



HAL
open science

Les polyphénols du vin rouge : des propriétés pour prévenir les cancers ?

Étienne Gaston

► **To cite this version:**

Étienne Gaston. Les polyphénols du vin rouge : des propriétés pour prévenir les cancers ?. Sciences pharmaceutiques. 2016. dumas-01267044

HAL Id: dumas-01267044

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01267044>

Submitted on 3 Feb 2016

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

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

Université de Bordeaux
U.F.R des SCIENCES PHARMACEUTIQUES

Année 2016 Thèse n°25

THESE pour l'obtention du
DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement

Le lundi 18 janvier 2016

Par

GASTON Etienne

Né le 15/11/87 à Cahors (46)

Les polyphénols du vin rouge : des propriétés pour prévenir les cancers ?

Directeur de thèse : Dr. Alain DECENDIT

Membres du Jury :

Dr. Alain DECENDIT, Maître de conférences

Président du jury

Dr. Arnaud COURTOIS, Maître de conférences

Juge

Dr. David THIOLLET, Docteur en pharmacie

Juge

REMERCIEMENTS

A Monsieur Decendit qui a accepté de me diriger dans ce travail et de présider le jury de cette thèse, merci pour vos conseils et encouragements.

A Monsieur Courtois, merci de me faire l'honneur de composer ce jury.

A Monsieur Thiollet, merci de m'avoir accueilli au sein de votre pharmacie et de m'accorder votre confiance.

A mes parents et mes frères, pour leur soutien durant toutes ces années d'études.

Aux ami(e)s, grâce à qui j'ai passé de très bonnes années de fac. Je n'ai que de bons souvenirs à me remémorer, merci à vous tous.

SOMMAIRE

LISTE DES ABREVIATIONS	10
LISTE DES FIGURES	12
LISTE DES TABLEAUX	14
INTRODUCTION	15
PREMIERE PARTIE : Le vin et les polyphénols du vin	16
1. Le développement du raisin et la vinification.....	17
1.1. Le raisin et sa maturation.....	17
1.2. La vinification en rouge.....	18
1.2.1. Généralités.....	18
1.2.2. Le foulage.....	18
1.2.3. L'égrappage ou éraflage.....	18
1.2.4. Mise en cuve et interventions éventuelles.....	19
1.2.5. Fermentation alcoolique et macération.....	19
1.2.6. Ecoulage et pressurage.....	20
1.2.7. Fermentation malo-lactique.....	20
2. Les polyphénols de la vigne et du vin.....	22
2.1. Généralités.....	22
2.2. Les non-flavonoïdes.....	24
2.2.1. Les acides phénols et dérivés.....	24
2.2.2. Les stilbènes.....	25
2.3. Les flavonoïdes.....	27
2.3.1. Les anthocyanes.....	28
2.3.2. Les flavanols.....	30
2.3.3. Les flavonols.....	35
3. Voies de biosynthèse des polyphénols et rôle pour la plante.....	36
3.1. Biosynthèse.....	36
3.2. Rôle des composés phénoliques pour la vigne.....	37
4. Biodisponibilité des polyphénols chez l'homme.....	39
4.1. Généralités.....	39
4.1.1. Facteurs influençant.....	39

4.1.2. Absorption et métabolisme des polyphénols.....	40
4.1.3. Transport des cellules depuis la lumière intestinale.....	42
4.1.4. Rôle de la microflore bactérienne.....	43
4.1.5. Transport plasmatique.....	43
4.1.6. Biodisponibilité tissulaire.	44
4.2. Absorption et métabolisme de composés phénoliques spécifiques.....	45
4.2.1. Catéchines.....	45
4.2.2. Anthocyanes.....	46
4.2.3. Acides phénols.....	46
4.2.4. Quercétine.....	47
4.2.5. Resvératrol.....	47
5. Etudes épidémiologiques, consommation de vin, mortalité et « French paradox ».....	49
5.1. Découverte du «French paradox».....	49
5.2. «French paradox» : régime alimentaire ou consommation d'alcool?.....	53
5.3. Vin, bière, spiritueux et mortalité toutes causes confondues.....	53

DEUXIEME PARTIE : Propriétés chimiques fondamentales et propriétés anti-oxydantes des polyphénols.....57

1. Propriétés fondamentales des phénols.....	58
1.1. Généralités.....	58
1.2. Propriétés réductrices.....	59
1.3. Liaisons hydrogènes.....	60
1.4. Acidité.....	61
2. Propriétés chimiques des polyphénols.....	61
2.1. Liaisons hydrogènes.....	62
2.2. Acidité.....	63
2.3. Complexation polyphénols-polyphénols.....	65
2.4. Nucléophilie.....	66
2.5. Electrophilie des anthocyanes.....	67
3. Stress oxydatif et propriétés anti-oxydantes des polyphénols du vin.....	69
3.1. Généralités sur les stress oxydatif.....	69
3.1.1. Origines et rôles des EOA.....	69

3.1.2. Le stress oxydatif.....	70
3.1.3. Cibles biologiques des EOA.....	71
3.1.4. Défenses antioxydantes.....	72
3.1.4.1. Défenses enzymatiques.....	73
3.1.4.2. Défenses non-enzymatiques.....	74
3.2. Les polyphénols du vin.....	76
3.2.1. Piégeage des radicaux libres.....	76
3.2.2. Oxydation.....	78
3.2.3. Complexation métallique.....	81
3.2.4. Complexation polyphénols-protéines.....	82
3.3. Places des radicaux libres dans les cancers.	83
3.3.1. Agents carcinogènes et stress oxydant.....	83
3.3.2. Mécanismes de l'effet carcinogène du stress oxydant : attaque de l'ADN et mutations.....	84
3.3.3. Vin et dommages oxydatifs.....	84

TROISIEME PARTIE : Polyphénols du vin rouge et cancers.....87

1. Histoire naturelle des cancers.....	88
1.1. Cancérogenèse.....	88
1.2. Gènes touchés.....	89
1.3. Les différentes mutations.....	92
1.3.1. Mutations génétiques et oncogènes.....	92
1.3.2. Mutations et gènes suppresseurs de tumeurs.....	94
1.3.3. Autres mutations.....	94
1.4. La cellule cancéreuse.....	94
1.5. Le cycle cellulaire.....	95
1.6. L'apoptose.....	98
1.7. Signalisation cellulaire et cancer.....	102
1.7.1. Généralités.....	102
1.7.2. Facteurs de croissance et récepteurs à activité tyrosine kinase.....	104
1.7.3. La voie des MAP kinases.....	106
1.7.3.1. De l'activation du récepteur à l'activation de RAS.....	106

1.7.3.2.	En aval de RAS.....	107
1.7.3.3.	Les substrats des MAP kinases.....	111
1.7.3.4.	Altérations oncogéniques.....	112
1.7.4.	La voie de la phosphatidylinositol-3-kinase.....	114
2.	Polyphénols du vin rouge et propriétés anticancéreuses.....	116
2.1.	Le cas du resvératrol.....	116
2.1.1.	La régulation de la progression du cycle cellulaire.....	116
2.1.2.	La régulation de l'apoptose et des voies de la survie..	117
2.1.3.	Inhibition de l'invasion tumorale et de l'angiogenèse.	118
2.1.4.	Régulation de l'inflammation.....	119
2.1.5.	Modulation des facteurs de transcriptions.....	120
2.1.6.	La cathepsine D lysosomale comme cible.....	121
2.2.	Propriétés anticancéreuses des flavonoïdes et exemple de la quercétine.....	121
2.2.1.	Inhibition de l'activité des protéines kinases.....	122
2.2.2.	Activité antiproliférative et induction de l'apoptose par les flavonoïdes.....	123
2.2.3.	Inhibition de la migration, de l'angiogenèse et des métastases par les flavonoïdes.....	125
3.	Cancers et polyphénols du vin rouge.....	125
3.1.	Cancer du sein et polyphénols du vin rouge.....	125
3.1.1.	Cancer du sein : généralités.....	125
3.1.2.	Potentiel antiprolifératif des polyphénols de vin rouge sur les cellules de cancer du sein.....	126
3.1.3.	Les polyphénols de vin rouge comme inhibiteurs de l'aomatase.....	127
3.1.4.	Cytotoxicité sélective des polyphénols de vin rouge....	129
3.1.5.	Etudes épidémiologique, vin et cancer du sein.....	129
3.2.	Cancer du poumon et polyphénols du vin rouge.....	130
3.2.1.	Cancer du poumon : généralités.....	130
3.2.2.	Effet antiprolifératif du vin rouge sur des cellules de CBNPC.....	132
3.2.3.	Akt, ERK, p53 et vin rouge.....	133

3.2.4. Etudes épidémiologiques, vin et cancer du poumon.....	135
3.3. Cancer colorectal et polyphénols du vin rouge.....	136
3.3.1. Le cancer du colon : généralités.....	136
3.3.2. Polyphénols du vin rouge et inhibition de la croissance de cellules de carcinome de colon.....	137
3.3.3. Polyphénols du vin rouge et régulation de l'expression génique.....	137
3.3.4. Etudes des effets particuliers de certains polyphénols du vin rouge sur le CCR.....	138
3.3.5. Etudes épidémiologiques, vin et cancer du colon et du rectum.....	139
4. Perspectives.....	140
4.1. Vers la chimioprévention.....	140
4.2. Un polyphénol en complément des traitements oncologiques standards ?.....	141
4.3. La prévention ou le traitement du cancer grâce à des formulations galéniques innovantes : la nanoformulation du resvératrol.....	142
CONCLUSION.....	145
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	146

LISTE DES ABREVIATIONS

ABC: ATP binding cassette.	DED: Death Effector Domain.
ADN: Acide DésoxyriboNucléique.	DISC: Death Inducing Signaling Complex.
AGPI: Acides Gras Poly Insaturés.	DMH: 1,2-diméthylhydrazine.
AGS: Acides Gras Saturés.	DUSP: Dual Specificity Phosphatase.
AOM: Azoxyméthane.	EGF: Epidermal Growth Factor.
AP-1: Activated Protein 1.	EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor.
ATP: Adénosine TriPhosphate.	EOA: Espèces oxygénées activées.
BAD: Bcl-2 Associated Agonist of cell Death.	ERK: Extra Cellular Regulated Kinase.
Bcl-2: B-cell Leukemia/Lymphomia-2.	FADD: Fas Associated Death Domain.
BCRP: Breast Cancer Resistance Protein.	FAK: Focal Adhesion Kinase.
BDE: Bond Dissociation Energy.	FGF: Fibroblastic Growth Factor.
CAK: Cyclin Activated Kinase.	FOXO: Forkhead Box Class O.
CARD: Caspases Recruitment Domain.	FRS: FGF Receptor substrate.
CBNPC: Cancer Bronchique Non à Petites Cellules.	GAP: GTPase Activating Protein.
CBPC : Cancer Bronchique à Petites Cellules.	GDP: Guanosine DiPhosphate.
CCR: Cancer Colorectal.	GEF: Guanine Nucleotide Exchange Factor.
Cdc: Cell division cycle.	GF: Growth Factor.
CdKs: Cyclins Dependent kinases.	GPCR ou RCPG: Récepteur Couplé à une Protéine G.
CHD : Coronary Heart Disease.	GPx: Glutathions Peroxydases.
CHS: Chalcone synthase.	GRB2: Growth Factor Receptor Bound Protein 2.
CKI: Cyclin Dependent Kinase Inhibitor.	GTP: Guanosine TriPosphate.
COMT: Catéchol-O-méthyl transférase.	HOMO: Highest Occupied Molecular Orbital
Cox-2: Cyclo-Oxygénase 2.	HSP: Heat Shock Protein.
DAG: Diacylglycérol.	IKK: Ikb kinase.

IP₃: Inositol-3-Phosphate.

JAK: Janus Kinase.

JKN: Jun-N Terminal Kinase.

LUMO: Lowest Unoccupied Molecular Orbital

LPH: Lactate phloridzine hydrolase.

MAP: Mitogen Activated Protein.

MCT: MonoCarboxylic Acid Transporter.

MKP: MAP Kinases Phosphatases.

MMPs: Matrix Métalloprotéines.

MRP: Multidrug Resistance Protein.

MSK: Mitogen and Stress Activated Kinase.

mTOR: Mammalian Target of Rapamycin.

NFκB: Nuclear Factor kappa B.

OM: Orbitale Moléculaire.

PDK1: Phosphoinositide dependent kinase 1.

PLC-γ: Phospholipase C gamma.

PI3K: Phosphoinositol-3-Phosphate.

POD : Peroxydase.

Point R : Point de Restriction.

PPO : Polyphénols Oxydase.

Pr Rb: Protéine rétinoblastome.

PTB: PhosphoTyrosine Binding.

RAS GRP: RAS Guanyl Nucleotide Releasing Protein.

RSK: Ribosome S6 Kinase.

RTK: Récepteur Tyrosine Kinase.

SAPK: Stress Activated Protein Kinase.

SE Ar : Substitution électrophile aromatique.

SH2: SRC Homology Domain 2.

SOD: SuperOxyde Dismutase.

SOS 1: Son Of Sevenless Homolog 1.

STS: Stilbène synthase.

SULT: Sulfotransférase.

TNF-α: Tumor Necrosis Factor alpha.

TRADD: TNF Receptor Associated Death Domain.

TRAIL: TNF Related Apoptosis Inducing Ligand.

TSC2: Tuberous Sclerosis Complex 2.

UGTs: Uridine-5'-diphosphate glucuronosyltransférase

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor.

VLDL: Very Low Density Protein.

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Etapes du développement du raisin. (Ribéreau-Gayon <i>et al.</i> , 2012)	16
Figure 2: Les étapes principales de la vinification traditionnelle en rouge.	20
Figure 3: Les acides phénols: série des acides benzoïques (gauche) et série des acides cinnamiques (droite).	23
Figure 4: Cis-resvératrol et Trans-resvératrol.	25
Figure 5: Le trans-picéide, le resvératrol glycosylé.	26
Figure 6: Un exemple de dimère de resvératrol : la ϵ -viniférine.	26
Figure 7: Structure générale des flavonoïdes (C6-C3-C6).	27
Figure 8 : Structures des anthocyanidines du raisin et du vin.	27
Figure 9: Exemple d'une anthocyane: la malvidine-3-O-glucoside.	28
Figure 10: Les différentes formes d'anthocyanes du vin (Waterhouse, 2002).	29
Figure 11: Ellagitannins issus du chêne retrouvés dans le vin.	30
Figure 12 Unités structurales des tannins condensés du vin.	31
Figure 13: Exemple de dimère procyanidolique (liaison C4-C8).	32
Figure 14: Structure des polymères de flavanols du raisin et du vin.	32
Figure 15: Réaction de Bate-Smith.	33
Figure 16 Principaux flavonols du vin.	34
Figure 17: Voies de biosynthèses des métabolites secondaires de la baie de raisin..	36
Figure 18: Sites potentiels de conjugaisons des polyphénols.	40
Figure 19: Schéma simplifié de l'absorption des polyphénols alimentaires.	41
Figure 20: Mortalité prématurée annuelle chez les 45-54 ans toutes causes confondues à l'exclusion des morts violentes dans les 87 départements français de 1973 à 1975 (Renaud & de Lorgeril, 1992), adapté des statistiques médicales de causes de mortalités, INSERM 1973-1975.	50
Figure 21: Risque relatif de mort de toutes causes par rapport à la quantité d'alcool et au type d'alcool consommé (Renaud, Guéguen, Siest, & Salamon, 1999).	54
Figure 22: Risque relatif de mort par cancers en relation avec la consommation totale d'alcool (Gronbaek, <i>et al.</i> , 2000)	55
Figure 23: Les formes mésomères du phénol et de sa base conjuguée (ion phénate).(Sarni-Manchado & Cheynier, 2006)	58
Figure 24: Phénol en interaction par liaisons hydrogènes avec 2 molécules d'eau.	59
Figure 25: La constante Ka.	60
Figure 26: Exemple de liaisons hydrogènes intra-moléculaire de la quercétine.	61
Figure 27: La catéchine et une liaison hydrogène intra-moléculaire possible.....	61
Figure 28: Monoanions de la quercétine.....	63
Figure 29: Bases quinonïdes issues de la déprotonation d'un ion flavylum (anthocyane). ...	64
Figure 30: Premières étapes de la copolymérisation de la catéchine et de l'éthanal.....	65
Figure 31: Réactivité électrophile des anthocyanes (ion flavylum).	67
Figure 32: Aperçu des différentes espèces oxygénées activées (EOA).	69
Figure 33: La peroxydation lipidique.	71
Figure 34: Réduction totale en eau et oxygène de l'anion superoxyde (Berké, <i>et al.</i> , 2003).	72
Figure 35: Les vitamines E. (Berké, <i>et al.</i> , 2003)	74
Figure 36: Régénération de la vitamine E par la vitamine C.(Berké, et al., 2003)	75
Figure 37: Réactions de transfert d'atome d'hydrogène depuis l'acide caféique.	76

Figure 38: Oxydation des polyphénols présentant un noyau catéchol et principales réactions des formes oxydées.	79
Figure 39: Complexation métallique des flavonoïdes.....	80
Figure 40: Mécanismes d'interactions des polyphénols et de l'éthanol avec les EOA.	85
Figure 41: Altérations multiples et sélection de cellules cancéreuses.	87
Figure 42: Lésions de l'ADN et modes de réparations possibles.	90
Figure 43: Principaux mécanismes de conversion des proto-oncogènes en oncogènes.....	92
Figure 44: les 6 caractéristiques de la cellule cancéreuse (Hanahan & Weinberg, 2000).	94
Figure 45: Les phases du cycle cellulaire.	95
Figure 46: Les différents types de complexes CDK/Cycline selon la phase du cycle cellulaire.	96
Figure 47: Activation/inactivation des complexes cyclines/CDK	97
Figure 48: Clivage en cascade de procaspases en caspases suite au signal apoptotique....	98
Figure 49: Structures des procaspases et des caspases.....	99
Figure 50: Voie d'activation extrinsèque des caspases.....	100
Figure 51: Voie intrinsèque de l'apoptose.....	101
Figure 52: La voie des MAP kinases (Robert, 2010).....	107
Figure 53: Les différents modules des cascades kinases (Robert, 2010).	109
Figure 54 : Schéma récapitulatif de la voie des PI3 kinases.	114
Figure 55: Cibles moléculaires des flavonoïdes dans la prévention du cancer	121
Figure 56: Inhibition de l'activité de l'aromatase par un extrait de vin rouge dans les glandes mammaires (B), l'ovaire (E) et l'utérus (H), en comparaison au groupe de contrôle (A,D,G) et des effets du Letrozole (C,F et I), un inhibiteur de l'aromatase. (Eng, <i>et al.</i> , 2002)	127
Figure 57: Effet du vin rouge sur l'incorporation de thymidine dans des cellules de CBNPC adapté de (Barron <i>et al.</i> , 2014).....	132
Figure 58: Effets du vin rouge sur Akt et ERK adapté de (Barron <i>et al.</i> , 2014)	133
Figure 59: Effet du vin rouge sur le p53 adapté de (Barron <i>et al.</i> , 2014).	134
Figure 60: Diagramme des gènes régulés à la baisse après un traitement par des polyphénols de vin rouge et leur fonction (Dolara, <i>et al.</i> , 2005).	137
Figure 61: Les différents agents chimiopréventifs et leur sites d'actions sur les différentes étapes de la cancérogenèse.....	140
Figure 62: Principes de la nanoformulation dans le traitement des cancers (Siddiqui, <i>et al.</i> , 2015).....	143

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Taux de polyphénols typiques dans le vin rouge et le vin blanc.* (Waterhouse, 2002)	22
Tableau 2: Les acides phénols du raisin et du vin.	24
Tableau 3 : Taux de mortalité standardisé par âge pour 100 000 hommes et facteurs de risques cardiaques (Renaud & de Lorgeril, 1992). ¹	49
Tableau 4: Taux de mortalité prématurée standardisée par âge (pour 100 000) dans la population MONICA (35-64 ans) (Renaud & de Lorgeril, 1992) adapté de (World Health Organization, 1989).	51
Tableau 5: Taux de mortalité par maladies coronariennes, HDL sérique et régime alimentaire dans les trois centres français MONICA (Renaud & de Lorgeril, 1992).....	51
Tableau 6: Sources de stress oxydant endogènes ou exogènes. (Haleng, et al., 2007)	69
Tableau 7: Exemples d'oncogènes impliqués dans des cancers humains.	89
Tableau 8: Quelques familles de récepteurs de facteurs de croissance.	104
Tableau 9: Mécanismes impliqués dans l'effet chimiopréventif de trois polyphénols sur des cellules de cancer colorectal (Araujo, et al., 2011).....	138

INTRODUCTION

En dépit de progrès dans le développement des thérapies anticancéreuses, l'incidence mondiale des cancers est toujours en augmentation et les chimiothérapies conventionnelles, qui causent de sérieux effets indésirables, ne parviennent dans de nombreux cas qu'à prolonger l'espérance de vie du malade de quelques années. Dans ce contexte particulier, la recherche pour une prévention efficace de ces maladies prend toute sa place et, au cours des dernières décennies, ce sont les produits naturels d'origine alimentaire qui se sont révélés être des sources importantes d'agents actifs dans la prévention des cancers. En France, pays historiquement classé dans les plus gros buveurs de vin, des études épidémiologiques maintenant bien connues relatèrent, dès les années 1980, les effets bénéfiques d'une consommation modérée et régulière de vin sur la mortalité coronarienne. Plus récemment, des études révèlent des effets bénéfiques vis-à-vis des cancers, effets dont les polyphénols du vin, en particulier du vin rouge, semblent être les pourvoyeurs. La consommation de vin pourrait donc s'avérer être une piste intéressante dans une optique de prévention nutritionnelle des cancers.

Dans une première partie, nous décrivons les grandes familles de polyphénols retrouvées dans le vin rouge ainsi que les principales étapes d'élaboration de ce dernier. Puis, dans une seconde partie, nous nous intéresserons aux propriétés chimiques fondamentales de ces polyphénols ainsi qu'à leur pouvoir anti-oxydant. La troisième partie étudiera les étapes de la cancérogenèse, les différentes cibles d'interactions potentielles des polyphénols avec la cellule cancéreuse ainsi que l'effet des polyphénols du vin rouge sur trois types de cancers différents. Pour finir, la dernière partie évoquera quelques perspectives d'utilisations des propriétés des polyphénols.

PREMIERE PARTIE: Le vin et les polyphénols du vin.

1. Le développement du raisin et la vinification.

1.1. Le raisin et sa maturation.

Au cours de son développement de l'ovaire au fruit mûr, le raisin suit une évolution commune à toutes les baies que l'on peut diviser en 3 phases en prenant en considération le diamètre des baies, leurs poids et leurs volumes (figure 1):

- Une première phase de croissance rapide (croissance herbacée), durant de 45 à 65 jours, fait suite à la fécondation et commence par la nouaison du fruit (apparition des pépins). Les baies ont une activité métabolique intense et la chlorophylle est le pigment dominant. Après la nouaison, la croissance de la baie se fait essentiellement par grandissement cellulaire.
- Une phase de ralentissement de croissance durant laquelle se produit la véraison caractérisée par l'apparition de la couleur chez les cépages colorés. Cette phase dure de 8 à 15 jours.
- Une deuxième phase de croissance vient ensuite, correspondant à la maturation proprement dite. Le grandissement cellulaire reprend et s'accompagne de modifications physiologiques pendant 35 à 55 jours. Il y'a accumulation de sucres libres, de composés phénoliques, d'acides aminés et d'ions.

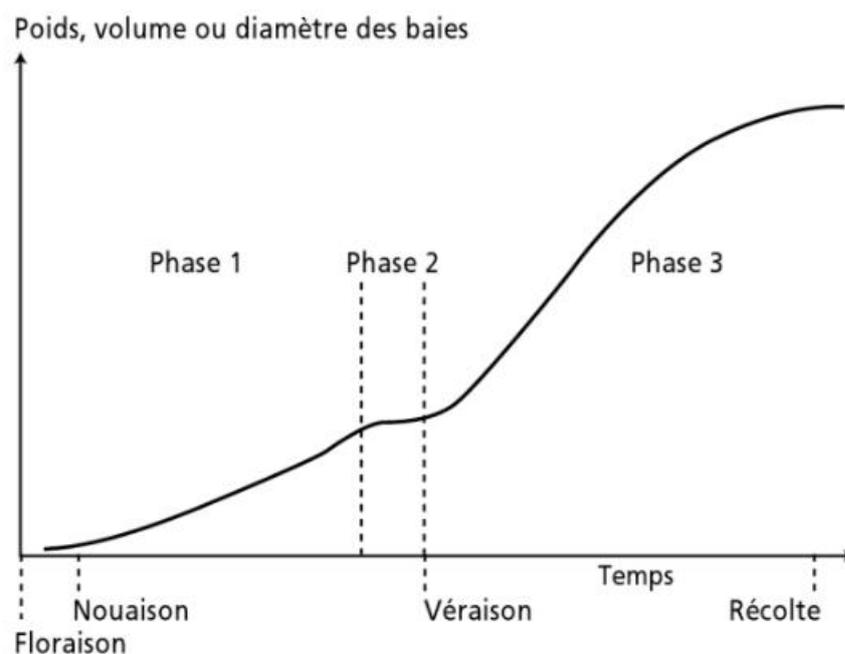


Figure 1: Etapes du développement du raisin. (Ribéreau-Gayon et al., 2012)

1.2. La vinification en rouge.

1.2.1. Généralités.

Le vin rouge est un vin de macération, la fermentation alcoolique du jus est accompagnée de l'extraction des constituants des parties solides de la grappe (pellicules, pépins, éventuellement rafles). Dans la vinification en rouge la plus classique, cette extraction est réalisée par la macération des parties solides pendant la fermentation du jus, toutefois, certaines procédures dissocient fermentation et macération, il n'en sera pas question dans ce chapitre qui vise juste à décrire les étapes les plus classiques de la vinification en rouge. L'intervention de la macération est primordiale, selon la nature des raisins et le type de vin désiré, celle-ci peut être plus ou moins poussée et apporter une personnalisation du vin produit. Les vins de style primeur, à consommer jeunes, doivent avoir des arômes et un fruité qui sont des fonctions inverses du taux de composés phénoliques, par contre, les vins de garde supposent une richesse suffisante en tannins et donc une macération plus poussée. Les étapes classiques de la vinification en rouges sont les suivantes (figure 2) : vendange, foulage, égrappage, cuvaison, fermentation alcoolique principale et macération, écoulage, égouttage/pressurage et fermentation malo-lactique (2^{ème} fermentation). Ces étapes sont celles de la vinification traditionnelle mais ils existent de nombreuses variantes et présentent une grande souplesse d'application.

1.2.2. Foulage.

Le foulage vient juste après les vendanges, il s'agit de l'écrasement du raisin de façon à rompre la pellicule pour dégager la pulpe et le jus. Le foulage constitue probablement le plus ancien traitement appliqué à la vendange et a plusieurs conséquences : le jus est aéré etensemencé par les levures, la fermentation est donc plus rapide, la vendange foulée peut être manipulée par pompage, le sulfitage est plus homogène et la macération est facilitée.

1.2.3. L'égrappage ou éraflage.

Cette étape vise à séparer les baies des rafles. L'éraflage peut être partiel ou total, il permet en premier lieu de diminuer le volume de cuverie nécessaire mais

aussi d'augmenter le degré alcoolique et l'acidité du vin final puisque les rafles modifient la composition du vin en y ajoutant de l'eau mais peu de sucres. D'autre part, les rafles sont susceptibles d'amener des goûts végétaux et herbacés désagréables. Le foulage et l'éraflage sont souvent réalisés en même temps par un matériel commun.

1.2.4. La mise en cuve et interventions éventuelles.

Après foulage et éraflage, la vendange est disposée dans une cuve à fermentation ou elle peut subir plusieurs interventions. Voici, à titre d'exemples, quelques interventions:

- Le sulfitage (action anti-oxydante, anti-oxydasique dissolvante et antimicrobienne).
- L'inoculation, soit avec un moût en fermentation soit avec des levures sèches actives. On recherche avant tout l'aptitude à conduire une fermentation complète et la résistance à la température.
- La correction de l'acidité.
- L'apport de tannins permettant de stabiliser la couleur en favorisant la condensation anthocyanes-tannins.
- Emploi d'enzymes pectolytiques pour favoriser l'extraction des composés phénoliques et obtenir des vins plus riches en tannins, moins astringents et moins amers.
- La diminution du moût en effectuant une saignée. Cette technique consiste à éliminer l'eau de pluie et le jus de pulpes non enrichi en constituants des pellicules pour concentrer le moût en composés phénoliques.

1.2.5. La fermentation alcoolique et la macération.

La fermentation alcoolique conduit à la transformation des sucres (glucose et fructose) présents dans le moût en éthanol et dioxyde de carbone. La température et l'aération du moût sont des données importantes influençant la bonne conduite de la fermentation. La macération, consistant au passage dans le jus de fermentation des constituants du marc, est responsable de toutes les caractéristiques spécifiques, visuelles olfactives et gustatives des vins rouges. Elle apporte principalement des

composés phénoliques participant à la structure générale mais aussi des substances minérales, des polysaccharides des substances azotés et des essences odorantes. La macération n'est pas une étape délimitée dans le schéma de vinification. Elle débute en effet dès l'étape de foulage et se poursuit tout au long de la fermentation, c'est lors de ce long processus que sont extraits les composés phénoliques provenant des différents organes du vin, à savoir les pépins, les pellicules et éventuellement les rafles.

1.2.6. L'écoulage et le pressurage.

Une fois la fermentation - macération terminée, le décuvage, aussi appelé écoulage, a lieu. Cette étape consiste à transférer le vin, appelé vin de goutte, dans une nouvelle cuve en le séparant du marc. Ce dernier est pressé pour donner les vins de presse, plus riches en extraits divers, notamment en matière colorante. Vins de goutte et vins de presse pourront éventuellement être assemblés en fonction des besoins.

1.2.7. La fermentation malo-lactique

Les vins obtenus en fin de fermentation présentent des concentrations en acide malique importantes. Cet acide est considéré comme microbiologiquement instable puisqu'il peut être utilisé par certains microorganismes. De plus, il est très souvent à l'origine d'une acidité importante du vin qu'il est nécessaire de réduire. L'acide malique doit donc être éliminé et cette dégradation peut se faire grâce à la fermentation malo-lactique qui va conduire à la transformation de l'acide malique en acide lactique sous l'action de certaines bactéries. Cette seconde fermentation confère au produit fini une stabilité biologique et un meilleur profil organoleptique (plus souple). Le plus souvent, elle intervient de façon spontanée dans un délai raisonnable.

