduced. Then, one can hypothesize that *in vivo* nutrient limitation related to reduced vascular structure within the tumour could work in concert with a direct effect of galangin to induce autophagy as observed *in vitro*, with the final aim to reduce the tumour growth rate. Indeed, this neo-vascularization reduction was highly correlated with both the mitotic index and Ki-67LI values (R=0.986 and R=0.983 respectively). This suggests that several anti-tumoural mechanisms can be triggered upon propolis treatment such as autophagy and cell growth, which may act in concert to reduce tumour growth and to prolong tumour survival.

Most melanoma tumours are resistant to commonly used cancer treatment such as radiotherapy and classical chemotherapies, and it was proposed that tumour cells could also activate autophagy to survive cancer treatment. Indeed, increasing evidence showed that autophagy causes cell resistance to antineoplastic therapies [39]. In these conditions, favouring the autophagy process with propolis would be deleterious for cancer patients. This obviously reduces the therapeutic use of such autophagy-inducer molecules. However, such natural treatments may be of interest as alternative treatments in patients with resistant cytotoxic chemotherapy. Although this still needs to be validated, such natural anti-cancer products could be proposed in tandem with non-chemotherapy treatments for which induction of autophagy is not counter indicated. Oxidative stress and autophagy exhibit a dependent but inverse relationship. Decreased-autophagy activity increases oxidative stress and increased oxidative stress in turn downregulates the autophagy

pathway, favouring cell proliferation in the tumour thereof. For instance, a recent study has demonstrated that in mice, sub-lethal radiation could persistently down-regulate anti-oxidants and autophagy signalling, and upregulate oxidant production and proliferative signalling [40]. In such situations and maybe in radio-resistant melanoma, induction of autophagy by natural products such as propolis could be exploited to improve treatment efficiency, notably by reducing the side effects of the treatment or through the several propolis anti-tumoral effects.

In this study, we showed that the total ethanolic extract from natural Algerian propolis as well as galangin displayed several antitumoral properties. On one hand, they induced autophagy and apoptosis, and on the other hand they impaired cell proliferation, adhesion and invasion. In conclusion, our results suggest that propolis may help patients with melanoma, when used as a complementary therapy to classical treatment under certain conditions as specified above. To know in the future whether the Algerian propolis could eventually represent an actual therapeutic advance in patients with melanoma, it would be interesting to confirm these promising pre-clinical *in vivo* results on melanoma progression by evaluating the combination of propolis with radiotherapy or with novel targeted biotherapies for melanoma such as BRAF or MEK inhibitors and/or CTLA4 or PD-1 blocking antibodies.

CONFLICT OF INTEREST

The author(s) confirm that this article content has no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by a research grant from the Ligue contre le Cancer (Comité de l'Aube) (Prof Antonicelli) and the Algerian Ministry of High Education and Scientific Research (Prof Lahouel). We are also grateful to Dr .Niha for kindly providing free access to the laboratory of anatomic pathology.