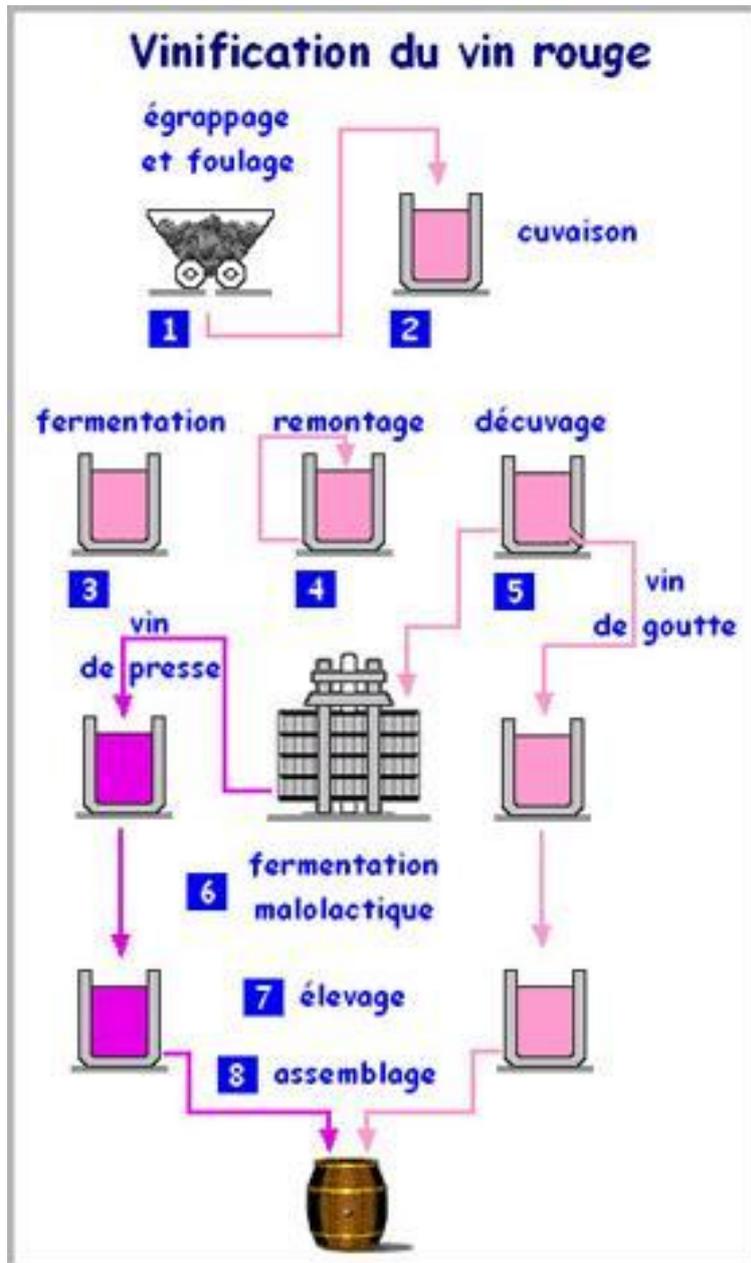


Figure 2: Les étapes principales de la vinification traditionnelle en rouge.

2. Les polyphénols de la vigne et du vin.

2.1. Généralités.

Les polyphénols sont un groupe large et complexe de métabolites secondaires ubiquitaires du règne végétal. Dans la vigne, ils sont retrouvés dans les différentes parties de la plante (baies, rafles, sarments) mais seuls ceux contenus dans le raisin sont extraits pendant la vinification. Les composés phénoliques sont notamment responsables des propriétés organoleptiques du vin comme l'astringence, la couleur, l'odeur, l'amertume et sont donc majeurs en œnologie. Ce groupe de molécule est aussi responsable du potentiel de conservation d'un vin, de son plus ou moins long vieillissement ainsi que des potentiels effets bénéfiques de celui-ci sur la santé, effets qui seront en parties décrits dans cette thèse. Il est à noter que la quantité totale de phénols retrouvée dans un verre de vin rouge est de l'ordre de 200 mg contre 40 mg dans un verre de vin blanc (Waterhouse, 2002). Le tableau 1 décrit plus précisément les différences entre vin blanc et vin rouge issus de *Vitis vinifera* quant à leur composition phénolique. Par ailleurs, il faut garder à l'esprit les différences variétales au sein de *Vitis vinifera* : cabernet sauvignon, pinot noir et autres cépages offrent une exceptionnelle diversité de vins aux compositions quantitatives et qualitatives de polyphénols variées.

Le chapitre qui suit a pour but de décrire les principales familles de polyphénols retrouvées dans le raisin et le vin, nous pouvons les classer en deux grandes catégories : les non flavonoïdes (les acides phénols et dérivés, les stilbènes) et les flavonoïdes (flavanols, flavonols et anthocyanes).

Tableau 1: Taux de polyphénols typiques dans le vin rouge et le vin blanc. * (Waterhouse, 2002)

Classe	Vin blanc		Vin rouge	
	Jeune	Agé	Jeune	Agé
Non flavonoïdes :				
Ac. cinnamiques	154	130	165	60
Ac. benzoïques	10	15	60	60
Tannins hydrolysables (du chêne)	0	100	0	250
Stilbène (resvératrol)	0.5	0.5	7	7
Total (mg/l)	164.5	245.5	232	377
Flavonoïdes :				
Monomères flavanols	25	15	200	100
Proanthocyanidines, tannins condensés	20	25	750	1000
Flavonols	-	-	100	100
Anthocyanes	-	-	400	90
Autres	-	-	50	75
Total (mg/l)	45	40	1500	1365
Total polyphénols	209.5	285.5	1732	1742

*Vin jeune signifie vin nouveau (moins de six mois d'âge) sans fermentation en barrique de chêne. Vin âgé désigne des vins blancs d'un an et des vins rouges de deux ans avec vieillissement en fût de chêne.

2.2. Les non flavonoïdes.

2.2.1. Les acides phénols et leurs dérivés.

Le raisin et le vin contiennent des acides benzoïques et des acides cinnamiques présents en quantité proche de 100 mg/l dans le vin rouge et de 10 à 20 mg/l dans le vin blanc (Bourzeix, 1967).

Sept acides benzoïques C₆-C₁ (figure 3) sont connus (acide p-hydroxybenzoïque, acide protocatéchique, acide vanilique, acide gallique, acide syringique, acide salicylique et acide gentistique) et sont retrouvés dans le raisin sous forme de combinaisons hétérosidiques ou sous forme d'esters, les formes libres étant présentes surtout dans le vin rouge (tableau 2).

Les acides phénols appartenant à la série des acides cinnamiques C₆-C₃ (figure 3) sont au nombre de quatre (acide caféique, acide p-coumarinique, acide sinapique, acide férulique) (tableau 2) et sont présents dans le raisin et dans le vin surtout sous forme estérifié par l'acide tartrique (Ribéreau-Gayon, 1965) et sous forme libre en faible quantité. Ces esters avec l'acide tartrique (acide coutarique, acide caftarique, acide fertarique) sont des constituants du jus de raisin particulièrement oxydable, à l'origine du brunissement du moût blanc (Cheynier, *et al.*, 1989). Bien que possédant peu de propriétés organoleptiques, ces composés peuvent être à l'origine de phénols volatils odorant après action de certains micro-organismes (Chatonnet, *et al.*, 1995).



Figure 3: Les acides phénols: série des acides benzoïques (gauche) et série des acides cinnamiques (droite).

Acides benzoïques	R₁	R₂	R₃	R₄	Acides cinnamiques
Acide p-hydroxybenzoïque	H	H	OH	H	Acide p-coumarinique
Acide protocatéchique	H	OH	OH	H	Acide caféique
Acide vanilique	H	OCH ₃	OH	H	Acide férulique
Acide gallique	H	OH	OH	OH	
Acide syringique	H	OCH ₃	OH	OCH ₃	Acide sinapique
Acide salicylique	OH	H	H	H	
Acide gentisique	OH	H	H	OH	

Tableau 2: Les acides phénols du raisin et du vin.

2.2.2. Les stilbènes.

Les stilbènes sont des composés phénoliques formés d'au moins deux cycles benzéniques reliés par une chaîne éthane ou éthylène formant un système conjugué. Cette structure particulière leur confère une grande réactivité due à la résonance des électrons sur toute la molécule. A partir de ce squelette relativement simple, il existe un grand nombre de composés dont la nature varie en fonction de la position des groupements hydroxyles, de la substitution par des sucres et de la conformation stérique (trans ou cis) de la molécule.

Les isomères trans- et cis- du resvératrol (figure 4) et leurs dérivés glycosylés, les trans- (figure 5) et cis-picéïdes constituent les quatre stilbènes les plus retrouvés dans le vin, à hauteur de 10 à 40 mg/l (Waterhouse & Lamuela-Raventos, 1994). Les stilbènes de la vigne se trouvent au niveau de la pellicule de la baie, des rafles et des feuilles, en outre, l'isomère trans du resvératrol et son dérivé glycosylé, le picéïde, seraient notamment produits par la vigne en réponse à une attaque fongique (Langcake, *et al.*, 1981) et extrait par la vinification en rouge. Sa teneur est de l'ordre de 1 à 3 mg/l et on lui attribue différentes propriétés hygiéniques notamment un caractère antioxydant vis-à-vis des lipoprotéines de basse densité (LDL). Chez *Vitis*

vinifera, de nombreux oligomères du resvératrol ont été mis en évidence (Jeandet, *et al.*, 1995) et ces derniers sont classés en deux groupes différents :

- Les oligomères du groupe A possèdent un hétérocycle oxygéné, on trouve dans ce groupe le dimère ϵ -viniférine (figure 6) et le trimère α -viniférine.
- Les oligomères du groupe B dépourvus d'hétérocycle oxygéné, on peut citer le pallidol (Waffo-Téguo, *et al.*, 2001)

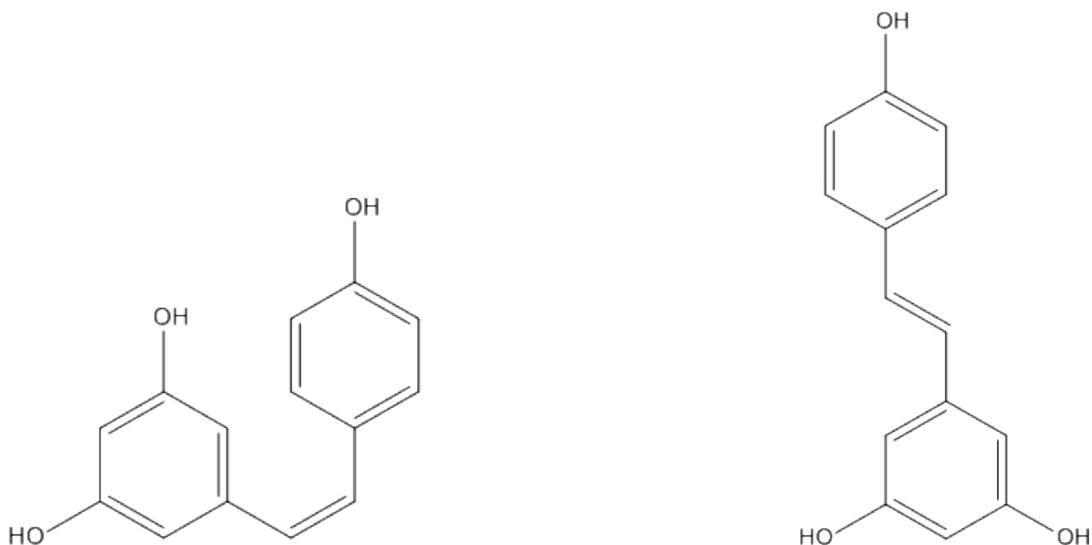


Figure 4: *Cis-resvératrol et Trans-resvératrol.*

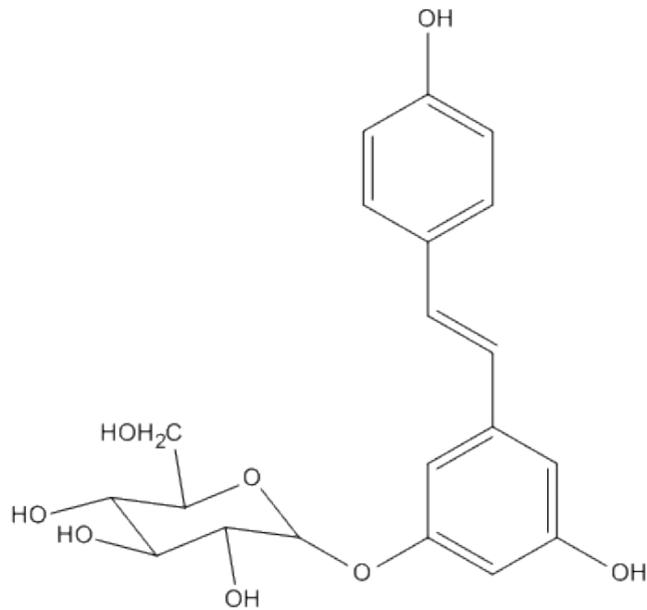


Figure 5: *Le trans-picéide, le resvératrol glycosylé.*

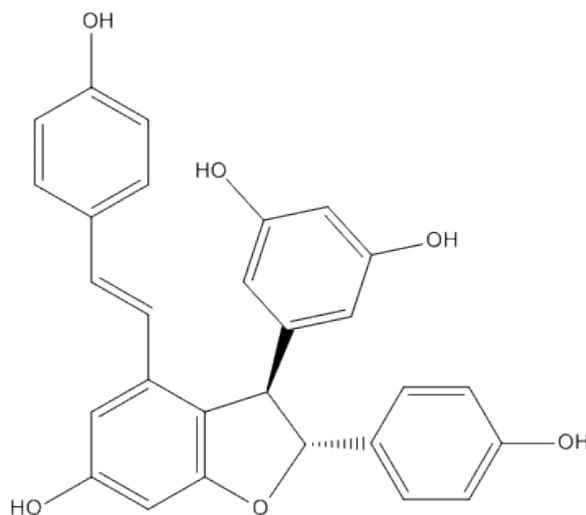


Figure 6: *Un exemple de dimère de resvératrol : la ε-viniférine.*

2.3. Les flavonoïdes.

Les flavonoïdes présentent une structure caractérisée par deux cycles benzéniques reliés par un hétérocycle oxygéné (structure générale en C₆-C₃-C₆) (figure 7). Cette famille de composés est divisée en plusieurs groupes en fonction du degré d'oxydation de l'hétérocycle central : anthocyanes, flavonols et flavanols sont les plus représentés chez la vigne et très souvent retrouvés sous forme de glucosides.

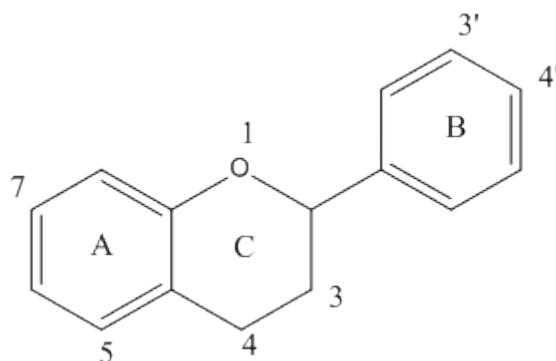
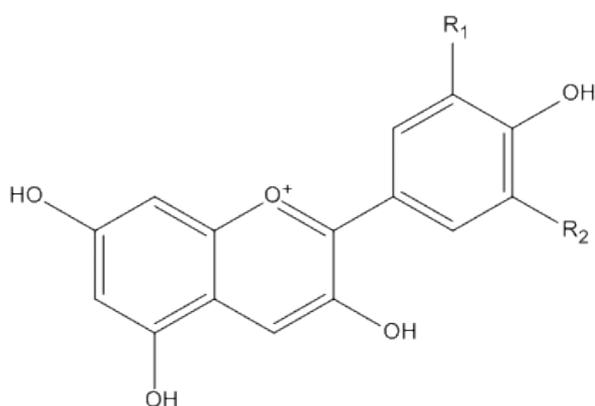


Figure 7: Structure générale des flavonoïdes (C6-C3-C6).

2.3.1. Les anthocyanes.

« Parmi les composés phénoliques du vin rouge, les tanins et les anthocyanes jouent le rôle le plus important au niveau de ses caractéristiques, c'est-à-dire couleur et caractères organoleptiques. » (Glories, 1978).

Les anthocyanes sont les pigments rouges du raisin, localisés surtout dans la pellicule des baies, ils s'accumulent depuis la véraison jusqu'à la maturité. Ces molécules sont les pigments des vins rouges jeunes, leur concentration dans ceux-ci varie de 300mg/l à 1000 mg/l (Leone, *et al.*, 1984). L'hétérocycle oxygéné caractéristique des anthocyanes est insaturé et cationique : c'est le cation flavylum qui est la forme prédominante à pH acide. Plus d'une quinzaine d'anthocyanes ont été identifiées dans les baies de raisin (Baldi, *et al.*, 1995). On distingue dans le raisin et dans le vin cinq anthocyanidines principales selon la substitution du noyau latéral, avec une prédominance de la malvidine (figure 8).



R1	R2	
OH	H	Cyanidine
OCH3	H	Paeonidine
OH	OH	Delphinidine
OH	OCH3	Pétunidine
OCH3	OCH3	Malvidine

Figure 8 : Structures des anthocyanidines du raisin et du vin.

Dans le vin issu de *Vitis vinifera*, les anthocyanes sont sous formes d'hétérosides (anthocyanidines plus stable) 3-O-monoglucosides et 3-O-monoglucosides acylés avec l'acide p-coumarique, l'acide caféique et avec l'acide acétique (Brouillard, 1982). Toutefois certaines espèces du genre *Vitis* comme *V. riparia* et *rupestris* présentent des quantités importantes d'anthocyanes diglucosides (Ribéreau-Gayon, 1959). La malvidine-3-O-glucoside est l'anthocyane majeure des vins de Bordeaux à base de Cabernet Sauvignon (figure 9).

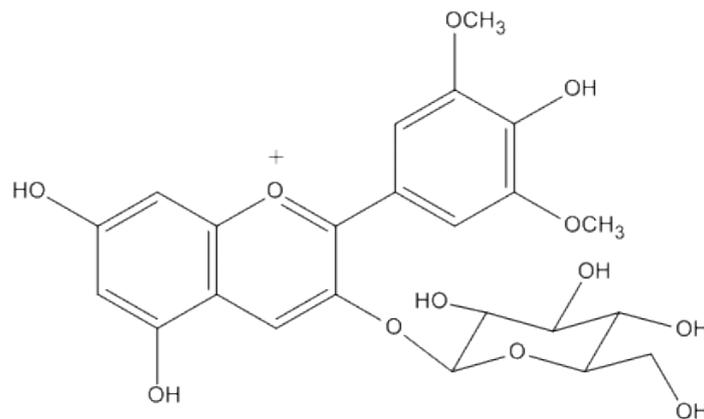


Figure 9: Exemple d'une anthocyane: la malvidine-3-O-glucoside.

La couleur de ces pigments est fonction des conditions du milieu (pH, SO₂) (Glories, 1984), (Brouillard & Lang, 1990). La forme flavylium, de couleur rouge, est prédominante en milieu acide mais se transforme, en milieu basique soit en base carbinol (incolore) soit en chalcone (jaune) soit en base quinonique (bleue) (figure 10).

La couleur dépend aussi de la structure moléculaire et de l'environnement. D'une part la substitution du cycle latéral entraîne un déplacement de la longueur d'onde d'absorption maximale (vers le mauve) d'autre part la fixation du glucose et l'acylation déplace la couleur en sens inverse (vers l'orange). Les molécules se trouvent surtout dans la pellicule (Amrani-joutei, *et al.*, 1993), en solution dans le suc vacuolaire en présence d'autres polyphénols (acides phénols, flavonoïdes...) susceptible d'intervenir sur la couleur des pigments : c'est la copigmentation qui tire en général les couleurs vers le bleu (*cf* deuxième partie : complexation polyphénols-polyphénols).

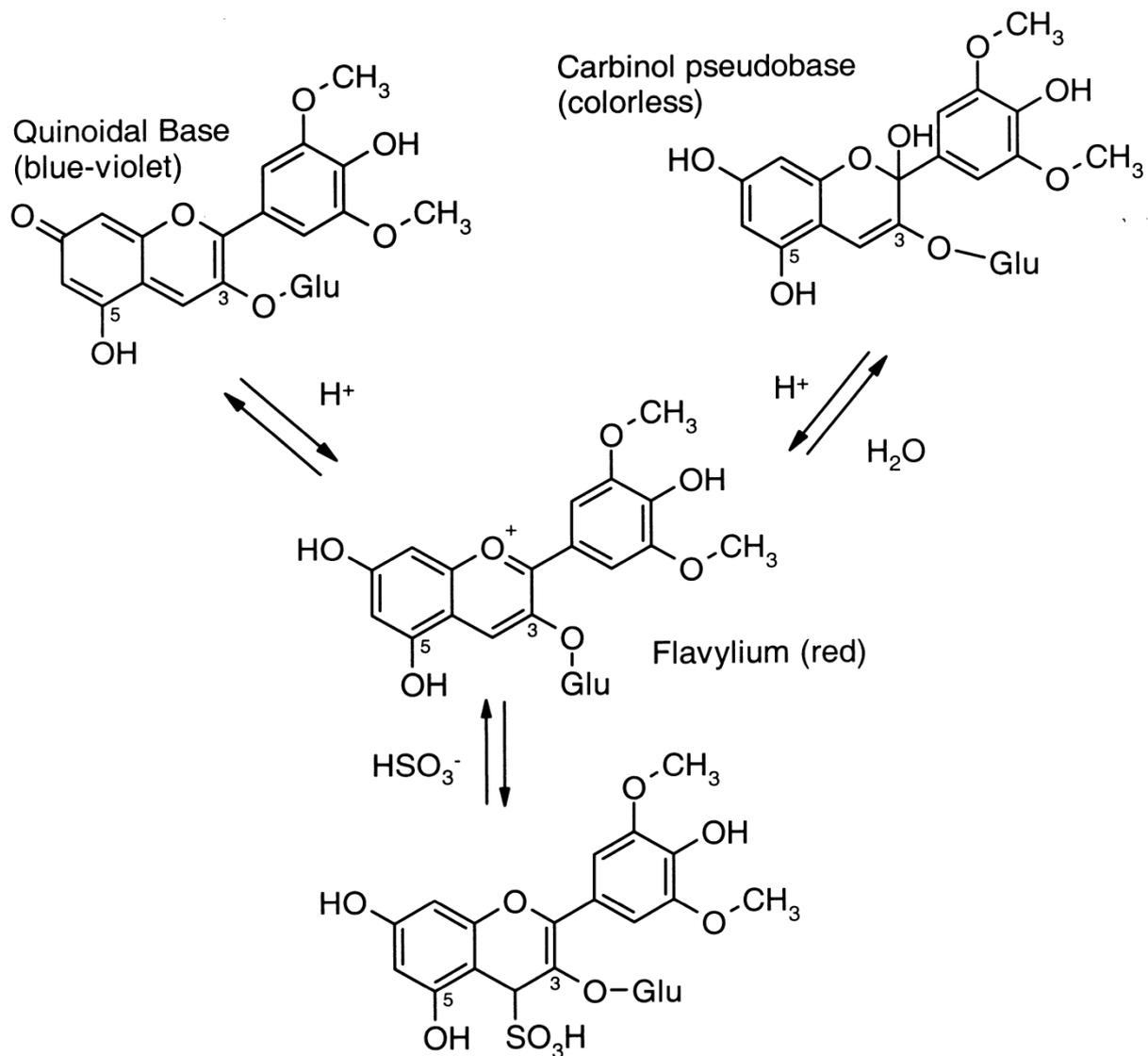


Figure 10: Les différentes formes d'anthocyanes du vin (Waterhouse, 2002).

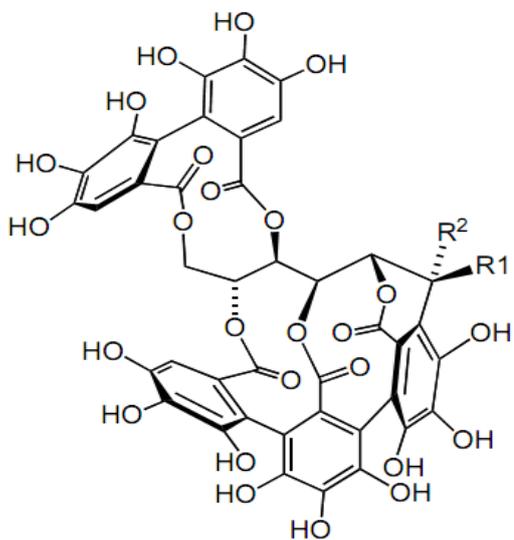
Au cours du vieillissement du vin, les anthocyanes vont participer à de nombreuses réactions d'oxydation, d'hydrolyse ou de condensation qui s'avèrent très importantes dans l'évolution des caractères organoleptiques du vin (Ribéreau-Gayon, Pontallier, & Glories, 1983).

2.3.2. Les flavanols.

Plus communément appelés tanins, ce sont des molécules capables de former des combinaisons stables avec des protéines et des polymères végétaux comme les polysaccharides. Les tanins sont des molécules phénoliques volumineuses car résultant de la polymérisation de molécule élémentaire à fonction

phénol. Selon la molécule élémentaire, on trouvera des tannins hydrolysables, des tannins catéchiques (condensés) ou des tannins complexes (mixtes).

Les tannins hydrolysables comprennent les gallotanins et les ellagitanins libérant respectivement l'acide gallique et l'acide ellagique après hydrolyse acide, ils contiennent aussi une molécule de glucose. Dans le bois de chêne utilisé en tonnellerie, on trouve en majorité deux ellagitanins isomères, la vescalagine et la castalagine (figure 11), qui après une hydrolyse acide, donneront la vescaline et la castaline. Ces différentes molécules sont solubles et passent rapidement en milieux hydroalcooliques tels que les vins (Moutounet, *et al.*, 1989). Leur oxydabilité et leurs propriétés gustatives (Pocock, *et al.*, 1994) leur confèrent un rôle important au cours de l'élevage des vins rouges en fût de chêne. Dans le vin, l'acide ellagique provient soit du bois du contenant soit de l'addition de tanins œnologiques, par contre l'acide gallique est lui présent dans les pépins et dans les pellicules des raisins.

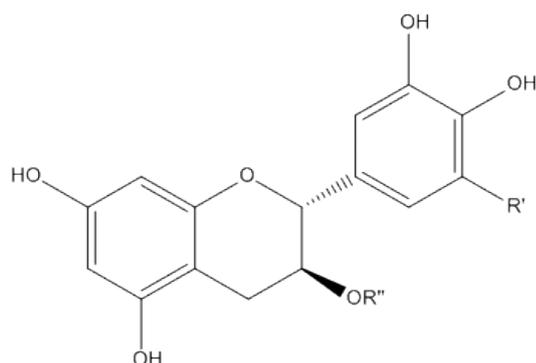


Ellagitannins	R1	R2
Vescalagine	OH	H
Castalagine	H	OH

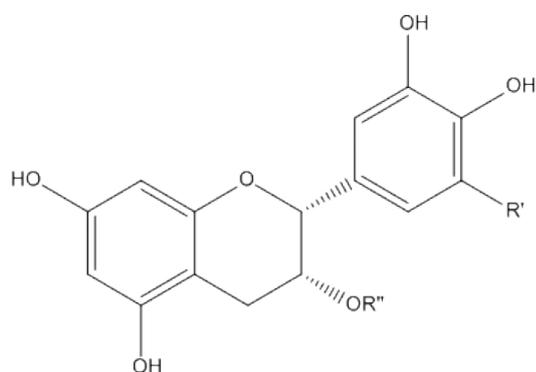
Figure 11: Ellagitannins issus du chêne retrouvés dans le vin.

Les tanins condensés du raisin et du vin sont des molécules plus ou moins complexes, c'est-à-dire des monomères, dimères (figure 12), oligomères ou polymères (figure 13) de flavan-3-ols, ou catéchines, la (+)-catéchine et la (-)-épicatéchine étant les unités structurales de base. Le chauffage en milieu acide de ces polymères en solution (réaction de Bate-Smith) (figure 14) libère la cyanidine de couleur rouge, d'où le nom de procyanidines ou encore d'oligomères

procyanidoliques donné à ces composés. Dans les vins rouges, la catéchine est présente à des concentrations allant de 150 à 220 mg/l, les vins blancs contiennent des quantités plus faibles, environ de 40mg/l (Waterhouse, *et al.*,1997). L'épicatéchine est présente en des teneurs moindres, de l'ordre de 80mg/l (Bourzeix, *et al.*, 1986).



Série	R'	R''
catéchine		
(+)-catéchine	H	H
(-)-catéchine	H	H
Gallocatechine	OH	H
Catéchine galoylée	H	Ac
		gallique



Série	R'	R''
épicatéchine		
(+)-épicatéchine	H	H
(-)-épicatéchine	H	H
Epigallocatechine	OH	H
épicatéchine galoylée	H	Ac
		gallique

Figure 12 : Unités structurales des tannins condensés du vin.

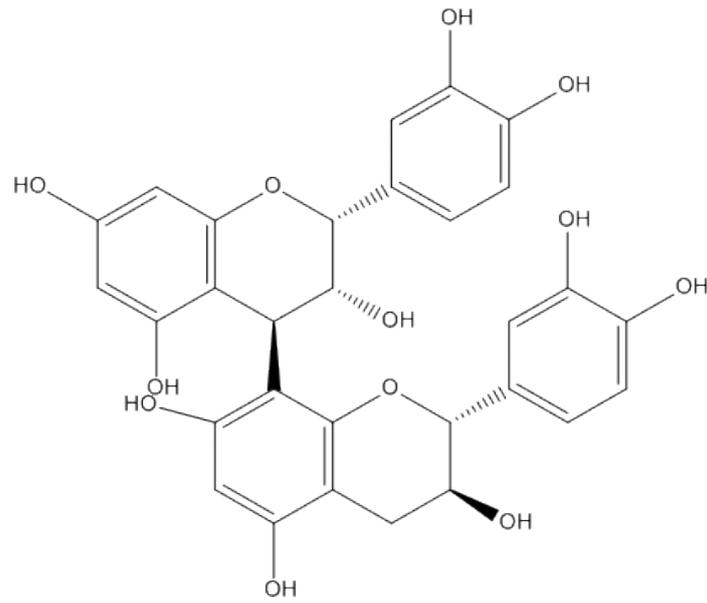


Figure 13: Exemple de dimère procyanidolique (liaison C4-C8).

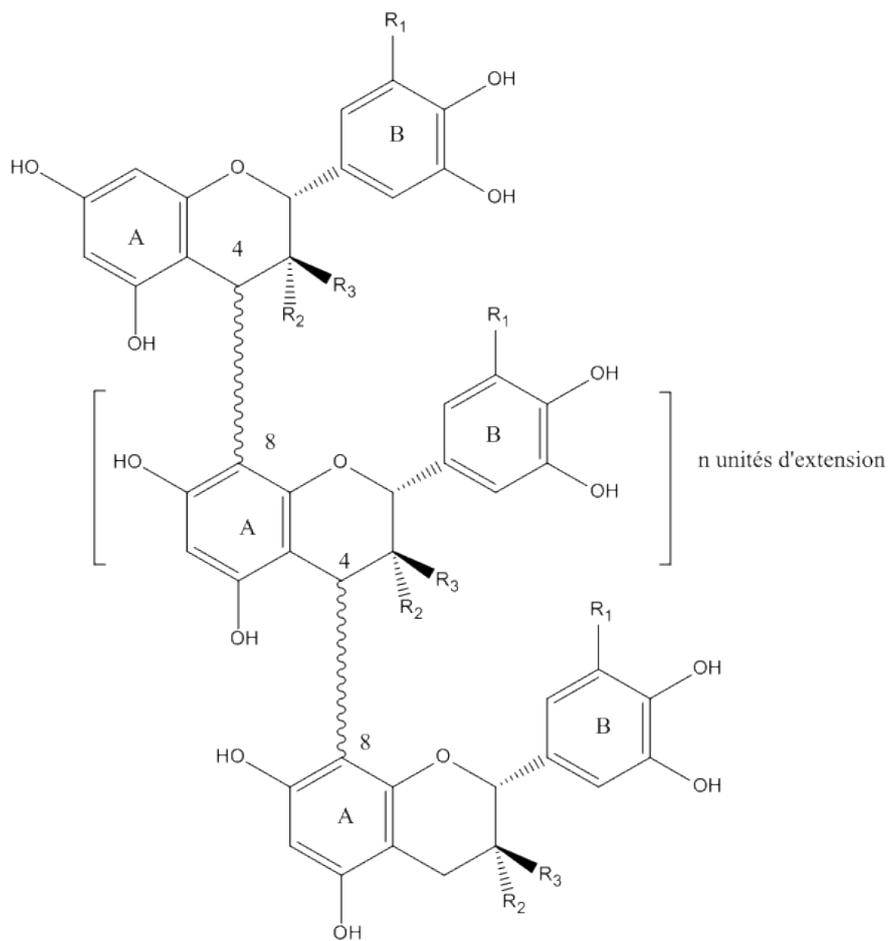


Figure 14: Structure des polymères de flavanols du raisin et du vin.

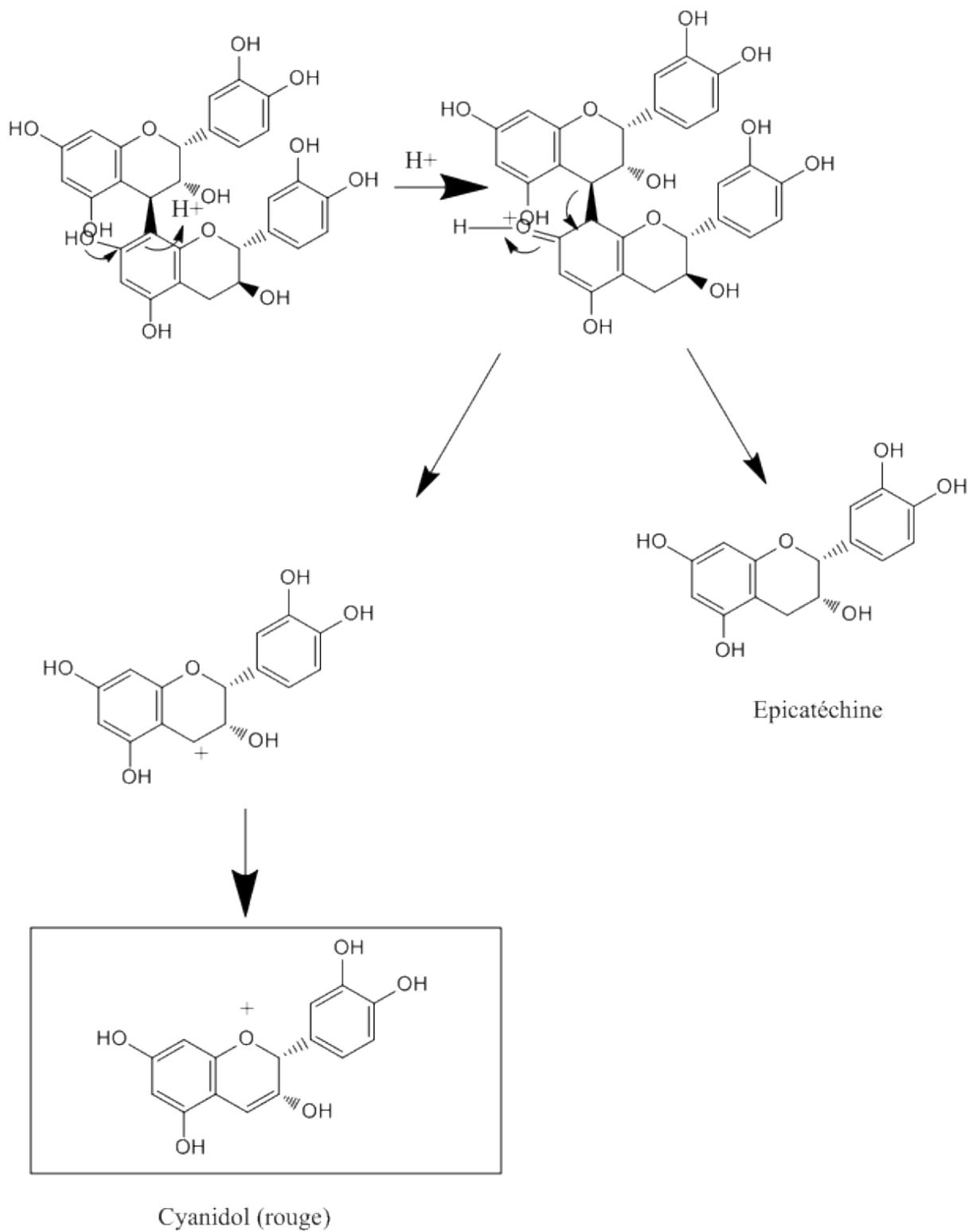


Figure 15: Réaction de Bate-Smith.

2.3.3. Les flavonols.

Les flavonols sont des pigments jaunes retrouvés dans toutes les variétés de raisins. Ils sont généralement dans le vin sous forme d'aglycones. Les principaux composés sont la quercétine, la myricétine et le kaempférol (Waterhouse & Teissèdre, 1997). Les hétérosides de la quercétine trouvés dans le vin rouge sont la rutine (quercétine-3-O-rutinoside), la quercitrine (quercétine-3O-glucoside) et l'isoquercitrine (quercétine-3-O-rhamnoside).

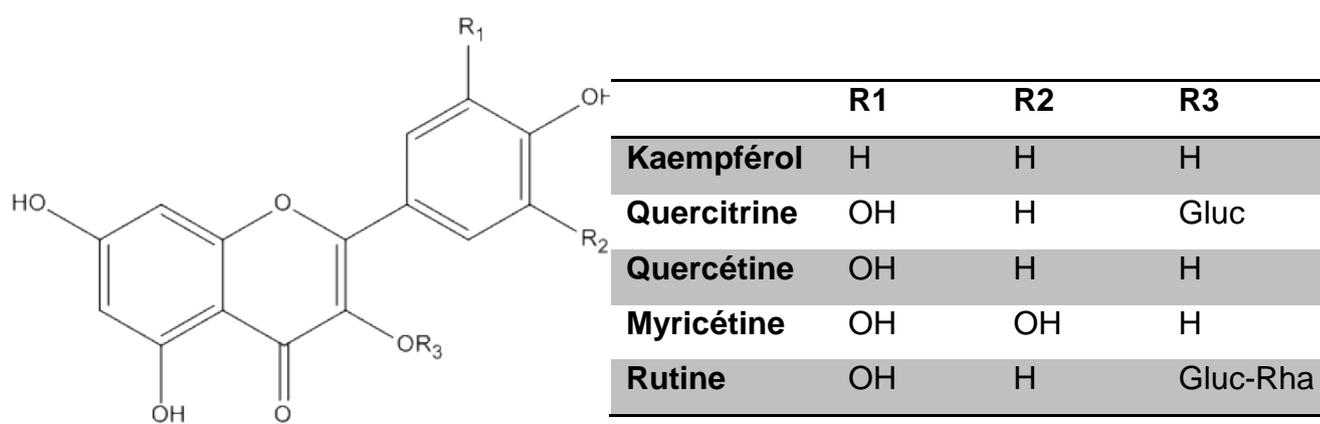


Figure 16: Principaux flavonols du vin.

3. Voies de biosynthèse et rôle pour la plante.

3.1. Biosynthèse.

Chez la vigne comme chez la plupart des végétaux, il existe plusieurs systèmes enzymatiques agissant de manière séquencée ou simultanée pour aboutir à la synthèse de molécules précises. Les composés phénoliques sont des produits secondaires du catabolisme des sucres, les enzymes clés de leur biosynthèse sont présentes très tôt dans le développement du raisin et sont responsables d'une augmentation brutale et continue des composés phénoliques totaux durant la première phase de la croissance végétale de la baie. Cette augmentation brutale est ensuite suivie d'une accumulation plus lente durant la phase de maturation en raison d'une activité protéique moindre par rapport à l'augmentation du volume des fruits.

Les composés les plus simples (un seul cycle benzénique) sont issus de la condensation de l'érythrose-4-phosphate avec l'acide phosphoenol-pyruvique. Cette voie de biosynthèse, nommée voie de l'acide shikimique, conduit à la fois aux acides benzoïques et cinnamiques mais aussi aux acides aminés aromatiques (phénylalanine et tyrosine). Les stilbènes et les flavonoïdes sont synthétisés par la voie de la phénylalanine/polymalonate, la dernière étape menant aux stilbènes est catalysée par la STS (stilbène synthase) tandis que pour les flavonoïdes, il s'agit de la CHS (chalcone synthase). Les étapes détaillées ainsi que les enzymes clés de cette voie de biosynthèse sont détaillées en figure 17.

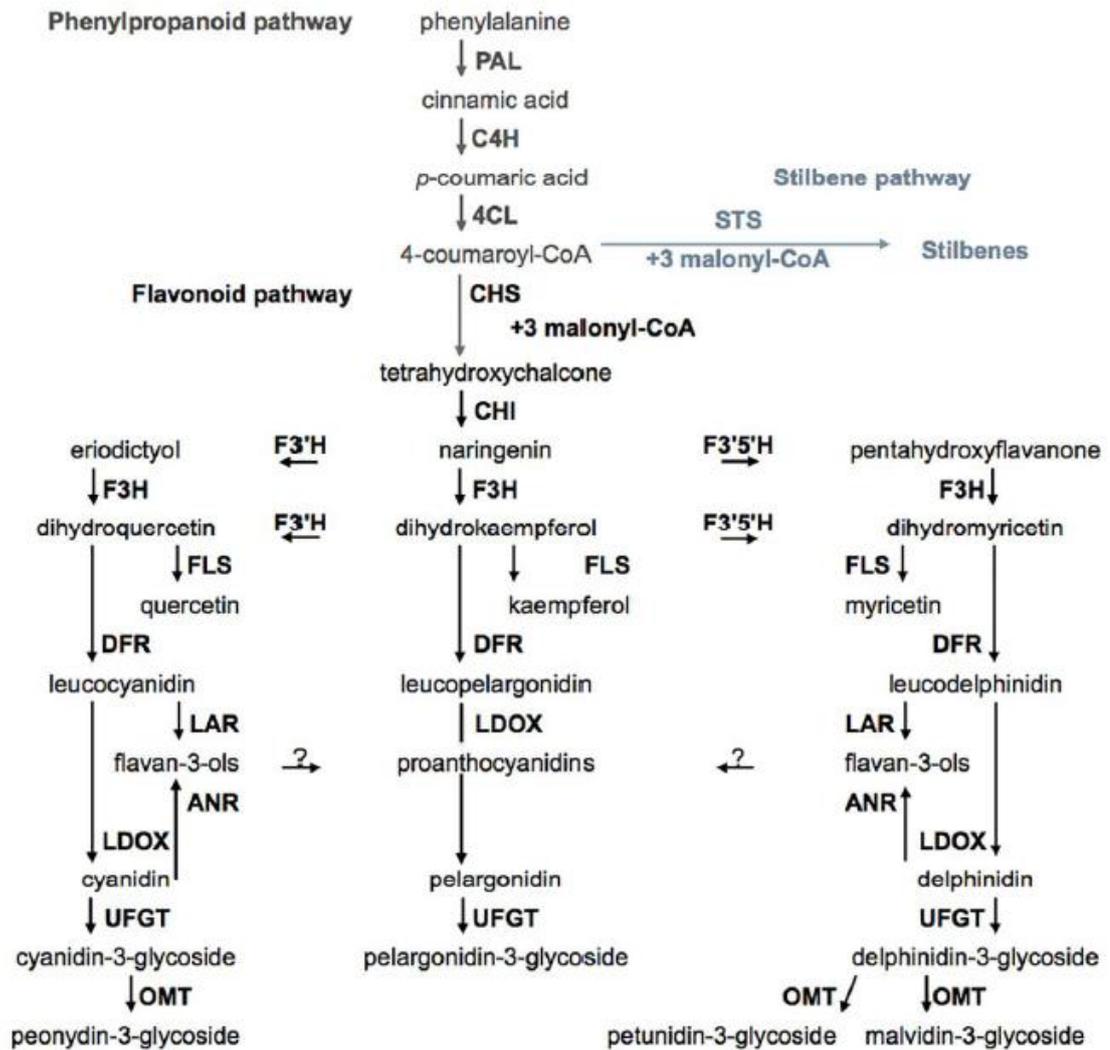


Figure 17: Voies de biosynthèses des métabolites secondaires de la baie de raisin. Phénylalanine ammonia lyase (PAL), cinnamate-4-hydroxylase (C4H), 4-coumaroyl:CoA-ligase (4CL), stilbène synthase (STS), chalcone synthase (CHS), chalcone isomerase (CHI), flavonoïde 3'-hydroxylase (F3'H), flavonoïde 3',5'-hydroxylase (F3'5'H), flavanone-3-hydroxylase (F3H), flavonol synthase (FLS), dihydroflavonol réductase (DFR), leucoanthocyanidine réductase (LAR), anthocyanidine réductase (ANR), leucoanthocyanidine dioxygénase (LDOX), dihydroflavonol 4-réductase (DFR), flavonoïde glucosyltransférane (UFGT), O-méthyltransférane (OMT).

3.2. Rôle des composés phénoliques pour la vigne.

La baie de raisin possède schématiquement, comme de nombreux autres fruits, 2 modes de défenses : l'un est actif l'autre est passif. On sait que les raisins verts sont beaucoup moins sensibles aux attaques diverses et notamment fongiques en comparaison des baies mûres, cette différence est la conséquence du passage d'un organe photosynthétiquement actif à activité métabolique intense vers un organe à faible activité métabolique dont le rôle principal est le stockage. On note que la proportion des éléments structuraux est largement modifiée entre une baie

verte et une baie mûre, ainsi, l'hypoderme et l'épiderme, constituant une barrière de défense passive importante, voit leur épaisseur nettement diminuer durant la maturation alors que la pulpe, zone la plus sensible aux attaques, va elle augmenter de façon très importante avec l'accumulation de sucres et d'eau dans les vacuoles.

La synthèse des composés phénoliques en réponse à une infection entre dans le cadre d'une défense active de la plante nommée réponse phytoalexique. Les stilbènes sont les molécules jouant probablement le plus grand rôle dans cette réponse, citons le resvératrol, produit suite à une attaque fongique grâce à l'activation de la stilbène synthase qui dérive le métabolisme phénolique normal pour augmenter la production des stilbènes. Le resvératrol et autres dérivés inhibent la formation des conidies et le développement des mycélium. Il faut noter que les baies vertes possèdent une forte capacité de réponse à une infection mais que l'aptitude à synthétiser du resvératrol diminue à la véraison et devient nulle à maturité (Jeandet, Bessis, & Gauteron, 1991). On note que les attaques infectieuses ne sont pas les seules causes inductrices de synthèses phénoliques, les traumatismes simples superficiels tels que des frottements (Tronchet, 1978) ou des piqûres de certains insectes aboutissent à l'accumulation de polyphénols tels que des flavonoïdes de manière localisée sur la zone traumatisée.

D'autre part, la présence dans les tissus de couches superficielles riches en vacuoles tanniques constitue un moyen de défense passive de la baie. Le mode d'action découle de la capacité des tannins à former des complexes avec les protéines et notamment avec les enzymes des mycélium libérées lors des premiers stades de la pénétration des champignons et chargées de faciliter la pénétration du parasite. On sait que le nombre de cellules hypodermiques et donc de vacuoles tanniques diminuent fortement au cours de la maturation et entraînent ainsi une plus grande sensibilité des baies mûres aux infections (Fougère-Rifot, Park, & Bouard, 1997).

Pour finir, il faut noter que les composés phénoliques jouent un rôle important dans l'attractivité du fruit en modifiant l'indicateur de maturité que sont les couleurs. La véraison, stade où s'opère le changement de couleur, correspond approximativement au moment où les pépins deviennent aptes à germer. Les animaux et en particulier les oiseaux, voient apparaître des baies dont la coloration varie du rouge au noir le plus profond, en passant par le mauve, le bleu et le violet, qui contrastent ainsi avec

le feuillage vert et leur indiquent la présence de fruits sucrés et nourrissants. La modification des couleurs due aux variations de compositions phénoliques des baies et donc un moyen de dissémination des plants et participe ainsi à la diversité génétique des vignes.

4. Biodisponibilité des polyphénols.

4.1. Généralités.

L'intérêt actuel suscité par les polyphénols est pour grande partie du aux résultats de différentes enquêtes épidémiologiques sur la consommation de vin, notamment certaines citées plus loin dans cette thèse. Toutefois, dans le but d'établir la preuve d'une potentielle efficacité d'un apport alimentaire de polyphénols dans la prévention de certaines maladies, il est primordial d'étudier les biodisponibilités relatives de ces dits composés ainsi que des facteurs l'influençant avant de pouvoir évaluer leurs potentiels effets biologiques. La biodisponibilité peut être définie comme la fraction réelle d'un composé ou d'un nutriment ingéré qui atteint la circulation systémique et les sites spécifiques où elle peut exercer son action biologique.

4.1.1. Facteurs influençants.

De nombreux facteurs susceptibles d'interférer avec la biodisponibilité existent, la structure chimique propre à chaque composé est bien sûr déterminante puisque les composés phénoliques existent très souvent sous forme de polymères ou sous formes glycosylées, formes qui ne peuvent être absorbées telles quelles (Sarni-Manchado & Cheynier, 2006). Nous verrons plus tard dans ce chapitre que ces molécules subiront, pour la plupart, des hydrolyses de la part des cellules intestinales ou de la flore microbienne avant absorption. La structure chimique spécifique du polyphénol ainsi que le type de sucre dans les formes glycosylées déterminent la vitesse et l'ampleur de l'absorption intestinale. Il existe par ailleurs d'importants facteurs relatifs à chaque individus comme les facteurs intestinaux (activité enzymatique, temps de transit intestinal, composition de la microflore bactérienne) et des facteurs systémiques (genre, âge, pathologies, génétique).

4.1.2. Absorption et métabolisme des polyphénols.

Les concentrations en composés phénoliques dans la circulation sanguine dépendent de leur métabolisme et de leur absorption depuis le tractus gastro-intestinal. Il semble que la voie métabolique subie par ces composés soit identique à la voie métabolisant d'autres xénobiotiques. Les polyphénols du vin et plus généralement alimentaires sont sous formes d'esters, de glycosides ou encore de polymères qui ne peuvent être absorbés tels quels. Suite à leur ingestion, certains polyphénols vont être absorbés dans l'intestin grêle. Il est largement accepté qu'il existe 2 mécanismes par lesquels les dérivés glycosylés vont être hydrolysés à ce niveau. Le premier implique l'action de la lactate phloridzine hydrolase (LPH), enzyme présente dans les cellules épithéliales de la bordure en brosse de l'intestin grêle. La LPH possède 2 sites catalytiques : l'un hydrolyse le lactose tandis que l'autre sert à la déglycosylation de substrats plus hydrophobes. Le premier site semble être responsable de la majeure partie de l'action de la LPH. Les aglycones libres peuvent entrer dans les cellules épithéliales par diffusion passive du fait de leur lipophilie suffisante. Le second mécanisme nécessite la β -glycosidase cytosolique (Day *et al.*, 1998) des cellules épithéliales ou certains polyphénols polaires sont transportés via un transporteur actif sodium-glucose dépendant nommé SGLT1 (Hollman *et al.*, 1995).

Les polyphénols non absorbés par l'intestin grêle atteignent le colon et vont subir des modifications structurales médiées par la flore microbienne : hydrolyse des glycosides et dégradation de l'aglycone en acides phénols simples. Cette étape pourrait être décisive pour l'action biologique des polyphénols car elle produirait certains métabolites actifs.

Avant leur passage dans la circulation systémique, les polyphénols qui sont maintenant sous forme d'aglycones vont encore voir leur structure modifiée par les processus de conjugaisons qui prennent place à la fois dans l'intestin grêle mais aussi et surtout dans le foie. Les conjugaisons qui regroupent glucuronidation, sulfation et méthylation représentent une voie commune de détoxification de nombreux xénobiotiques visant à réduire leurs potentiels effets nocifs et permettre leur excrétion facilitée dans la bile ou l'urine en augmentant leur solubilité (figure 18).

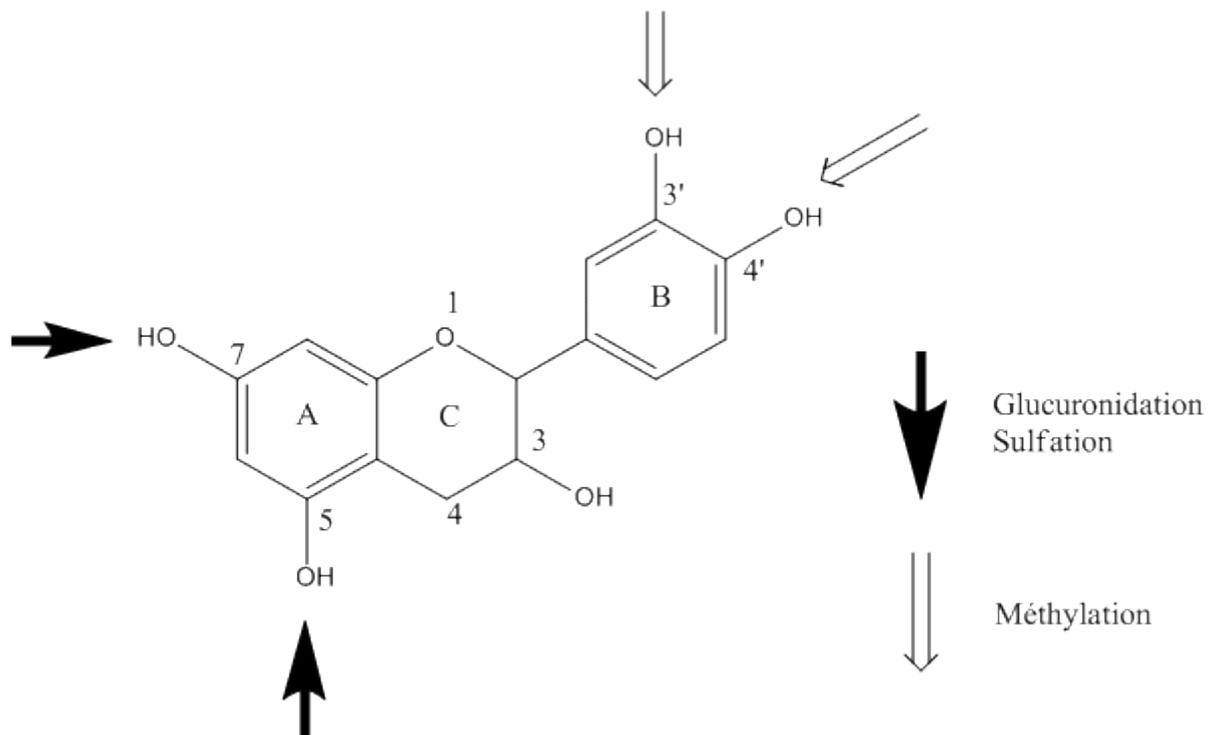


Figure 18: Sites potentiels de conjugaisons des polyphénols. Les flèches pleines représentent les sites potentiels de glucuroconjugaisons et sulfations, les flèches creuses de méthylation.

La catéchol-O-méthyltransférase (COMT) catalyse le transfert d'un groupement méthyl depuis l'adénosyl-méthionine vers les polyphénols contenant un groupement diphenolique comme la quercétine, la catéchine, l'acide cafféique et la cyanidine. Les sulfotransférases (SULT) catalysent le transfert d'un sulfate depuis la phosphoadénosine-phosphosulfate vers un groupement hydroxyle de divers substrats dont les polyphénols. Les uridine-5'-diphosphateglucuronosyltransférases (UGTs) sont des enzymes membranaires localisées dans le réticulum endoplasmique de nombreux tissus et qui catalysent les transferts d'un acide glucuronique vers les polyphénols.

Les processus de conjugaisons sont à la fois producteurs de potentiels métabolites actifs mais sont responsables, par ailleurs, d'une réduction du taux de polyphénols total dans la circulation sanguine en augmentant leurs excréations.

La relative importance de tel ou tel type de conjugaison varie selon la nature du substrat et de la dose ingérée. Quoiqu'il en soit, ces mécanismes de conjugaisons sont très efficaces et les aglycones libres ne se retrouvent généralement pas, ou à de très faibles doses, dans le plasma. Ces modifications affectent profondément les

effets biologiques des polyphénols et par conséquent les composés atteignant cellules et tissus cibles sont chimiquement, biologiquement et fonctionnellement différents des polyphénols originels retrouvés dans le vin.

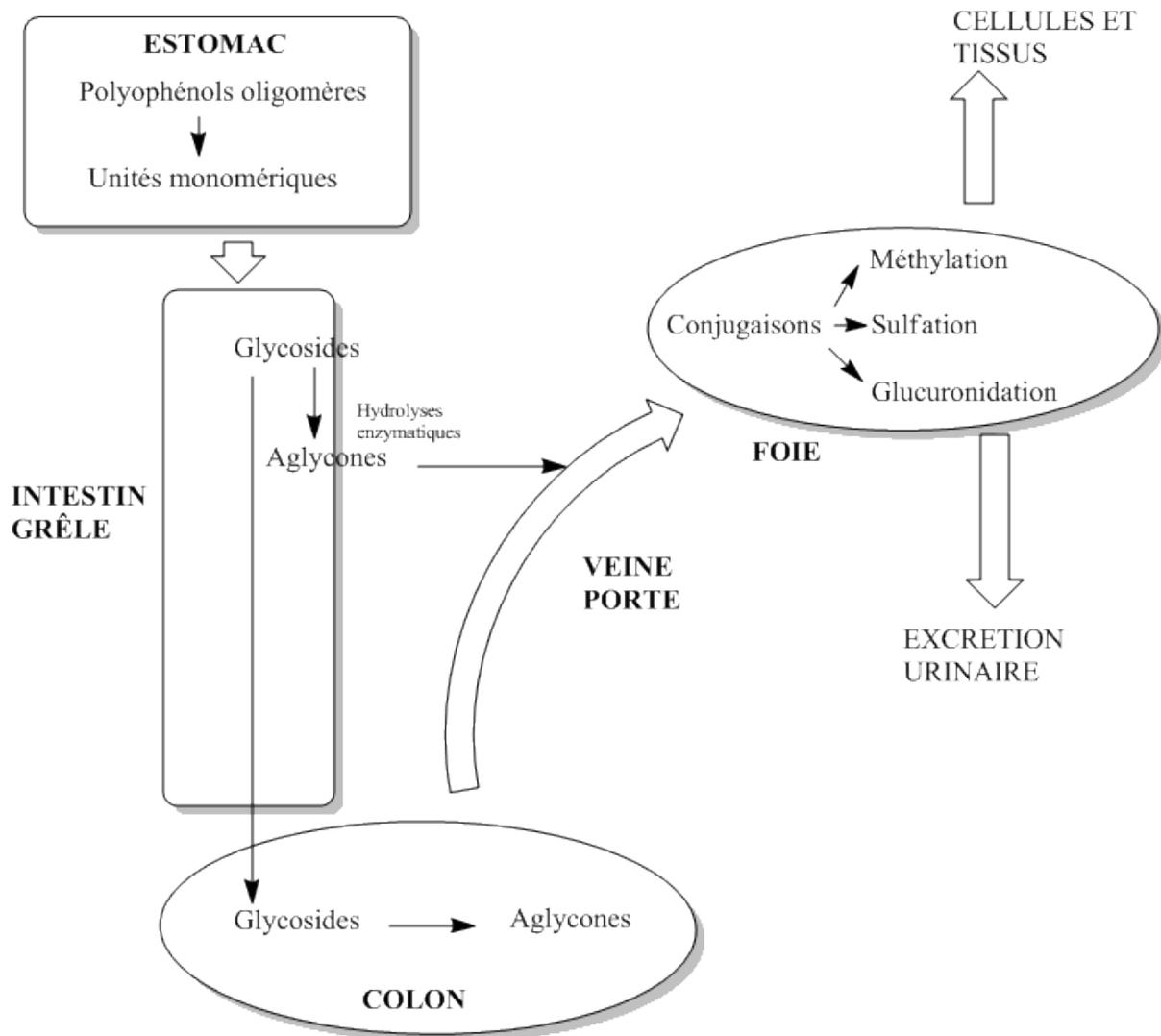


Figure 19: Schéma simplifié de l'absorption des polyphénols alimentaires.