AUTHORS CONTRIBUTIONS

Conceived and designed the experiments: AF GS

Performed the experiments: BL GS

Analyzed the data: AF BL GS DA BP GF

Contributed reagents/materials/analysis tools: AF LM

Wrote the paper: AF BL BP GS

REFERENCES

- [1] Cummins, D.L.; Cummins, J.M.; Pantle, H.; Silverman, M.A.; Leonard, A.L.; Chanmugam, A. Cutaneous Malignant Melanoma. *Mayo Clin. Proc.*, **2006**, *81*, 500-507.
- [2] Chapman, P.B.; Hauschild, A.; Robert, C.; Haanen, J.B.; Ascierto, P.; Larkin, J.; Dummer, R.; Garbe, C.; Testori, A.; Maio, M.; Hogg, D.; Lorigan, P.; Lebbe, C.; Jouary, T.; Schadendorf, D.; Ribas, A.; O'Day, S.J.; Sosman, J.A.; Kirkwood, J.M.; Eggermont, A.M.M.; Dreno, B.; Nolop, K.; Li, J.; Nelson, B.; Hou, J.; Lee, R.J.; Flaherty, K.T.; McArthur, G.A.; BRIM-3 Study Group. Improved Survival with Vemurafenib in Melanoma with BRAF V600E Mutation. *N. Engl. J. Med.*, **2011**, *364*, 2507-2516.
- [3] Hodi, F.S.; O'Day, S.J.; McDermott, D.F.; Weber, R.W.; Sosman, J.A.; Haanen, J.B.; Gonzalez, R.; Robert, C.; Schadendorf, D.; Hassel, J.C.; Akerley, W.; van den Eertwegh, A.J.M.; Lutzky, J.; Lorigan, P.; Vaubel, J.M.; Linette, G.P.; Hogg, D.; Ottensmeier, C.H.; Lebbé, C.; Peschel, C.; Quirt, I.; Clark, J.I.; Wolchok, J.D.; Weber, J.S.; Tian, J.; Yellin, M.J.; Nichol, G.M.; Hoos, A.; Urba, W.J. Improved Survival with Ipilimumab in Patients with Metastatic Melanoma. *N. Engl. J. Med.*, **2010**, *363*, 711-723.