4.1.3. Transport dans les cellules depuis la lumière intestinale.

Comme mentionné plus haut, certains composés phénoliques hydrophiles peuvent être transportés dans les entérocytes par des transporteurs SGLT1. Ce processus implique des protéines membranaires contenant au moins un site de liaison d'ATP ou ATP Binding Cassette (ABC) qui utilisent l'énergie résultant de l'hydrolyse d'ATP pour le transport de différentes substances. Ces protéines membranaires sont exprimées dans le foie, les reins, le tractus gastro-intestinal le placenta et les testicules. La famille des transporteurs ABC comprend les MRPs

(multidrug resistance proteins), les BCRP (breast cancer resistance protein) et les glycoprotéines P qui sont toutes responsables de l'efflux de composés bioactifs depuis les cellules intestinales vers la circulation sanguine ou de nouveau vers la lumière intestinale (Alvarez *et al.*, 2010). Ces transporteurs montrent peu de spécificité de substrats et jouent donc un rôle majeur dans la limitation de la délivrance de substances aux cellules. Par exemple, le MRP3, localisé dans la membrane basolatérale des entérocytes, est responsable du transport du trans-resvératrol glucuronide vers la circulation sanguine (Kaldas & Walle, 2003). On peut aussi citer ici le MRP2 présent dans la membrane apicale des entérocytes qui prend en charge le transport de polyphénols glucuroconjugués ou sulfoconjugués.

4.1.4. Le rôle de la flore microbienne.

Les polyphénols non absorbés par l'intestin grêle atteignent le colon, la flore présente à ce niveau est capable d'hydrolyser les glycosides en aglycones puis de métaboliser les aglycones en acides aromatiques variés (Scheline, 1991). La scission en différents points de l'hétérocycle de l'aglycone dépend de la structure chimique de celle-ci : les flavonols donnent principalement des acides hydroxyphenylacétiques tandis que les flavanols produisent des phenylvalérolactones et des acides hydroxyphenylpropioniques. Ces acides seront ensuite métabolisés en dérivés de l'acide benzoïque (Gonthier, Cheynier, & Donovan, 2003). Les métabolites formés par la microflore du colon sont transportés par la veine porte jusqu'au foie où ils subiront sulfoconjuguaisons et glucuroconjuguaisons avant d'être transportés dans la circulation générale puis excrétés dans les urines (ou les fèces pour ceux qui ne sont pas absorbés). L'identification et la quantification des métabolites microbiens constitue un important champ de recherche car certains de ces dits métabolites pourraient avoir des effets physiologiques majeurs, comme le suggère l'action des acides hydroxyphénylacétiques vis-à-vis de l'agrégation plaquettaire (Kim *et al.*, 1998).

4.1.5. Transport plasmatique.

Les métabolites de polyphénols ne circulent pas sous formes libres dans le sang. Des expérimentations *in vitro* ont montré que la quercétine était liée à 99% aux protéines plasmatiques et que sa liaison aux VLDL (very low density lipoproteins) était négligeable (Boulton, Walle, & Walle, 1998). Il en est de même pour ses

métabolites qui sont eux aussi fortement liés aux protéines plasmiques. L'albumine est la principale protéine impliquée dans le transport des polyphénols, l'affinité de ces composés pour la protéine dépend de leur structure chimique. Le kaempférol et la quercétine ont une affinité semblable pour l'albumine (Dangles *et al.*, 2001). En revanche la substitution en position 3 de l'hydroxyle, observée par exemple sur la rutine (3-O-glycoside de quercétine), diminue la liaison à l'albumine. Les sulfatations et glucuronidations des polyphénols ont aussi un impact sur cette affinité qui peut être variable selon la position de substitution.

La liaison à l'albumine peut avoir des conséquences importantes sur la vitesse d'élimination des métabolites et sur leur libération au niveau des tissus cibles. On admet classiquement que la captation cellulaire est proportionnelle à la concentration de métabolites libres, cependant, l'impact de la liaison à l'albumine sur l'activité biologique des polyphénols n'est pas aussi clairement établie. Le noyau catéchol de la quercétine liée à l'albumine reste en effet accessible pour certains agents oxydants (Dangles, Dufour, & Bret, 1999). La quercétine pourrait donc éventuellement exercer son pouvoir antioxydant même lorsqu'elle est liée à l'albumine si cet élément clé de la structure chimique est aussi accessible aux radicaux libres. Toutefois, il est important de noter que les propriétés biologiques des polyphénols ne se limitent pas aux effets antioxydants, ainsi la liaison à l'albumine pourrait fortement moduler ces autres activités.

4.1.6. Biodisponibilité tissulaire.

Lorsque des doses uniques de polyphénols radiomarqués (quercétine, resvératrol) sont administrées à des souris ou des rats sacrifiés 1 ou 6h après, la radioactivité est principalement retrouvée dans le sang et les tissus digestifs (estomac, intestin, foie) (Vitrac, *et al.*, 2003 ; Mullen, *et al.*, 2002). Cependant, les polyphénols ont été détectés par HPLC dans un grand nombre d'autres tissus chez le rat et la souris :

- Le cerveau (Abd El Mohsen *et al.*, 2002).
- Les cellules endothéliales (Youdim, Martin, & Joseph, 2000).
- Le cœur, les reins, la rate, le pancréas, la prostate, l'utérus, les ovaires, les glandes mammaires, les testicules, la vessie, les os et la peau. (Kim *et al.*, 2000 ; Suganuma *et al.*, 1998)

La microradiographie de tissus de souris ayant subi une administration de gallate d'epigallocatechine ou de resvératrol radiomarqués a montré clairement que la radioactivité était inégalement répartie entre les cellules d'un même organe (Suganuma *et al.*, 1998 ; Vitrac *et al.*, 2003).

4.2. Absorption et métabolisme de composés phénoliques spécifiques.

4.2.1. Catéchines.

La 3'-O-méthylcatéchine-glucuronide et la catéchine-glucuronide sont 2 métabolites produits par les cellules intestinales, par ailleurs, des sulfations et méthylations des métabolites de la catéchine peuvent intervenir dans le foie (Donovan, *et al.*, 2001). Les catéchines sont retrouvées dans le sang principalement sous forme de métabolites glucuronidés chez des rats nourris avec des catéchines. Sont également retrouvés les dérivés à la fois glucuronidés et sulfatés de la 3'-O-méthylcatéchine, produits vraisemblablement dans le foie et seulement détectés dans la bile. Chez l'homme, on retrouve entre 3 et 10.3% des catéchines de vin rouge ingéré dans les urines, principalement sous forme de métabolites (3'-O-méthylcatéchine et dérivés glucuroconjugués ou sulfoconjugués) (Donovan, *et al.*, 2002).

Les épicatechines sont retrouvées sous forme de métabolites glucuronidés et sulfatés dans le plasma et on note une absorption compétitive entre épicatechines et catéchines dans les intestins de rats: lorsqu'on administre par voie orale de la (+)-catéchine aux rats, le métabolite (+)-catéchine 5-O- β -glucuronide est retrouvé dans le plasma, la bile et les urines. A l'inverse, quand de la (-)-épicatechine est donnée au rats, c'est la (-)-épicatechine 5-O- β -glucuronide qui est détectée dans les mêmes échantillons de liquides biologiques (Haralda, *et al.*, 1999). La (+)-catéchine et la (-)-épicatechine sont absorbées depuis l'intestin grêle à la fois par diffusion passive et par diffusion facilitée, la présence ou non d'éthanol n'influence pas cette absorption. Les catéchines peuvent aussi être transformées par la flore microbienne en acides phénoliques. Chez les rats, les métabolites présents aux plus hautes concentrations et détectés dans les urines sont : l'acide 3-hydroxyphenylpropionique, l'acide 3-hydroxybenzoïque et l'acide 3-hydroxyhippurique (Gonthier, *et al.*, 2003). Quand les catéchines sont incubées avec la microflore intestinale humaine, la métabolisation

forme l'acide 4-hydroxybenzoïque, le phloroglucinol, le 2,4,6-trihydroxybenzaldéhyde et l'acide 4-méthoxysalicylique.

4.2.2. Anthocyanes.

Chez les humains, les concentrations plasmatiques retrouvées après consommation d'anthocyanes sont de l'ordre de la nanomole. La plupart des anthocyanes absorbées sont retrouvées dans les urines après 3h (Cao, *et al.*, 2001). En outre, de petites quantités d'anthocyanes ont pu être détectées dans le tractus gastro-intestinal bas de rats ayant consommés des anthocyanes, aucune dans le foie, les reins et le cerveau. Chez ces mêmes rats, des anthocyanes sont retrouvées en quantités détectables dans les fèces. Les anthocyanes sont glucuronidées et méthylées chez la souris, ce qui se retrouve dans les échantillons d'urines et de fèces (He, *et al.*, 2005).

La majeure partie des anthocyanes sont métabolisées *in vivo* par la microflore intestinale qui produit acide phénols et aldéhydes (Aura, *et al.*, 2005), ainsi, un extrait d'anthocyanes de cabernet-sauvignon est métabolisé par une microflore intestinale issue du porc en acide 3-O-méthylgallique, en acide syringique et en 2,4,6-trihydroxybenzaldéhyde (Forester & Waterhouse, 2008).

4.2.3. Acides phénols.

Les acides phénols sont des composés sujets à de considérables modifications opérées par la flore microbienne. Après 2H d'incubation d'acide caféique avec la microflore bactérienne fécale, les acides benzoïque et 3-hydroxyphénylpropionique sont produits et aucuns autres dérivés ne sont détectés (Gonthier, *et al.*, 2006). Les acides phénols subissent bien sûr également le métabolisme cellulaire comme le prouve l'incubation de dérivés cinnamiques avec des cellules Caco-2, les méthylhydroxycinnamates peuvent être hydrolysés et rendent leur aglycone à l'extérieur de la cellule ou être transportés à l'intérieur de celle-ci pour être sulfoconjugués ou glucuroconjugués respectivement par les sulfotransférases ou les UDP-glucuronosyltransférases (Kern, *et al.*, 2003). Les études prouvent par ailleurs que les transports des cellules intestinales peuvent être sélectifs, ainsi, l'acide p-coumarique est mieux absorbé que l'acide gallique quand ils sont donnés oralement à des rats (Konishi, *et al.*, 2004), ce qui pourrait être du à des

modalités de transport différentes. L'acide gallique est plutôt transporté par diffusion paracellulaire tandis que les acides m-coumarique et m-hydroxyphenylpropionique utilisent le transporteur MCT (MonoCarboxylic acid Transporter) dans des cellules Caco-2 (Konishi & Kobayashi, 2003).

4.2.4. Quercétine.

La quercétine n'est pas retrouvée sous forme libre ou sous forme de dérivé glycosylé dans le plasma mais exclusivement sous forme de conjugués méthylés, sulfatés ou glucuroconjugués (Day, *et al.*, 2001), par ailleurs, des doses faibles en quercétine aboutissent à de plus grandes concentrations de formes méthylées que des doses plus grandes et des composés tels que l'isorhamnétine ou la tamarixétine sont produits chez le rat (Dragoni, *et al.*, 2006). La microflore intestinale peut métaboliser la quercétine en acides 4-hydroxybenzoïque, 3,4-dihydroxybenzoïque et 3,4-dihydroxyphenylacétique qui ont une élimination plutôt lente, avec une demi-vie d'environ 11 à 28 h, permettant un cumul de ces derniers dans le plasma en cas d'ingestion répétée ou régulière de quercétine.

4.2.5. Resvératrol.

La biodisponibilité du resvératrol est relativement faible après ingestion orale, comme pour plusieurs autres polyphénols (Goldberg, Yan, & Soleas, 2003). Il est néanmoins bien absorbé au niveau intestinal. Il semble que l'absorption soit saturante à partir d'une dose assez faible (Das, Lin, Ho, & Ng, 2008). Une ingestion d'une quantité plus importante que cette dose ne semble pas pouvoir augmenter l'absorption ou la biodisponibilité du resvératrol. Le picéide étant la forme majoritaire du resvératrol dans le vin rouge, l'étude de son absorption et de ses métabolites est primordiale pour pouvoir comprendre les effets biologiques de ce dernier. Une partie du picéide est déglycosylé dans la lumière intestinale par la lactase phloridzine hydrolase, le reste traverse la membrane apicale via des cotransporteurs sodium/glucose (SGLT 1). Le picéide incorporé est également déglycosylé par la β -D-glucosidase cytosolique dans les cellules de l'épithélium intestinal, comme le montrent des tests effectués sur cellules Caco-2 (Henry-Vitrac *et al.*, 2006). On retrouve dans le sang principalement les formes monoglucuronides (resvératrol-4'-O-D-glucuronide, resvératrol-3'-O-D-glucuronide) et monosulfates (resvératrol-3-sulfate) (Walle *et al.*, 2004). Le resvératrol semble être en effet rapidement métabolisé par

les enzymes de détoxification des xénobiotiques de phase II. Cet effet est retrouvé partiellement dès l'intestin grêle pour les glucuronides (Kuhnle *et al.*, 2000) et le sulfate (De Santi *et al.*, 2000). Le resvératrol est ensuite distribué dans l'organisme (Vitrac *et al.*, 2003) *via* le réseau artériel où il est fixé à l'albumine. Les organes accumulant le resvératrol ou ses métabolites sont préférentiellement des organes impliqués soit dans l'absorption (système digestif), soit dans l'excrétion (foie, reins). L'accumulation dans le foie est particulièrement rapide et marquée, y compris sous forme aglycone. On retrouve donc du resvératrol dans différents liquides tels que la bile et l'urine, sa présence dans le sang n'étant que de courte durée. L'entrée du resvératrol dans les cellules (hépatiques notamment) implique des processus de diffusion passive et des transporteurs actifs (Lancon *et al.*, 2004). Au niveau hépatique, le resvératrol aglycone est métabolisé en resvératrol-4'-O-D-glucuronide, resvératrol-3'-O-D-glucuronide et resvératrol-3-sulfate (De Santi *et al.*, 2000). Ceci est dû à l'action des enzymes de phase II du métabolisme de détoxification des xénobiotiques telles que les UGTs (UDP-GlucurosylTransférase) et SULT (SULfoTransférases). L'expression de ces enzymes est d'ailleurs plus importante lorsque les cellules ont été mises en contact avec du resvératrol, suggérant une induction enzymatique dépendante du resvératrol (Lancon, *et al.*, 2007) . Les métabolites ainsi produits sont ensuite expulsés de la cellule par des transporteurs/enzymes de phase III du métabolisme de détoxification des xénobiotiques. La modulation des cinétiques d'influx et d'efflux du resvératrol peut donc se révéler être une piste intéressante pour en améliorer l'effet au niveau cellulaire. A moins qu'au niveau des cellules des tissus cibles ces métabolites soient clivés grâce à l'action d'une glucuronidase, le resvératrol aglycone apparaît comme étant très peu en contact avec les tissus (Yu, *et al.*, 2002). Le taux de resvératrol circulant pourrait être augmenté artificiellement par l'administration de resvératrol en injection intraveineuse ou en hydrogels dermiques, le métabolisme étant relativement faible au niveau de la peau (Hung *et al.*, 2008), mais, étant donné la vitesse de métabolisation hépatique, des prises fréquentes seraient nécessaires pour maintenir un taux circulant suffisant pour induire des effets biologiques. Ces faibles expositions tissulaires ne concernent que le resvératrol libre, ses métabolites présentant une pharmacocinétique plus apte à agir sur les cellules. L'efficacité biologique des métabolites du resvératrol (resvératrol-3-sulfate, resvératrol-4'-O-D-glucuronide,

resvératrol-3'-O-D-glucuronide) doit être testée sur des lignées cancéreuses afin d'établir leur potentiel chimiopréventif.

5. Etudes épidémiologiques, consommation de vin et mortalité.

5.1. Découverte du « French paradox »

A la fin des années 1980, le projet WHO-MONICA (World Health Organisation MONitoring trends and determinants In CArdiovascular disease) révèle que le taux de mortalité français par maladie coronarienne (infarctus du myocarde notamment) est plus bas que dans d'autres pays industrialisés tels que le Royaume-Uni ou les Etats unis (World Health Organization, 1989). Ce taux est en effet proche de ceux observés au Japon ou en Chine (notamment chez les femmes) en dépit d'une consommation supérieure en graisses saturées et de taux de cholestérol sériques semblables à ceux observés au Royaume-Uni et aux Etats unis (tableau 3). Par ailleurs, les mesures d'autres facteurs de risques cardio-vasculaires tels que la pression sanguine, l'indice de masse corporelle et le tabagisme ne révèlent pas de différences significatives entre la France et les pays industrialisés à plus fort taux de mortalité. Cette contradiction se vérifie également en comparaison de pays déjà connus pour la faible incidence de leurs maladies coronariennes tels que l'Italie, la Grèce et l'Espagne. De plus, même si les trois centres français ayant participé au projet MONICA (Toulouse, Strasbourg et Lille) ont des taux de mortalité par maladies coronariennes inférieurs aux Etats-Unis, à l'Irlande et à l'Ecosse (tableau 4), les résultats dévoilent des différences notables au sein même de ces centres. Le taux de mortalité Toulousain est en effet plus bas que dans les autres centres français et se rapproche du taux Japonais (tableau 4).

L'expression « French paradox », apparue suite à ces conclusions, décrit cette singularité française vis-à-vis de la maladie coronarienne et a suscité l'intérêt de nombreuses équipes de recherches, européennes ou américaines, qui, au cours des trente dernières années, ont rassemblé de nombreuses études et données épidémiologiques en relation avec le sujet.

Parmi ces études, nous pouvons citer les travaux du docteur Renaud (Renaud & de Lorgeril, 1992) qui posent des hypothèses quant à l'origine du French paradox. Dans un premier temps, l'équipe confronte les statistiques issues du projet WHO-MONICA

(tableau 4) avec des statistiques françaises et publications antérieures, notamment des années 1970 (figure 18). Les chercheurs révèlent la concordance des résultats de ces sources : Toulouse et la région Sud-ouest de la France ont un taux de mortalité coronarienne inférieur au reste de la France. Partant de ce constat, l'équipe va tenter de déterminer la particularité de la région sud-ouest et s'intéresse en premier lieu aux habitudes alimentaires de celle-ci que l'on peut qualifier de régime méditerranéen (consommation faible en beurre et importante en graisses végétales, fruits, légumes, pain, fromage et vin) (tableau 5). Les chercheurs observent que l'association inverse entre consommation régulière de vin et taux de mortalité coronarienne s'accordent avec de précédentes publications (St Leger, Cochrane, & Moore, 1979) qui tendent à démontrer un potentiel effet bénéfique de l'alcool et en particulier du vin. Dès lors, l'hypothèse d'une consommation de vin protectrice à l'origine du French paradox est posée : en France, les effets néfastes d'une grande consommation de graisses saturées seraient contrecarrés par une consommation régulière et modérée de vin.

Tableau 3 : Taux de mortalité standardisé par âge pour 100 000 hommes et facteurs de risques cardiaques (Renaud & de Lorgeril, 1992).¹

	CHD (coronary heart disease)²	Cancer des poumons	Apport en graisse (%) Calories)	Cholestérol sérique	Prévalence Fumeurs
Japon	51	47	28	-	70
France	95	69	45	233	37
Espagne	109	63	42	219	47
Italie	140	87	42	224	47
Suisse	163	67	46	248	32
Belgique	162	116	46	238	47
USA	255	84	46	209	40
Ecosse	363	105	44	244	52

1 Adapté à partir des statistiques de l'organisation mondiale de la santé (World Health Organization, 1989) et des statistiques de l'OCDE (Organization for Economic Co-operation and development (OECD), 1991). 2 Maladies coronariennes.

men 45-54 years/100000

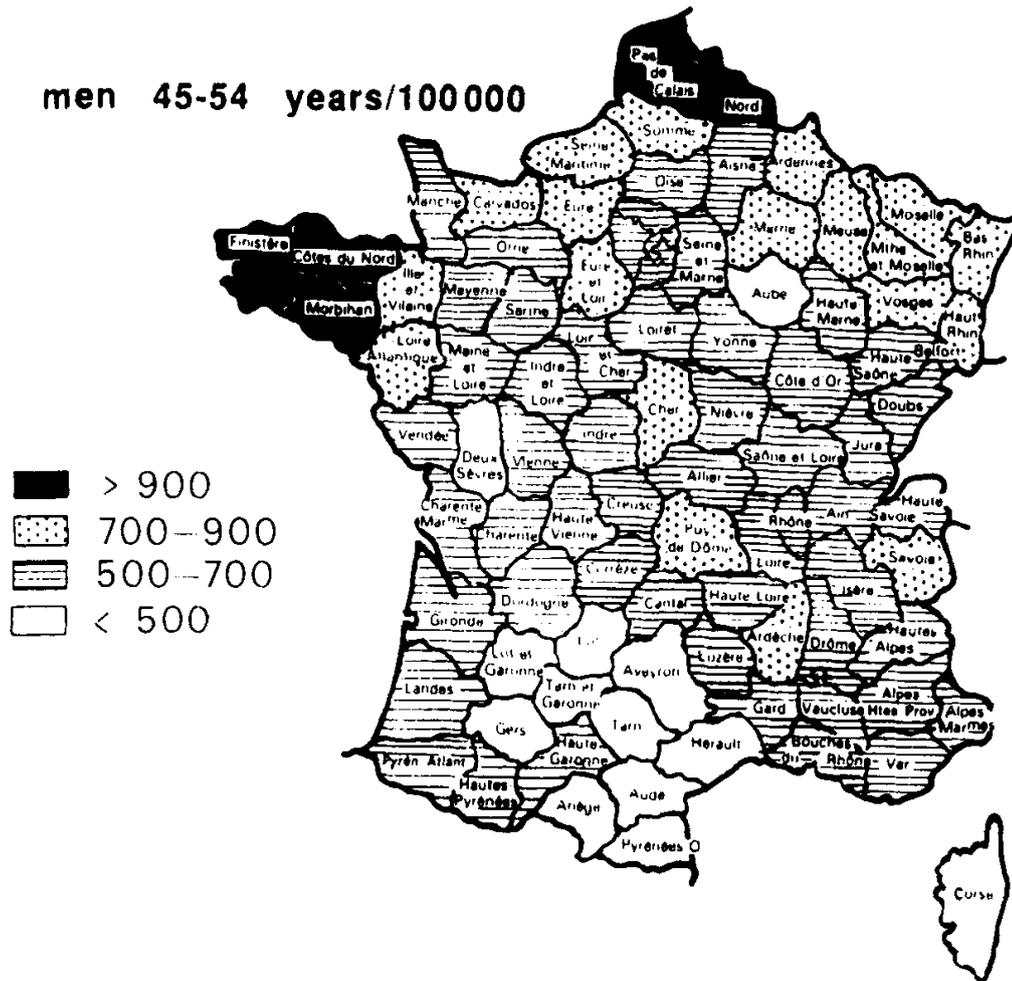


Figure 20: Mortalité prématurée annuelle chez les 45-54 ans toutes causes confondues à l'exclusion des morts violentes dans les 87 départements français de 1973 à 1975 (Renaud & de Lorgeril, 1992), adapté des statistiques médicales de causes de mortalités, INSERM 1973-1975.

Tableau 4: Taux de mortalité prématurée standardisée par âge (pour 100 000) dans la population MONICA (35-64 ans) (Renaud & de Lorgeril, 1992) adapté de (World Health Organization, 1989).

	CHD¹		Cardiovasculaire		Total	
	Homme	Femmes	Homme	Femmes	Hommes	Femmes
Pékin (Chine)	49	27	191	170	471	371
Japon	33	9	144	63	512	246
Toulouse (France)	78	11	140	39	575	255
Strasbourg (France)	102	21	216	64	887	318
Lille (France)	105	20	224	72	1041	411
Standford (USA)	182	48	266	93	708	371
Belfast (Irlande)	348	88	445	152	933	463
Glasgow (Ecosse)	380	132	501	225	1179	681

1. Maladies coronariennes.

Tableau 5: Taux de mortalité par maladies coronariennes, HDL sérique et régime alimentaire dans les trois centres français MONICA (Renaud & de Lorgeril, 1992).

	Strasbourg	Toulouse	Lille
Taux de mortalité maladies coronariennes/ 1100 000 hommes	102	78	105
HDL sérique (mg/dl)	45	52	60
Régime alimentaire (g/jour):			
Pain	164	225	152
Légumes	217	306	212
Fruits	149	238	160
Beurre	22	13	20
Fromage	34	51	42
Graisse végétale	16	20	15
Vin	286	383	267

5.2. French paradox : régime alimentaire ou consommation d'alcool ?

Suite à l'observation du « French paradox », il est apparu nécessaire d'évaluer et différencier la part imputable au régime méditerranéen de la part liée à la consommation d'alcool. Les travaux du docteur Criqui (Criqui & Ringel, 1994), basés sur la comparaison de données émanant de vingt-six pays différents relatives à la consommation d'alcools au niveau quantitatif et qualitatif (vin, bière ou spiritueux) et aux régimes alimentaires (part de graisses animales, de fruits et de légumes dans les calories totales) tentent de répondre à cette interrogation. Les conclusions révèlent que le vin est l'élément diététique le plus fortement corrélé aux taux diminués de mortalité par maladies coronariennes devant la bière et les spiritueux. Néanmoins, il semble que les populations consommant des quantités modérées de bière, de vin ou de spiritueux aient toutes des taux de mortalité coronarienne diminués. L'effet protecteur serait le plus prononcé avec le vin qu'avec la bière qui apparaît elle-même plus protectrice que les spiritueux. L'étude insiste par ailleurs sur le fait que l'effet bénéfique sur le taux de mortalité global ne s'observe que pour des consommations légère à modérée (1 à 2 verres par jour) bien que l'effet bénéfique sur les maladies coronariennes soit conservé pour une consommation de 5 à 6 verres par jours. Ce phénomène s'explique par l'augmentation progressive des taux de mortalités dues à toutes les autres maladies cardio-vasculaires ainsi qu'aux autres causes au-delà de deux verres d'alcool par jour.

5.2. Vins, bières, spiritueux et mortalité toutes causes confondues.

D'autres études se sont penchées plus particulièrement sur les consommations de différents alcools et les potentiels effets bénéfiques associés à chacun d'eux. Ainsi, l'étude « *Wine, beer and mortality in middle-aged men from eastern France* », (Renaud, Guéguen, Siest, & Salamon, 1999) confirme un effet bénéfique d'une consommation modérée de vin sur le taux de mortalité par maladie cardio-vasculaire mais confirme également une diminution sur le taux de mortalité global, toutes causes confondues (causes cardio-vasculaires, coronaires, cancers, cirrhoses, morts subites...). L'étude se base sur des données de plus de trente six milles personnes âgées de 40 à 60 ans sur la période de 1978 à 1983 et prend en compte les activités professionnelles et loisirs, le rapport au tabagisme, un questionnaire des

antécédents médicaux, des paramètres biologiques (cholestérol sérique, glycémie, γ -glutamyltransférase...) ainsi que les quantités et types de boissons (alcoolisées ou non) habituellement consommés parmi six différents choix (dont trois alcoolisés : vin, bière, apéritifs et liqueurs). Trois catégories furent établies : les buveurs de vin qui ne boivent pas de bière, les buveurs de bière, dont la consommation d'alcool est constituée d'au moins 40% de bière et les buveurs de vin et de bière qui consomment moins de 40% de bière. Le but de cette étude fut de déterminer le risque relatif de mort (toutes causes confondues) associé à chaque catégorie de buveurs en comparaison des non-buveurs. Les résultats furent retranscrits sous la forme d'une courbe, devenue depuis célèbre, la courbe en forme de J (figure 21). Ce graphe, qui fait aujourd'hui figure de référence, décrit une zone de consommation de vin (1 à 3 verres par jour) corrélée à une diminution du taux de mortalité global entre 29% et 33% en comparaison des non buveurs. En revanche, en ce qui concerne les buveurs de bière, bien qu'une relation entre consommation modérée et diminution du taux de mortalité cardiovasculaire a pu être démontrée, aucun effet sur les cancers et le taux de mortalité global n'a été mis en évidence. En outre, il est important de rappeler que les consommateurs réguliers de grandes quantités d'alcools, de n'importe quel type, voient leur risque relatif global fortement augmenter, notamment du fait d'une augmentation du risque de cancers et de cirrhoses.

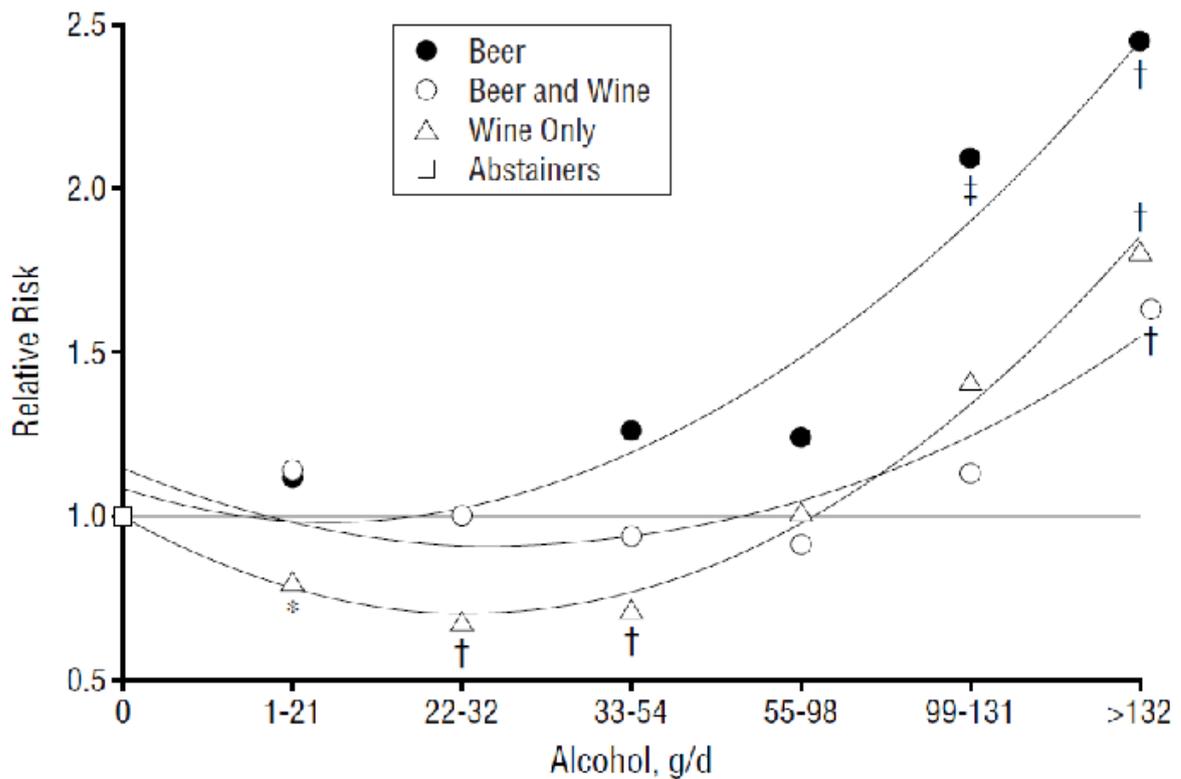


Figure 21: Risque relatif de mort de toutes causes par rapport à la quantité d'alcool et au type d'alcool consommé (Renaud, Guéguen, Siest, & Salamon, 1999).

Une étude plus récente sur une cohorte de plus de 120 000 sujets nord américains confirme l'effet salutaire d'une consommation modérée de vin sur le risque de mortalité global (Klatsky, *et al.*, 2003) et la prédominance de cet effet par rapport aux consommations modérées d'autres alcools. L'équipe du Docteur Gronbaek parvient également aux mêmes conclusions, le vin en consommation modérée entrainerait effectivement une réduction du risque de mortalité liés aux maladies coronariennes et aux cancers en comparaison des non-buveurs de vin (Gronbaek, *et al.*, 2000), les résultats prenant la forme d'une courbe en J que ce soit pour le risque relatif de cancers (figure 22) ou pour les maladies coronariennes.

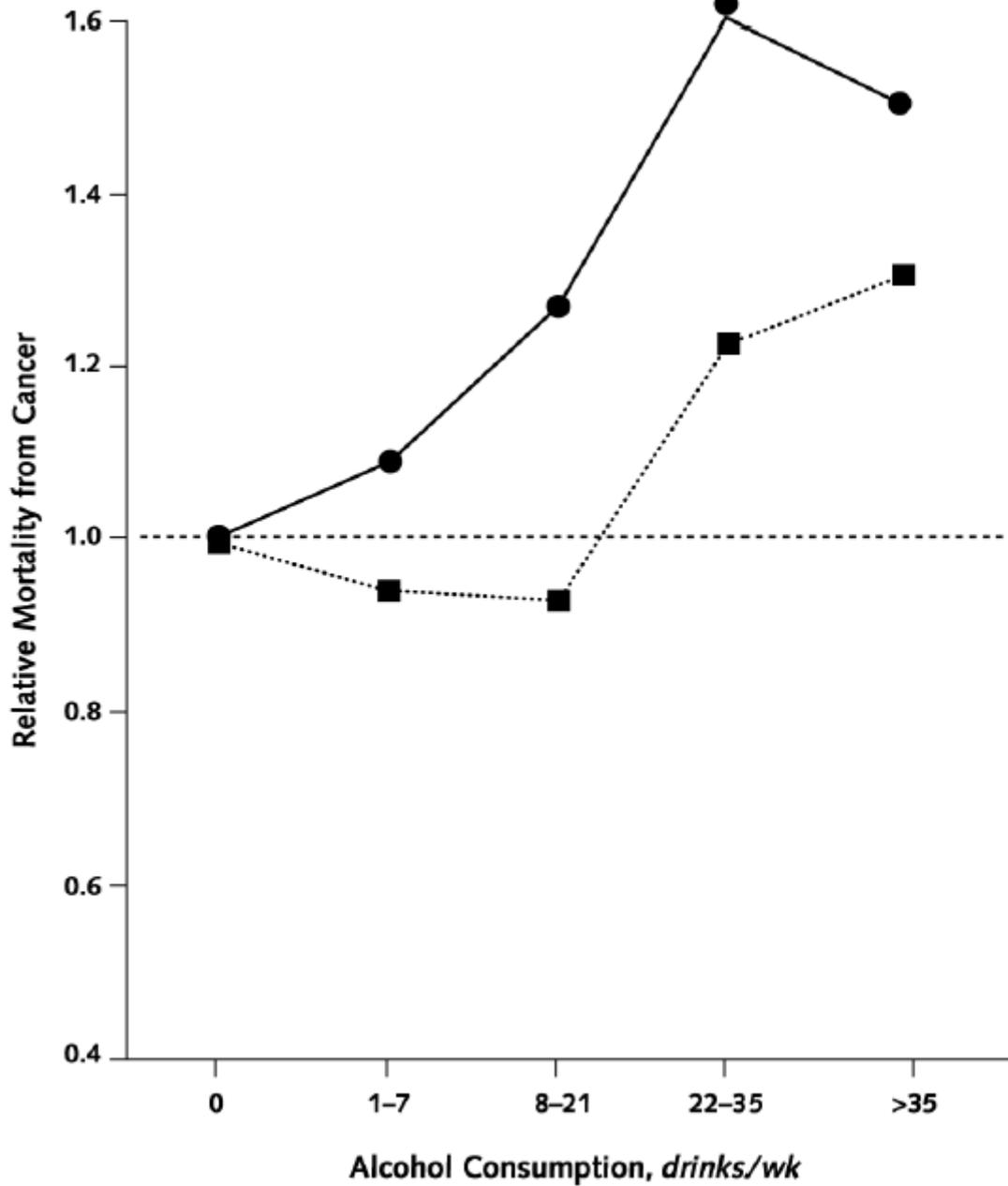


Figure 22: Risque relatif de mort par cancers en relation avec la consommation totale d'alcool. Les cercles représentent les données émanant des non-buveurs de vin, les carrés sont celles des buveurs de vin. Drinks/wk signifie verres par semaine. (Gronbaek, et al., 2000)

DEUXIEME PARTIE : Propriétés chimiques fondamentales et propriétés anti-oxydantes des polyphénols.

1. Propriétés fondamentales des phénols.

1.1. Généralités.

Les propriétés chimiques des polyphénols sont en grande partie dues à celles du phénol lui-même. Ces dernières sont cependant fortement modulées par les substituants typiques des noyaux phénoliques, en particulier ceux capables d'étendre la délocalisation électronique :

- Substituants à effet mésomère donneurs d'électrons (+M) tels que d'autres groupes OH et les groupes OCH₃
- Substituants attracteurs d'électrons (-M) tels que les groupements CO₂H et CH=CH-CO₂H des acides phénoliques et l'hétérocycle C des flavonols et des anthocyanes.

Par définition, un phénol présente un cycle benzénique dont l'un des 6 atomes de carbone porte un groupement OH. La conjugaison d'une des paires libres de l'atome d'oxygène avec le cycle traduit l'effet +M du groupement OH. Ce phénomène augmente la délocalisation électronique (8 électrons délocalisés sur 7 atomes) et confère une charge négative partielle aux atomes C₂, C₄ et C₆ qui se traduit par la représentation de 4 formes mésomères (figure 23). Le phénol présente un jeu de 7 orbitales moléculaires (OM) de type π , combinaison linéaire des 7 orbitales atomiques 2p fournies par les 6 atomes de carbone et l'atome d'oxygène. Parmi ces OM, 4 sont occupées et 3 sont vides. En raison de l'effet +M du groupe OH, l'énergie de l'OM occupée de plus haute énergie (HOMO) est plus élevée dans le phénol que dans le benzène. L'introduction d'autres groupements à effets +M intensifie ce phénomène alors que les groupements à effets -M l'atténuent. De plus, ces derniers tendent à abaisser l'énergie de l'OM vide de plus basse énergie (LUMO). En outre, ces effets électroniques affectent grandement l'énergie de dissociation homolytique de la liaison OH (Bond Dissociation Energy ou BDE). Les phénols sont des nucléophiles non seulement par leur atome d'oxygène mais aussi par leurs atomes de carbone en *ortho* et *para* du groupe OH (figure 23). Cette propriété est à l'origine de substitutions électrophiles aromatiques régiosélectives des positions en *ortho* et *para*.

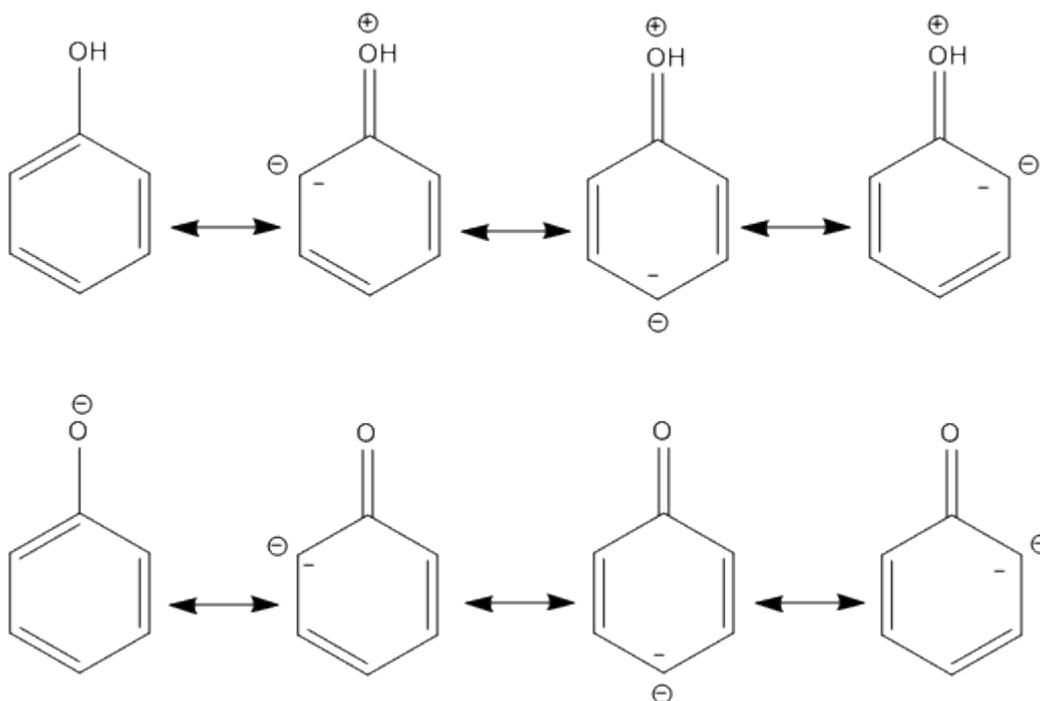


Figure 23: Les formes mésomères du phénol et de sa base conjuguée (ion phénate). (Sarni-Manchado & Cheyner, 2006)

D'une part, le déficit électronique sur l'oxygène provoque un accroissement de sa polarisation. D'autre part, l'ion phénolate, base conjuguée des phénols, est stabilisé par résonance et sa formation, moyennant le départ d'un H⁺, est favorisée.

1.2. Propriétés réductrices.

Le potentiel d'ionisation (PI mesuré en phase gazeuse) d'une molécule est l'énergie minimale à lui fournir pour arracher un électron qui est donc prélevé sur l'HOMO. Plus un composé aromatique est substitué par des groupements donneurs d'électrons, plus l'énergie de son HOMO est élevée, plus son potentiel d'ionisation est faible et plus son caractère réducteur est grand. Il peut alors subir une oxydation mono-électronique qui conduit au radical-cation correspondant, dans le cas d'un phénol ArOH, le radical-cation formé est un acide fort (Bordwell & Cheng, 1991) qui se déprotone aussitôt pour former un radical phénoxy ou aryloxy ArO[•]. L'équivalent en solution du potentiel d'ionisation d'un phénol est le potentiel rédox standard E⁰ du couple $\frac{\text{ArOH}}{\text{ArO}^\bullet}$. Plus un phénol est réducteur, plus E⁰ est faible. Le radical aryloxy (ArO[•]) peut être produit directement par transfert de l'atome H phénolique vers un radical de haute énergie tel que les radicaux oxyl R[•]O et peroxy R[•]O₂ produits par exemple au cours de la peroxydation des lipides. Ces réactions de transfert d'atome

d'H et/ou d'électrons avec conversion d'un radical très réactif en un radical stabilisé sont l'un des principaux mécanismes d'action antioxydante des phénols. La capacité du phénol à céder un atome d'H peut être quantifiée par l'énergie de dissociation homolytique de la liaison OH (BDE). Plus la BDE d'un phénol est faible, plus fort est son caractère donneur d'atome H. D'une manière générale, un substituant à effet +M en position ortho (C2, C6) ou para (C4) du groupe OH stabilise le radical par délocalisation de l'électron célibataire vers ce groupement d'où une BDE plus faible. L'introduction sur le noyau phénolique d'un groupement à effet -M conduit généralement à une BDE plus élevée pour le groupement OH.

1.3. Liaisons hydrogène.

La liaison hydrogène est une interaction électrostatique entre un atome d'hydrogène lié à un atome électronégatif tel que l'oxygène et les électrons libres d'autres atomes.

En raison du caractère acide du proton du groupe OH, les phénols sont des donneurs de liaisons hydrogènes (liaison H) mais aussi des accepteurs de liaison H grâce à la paire libre de l'atome d'oxygène non conjuguée avec le cycle. Le Phénol est ainsi capable de donner une liaison H et d'en recevoir une (figure 24)

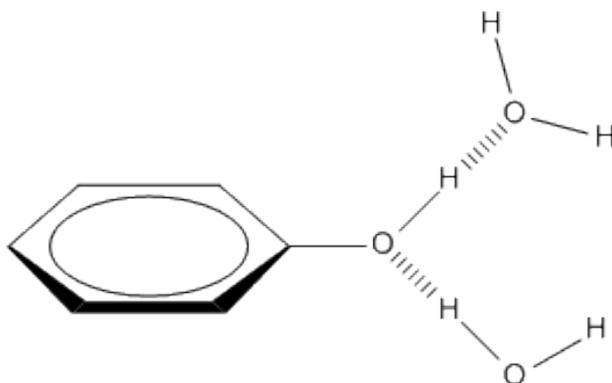


Figure 24: Phénol en interaction par liaisons hydrogènes avec 2 molécules d'eau.

1.4. Acidité.

Un composé est considéré comme acide lorsqu'il est capable de libérer un proton (H⁺) en solution. La constante Ka acide d'un composé définit dans quelle mesure le proton est libéré, les acides forts sont complètement dissociés tandis que les acides faibles (HA) sont à l'équilibre avec leur état dissocié (figure 25). On utilise en général le pKa (pKa = - log Ka), plus l'acide est fort et plus son pka est faible.



$$: \quad \text{Ka} = \frac{[\text{H}^+][\text{A}^-]}{[\text{HA}]}$$

Figure 25: La constante Ka.

La coupure hétérolytique de la liaison OH (déprotonation) entraîne la formation d'un ion phénate dans lequel la délocalisation électronique de l'atome O vers le cycle (+M) est fortement augmentée. L'anion phénate est donc relativement stabilisé grâce à l'existence de plusieurs formes mésomères. Ce phénomène ainsi que la forte solvatation de l'anion phénate par formation de liaisons H avec l'eau permettent d'expliquer les propriétés acides faibles des phénols représentées par des pKa typiques entre 8 et 10. Ces derniers viennent se placer entre les acides carboxyliques (pKa = 4-5) et les alcools aliphatiques (pKa= 16-19). Les propriétés des phénols (nucléophilie, caractère réducteur) sont amplifiées lors de la formation des ions phénates correspondants.

2. Propriétés chimiques des polyphénols.

Les propriétés ci-dessus seront développées sur quelques molécules importantes que sont les acides hydroxybenzoïques, les acides hydroxycinnamiques, la quercétine (flavonols), les catéchines et épicatechines (flavanols) et les anthocyanes. Des propriétés spécifiques de certains polyphénols seront aussi développées.

2.1. Liaisons hydrogènes.

Les composés phénoliques peuvent former, en plus des liaisons hydrogènes « classiques » avec des molécules d'eau par exemple, des liaisons hydrogènes inter- et/ou intra-moléculaires. Les liaisons hydrogènes intra-moléculaires sont communes entre groupements hydroxyles adjacents (ortho-substitution), ou des groupes en position ortho par rapport à un groupe carbonyle. La quercétine (figure 26) et la catéchine sont deux bons exemples pour illustrer cette capacité. Cette dernière a la capacité de créer une liaison hydrogène entre l'oxygène de l'hétérocycle central et un groupement hydroxyle de ce même cycle (figure 27) (Vermerris & Nicholson, 2009).

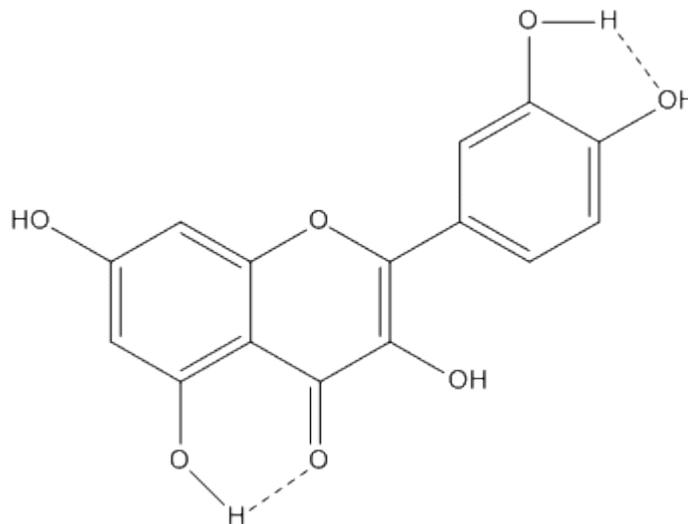


Figure 26: Exemple de liaisons hydrogènes intra-moléculaire de la quercétine.

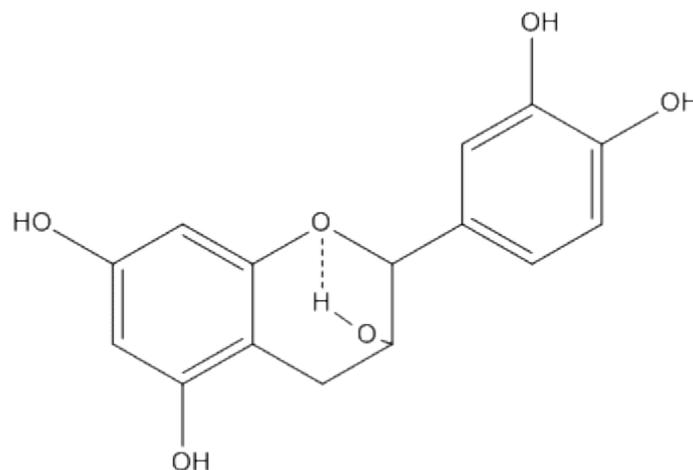


Figure 27: La catéchine et une liaison hydrogène intramolécule possible.

La formation de liaisons hydrogène² dans les composés phénoliques peuvent être résumées avec les règles générales suivantes (Vermerris & Nicholson, 2009):

- Sauf pour cause d'encombrement stérique, tous les composés phénoliques prennent part à des liaisons hydrogène.
- Les liaisons hydrogène intramoléculaires sont moins stables que des liaisons hydrogène intermoléculaires.
- La formation de liaisons hydrogène intramoléculaire diminue la réactivité.

2.2. Acidité.

Le pKa des composés phénoliques dépend de l'ensemble de la structure de la molécule ainsi que de la nature des substituants des cycles. A l'exception de la catéchine, les noyaux phénoliques des polyphénols sélectionnés sont substitués par des groupements à effets –M. Les positions en *ortho* et en *para* du groupe à effet –M présentent un caractère acide renforcé, ce qui permet une dissociation au moins partielle à pH neutre. Cette exaltation de l'acidité est due à la stabilisation de l'ion phénate correspondant par délocalisation de la densité électronique vers le groupement à effet –M. Dans le cas de la quercétine (figure 28), les groupements OH les plus acides sont O4'-H et O7-H. Malgré sa position en *ortho* du groupement carbonyle, O5-H est peu acide car stabilisé par une liaison hydrogène forte avec ce même groupement. Les mesures de pKa montrent qu'à pH neutre, la quercétine est un mélange de mono- et de dianions.

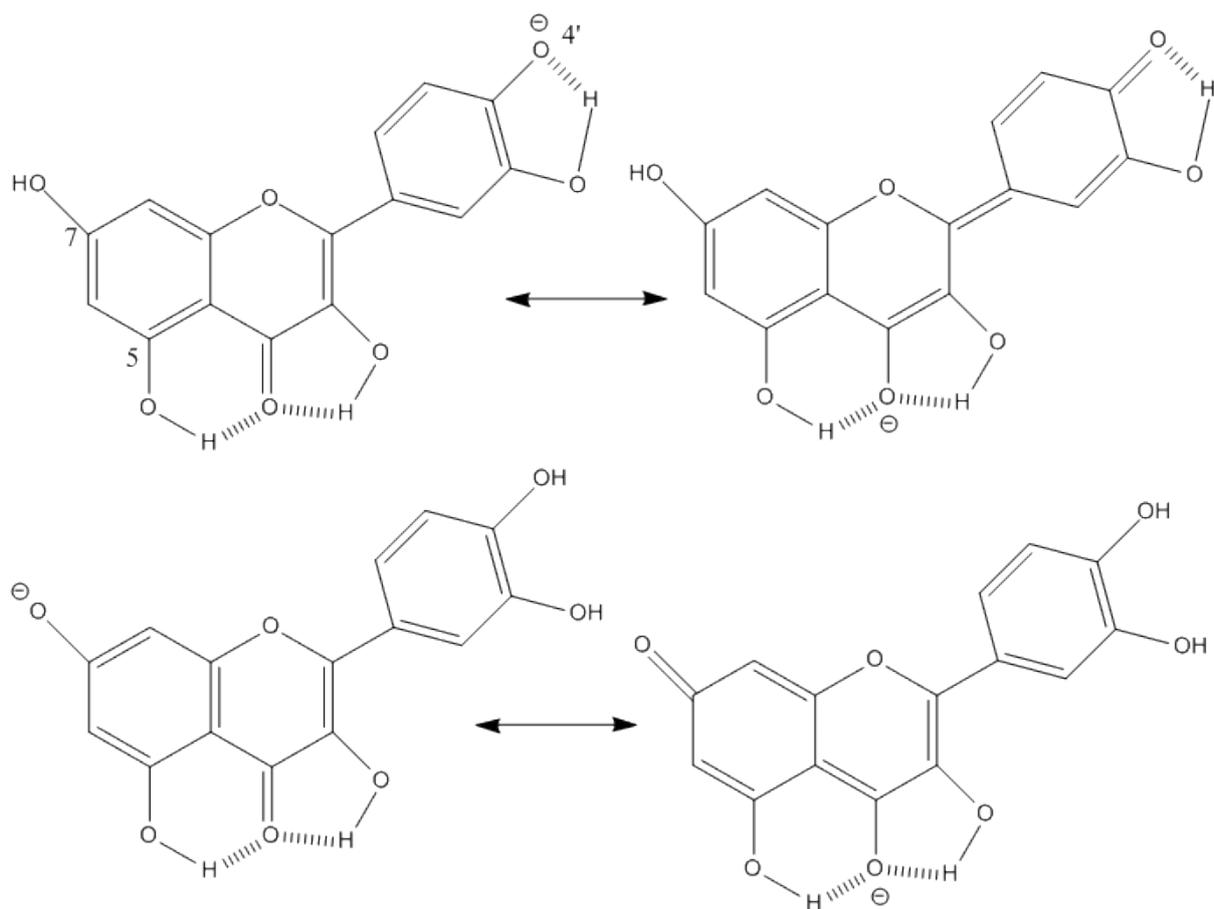


Figure 28: Monoanions de la quercétine.

En ce qui concerne les anthocyanes, la déprotonation de O4'-H ou de O7-H entraîne la formation des bases quinonoïdes neutres (2 formes tautomères) qui peuvent aussi subir une déprotonation du OH résiduel pour donner la base quinonoïde anionique (2 formes mésomères) (figure 29).

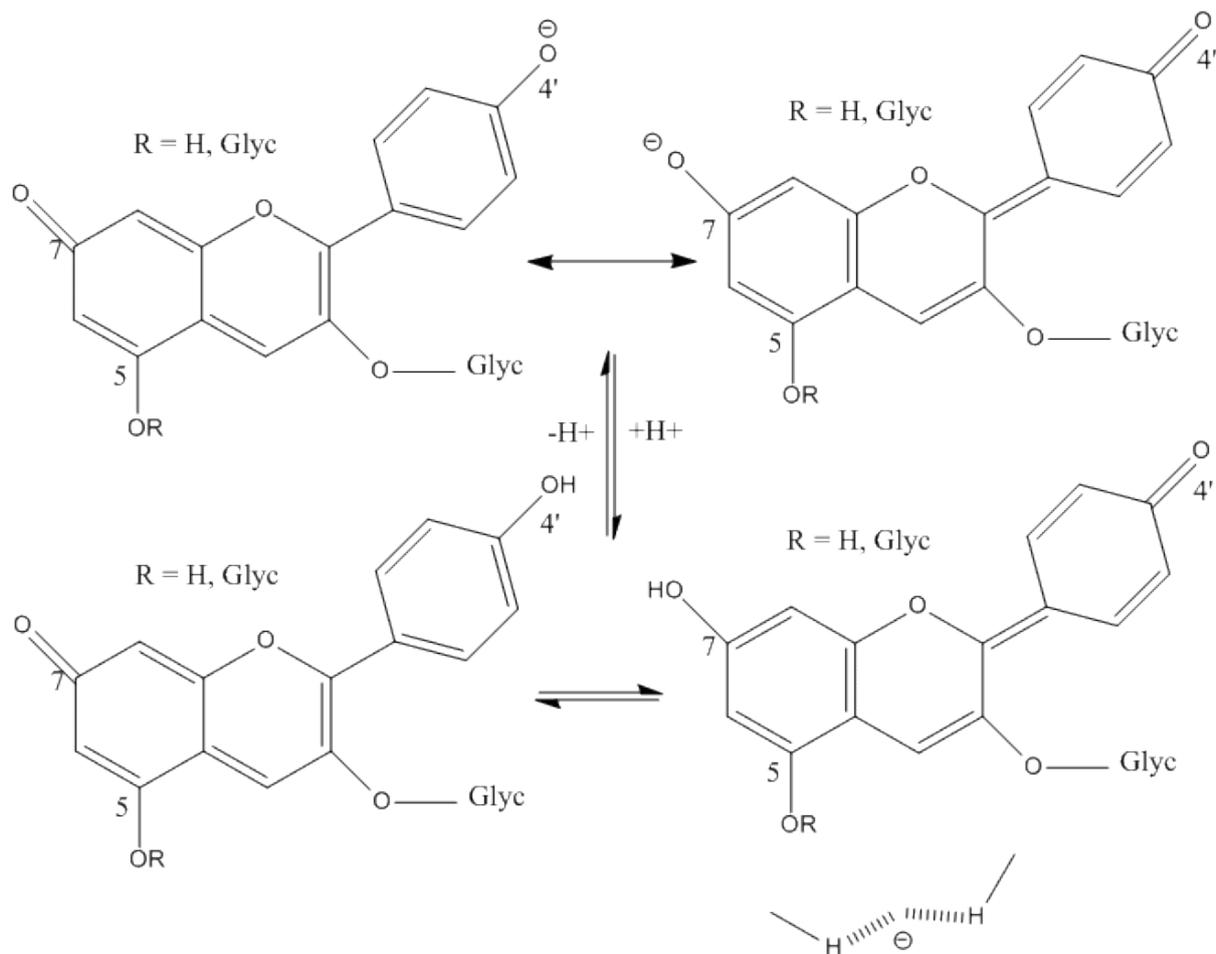


Figure 29: Bases quinonoïdes issues de la déprotonation d'un ion flavylium (anthocyane).

2.3. Complexation polyphénols-polyphénols.

Ces complexations sont à la base de l'un des mécanismes de stabilisation des couleurs naturelles des anthocyanes nommé copigmentation (Brouillard, *et al.*, 1989). Ce phénomène implique les formes colorées des anthocyanes d'une part, c'est-à-dire le cation flavylium et les bases quinonoïdes, ainsi que les polyphénols fortement polarisables d'autre part tels que les acides hydroxycinnamiques et les flavonols jouant le rôle de copigments. Ces derniers, en excès par rapport aux anthocyanes, entraînent une diminution du déplacement chimique des signaux du noyau flavylium (Mistry, *et al.*, 1991), il y'a « empilement » des cycles aromatiques du pigment et du copigment. Le cation flavylium, plan et très polarisable, d'une anthocyane donné a plus d'affinité pour un copigment donné que la forme hémiacétal peu polarisable, l'équilibre entre les deux formes est donc déplacé au profit du premier. De même, pour une anthocyane donnée, la quercétine et ses dérivés sont

de meilleurs copigments (Alluis & Dangles, 2001) qu'un analogue à cycle C saturé tel que la catéchine (Dangles & Brouillard, 1992).

2.4. Nucléophilie.

Le cycle A de la catéchine et des autres flavanols présente 2 centres C6 et C8 fortement nucléophiles car situés en *ortho* et en *para* de 3 groupements OH ou OR à effet +M. Le noyau A est également activé par le groupement carboné saturé en C4. Cette nucléophilie autorise des réactions de substitutions électrophiles aromatiques qui peuvent intervenir lors de la maturation des vins rouges. Les électrophiles en jeu sont notamment le cation flavylum des anthocyanes et l'éthanal produit par autoxydation de l'éthanol (figure 30) (Es-Safi, *et al.*, 1999).