- [4] Robert, C.; Thomas, L.; Bondarenko, I.; O'Day, S.; Weber, J.; Garbe, C.; Lebbe, C.; Baurain, J.-F.; Testori, A.; Grob, J.-J.; Davidson, N.; Richards, J.; Maio, M.; Hauschild, A.; Miller, W.H.; Gascon, P.; Lotem, M.; Harmankaya, K.; Ibrahim, R.; Francis, S.; Chen, T.-T.; Humphrey, R.; Hoos, A.; Wolchok, J.D. Ipilimumab plus Dacarbazine for Previously Untreated Metastatic Melanoma. *N. Engl. J. Med.*, **2011**, *364*, 2517-2526.
- [5] Topalian, S.L.; Hodi, F.S.; Brahmer, J.R.; Gettinger, S.N.; Smith, D.C.; McDermott, D.F.; Powderly, J.D.; Carvajal, R.D.; Sosman, J.A.; Atkins, M.B.; Leming, P.D.; Spigel, D.R.; Antonia, S.J.; Horn, L.; Drake, C.G.; Pardoll, D.M.; Chen, L.; Sharfman, W.H.; Anders, R.A.; Taube, J.M.; McMiller, T.L.; Xu, H.; Korman, A.J.; Jure-Kunkel, M.; Agrawal, S.; McDonald, D.; Kollia, G.D.; Gupta, A.; Wigginton, J.M.; Sznol, M. Safety, Activity, and Immune Correlates of Anti-PD-1 Antibody in Cancer. *N. Engl. J. Med.*, **2012**, *366*, 2443-2454.
- [6] Lao, C.D.; Demiere, M.-F.; Sondak, V.K. Targeting Events in Melanoma Carcinogenesis for the Prevention of Melanoma. *Expert Rev. Anticancer Ther.*, **2006**, *6*, 1559-1568.
- [7] Jensen, J.D.; Wing, G.J.; Dellavalle, R.P. Nutrition and Melanoma Prevention. *Clin. Dermatol.*, **2010**, *28*, 644-649.
- [8] Zheng, Y.Y.; Viswanathan, B.; Kesarwani, P.; Mehrotra, S. Dietary Agents in Cancer Prevention: An Immunological Perspective. *Photochem. Photobiol.*, **2012**, *88*, 1083-1098.
- [9] Katta, R.; Desai, S.P. Diet and Dermatology: The Role of Dietary Intervention in Skin Disease. *J. Clin. Aesthetic Dermatol.*, **2014**, *7*, 46-51.
- [10] Benguedouar, L.; Bousenane, H.N.; Wided, K.; Alyane, M.; Rouibah, H.; Lahouel, M. Efficiency of Propolis Extract against Mitochondrial Stress Induced by Antineoplastic Agents (doxorubicin and Vinblastin) in Rats. *Indian J. Exp. Biol.*, **2008**, *46*, 112-119.
- [11] Lisbona, C.; Díaz-Castro, J.; Alférez, M.J.M.; Guisado, I.M.; Guisado, R.; López-Aliaga, I. Positive Influence of a Natural Product as Propolis on Antioxidant Status and Lipid Peroxidation in Senescent Rats. *J. Physiol. Biochem.*, **2013**, *69*, 919-925.
- [12] Boutabet, K.; Kebsa, W.; Alyane, M.; Lahouel, M. Polyphenolic Fraction of Algerian Propolis Protects Rat Kidney against Acute Oxidative Stress Induced by Doxorubicin. *Indian J. Nephrol.*, **2011**, *21*, 101-106.
- [13] Zhang, W.; Lan, Y.; Huang, Q.; Hua, Z. Galangin Induces B16F10 Melanoma Cell Apoptosis via Mitochondrial Pathway and Sustained Activation of p38 MAPK. *Cytotechnology*, **2013**, *65*, 447-455.
- [14] Zhang, W.; Tang, B.; Huang, Q.; Hua, Z. Galangin Inhibits Tumor Growth and Metastasis of B16F10 Melanoma. *J. Cell. Biochem.*, **2013**, *114*, 152-161.
- [15] Russo, A.; Longo, R.; Vanella, A. Antioxidant Activity of Propolis: Role of Caffeic Acid Phenethyl Ester and Galangin. *Fitoterapia*, **2002**, *73 Suppl 1*, S21-S29.
- [16] Tiong, K.H.; Yiap, B.C.; Tan, E.L.; Ismail, R.; Ong, C.E. *In Vitro* Modulation of Naturally Occurring Flavonoids on Cytochrome P450 2A6 (CYP2A6) Activity. *Xenobiotica Fate Foreign Compd. Biol. Syst.*, **2010**, *40*, 458-466.
- [17] Wald, M.; Olejár, T.; Sebková, V.; Zadinová, M.; Boubelík, M.; Poucková, P. Mixture of Trypsin, Chymotrypsin and Papain Reduces Formation of Metastases and Extends Survival Time of C57Bl6 Mice with Syngeneic Melanoma B16. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **2001**, *47 Suppl*, S16-S22.
- [18] van Diest, P.J.; Baak, J.P.; Matze-Cok, P.; Wisse-Brekelmans, E.C.; van Galen, C.M.; Kurver, P.H.; Bellot, S.M.; Fijnheer, J.; van Gorp, L.H.; Kwee, W.S. Reproducibility of Mitosis Counting in 2,469 Breast Cancer Specimens: Results from the Multicenter Morphometric Mammary Carcinoma Project. *Hum. Pathol.*, **1992**, *23*, 603-607.
- [19] Li, L.X.; Crotty, K.A.; Kril, J.J.; Palmer, A.A.; McCarthy, S.W. Method of Melanin Bleaching in MIB1-Ki67 Immunostaining of Pigmented Lesions: A Quantitative Evaluation in Malignant Melanomas. *Histochem. J.*, **1999**, *31*, 237-240.
- [20] Haapasalo, H.; Pesonen, E.; Collan, Y. Volume Corrected Mitotic Index (M/V-INDEX). The Standard of Mitotic Activity in Neoplasms. *Pathol. Res. Pract.*, **1989**, *185*, 551-554.