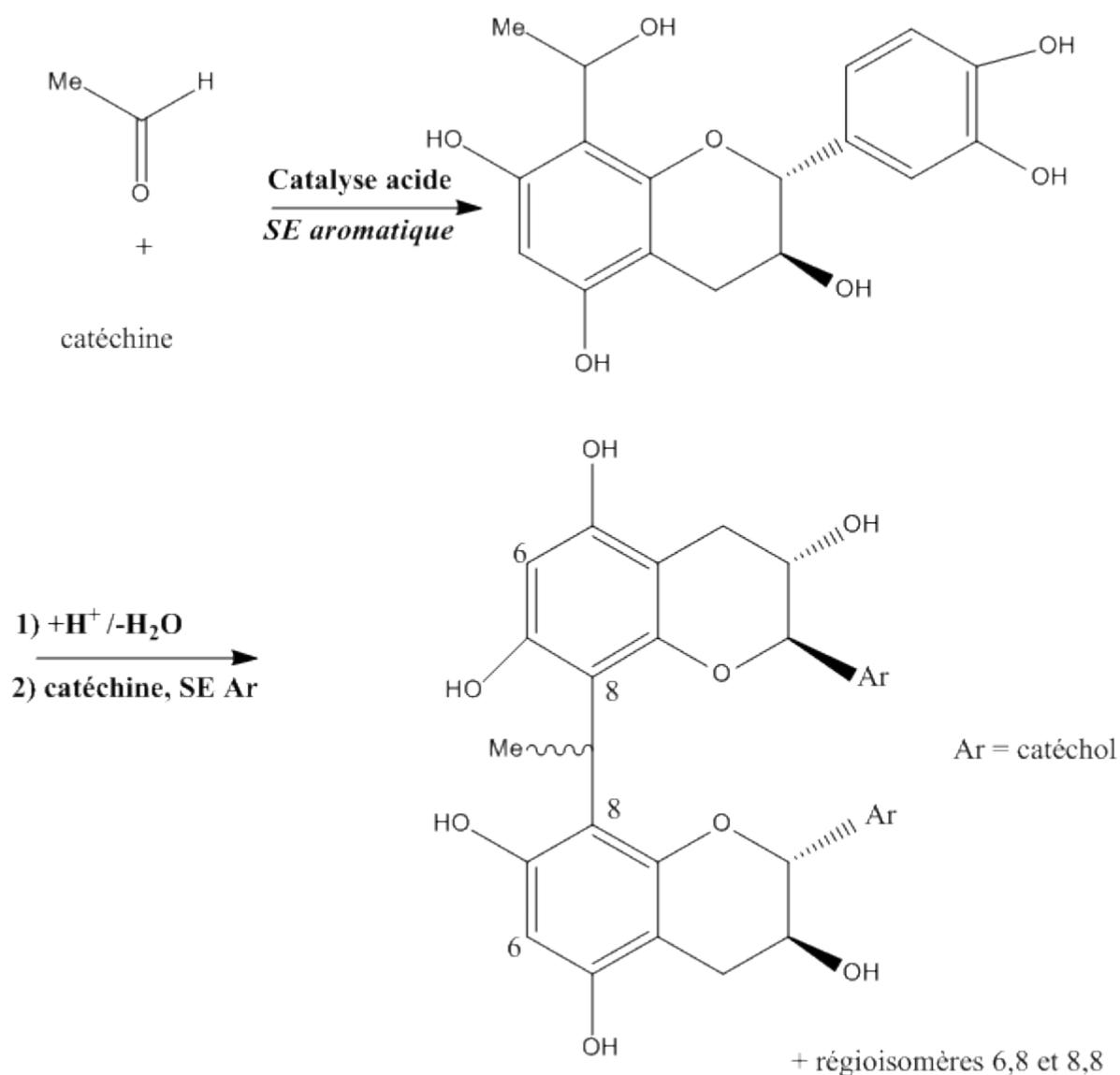


Figure 30: Premières étapes de la copolymérisation de la catéchine et de l'éthanal.

2.5. Electrophilie des anthocyanes.

Le caractère électrophile est une propriété particulière des anthocyanes due à l'hétérocycle pyrylium. La forme flavylium des anthocyanes présente en effet deux centres électrophiles, les carbones C2 et C4, qui peuvent subir des réactions d'additions nucléophiles (addition 1,2 et 1,4). La molécule d'eau s'additionne préférentiellement en C2 (Brouillard & Dubois, 1977) et conduit à un hémiacétal (2 épimères), principale forme incolore des anthocyanes, en équilibre tautomérique avec des formes chalcones Z et E. Les nucléophiles tels que l'ion hydrogénosulfite (base conjuguée du dioxyde de soufre, typiquement utilisé comme agent antimicrobien et antibrunissement) s'additionne préférentiellement en C4 du noyau flavylium (Berke, *et al.*, 1998). Il en est de même dans le cas d'autres nucléophiles carbonés qui peuvent apparaître dans le vin du fait du métabolisme microbien. Notons que les additions nucléophiles en C4, avec cyclisation éventuelle impliquant O-5H, conduisent à des intermédiaires flavènes dont l'autoxydation est très favorisée puisqu'elle permet la ré-aromatisation de l'hétérocycle.

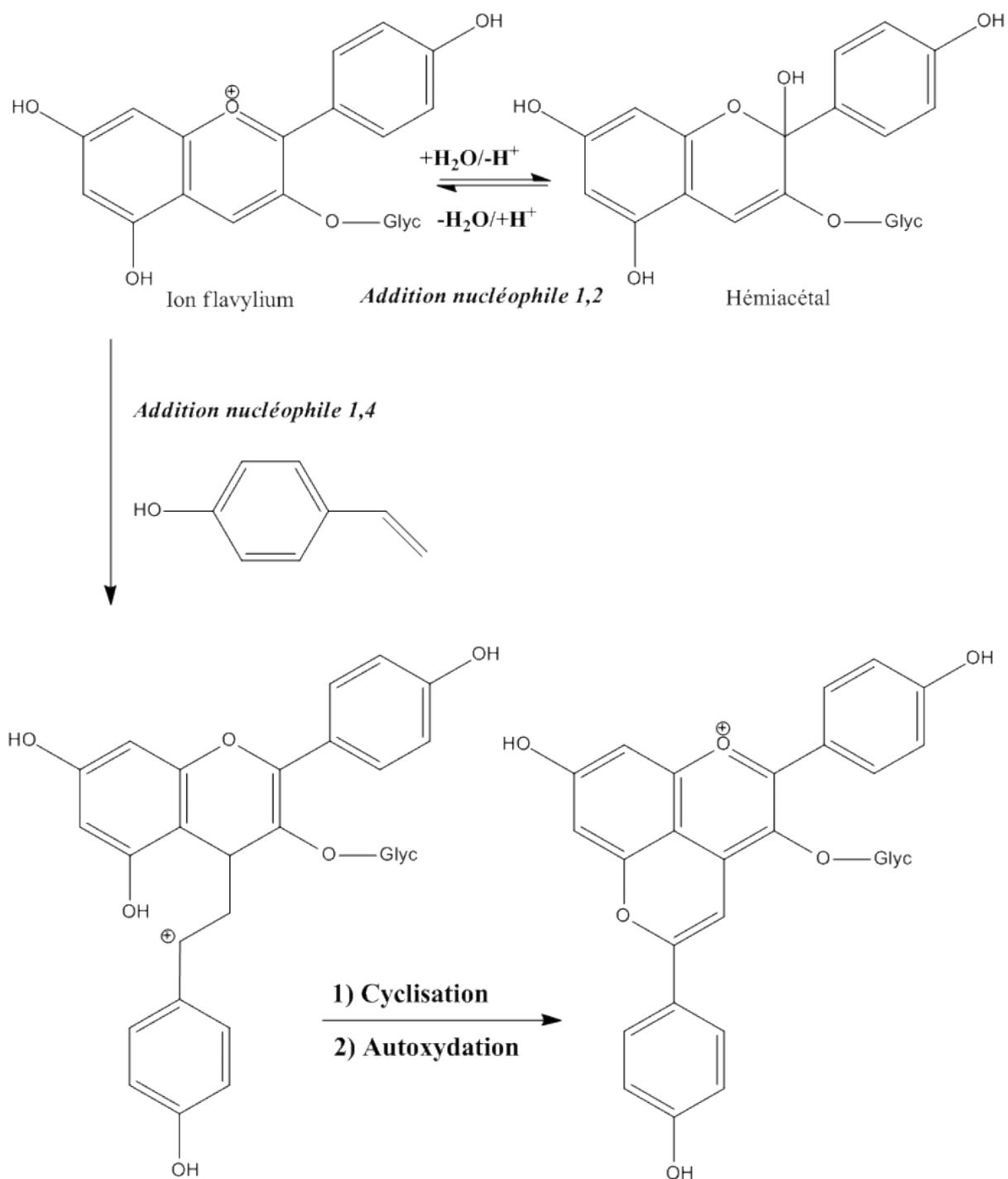


Figure 31: Réactivité électrophile des anthocyanes (ion flavylum).

3. Stress oxydatif et propriétés anti-oxydantes des polyphénols du vin rouge.

3.1. Généralités sur les espèces oxygénées activées (EOA) et le stress oxydatif.

3.1.1. Origine et rôles des espèces oxygénées activées (EOA).

La chaîne respiratoire mitochondriale joue un rôle capital dans la cellule en fournissant à celle-ci une source d'énergie essentielle que sont les molécules d'ATP (Adénosine TriPhosphate). Dans les conditions physiologiques, environ 0.4 à 4% d'électrons s'échappent lors de cette production et réagissent directement avec l'oxygène dissous dans le cytoplasme pour donner naissance à des espèces oxygénées activées ou EOA. Les EOA sont des atomes, ions ou molécules contenant un ou plusieurs électrons non appariés rendant le composé extrêmement réactif. Ce dernier cherche à acquérir ou donner un électron afin de devenir plus stable et attaque d'autres molécules non radicales. Les EOA peuvent être soit des radicaux libres comme l'anion superoxyde ou le radical hydroxyle soit des molécules comme le peroxyde d'hydrogène ou l'oxygène singulet. Dans cette chimie particulière, les métaux comme Fe^{2+} et Cu^{2+} jouent un rôle de catalyseur dans la formation du radical hydroxyle (Delattre, *et al.*, 2005).

Les EOA, selon leur concentration, peuvent avoir un rôle physiologique ou un effet toxique. Dans des conditions normales, celles-ci sont générées en faibles quantités et ont un rôle de messagers secondaires pouvant réguler les phénomènes d'apoptoses ou activer des facteurs de transcriptions. Citons le monoxyde d'azote radicalaire ou $NO\cdot$, cette molécule labile très diffusible peut réguler de nombreuses fonctions physiologiques tel que le tonus vasculaire, le fonctionnement rénal et la neurotransmission. Les EOA sont par ailleurs, en étant libérées au sein du système phagocytaire, très utiles pour la défense de l'organisme et la destruction des agresseurs.

Formées en trop grandes quantités, les EOA deviennent « pathologiques » en activant les gènes codant l'expression de cytokines pro-inflammatoires ou de protéines d'adhésions. Leur nature instable leur conférant une grande réactivité vis-à-vis de nombreux substrats biologiques peut entraîner des modifications oxydatives

délétères potentiellement impliquées dans l'apparition de pathologies aiguës ou chroniques.

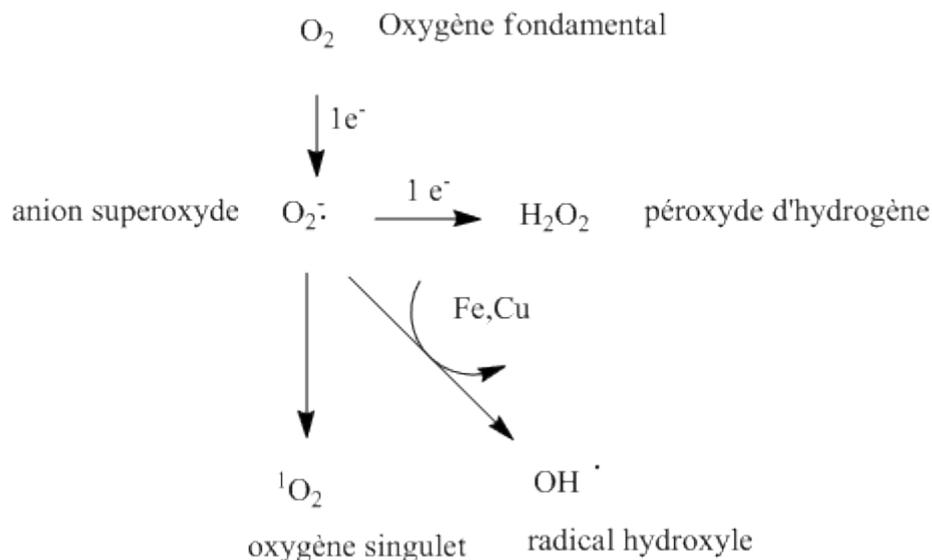


Figure 32: Aperçu des différentes espèces oxygénées activées (EOA).

3.1.2. Stress oxydant et facteurs favorisant.

Dans les conditions physiologiques, la production des EOA est maîtrisée par les systèmes de défense de notre organisme, la balance anti-oxydants/pro-oxydants est en équilibre. Le stress oxydant résulte d'une situation où l'organisme ne peut contrôler la présence toxique des radicaux oxygénés. Comme le montre le tableau suivant, le stress oxydant peut avoir différentes origines, endogènes ou exogènes.

Mode de vie	Environnement	Mécanismes biochimiques
Tabagisme	Pollution	Inflammation
Alcool	Ozone	Intervention chirurgicale (transplantation...)
Faible consommation de fruits et légumes	Amiante	Surcharge en fer
Médicaments	Radiations	Biosynthèse de prostaglandines
Exposition au soleil	Contact avec des substances cancérogènes	Altération de la fonction endothéliale
Exercice physique intense ou mal géré		Altération mitochondriale

Tableau 6: Sources de stress oxydant endogènes ou exogènes. (Haleng, et al., 2007)

3.1.3. Principales cibles biologiques des EOA.

Lorsque la cellule est confrontée à un excès de radicaux libres, tous les principaux organites sont susceptibles de subir des dommages oxydatifs, cependant, 4 sites sont des cibles privilégiées : l'acide désoxyribonucléique (ADN), les protéines, les lipides membranaires et les lipoprotéines.

L'ADN est une cible privilégiée des EOA. Les oxydations de l'ADN sont un risque direct pour la stabilité du génome, citons la guanine qui peut réagir avec le radical hydroxyle pour former la 8-hydroxy-2'-déoxyguanosine qui, au lieu de s'apparier avec la cytosine, s'associera avec l'adénine entraînant des mutations au sein de l'ADN et des potentielles altérations du message génétique. Les lésions oxydatives de l'ADN peuvent être efficacement réparées par excision de base ou par excision de nucléotides, en revanche, si les niveaux d'EOA augmentent au-delà de la capacité des défenses anti-oxydantes, la capacité de réparation de l'ADN des cellules peut être submergée, conduisant à l'accumulation de produits oxydatifs de l'ADN et à la formation de mutations, de cassures double brin de l'ADN et d'anomalies chromosomiques pouvant prendre place dans un processus de cancérogénèse.

Concernant les protéines, les acides aminés qui les composent réagissent différemment vis-à-vis des EOA. Les plus réactifs sont l'histidine, le tryptophane, la proline, la cystéine et la tyrosine. L'attaque radicalaire de ces acides aminés provoquera l'oxydation de certains résidus entraînant des dommages irréparables comme des modifications fonctionnelles importantes (perte d'activité enzymatique, non reconnaissance d'un ligand par un récepteur...).

Les lipides membranaires sont aussi des cibles de choix pour le radical hydroxyle qui peut arracher un hydrogène sur les carbones situés entre deux doubles liaisons des acides gras poly-insaturés (AGPI) : ceci est la phase d'initiation. Le radical lipidique réagit avec une molécule d'oxygène pour former un radical peroxyde, assez réactif pour arracher un hydrogène à un AGPI voisin. Etant donné l'arrangement spatial des structures membranaires (bicouches) et la réactivité des radicaux peroxydes formés, on entre alors dans une phase de propagation et la réaction en chaîne ainsi générée peut aboutir à une altération de la fluidité membranaire conduisant à la mort cellulaire (figure 33). D'autre part, les peroxydations des structures membranaires (acide arachidonique par exemple) peuvent déclencher la formation d'une série de

composés tels que les prostaglandines, les tromboxanes ou les leucotriènes qui sont des substances pro-inflammatoires. Il est à noter qu'une oxydation des acides gras saturés (AGS) est possible bien que beaucoup plus rare pour des raisons structurales, ces derniers sont en effet nettement moins oxydables que les AGPI (environ 1000 fois moins réactifs).

Les lipoprotéines circulantes peuvent être oxydés par une attaque radicalaire et aboutir à la formation de LDL oxydés captés par des récepteurs spécifiques des macrophages. Ces macrophages se transforment petit à petit en cellules spumeuses qui prennent part aux premières phases de l'athérosclérose. De plus, ces LDL oxydés sont immunogènes et les immuns complexes peuvent engendrer la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires suite à l'activation de la voie classique du complément (Nakajima, *et al.*, 2006).

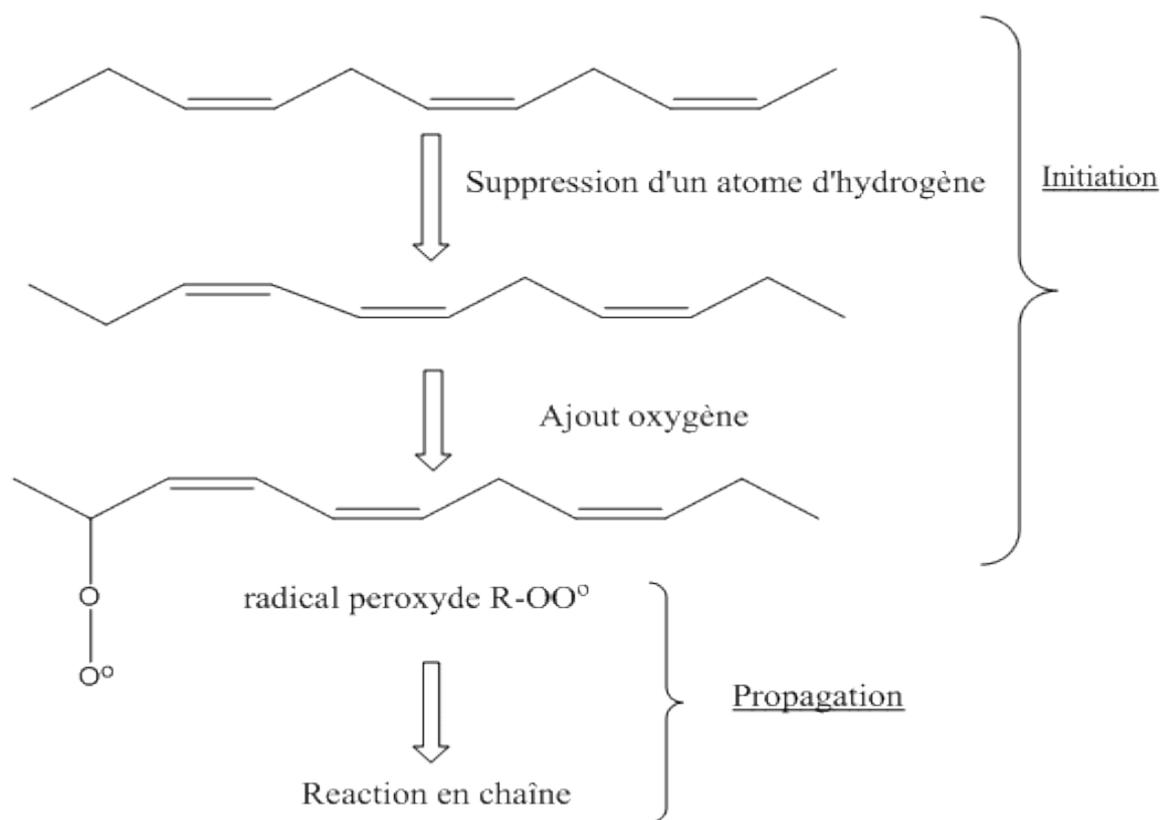


Figure 33: La peroxydation lipidique.

3.1.4. Les défenses anti-oxydantes.

L'organisme peut se protéger des effets délétères des EOA grâce à deux sources d'anti-oxydants. L'une est endogène, composée d'enzymes (les

superoxydes dismutases, les glutathions peroxydases, la catalase) de protéines (ferritine, transferrine, céruléoplasmine, albumine) et de système de réparation des dommages oxydatifs comme des endonucléases. L'autre est exogène et provient de l'alimentation.

3.1.4.1. Les systèmes enzymatiques de défenses

Les superoxydes dismutases (SOD) sont des métalloprotéines qui représentent la première ligne de défense contre le stress oxydant en assurant l'élimination de l'anion superoxyde par une réaction de dismutation qui transforme ce dernier en peroxyde d'hydrogène et en oxygène. On décrit chez l'homme 3 isoenzymes : la Cu/Zn-SOD1 cytosolique, la Mn-SOD2 mitochondriale et la Cu/Zn-SOD3, cette dernière est sécrétée par les cellules musculaires lisses et constitue un système antioxydant majeur de la paroi artérielle, son expression et sa sécrétion sont augmentées par les facteurs vasoactifs (histamine, endothéline 1, angiotensine II).

Les glutathion peroxydases (GPxs) sont des sélénoprotéines retrouvées sous 5 isoformes qui réduisent les peroxydes au dépens de son substrat spécifique, le glutathion réduit (GSH). Son rôle principal consiste en l'élimination des peroxydes lipidiques résultant de l'action du stress oxydant sur les AGPI. La GPx est effondrée en cas de carence majeure en sélénium, elle est donc un bon reflet de cette carence.

Le système thiorédoxine maintient le milieu intracellulaire dans un état plutôt réducteur et garde les protéines à l'état réduit. La thiorédoxine est régénérée par le NADPH sous l'action de la thiorédoxine réductase. Elle intervient aussi dans la dégradation des peroxydes lipidiques et du peroxyde d'hydrogène ainsi que dans la régénération du radical ascorbyl en acide ascorbique.

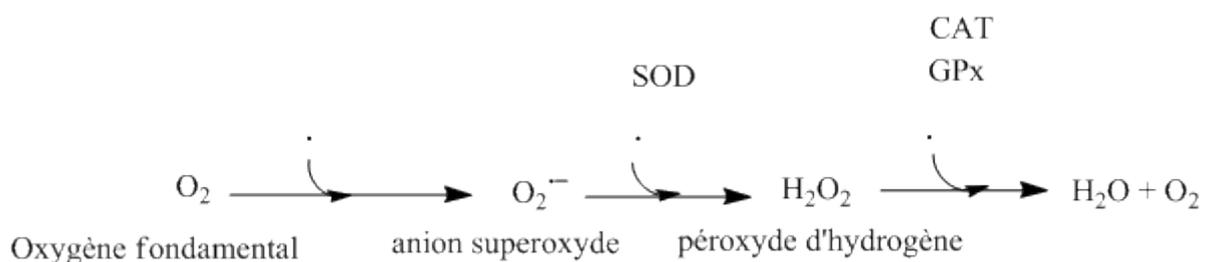


Figure 34: Réduction totale en eau et oxygène de l'anion superoxyde (Berké, et al., 2003).

3.1.4.2. Systèmes anti-oxydants non enzymatiques.

La vitamine C (acide ascorbique) est un excellent piègeur d'EOA (anion superoxyde ou radical hydroxyle) et participe également à l'inhibition de la peroxydation lipidique en régénérant la vitamine E à partir de la forme radicalaire issue de sa réaction avec les radicaux lipidiques. Ses autres fonctions sont par ailleurs multiple, la vitamine C contribue au bon fonctionnement du système immunitaire, à la synthèse du collagène et des globules rouges ainsi que dans la métabolisation du fer.

Parmi les autres piègeurs de radicaux libres, les vitamines E tiennent une place essentielle car ces dernières s'opposent efficacement aux peroxydations lipidiques. Le terme de vitamine E désigne en fait un ensemble d'isomères que sont les tocophérols (noyau chromanol et chaîne latérale saturée à 16 atomes de carbone) et les tocotriénols (trois doubles liaisons sur la chaîne latérale) (figure 35). Deux isomères sont particulièrement intéressants du point de vue biologique, il s'agit de l' α et du γ -tocophérol. Le caractère hydrophobe de la chaîne latérale (chaîne phytyle) de ces derniers leur permet de s'insérer au sein des membranes riches en AGPI où ils jouent un rôle protecteur en formant un radical tocophéryl avec les radicaux lipidiques peroxydes, empêchant ainsi la propagation de la peroxydation lipidique. Le noyau chromanol hydrophile affleurant à la surface de la membrane autorise la régénération de la vitamine E de sa forme radicalaire tocophéryl grâce à l'intervention d'un réducteur (antioxydant) cytoplasmique hydrosoluble qui est la vitamine C (figure 36).

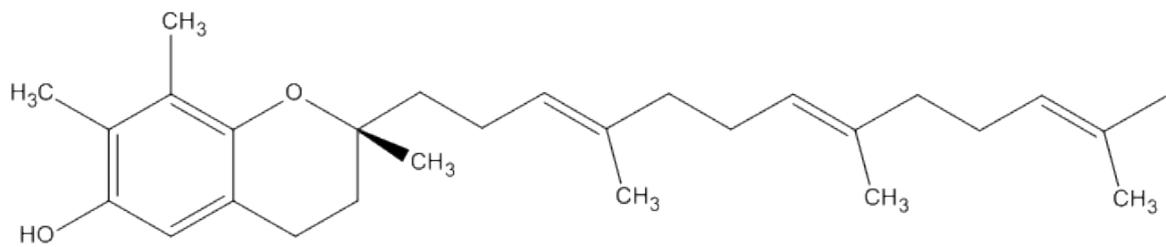
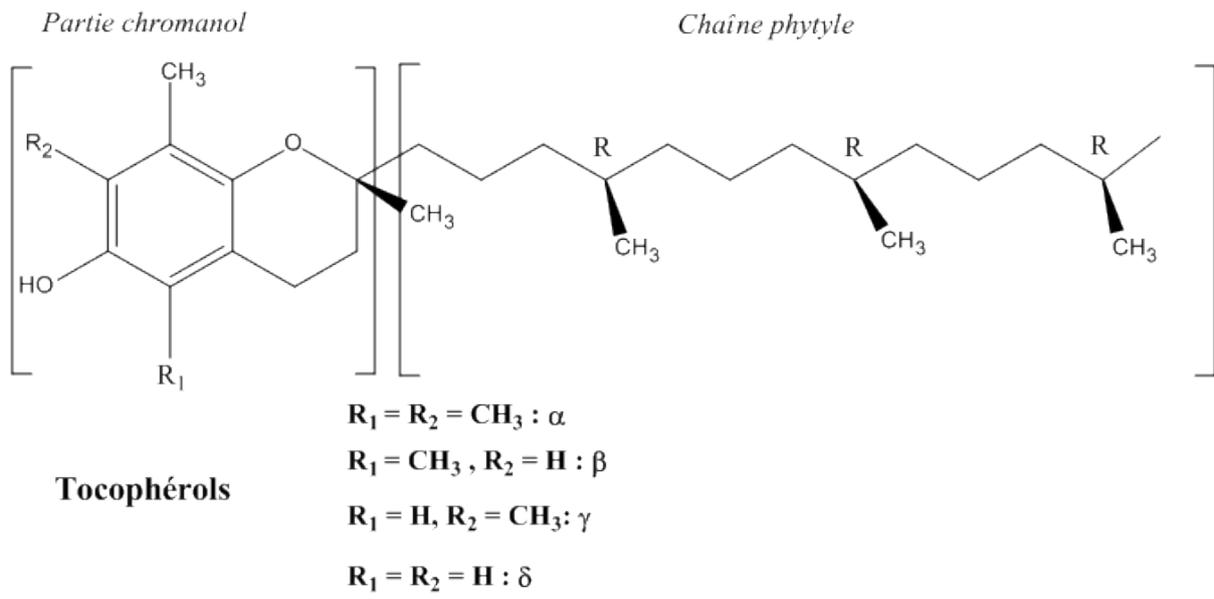


Figure 35: Les vitamines E. (Berké, et al., 2003)

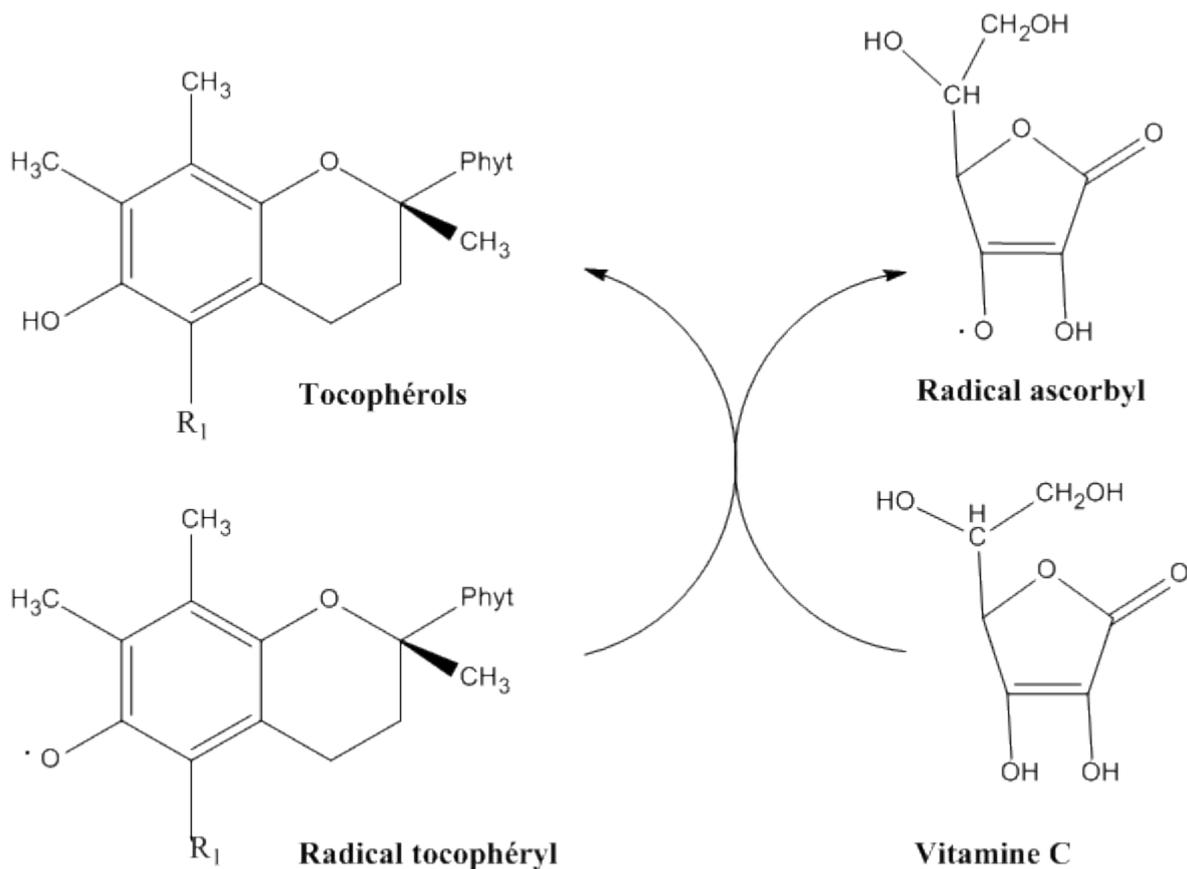


Figure 36: Régénération de la vitamine E par la vitamine C. (Berké, et al., 2003)

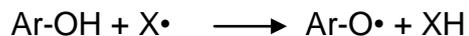
Le β -carotène, chef de file des caroténoïdes, également appelé provitamine A (car donnant naissance après hydrolyse hépatique à deux molécules de vitamine A) peut lui aussi lutter contre la peroxydation lipidique en captant les radicaux peroxydes et stopper ainsi la réaction en chaîne.

3.2. Polyphénols du vin et pouvoir anti-oxydants.

3.2.1. La capacité de piégeage des radicaux libres.

Le fort caractère réducteur et donneur d'atome d'hydrogène des polyphénols se manifeste par de faibles potentiels rédox des couples $\frac{\text{ArOH}}{\text{ArO}^\bullet}$ et des réactions rapides avec les espèces oxygénées réactives tels que les radicaux oxyl et peroxy dont la production excessive (stress oxydatif) est impliquée dans le développement de plusieurs pathologies chroniques. Cette capacité de réduction rapide des radicaux libres oxydants, appelée aussi « piégeage des radicaux libres » peut être

représentée sous la forme de l'équation simple qui suit où X^\bullet est une EOA et $Ar-O^\bullet$ est un radical aryloxy :



Pour un polyphénol donné, la valeur de E^0 diminue quand le pH s'élève en accord avec l'augmentation du pouvoir réducteur du composé, au gré des déprotonations successives des groupements OH. Une substitution 1,2-dihydroxy sur le noyau B (catéchol) est le déterminant majeur de l'activité anti-oxydante en accord avec la faible BDE des groupements OH correspondants (Rice-Evans, *et al.*, 1996). La formation de radicaux semi-quinones à partir d'un polyphénol à noyau catéchol est représentée sur la figure 37 à partir de l'acide caféique. L'extension de la délocalisation électronique à la chaîne carbonée insaturée dans le radical issu de la dissociation de O4-H rend la formation de ce dernier plus favorable (BDE plus faible) que celle du radical issu de la dissociation de O3-H.

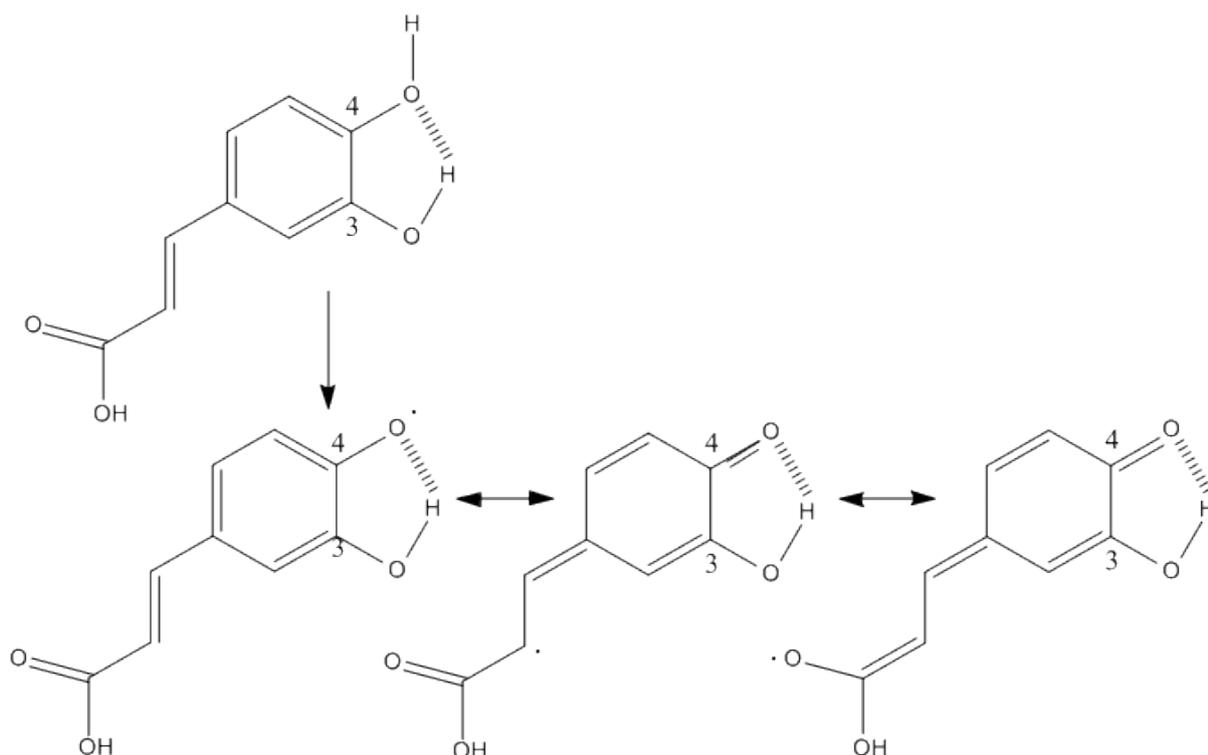


Figure 37: Réactions de transfert d'atome d'hydrogène depuis l'acide caféique.

3.2.2. L'oxydation.

L'oxydation des polyphénols est un phénomène sous-jacent à leur activité anti-oxydante et qui, d'autre part, conditionne la stabilité et l'évolution des polyphénols dans le vin et aussi chez l'homme après ingestion. Il peut s'agir d'oxydation enzymatique catalysée par la polyphénoloxydase (PPO) dans les conditions aérobies ou les peroxydases (POD) en présence de peroxyde d'hydrogène mais aussi d'oxydation non enzymatique par le dioxygène de l'air (autoxydation). Selon le système oxydant, on observe des successions de transferts mono-électroniques avec production d'intermédiaires radicalaires (radicaux aryloxy) ou par oxydation bi-électronique. Malgré la forte délocalisation de leurs électrons π , les radicaux aryloxy dérivés de polyphénols sont des intermédiaires très instables qui ne sont détectables que par des méthodes cinétiques rapides (Bors & Michel, 1999). Ils évoluent en effet rapidement par dismutation, dimérisation voire réaction avec le dioxygène, les deux premiers types de réactions semblent être des voies privilégiées (Bors & Michel, 1999). La dismutation requiert en général un noyau catéchol et s'accompagne alors de la formation d'une ortho-quinone avec régénération du polyphénol parent. Les ortho quinones sont elles-mêmes des intermédiaires peu stables et, du fait de leur caractère électrophiles, évoluent rapidement par diverses voies (figure 36) :

- Dimérisation, voire oligomérisation. Cette voie semble prédominante avec les ortho-quinones dérivés de l'acide caféique (Hapiot, *et al.*, 1996) et de la catéchine (Guyot, *et al.*, 1996). La réaction peut procéder par addition nucléophile d'une molécule de polyphénol sur l'ortho-quinone correspondante ou par recombinaison de radicaux aryloxy. L'oxydation de la catéchine par la polyphénoloxydase conduit à une variété de dimères de types biaryle et biaryléther et dont la liaison entre les unités catéchines implique le cycle A de l'une et le cycle B de l'autre (Guyot, *et al.*, 1996). Les deux mécanismes semblent être en compétition.
- Addition de solvant (eau, alcool). Dans le cas de la quercétine, l'addition du solvant se fait sur le C2 et entraîne une déconjugaison du cycle central (Dangles, *et al.*, 1999). Chez les anthocyanes, l'addition d'eau peut être suivie par l'élimination du cycle B avec formation de coumarines (Dangles, *et al.*, 2000).

- Addition nucléophile, avec de bons nucléophiles présents dans le milieu, tel que le résidu Cys du tripeptide glutathion, voire un autre polyphénol. (Sarni-Manchado, *et al.*, 1997). Par ailleurs, le couplage des quinones à des résidus nucléophiles de protéines et d'acides nucléiques est potentiellement un phénomène à répercussions biologique.

Par ailleurs, le caractère oxydant des ortho-quinones et des radicaux aryloxy permet la co-oxydation de substrats réducteurs tels que l'ion ascorbate (vitamine C) (Bors, *et al.*, 1995), le glutathion et d'autres phénols (Sarni, *et al.*, 1995). Ces réactions redox permettent l'oxydation indirecte de polyphénols qui, à la différence de l'acide caféique, ne sont pas des substrats de la polyphénoloxydase. Elles permettent également d'établir une interdépendance entre les activités de divers anti-oxydants en mélange.

Enfin signalons que les dimères et produits d'additions présentent aussi des noyaux phénoliques et peuvent donc également être oxydés. Au cours de l'action anti-oxydante, les cascades réactionnelles permettent la capture de plusieurs équivalents d'EOA par mole d'anti-oxydants, particulièrement lorsque ce dernier présente un noyau catéchol, ce qui est un avantage important pour l'activité anti-oxydante des polyphénols (Groupy, *et al.*, 2003).

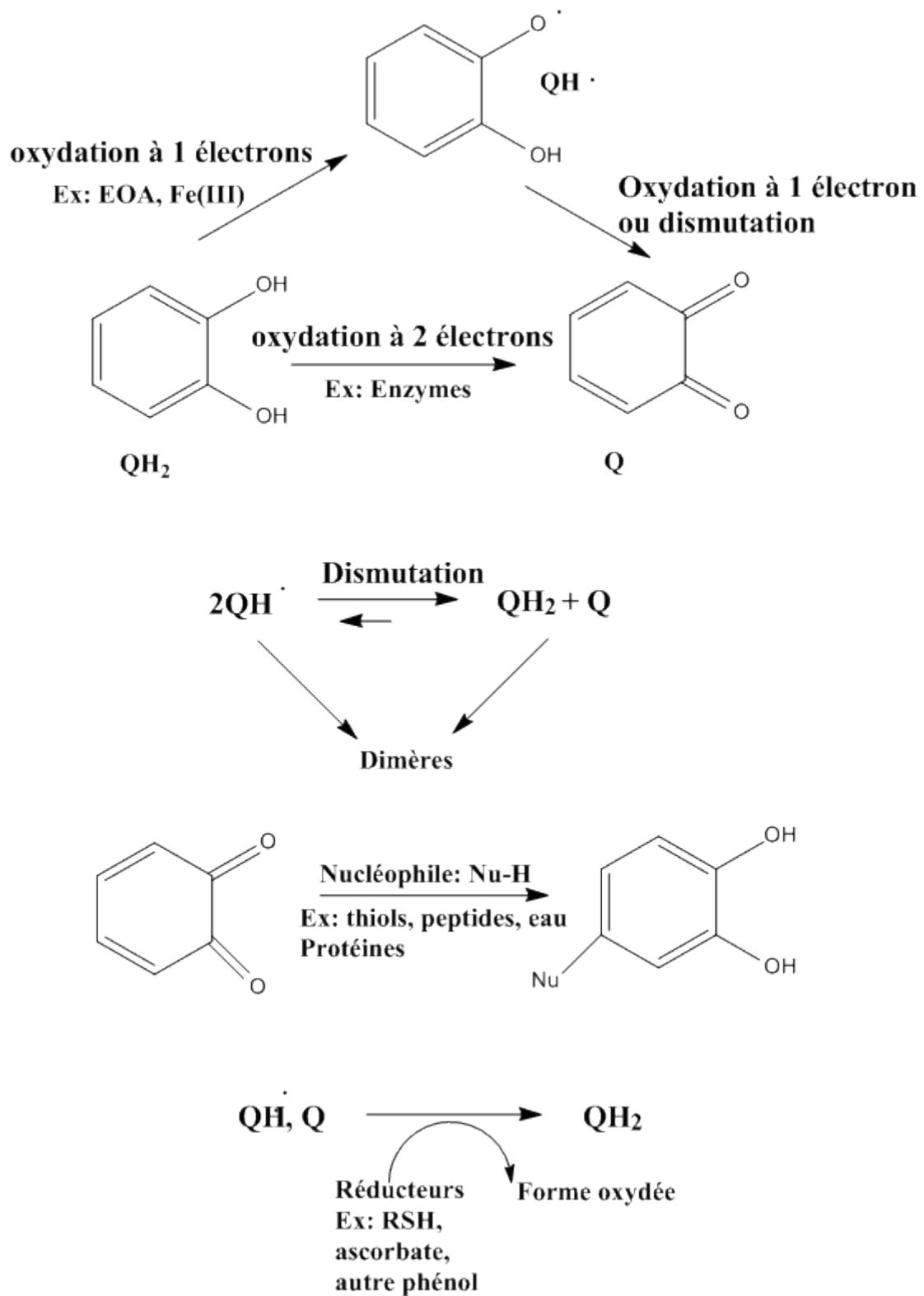


Figure 38: Oxydation des polyphénols présentant un noyau catéchol et principales réactions des formes oxydées.

3.2.3. La complexation métallique.

Les polyphénols présentant un noyau catéchol ou des groupements CO et OH coplanaires et proches peuvent former des chélates avec des ions métalliques à fortes charges positives tels que Al^{3+} et Fe^{3+} moyennant le remplacement d'un ou deux protons du polyphénol par l'ion métallique (figure 39). Cette complexation ne peut donc se réaliser en milieu trop acide (Cornard, *et al.*, 2001). La quercétine forme, par exemple, dès pH 4 des complexes stables avec Fe^{3+} par substitution des 2 protons du noyau catéchol. La stabilité des complexes métalliques formés peut être modulée par les substituants du noyau polyphénolique (Alluis & Dangles, 2001).

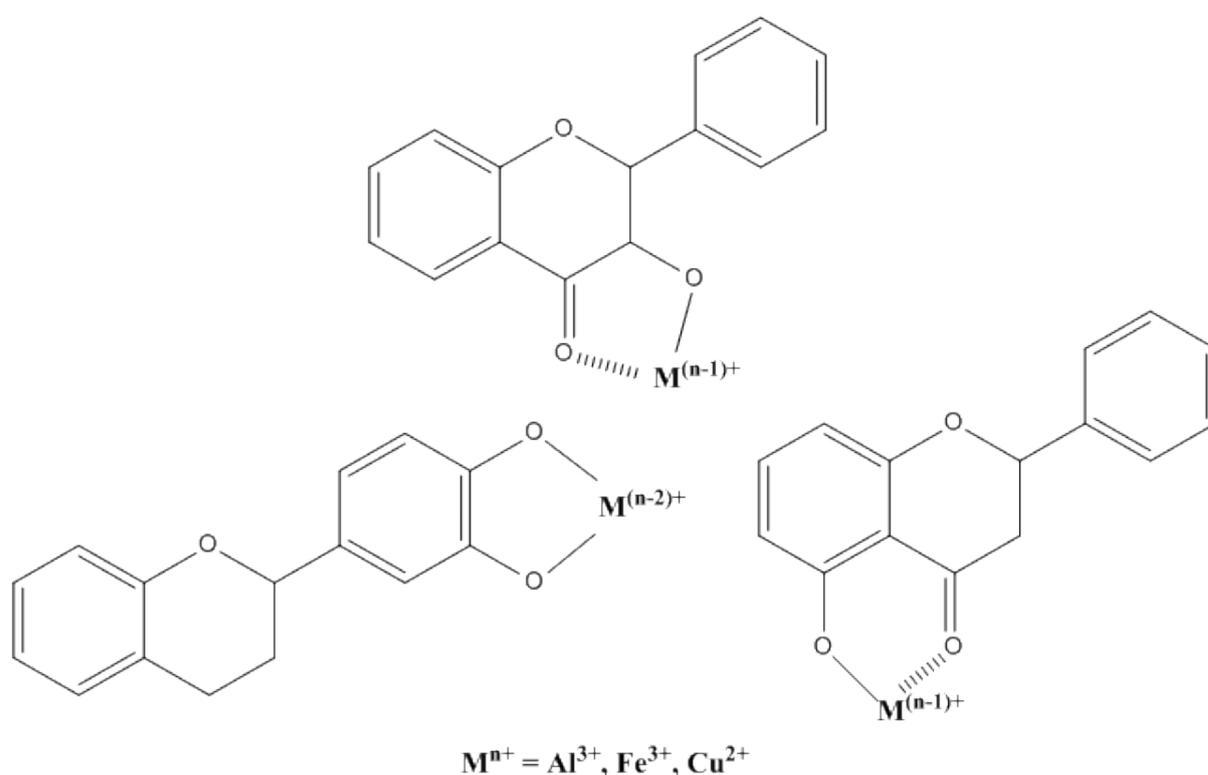
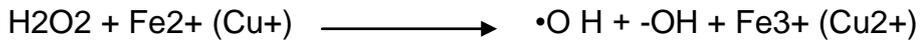


Figure 39: Complexation métallique des flavonoïdes.

La complexation métallique des polyphénols joue un rôle important à plusieurs titres :

- Dans l'expression des couleurs naturelles avec la complexation métallique des anthocyanes qui intervient à $pH > 3$ et induit de forts déplacements de la bande d'absorption du pigment dans le domaine visible.
- Dans les propriétés anti-oxydantes des polyphénols. La voie majeure de production des EOA se fait par réduction du dioxygène par $Fe(II)$ ou $Cu(I)$, ils

peuvent aussi être responsables de la production du radical OH• par la réduction de H₂O₂ lors de la réaction de Fenton (Heim, *et al.*, 2002) :



La formation de complexes stables et inertes bloquant l'ion métallique constitue un mécanisme d'action anti-oxydante. Dans le cas des flavonoïdes, il semblerait que l'importance de ce mécanisme dépende de la cible à protéger, il serait minime dans l'inhibition de la peroxydation des lipides en comparaison de l'activité antioxydante par capture des EOA (Van Acker *et al.*, 1998). En revanche, ce mécanisme serait dominant dans la protection vis-à-vis des coupures oxydantes des brins d'ADN (Sestili, *et al.*, 1998).

3.2.4. Complexation polyphénol-protéine.

Le noyau phénolique est une unité structurale favorable à de nombreuses interactions avec les protéines via notamment des interactions de van der Waals et des liaisons hydrogènes. Les polyphénols inhibent *in vitro* un grand nombre d'enzymes (Havsteen, 2002) mais la portée biologique de ces phénomènes d'inhibition enzymatique est étroitement dépendante des études de biodisponibilité. Il s'agit notamment de vérifier que l'interaction des formes biodisponibles (formes conjuguées avec la protéine cible) persiste aux concentrations physiologiques. Des effets cellulaires spécifiques sont de plus en plus évoqués, en plus des effets anti-oxydants, pour expliquer les effets nutritionnels si particuliers des polyphénols chez l'homme. L'inhibition des enzymes génératrices des radicaux libres dans les systèmes biologiques est un mécanisme important d'effet anti-oxydant des polyphénols. Les flavonoïdes sont les molécules les plus susceptibles d'être impliquées dans cet effet par formation de complexe inhibiteur-enzyme (et/ou par piégeage direct des EOA) Cette double action est bien mise en évidence dans le cas de la xanthine oxydase, enzyme du foie impliquée dans la maladie de la goutte. Cette dernière catalyse une réaction du catabolisme des purines, en transformant l'hypoxanthine en xanthine et la xanthine en acide urique (Dangles & Dufour, 2008). Cette enzyme est considérée comme une source biologique importante de radical superoxyde. Les flavones et flavonols se lient à la XO en compétition avec le substrat xanthine, ce qui inhibe la formation de l'acide urique. D'autre part, le flavanol (cycle C non plan) catéchine ne se lie pas à l'enzyme mais réduit efficacement le superoxyde.

Enfin, les flavones et flavonols ayant un cycle B de type catéchol comme la quercétine combinent les deux mécanismes, à savoir formation d'un complexe inhibiteur-enzyme et réduction du superoxyde résiduel qui s'est échappé de la cavité enzymatique. De nombreux flavonoïdes sont aussi de puissants inhibiteurs des métalloenzymes lipoxigénase, myéloperoxydase et NADPH oxydase (Dangles & Dufour, 2008). Par ailleurs, une piste particulièrement intéressante quant à un mécanisme possible d'action anticancérogène serait l'inhibition par les flavonoïdes de diverses kinases, catalysant la phosphorylation de multiples substrats, impliquées notamment dans la régulation de la multiplication cellulaire et de l'apoptose (Gamet-Payrastre *et al.*, 1999).

D'autre part, Il est a noté que les protéines salivaires, riches en résidus proline, offrent un grand nombre de sites de complexation possibles avec les polyphénols, l'aggrégation des complexes entre eux entraîne une précipitation et représente une étape clé dans le développement de la sensation d'astringence.

3.3. Places des radicaux libres dans les cancers.

3.3.1. Agents carcinogènes et stress oxydant.

L'exposition à des facteurs de risques dits carcinogènes, qu'elle soit due à des comportements à risques, à une pollution importante ou à la vie professionnelle, a un rôle majeur dans l'histoire naturelle du cancer. Or, dans la quasi-totalité, ces facteurs carcinogènes créant des lésions géniques sont des générateurs directs ou indirects de radicaux libres et d'espèces oxygénées activées. L'air pollué apporte ainsi directement des espèces pro-oxydantes comme l'ozone (Diaz-Llera *et al.*, 2002), de même les rayonnements ionisants comme les rayons X ou gamma peuvent directement générer des radicaux hydroxyles par radiolyse alors que les rayonnements ultra-violets A génèrent des radicaux superoxydes et de l'oxygène singulet par photoactivation de molécules présentes dans la peau (Pathak *et al.*, 1969). La fumée de tabac apporte directement des radicaux oxygénés dans les poumons et en libère aussi par des mécanismes indirects (Murphy *et al.*, 1992), au total, la fumée de cigarette contiendrait plus de 200 composés pro-oxydants.

3.3.2. Mécanismes de l'effet carcinogène du stress oxydant : attaque de l'ADN et mutations.

Les radicaux libres et surtout le radical hydroxyle, considéré comme l'espèce réactive la plus impliquée dans les phénomènes d'oxydations endogènes de l'ADN cellulaire, altèrent ce dernier soit en l'oxydant soit en formant des adduits à celui-ci. On dénombre au moins 5 classes de dégâts oxydatifs médiés par le radical hydroxyle (Cadet *et al.*, 1995) :

- Les bases oxydées ;
- Les sites abasiques ;
- Les adduits intra-caténaux ;
- Les cassures de brins ;
- Les pontages ADN-protéines.

Les lésions oxydatives touchent de nombreuses bases mais la lésion la mieux connue est de loin la 8-oxo-7,8-déshydroguanine (8oxodG), la guanine étant une cible privilégiée des réactions d'oxydations. Cette base oxydée est aujourd'hui considérée comme un bon marqueur du stress oxydant. Ces modifications de bases par oxydations sont des lésions courantes de l'ADN induites de manière physiologique par le métabolisme aérobie, on estime en effet que l'ADN nucléaire subirait environ 1000 attaques oxydatives par jour. Il existe heureusement des mécanismes de réparations des bases endommagées de l'ADN chargés de maintenir l'intégrité de l'information génétique. On peut ici citer les 5 principaux systèmes (Friedberg, 1995) que sont le système de réparation par excision de bases, le système de réparation des mésappariements, le système de réparation par excision de nucléotides, la réparation des cassures double brin non homologue et la réparation par recombinaison homologue. Les mutations interviennent lorsqu'un excès de lésions est observé ou qu'une déficience de réparation laisse persister ces anomalies et de nombreuses évidences suggèrent que l'attaque de l'ADN joue un rôle essentiel dans la phase d'initiation de la cancérogénèse.

3.3.3. Vin et dommages oxydatifs.

Le métabolisme de l'éthanol contenu dans le vin peut être à l'origine d'une production de radicaux libres ainsi que d'une réduction des niveaux de glutathion,

composé ayant un rôle majeur dans la protection cellulaire contre le stress oxydatif (Videla & Valenzuela, 1987). La question est de savoir si les polyphénols du vin peuvent contrecarrer les effets oxydatifs de l'alcool d'une part et éventuellement de fournir des bénéfices additionnels sur le stress et les dommages oxydatifs d'autre part. Les mécanismes par lesquels les composants du vin (polyphénols et éthanol) peuvent interagir avec les EOA sont représentés en figure 40. Les EOA touchent les lipides, l'ADN et les protéines. On sait que l'oxydation des lipoprotéines LDL est un marqueur important dans l'athérosclérose et le développement de la maladie coronarienne (Witzum, 1994). En outre, les dommages oxydatifs de l'ADN sont considérés comme une étape cruciale dans la cancérogénèse humaine (Cooke, *et al.*, 2003). L'éthanol augmente l'activité du CYP2E1, protéine produisant des EOA durant son cycle catalytique, on observe également une augmentation de la production de puissants EOA via la réaction de fenton qui met en jeu le Fe (Nagata, *et al.*, 2007). L'éthanol et les polyphénols peuvent tout les deux augmenter le taux de HDL, lipoprotéine jouant un rôle important en diminuant l'oxydation des phospholipides dans les LDL grâce à l'action conjuguée de l'ApoA1 et d'une enzyme, la paraoxonase1 (Ansell, *et al.*, 2005).

Comme nous l'avons vu précédemment, les polyphénols peuvent agir aussi bien comme piègeurs de radicaux libres que comme chélateurs de métaux. Au niveau de l'ADN, les polyphénols peuvent former un complexe ternaire (ADN-polyphénols-Cu²⁺) menant à l'apoptose.

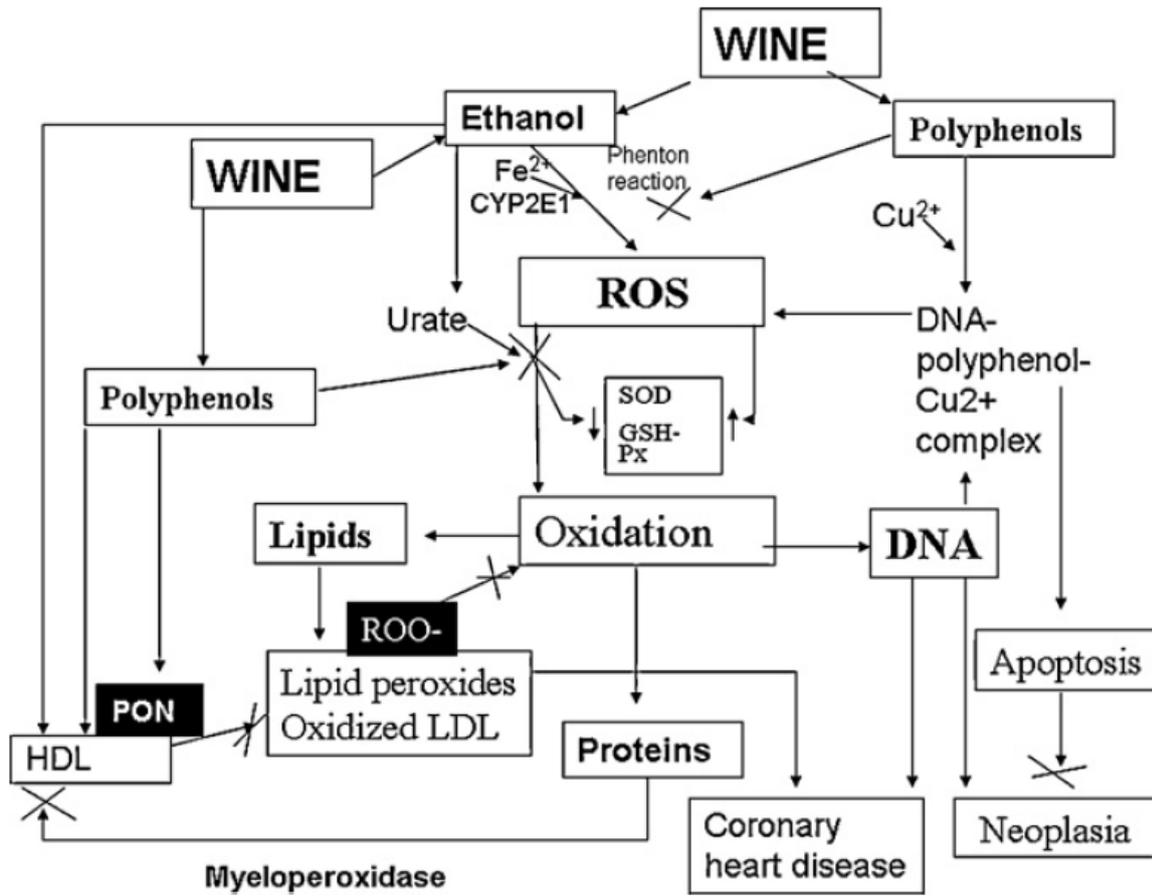


Figure 40: Mécanismes d'interactions des polyphénols et de l'éthanol avec les EOA.

TROISIEME PARTIE : Polyphénols du vin rouge et cancers.

1. Histoire naturelle des cancers.

1.1. Cancérogénèse.

Le cancer est une maladie génétique résultant de multiples altérations de l'ADN dans les cellules somatiques (une seule mutation ne suffit pas à elle seule à créer un cancer). Durant toute la vie cellulaire, notre ADN est en effet soumis à de multiples agressions. Dans la majeure partie des cas, ces modifications de l'ADN passent inaperçues car des mécanismes réparateurs efficaces corrigent ces défauts. Pourtant, dans de rares cas, une mutation peut atteindre et modifier la structure d'un gène clé codant un facteur qui règle le contrôle de la multiplication cellulaire. Dans ce cas, la cellule peut acquérir un avantage sélectif qui lui permettra de donner naissance à un premier clone de cellule anormale. Les cellules possédant un avantage sélectif ont une probabilité de subir et de sélectionner une seconde mutation plus importante. Dans ce cas, une seconde population sera générée, plus anormale que la première et se développant à ses dépens. On peut ainsi, par diverses étapes successives, accumuler plusieurs mutations, chacune d'entre elles permettant la sélection d'un clone de plus en plus malin pour finir par une cellule hautement cancéreuse.

La cancérogénèse est donc un processus dynamique, multi-étapes, pouvant durer plus de 20 ans dans certains cas, au cours duquel est observé une accumulation de plusieurs événements rares et une sélection progressive de cellules de plus en plus altérées (figure 41).

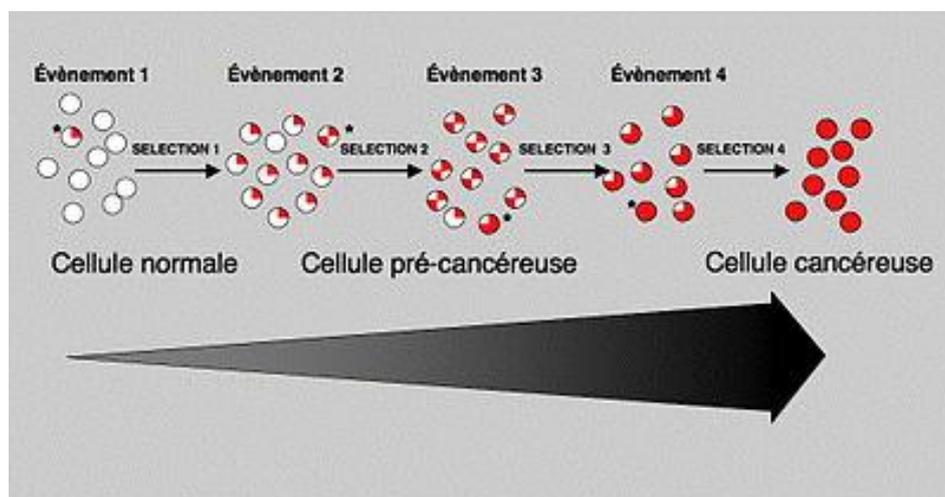


Figure 41: Altérations multiples et sélection de cellules cancéreuses.