- [21] Lesage, C.; Barbe, C.; Le Clairche, A.; Lesage, F.-X.; Bernard, P.; Grange, F. Sex-Related Location of Head and Neck Melanoma Strongly Argues for a Major Role of Sun Exposure in Cars and Photoprotection by Hair. *J. Invest. Dermatol.*, **2013**, *133*, 1205-1211.
- [22] Yusuf, N.; Irby, C.; Katiyar, S.K.; Elmetts, C.A. Photoprotective Effects of Green Tea Polyphenols. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.*, **2007**, *23*, 48-56.
- [23] Balch, C.M.; Soong, S.-J.; Gershenwald, J.E.; Thompson, J.F.; Coit, D.G.; Atkins, M.B.; Ding, S.; Cochran, A.J.; Eggemont, A.M.M.; Flaherty, K.T.; Gimotty, P.A.; Johnson, T.M.; Kirkwood, J.M.; Leong, S.P.; McMasters, K.M.; Mihm, M.C., Jr; Morton, D.L.; Ross, M.I.; Sondak, V.K. Age as a Prognostic Factor in Patients with Localized Melanoma and Regional Metastases. *Ann. Surg. Oncol.*, **2013**.
- [24] Nikolaou, V.; Stratigos, A.J. Emerging Trends in the Epidemiology of Melanoma. *Br. J. Dermatol.*, **2013**.
- [25] Hernandez, J.; Goycoolea, F.M.; Quintero, J.; Acosta, A.; Castañeda, M.; Dominguez, Z.; Robles, R.; Vazquez-Moreno, L.; Velazquez, E.F.; Astiazaran, H.; Lugo, E.; Velazquez, C. Sonoran Propolis: Chemical Composition and Antiproliferative Activity on Cancer Cell Lines. *Planta Med.*, **2007**, *73*, 1469-1474.
- [26] Nardini, M.; Leonardi, F.; Scaccini, C.; Virgili, F. Modulation of Ceramide-Induced NF-kappaB Binding Activity and Apoptotic Response by Caffeic Acid in U937 Cells: Comparison with Other Antioxidants. *Free Radic. Biol. Med.*, **2001**, *30*, 722-733.
- [27] Nagaoka, T.; Banskota, A.H.; Tezuka, Y.; Harimaya, Y.; Koizumi, K.; Saiki, I.; Kadota, S. Inhibitory Effects of Caffeic Acid Phenethyl Ester Analogues on Experimental Lung Metastasis of Murine Colon 26-L5 Carcinoma Cells. *Biol. Pharm. Bull.*, **2003**, *26*, 638-641.
- [28] Nagaoka, T.; Banskota, A.H.; Tezuka, Y.; Saiki, I.; Kadota, S. Selective Antiproliferative Activity of Caffeic Acid Phenethyl Ester Analogues on Highly Liver-Metastatic Murine Colon 26-L5 Carcinoma Cell Line. *Bioorg. Med. Chem.*, **2002**, *10*, 3351-3359.
- [29] Orsolic, N.; Saranović, A.B.; Basić, I. Direct and Indirect Mechanism(s) of Antitumor Activity of Propolis and Its Polyphenolic Compounds. *Planta Med.*, **2006**, *72*, 20-27.
- [30] Salomão, K.; Pereira, P.R.S.; Campos, L.C.; Borba, C.M.; Cabello, P.H.; Marcucci, M.C.; de Castro, S.L. Brazilian Propolis: Correlation between Chemical Composition and Antimicrobial Activity. *Evid.-Based Complement. Altern. Med. ECAM*, **2008**, *5*, 317-324.
- [31] Segueni, N.; Magid, A.A.; Decarme, M.; Rhouati, S.; Lahouel, M.; Antonicelli, F.; Lavaud, C.; Hornebeck, W. Inhibition of Stromelysin-1 by Caffeic Acid Derivatives from a Propolis Sample from Algeria. *Planta Med.*, **2011**, *77*, 999-1004.
- [32] Ntayi, C.; Labrousse, A.-L.; Debret, R.; Birembaut, P.; Bellon, G.; Antonicelli, F.; Hornebeck, W.; Bernard, P. Elastin-Derived Peptides Upregulate Matrix Metalloproteinase-2-Mediated Melanoma Cell Invasion through Elastin-Binding Protein. *J. Invest. Dermatol.*, **2004**, *122*, 256-265.
- [33] Hornebeck, W.; Robinet, A.; Duca, L.; Antonicelli, F.; Wallach, J.; Bellon, G. The Elastin Connection and Melanoma Progression. *Anticancer Res.*, **2005**, *25*, 2617-2625.
- [34] Debret, R.; Le Naour, R.R.; Sallénave, J.-M.; Deshorgue, A.; Hornebeck, W.G.; Guenounou, M.; Bernard, P.; Antonicelli, F.D. Elastin Fragments Induce IL-1beta Upregulation via NF-kappaB Pathway in Melanoma Cells. *J. Invest. Dermatol.*, **2006**, *126*, 1860-1868.
- [35] Frank, A.; David, V.; Aurelie, T.-R.; Florent, G.; William, H.; Philippe, B. Regulation of MMPs during Melanoma Progression: From Genetic to Epigenetic. *Anticancer Agents Med. Chem.*, **2012**, *12*, 773-782.
- [36] Juliano, R.L.; Reddig, P.; Alahari, S.; Edin, M.; Howe, A.; Aplin, A. Integrin Regulation of Cell Signalling and Motility. *Biochem. Soc. Trans.*, **2004**, *32*, 443-446.
- [37] Li, X.; Wu, D.I.; Shen, J.; Zhou, M.; Lu, Y. Rapamycin Induces Autophagy in the Melanoma Cell Line M14 via Regulation of the Expression Levels of Bcl-2 and Bax. *Oncol. Lett.*, **2013**, *5*, 167-172.

- [38] Eskelinen, E.-L. The Dual Role of Autophagy in Cancer. *Curr. Opin. Pharmacol.*, **2011**, *11*, 294-300.
- [39] Zhou, Y.; Sun, K.; Ma, Y.; Yang, H.; Zhang, Y.; Kong, X.; Wei, L. Autophagy Inhibits Chemotherapy-Induced Apoptosis through Downregulating Bad and Bim in Hepatocellular Carcinoma Cells. *Sci. Rep.*, **2014**, *4*, 5382.
- [40] Datta, K.; Suman, S.; Fornace, A.J. Radiation Persistently Promoted Oxidative Stress, Activated mTOR via PI3K/Akt, and Downregulated Autophagy Pathway in Mouse Intestine. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **2014**, *57*, 167-176.

Modulation par l'extrait de Propolis algérienne du système de détoxification au cours du stress oxydatif secondaire à la doxorubicine sur un modèle murin de cancer primaire de mélanome cutané

Résumé

Il est admis que tout xénobiotique médicament, toxique ou polluant, induit des effets délétères sur l'organisme. Le stress oxydatif est la résultante d'effets secondaires. Pour lutter contre les radicaux libres nocifs, l'organisme possède des systèmes de défense naturels antioxydants. Ces derniers ne sont pas toujours efficaces face à un excès de radicaux libres oxygénés générés par exemple lors de traitements par des médicaments anticancéreux. Considérés comme toxiques ils sont pro-oxydants conduisant de ce fait à des effets secondaires touchant les fonctions vitales de l'organisme. Plusieurs traitements adjuvants antioxydants sont utilisés afin de pallier aux effets toxiques des chimiothérapies anticancéreuses. La Propolis est un produit naturel apicole, de composition chimique complexe et différente selon la région de récolte, utilisé depuis l'antiquité dans la médecine traditionnelle, qui présente en conséquence un large spectre d'activités biologiques.

Nous avons dans un premier temps étudié l'activité antioxydante de l'extrait éthanolique de Propolis (EEP) algérienne ceci par l'exploration du système enzymatique et non enzymatique de détoxification au niveau hépatique et cardiaque au cours d'un traitement par les médicaments anticancéreux (doxorubicine et vinblastine) chez l'animal sain. Les résultats de cette étude confirmant l'activité antioxydante de L'EEP, nous a conduits à étudier l'effet anti-tumoral de l'EEP dans une situation physiopathologique d'un modèle murin de mélanome cutané. En traitement préventif, curatif ou continu, L'EEP seul ou en association avec la doxorubicine, augmentait la survie des animaux comparée au contrôle quel que soit le traitement administré, mais avec une meilleure survie en traitement Curatif. Une diminution significative de la croissance des tumeurs était observée chez les souris traitées par l'EEP Préventif ou en Curatif.

Cette étude nous permet de proposer le traitement par l'EEP comme agent adjuvant et curatif associé aux chimiothérapies conventionnelles contre le mélanome.

Mots clés : Propolis , antioxydant, doxorubicine, mélanome, anti-tumoral.

المخلص

من المسلم به أن أي دواء أجنبي بيولوجيا، سام أو ملوث، يؤدي إلى آثار ضارة على الجسم. الأكسدة هي نتيجة لهاته الآثار الثانوية. يمتلك الجسم أنظمة الدفاع الطبيعية المضادة للأكسدة، لمكافحة الجذور الحرة الضارة، هاته الأخيرة ليست دائما فعالة في التعامل مع وجود فائض من الجذور الحرة الأكسجينية على سبيل المثال أثناء العلاج بالأدوية المضادة للسرطان. فهي تعتبر سامة، كمالية للأكسدة وبالتالي تؤدي إلى آثار ثانوية تؤثر على الوظائف الحيوية للجسم. العديد من المواد المساعدة تستخدم كمواد مضادة للأكسدة للتغلب على الآثار السامة للعلاج الكيماوي للسرطان. العكبر منتج طبيعي ناتج عن تربية النحل، ذو تركيب كيميائي معقد يختلف حسب منطقة حصاد، يستخدم منذ العصور القديمة في الطب الشعبي، بالتالي يقدم مجموعة واسعة من الأنشطة البيولوجية. تركزت دراساتنا في البداية على النشاط المضاد للأكسدة للمستخلص الإيثانولي للعكبر الجزائري عن طريق دراسة النظم الأنزيمية وغير الأنزيمية لإزالة السموم من الكبد والقلب أثناء العلاج بالأدوية المضادة للسرطان مثل، الدكسوروبيسين و الفنبلاستين (Doxorubicine et Vinblastine) عند الحيوانات السليمة. نتائج هذه الدراسة أكدت النشاط المضاد للأكسدة للمستخلص الإيثانولي للعكبر، مما قادنا إلى دراسة النشاط المضاد للأورام لهذا المستخلص في حالة فيزيولوجية مرضية لفأر يعاني من سرطان الجلد أو الميلانوم . في حالة العلاج الوقائي، العلاجي أو المستمر، أدي المستخلص الإيثانولي للعكبر وحده أو بالاشتراك مع الدكسوروبيسين ، إلى زيادة بقاء الحيوانات حية مقارنة بالشاهد، بغض النظر عن نوع العلاج ولكن مع أفضل بقاء على قيد الحياة بالنسبة للعلاجي. ولوحظ وجود انخفاض كبير في نمو الأورام في الفئران التي عولجت بالمستخلص الإيثانولي للعكبر الوقائي و/أو العلاجي.

هاته الدراسة تسمح لنا أن نقترح العلاج بالمستخلص الإيثانولي للعكبر كمساعد وعلاجي بالاشتراك مع العلاج الكيميائي التقليدي المضاد لسرطان الجلد.

الكلمات المفتاحية : العكبر، مصاد الأكسدة، الدكسوروبيسين، سرطان الجلد، مصاد للسرطان.

Abstract

It is known that xenobiotics, medicines, toxics or pollution agents induce deleterious effects in the organism. Oxidative stress is the result of these side effects. To fight against reactive oxygen species, the organism uses its antioxidant natural defence system but this last is not always efficient against ROS overproduction due to for example the use of anticancer drugs. Considered as toxics, they are pro-oxidant and induce, as a result, a number of side effects, affecting vital function of the organism. A number of antioxidant adjuvant treatments are used in order to hide the toxic effects of chemotherapeutic agent side effects. Propolis is a natural bee product with a complicated chemical composition that differs in collection regions. It is used in folk medicine from antique periods and exposes as a result a broad spectrum of biological activities. In the present work, we have first studied the antioxidant activity of the ethanolic extract of an Algerian propolis (EEP), by assaying the enzymatic and non enzymatic detoxifying system in healthy rat heart and liver treated by anticancer drugs (Doxorubicin and vinblastin). The results of this study confirmed the antioxidant activity of EEP and led us to study its anti-tumour activity in a pathologic situation of a skin cancer murine model of melanoma. As a preventive, curative or continuous treatment, EEP alone or in association with doxorubicin prolonged animal survival compared to control group with best results in curative treatment. A significant decrease in tumour growth was observed in either preventive or curative EEP treatments.

This investigation led us to propose the EEP as an adjuvant or a curative treatment associated with conventional chemotherapy against melanoma cancer.

Key words : Propolis, antioxidant, doxorubicin, melanoma, anti-tumoural.