Le modèle expérimental de cancérogenèse proposé en 1948 par Bérémbaum et Shubik est applicable à la plupart des cancers humains :

- *L'initiation* est une altération du génome d'une cellule normale, il y'a accumulation d'anomalies génétiques touchant des gènes impliqués dans le maintien de l'intégrité et des caractéristiques propres à la cellule. On peut citer les proto-oncogènes (les formes mutées de ces gènes sont appelés oncogènes) ainsi que les gènes suppresseurs de tumeurs. L'initiation est un phénomène rapide et irréversible, la cellule initiée devient alors immortelle et insensible aux signaux extérieurs. Toutes les cellules qui constituent une tumeur sont, au départ, issues d'une seule cellule qui s'est dérégulée.
- *La promotion* tumorale est un processus prolongé nécessitant une dérégulation du cycle cellulaire et une perte des mécanismes de réparation des mutations. Les cellules initiées vont se multiplier de manière autonome et former des lésions précancéreuses.
- *La progression* transforme les lésions précancéreuses en tumeurs, les cellules tumorales évoluent de manière instable tant sur le plan génétique que phénotypique. Ces tumeurs peuvent causer une compression des organes voisins, un envahissement et une destruction des tissus adjacents entraînant des perturbations physiologiques et mettent en place des mécanismes de néoangiogenèse afin d'assurer une irrigation sanguine aux cellules même au cœur de la tumeur. L'invasion métastatique est le dernier stade et correspond à la migration des cellules tumorales hors de leur localisation première via la circulation sanguine ou lymphatique.

1.2. Gènes touchés.

Nous avons évoqué plus haut que plusieurs mutations successives au sein d'une même cellule étaient nécessaires au processus de cancérogenèse. Il est en effet nécessaire que plusieurs gènes différents soient conjointement dérégulés (au moins 10 à 20 gènes) pour que la cellule se cancérisse, le cancer est donc une pathologie multigénique. Ces altérations se produisent de manières successives, chacune d'entre elles favorisant la suivante. Cette suite d'altérations n'est pas aléatoire et pour chaque type de cancer, on a pu mettre en évidence une certaine spécificité des gènes altérés ainsi qu'une chronologie particulière dans le

développement des évènements. Cette très grande diversité génétique est à la base de l'hétérogénéité de la pathologie cancéreuse.

En premier lieu, des mutations activent des proto-oncogènes existant dans le patrimoine normal de la cellule et régulant de manière positive la division et la croissance cellulaire, les formes mutés de ces gènes sont des oncogènes. L'acquisition d'oncogènes par une cellule normale est capable de rendre cette dernière cancéreuse par un gain de fonction. Ces mutations sont souvent dominantes et la conversion de proto-oncogène vers oncogène peut correspondre à des altérations quantitatives (expression exagérée) ou qualitatives (modifications structurales) survenant selon diverses modalités. Les facteurs de croissances (GF ou Growth Factors), les récepteurs de facteurs de croissances, les protéines de transduction du signal, les facteurs de transcriptions sont des exemples de molécules codées par les oncogènes (tableau 7).

Oncogènes	Fonction cellulaire	Anomalie	Type de tumeur
C-myc	Facteur de transcription		Cancer du sein
EGFR	Récepteur de facteur de croissance	Surexpression ou mutation activatrice	Nombreux carcinomes
Bcr-Abl	Tyrosine kinase	Translocation	Leucémie myéloïde chronique
K-ras	Intermédiaire de la signalisation	Mutation activatrice	Carcinomes colique, pancréatique, bronchique.
RET	Récepteur de facteur de croissance	Mutation activatrice	Carcinomes thyroïdiens

Tableau 7: Exemples d'oncogènes impliqués dans des cancers humains.

D'autre part, des mutations peuvent détruire un gène de contrôle négatif du fonctionnement cellulaire, ces gènes dit suppresseurs de tumeurs ou anti-oncogènes sont de véritables verrous protecteurs vis-à-vis de la transformation tumorale de la cellule. La délétion des gènes sur les 2 allèles est souvent nécessaire pour aboutir à une perte de fonction. On dénombre 3 familles d'anti-oncogènes :

- Les gènes impliqués dans le maintien de l'intégrité du génome cellulaire (surveillance et réparation), nommés « Caretakers ».
- Les gènes impliqués dans la prolifération et la survie cellulaire (cycle cellulaire, apoptose), ou « Gatekeepers » tel que le gène de la protéine p53 qui est un régulateur négatif de la division cellulaire et dont la délétion est retrouvée dans de nombreux cancers.
- Les gènes impliqués dans les modifications de l'environnement tumoral (stroma) dits « Landscaper ».

Les altérations de la structure ou de l'expression des gènes impliqués dans la cancérogenèse (oncogènes et gènes suppresseurs de tumeurs) peuvent être en rapport avec des agressions génotoxiques par des carcinogènes exogènes (aériens ou alimentaires) ou endogènes (radicaux libres), des radiations ionisantes, des agressions virales (rares chez l'homme) ou encore des erreurs "spontanées" et non réparées de réplication de l'ADN (figure 42).

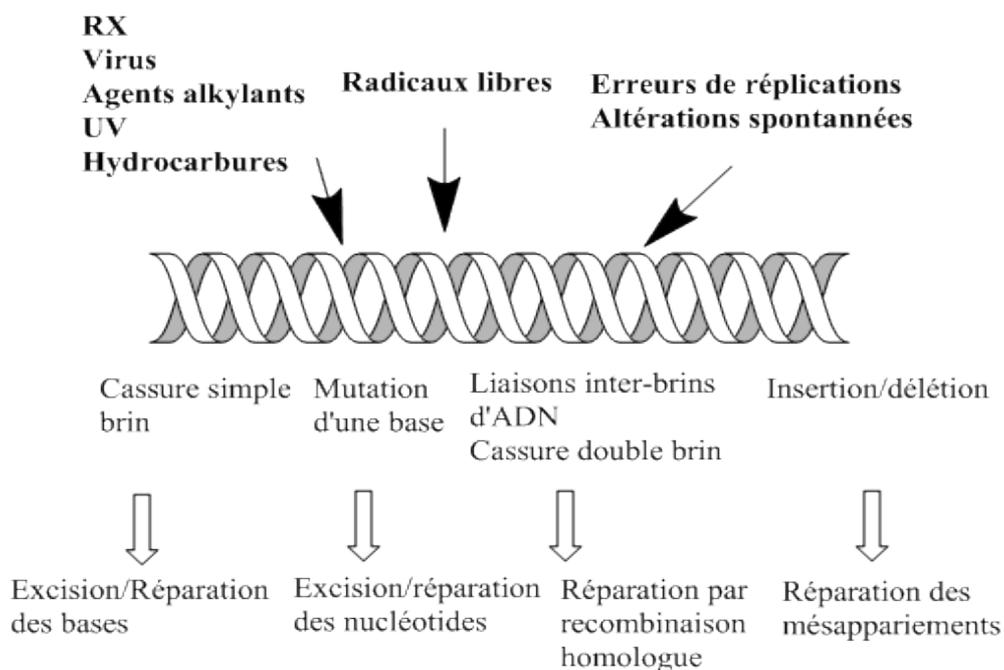


Figure 42: Lésions de l'ADN et modes de réparations possibles.

1.3. Les différentes mutations.

1.3.1. Mutations génétiques et oncogènes.

La conversion proto-oncogène vers oncogène peut se faire selon 4 mécanismes : la mutation ponctuelle activatrice, l'amplification génique, la recombinaison chromosomique et l'infection virale (plus rare) (figure 43).

En premier lieu, évoquons la mutation ponctuelle activatrice (substitution, insertion, délétion). Nous pouvons citer comme exemple le gène RET, codant pour un récepteur transmembranaire à activité tyrosine kinase pouvant être muté en des points précis avec pour effet une activation permanente de ce récepteur et une stimulation de la prolifération cellulaire. Cliniquement, une mutation activatrice du gène RET a pour conséquence un risque de cancer médullaire de la thyroïde de 100% chez la personne porteuse. Un autre exemple de proto-oncogène activé par ce mécanisme est le récepteur du facteur de croissance EGF (EGF-R ou Her1): la délétion du site de liaison au ligand de ce récepteur aboutit à son activation constitutive car non régulé par la liaison au ligand.

L'amplification génique est aussi un mécanisme de la conversion de proto-oncogènes vers oncogènes. Il s'agit d'une duplication d'un gène en plusieurs exemplaires, aboutissant à une surexpression de ce dernier. Par exemple, le gène Her2 (appartenant à la famille des récepteurs transmembranaires à l'EGF) est amplifié dans 25 à 30% des cancers du sein et cette amplification, recherchée systématiquement dans toute tumeur du sein opérée, représente un marqueur thérapeutique et un marqueur de mauvais pronostic.

La recombinaison chromosomique peut aboutir à la surexpression d'un gène par juxtaposition de ce gène près d'une région activatrice de la transcription (promoteur). C'est le cas, par exemple, du réarrangement chromosomique t(8,14) observé dans les lymphomes de Burkitt qui place le gène Myc (facteur de transcription) à proximité de régions régulant l'expression des gènes d'immunoglobulines (IgH). Ce réarrangement aboutit à une forte expression du gène Myc favorisant la prolifération cellulaire. Une autre conséquence possible des réarrangements chromosomiques est

la formation d'un gène hybride aboutissant à une protéine hybride (protéine de fusion) hyperactive. C'est le cas de la translocation t(9,22), observée dans la leucémie myéloïde chronique, qui aboutit à la protéine de fusion Bcr-Abl ayant une forte activité tyrosine kinase comparée à la protéine Abl seule qui est un intermédiaire de la signalisation cellulaire.

Les virus sont également à l'origine d'un mécanisme plus rare de mutations. Le génome viral peut en effet s'intégrer près d'un gène régulateur de la cellule hôte et aboutir à un gène et à une protéine hybride. Par exemple, le virus à ADN de l'hépatite B peut s'intégrer près du récepteur à l'acide rétinoïque (facteur de transcription RAR) et altère son activité, aboutissant à un cancer du foie ou hépatocarcinome. Le virus peut également s'intégrer au hasard dans le génome de la cellule hôte mais exprimer des protéines régulatrices modifiant l'activité des gènes de cette dernière. C'est le cas du rétrovirus HTLV1 portant le gène Tax, qui peut induire des lymphomes ou certains types de leucémies.

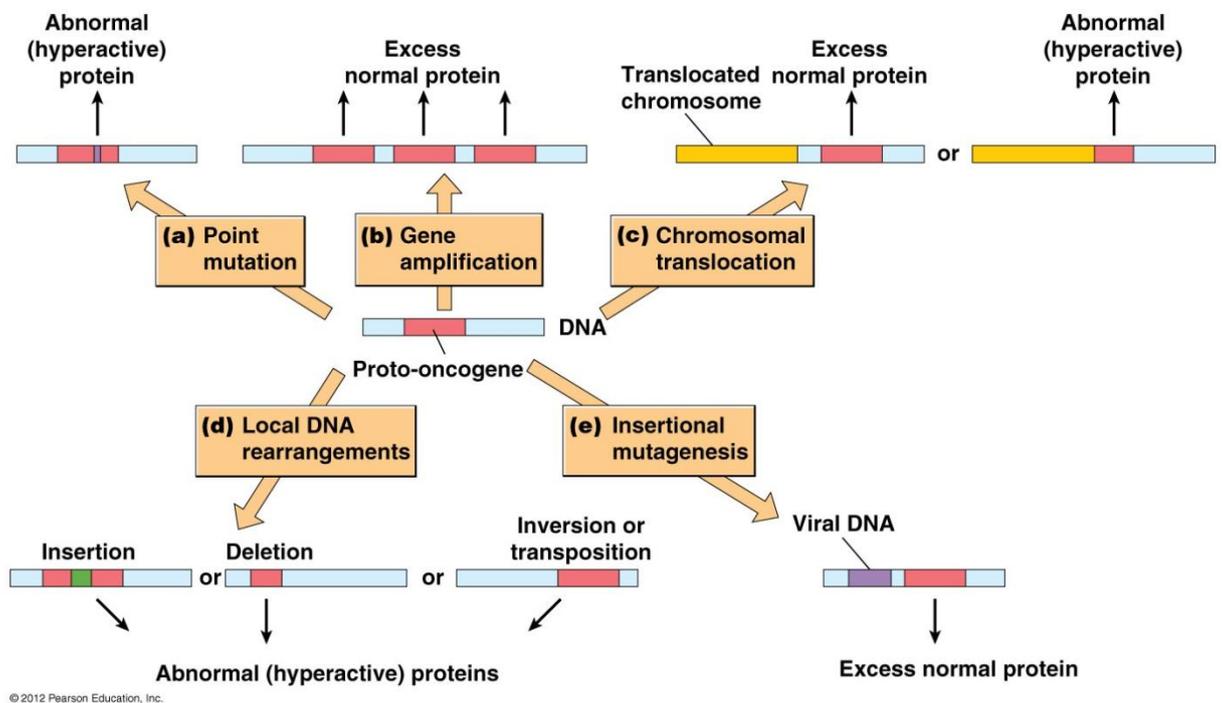


Figure 43: Principaux mécanismes de conversion des proto-oncogènes en oncogènes. a : mutation ponctuelle ; b : amplification génique ; c : translocation chromosomique ; d : réarrangements locaux de l'ADN (insertion, délétion, inversion ou transposition) ; e :insertion mutagène (ADN viral).

1.3.2. Mutations et gène suppresseurs de tumeurs.

Les mutations touchant les anti-oncogènes peuvent être des délétions, des mutations inactivatrices, des anomalies durant la mitose (perte de chromosome, recombinaison mitotique) ou des conversions géniques (transfert non réciproque d'information génétique).

1.3.3. Autres mutations.

Si le cancer est bien une maladie génétique ou sont observées bon nombre d'altérations de l'ADN touchant à la séquence du génome (mutation, délétion...), la recherche actuelle montre que des mécanismes épigénétiques interviennent également, et qui, sans modifier l'intégrité du génome, vont altérer son fonctionnement et sa dynamique. Les altérations épigénétiques interviendraient vraisemblablement à un stade précoce de la progression tumorale, aboutissant à l'activation de proto-oncogènes ou à l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs. Il semble notamment que des modifications de la méthylation de l'ADN au niveau de régions promotrices de gènes clés soient impliquées dans ces phénomènes (par hyper ou hypo-méthylation). Ces mécanismes épigénétiques auraient une place importante dans la cancérogenèse.

1.4. Cellules cancéreuses.

Suite aux mutations successives touchant proto-oncogènes et anti-oncogènes, les cellules cancéreuses gagnent des avantages sélectifs caractéristiques (figure 44):

- Indépendance vis-à-vis des signaux stimulant la prolifération (les cellules tumorales n'ont plus besoin de signal particulier pour se diviser).
- Insensibilité aux signaux inhibiteurs.
- Abolition de l'apoptose ou mort cellulaire programmée.
- Capacité proliférative illimitée (perte de la sénescence)
- Capacité d'angiogenèse (capacité de stimulation de nouveaux vaisseaux sanguins pour l'oxygénation de la tumeur).
- Acquisition d'un pouvoir invasif (métastases).

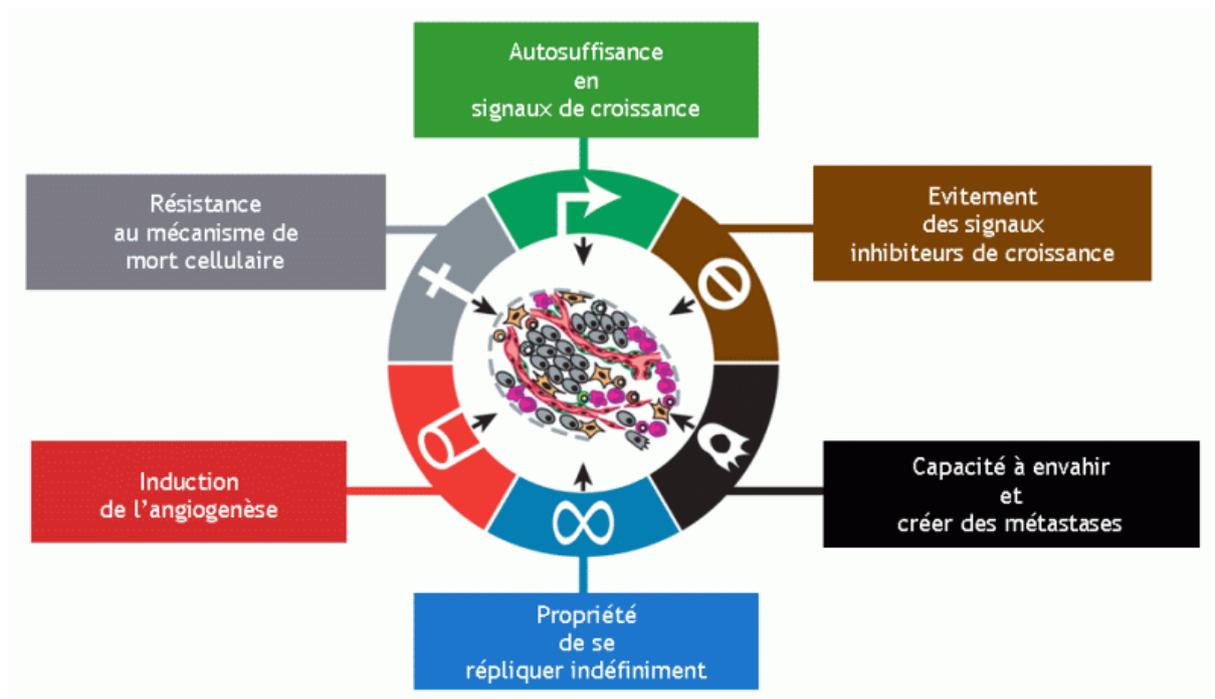


Figure 44: les 6 caractéristiques de la cellule cancéreuse (Hanahan & Weinberg, 2000).

La cellule tumorale est également caractérisée par une instabilité génétique liée à une déficience des systèmes de surveillances et de réparations du génome permettant l'accumulation d'altérations de son ADN et sa prolifération. Ainsi, l'instabilité génétique est un mécanisme essentiel dans la genèse et l'évolution du processus tumoral.

1.5. Le cycle cellulaire.

Le cycle cellulaire (figure 45) correspond à la vie d'une cellule depuis sa formation par division de la cellule mère jusqu'au moment où elle même a fini de se diviser en 2 cellules filles. Ce cycle est composé de l'interphase qui comprend les 3 sous phases G1, S et G2 ainsi que de la phase de mitose M, comportant la prophase, la métaphase, l'anaphase et la télophase. Le contrôle de ce cycle est soumis à un système de régulation complexe évitant une prolifération cellulaire excessive dont les mécanismes fondamentaux sont hautement conservés à travers l'évolution et opèrent de la même manière chez tous les organismes eucaryotes.

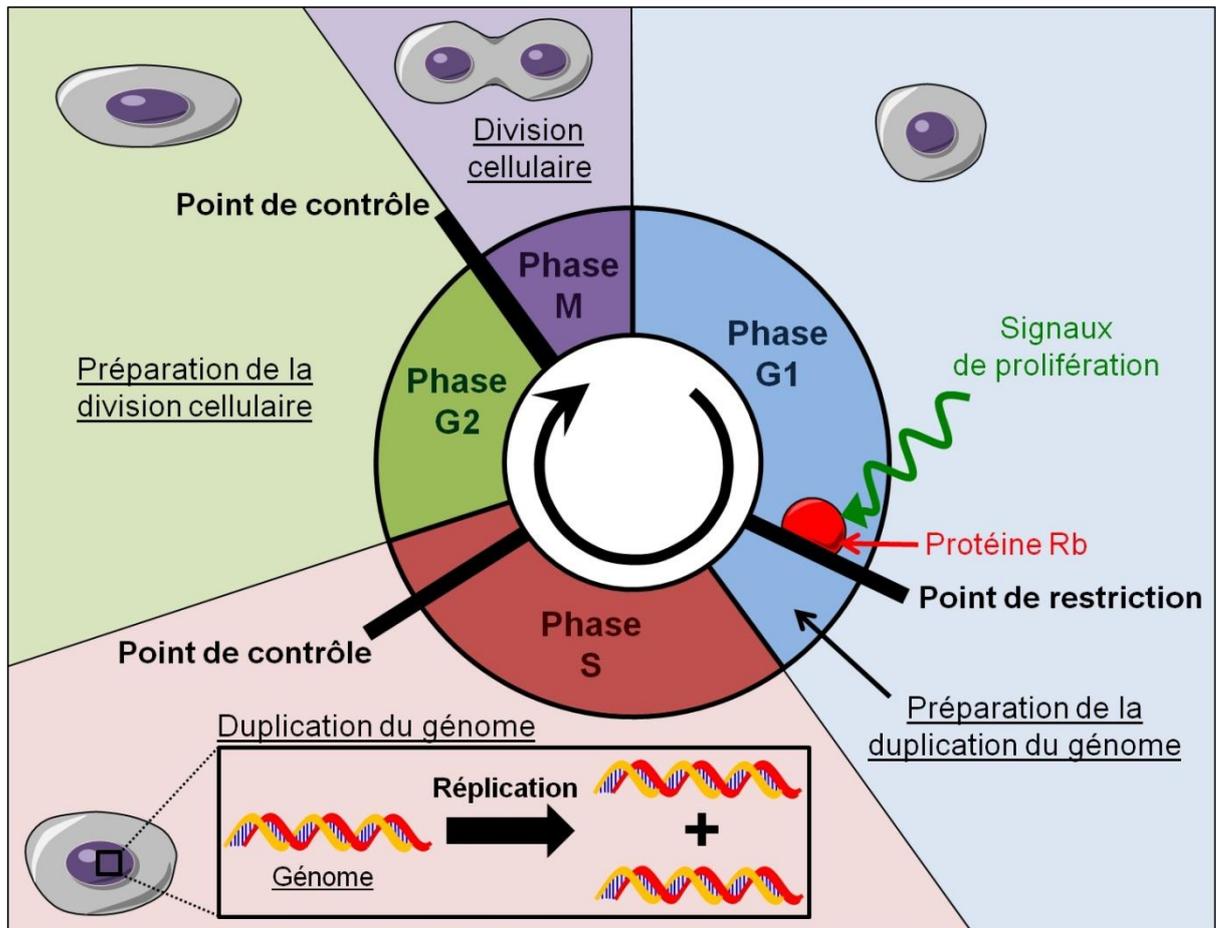


Figure 45: Les phases du cycle cellulaire.

Les différentes transitions du cycle cellulaire doivent respecter un ordre et un « horaire » immuable, ainsi, les systèmes de contrôles traitent l'ensemble des signaux régulateurs reçus par la cellule grâce à des points de contrôles (« check point ») qui enregistrent les conditions intracellulaires (l'état de réplication de l'ADN, du fuseau mitotique...) et les conditions extracellulaires (signaux provenant d'autres cellules) afin de déterminer si la cellule peut et doit se diviser. Ces points de contrôles impliquent les Cdk (« cycline dependent kinase ») ainsi que des cyclines associées en complexes protéiques hétérodimériques. Ces complexes cyclines/Cdk agissent en phosphorylant les protéines cibles, sachant qu'il existe des complexes cycline/Cdk spécifiques à chaque phase du cycle cellulaire (figure 46).

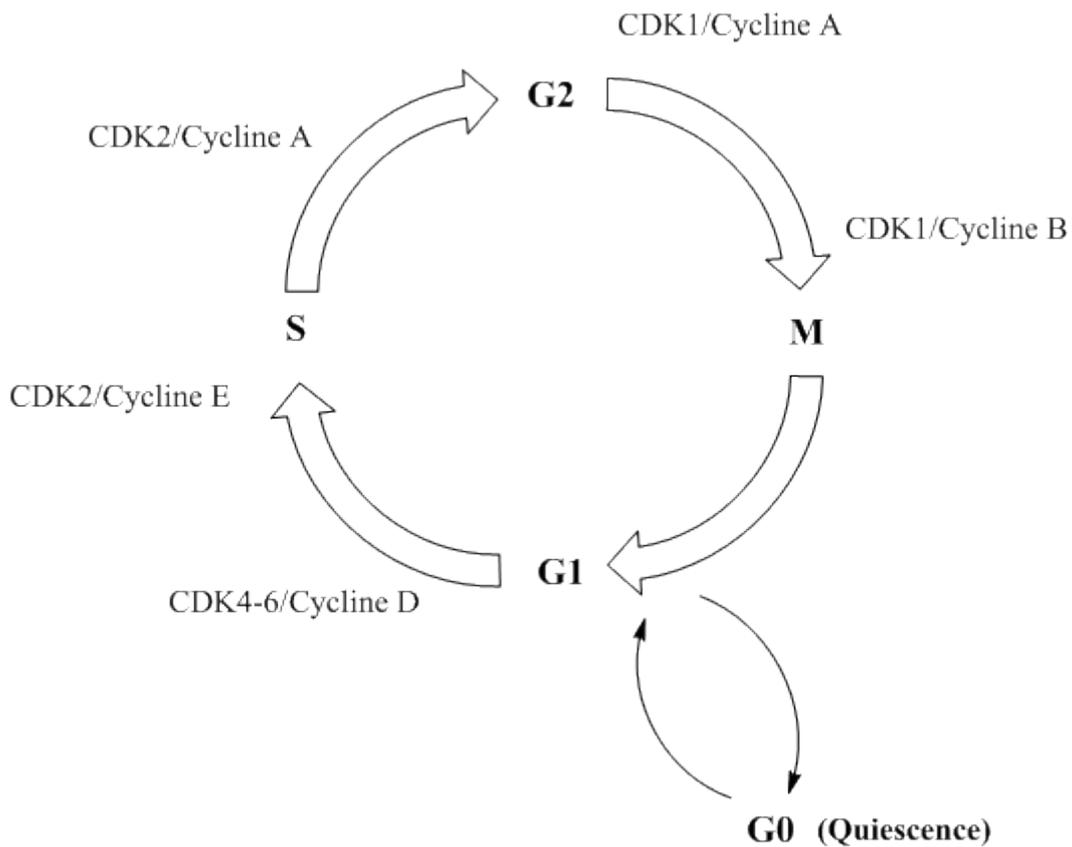


Figure 46: Les différents types de complexes CDK/Cycline selon la phase du cycle cellulaire.

Ainsi, la progression en phase G1 est assurée par les complexes cycline D/Cdk4 et cycline D/Cdk6 qui phosphorylent et inactivent la protéine Rb (protéine Rétinoblastome), ce qui a pour effet de libérer les facteurs de transcription E2F qui contrôlent entre autres l'expression de gènes des cyclines E et A. Le point de contrôle du passage en phase S est appelé point R (point de restriction) et est sous le contrôle du complexe cycline E/Cdk2. Lorsque ces points de contrôles ne sont pas passés avec succès, la cellule entre en phase G0 de manière temporaire ou permanente, celles-ci sont alors dites quiescentes, c'est-à-dire qu'elles ne se divisent plus. La phase G0 est souvent induite par des conditions défavorables mais peut être tout à fait normale pour certains types de cellules (neurones, myocytes, pneumocytes). En phase S, le matériel chromosomique est doublé par réplication de l'ADN sous le contrôle du complexe cycline A/Cdk2. La transition en G2 est quant à elle dépendante du complexe cycline A/Cdk1. La phase G2 est la dernière étape avant l'entrée en mitose. Cette transition en phase M est contrôlée par le complexe cycline B/Cdk1.

La régulation de ces phases passe par la synthèse/dégradation des cyclines, les phosphorylations/déphosphoylations des Cdks (Cdc25, CAK, Wee 1) et l'action des CKI («Cdk Inhibitor») telles que p16, p21 et p27 (Morgan, 1995) (figure 47).

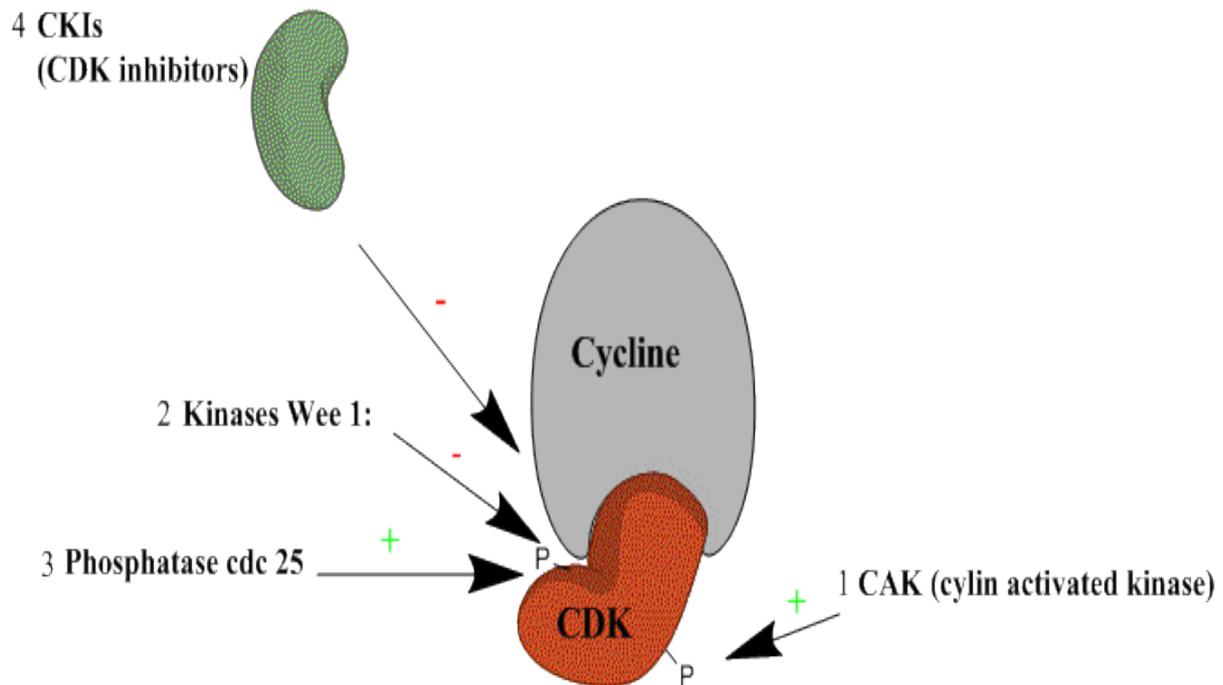


Figure 47: Activation/inactivation des complexes cyclines/CDK. (1 : Activation par phosphorylation d'une thréonine en position C-terminale par une CAK en position 160, 161 ou 172 selon les CDK ; 2 : Phosphorylation inhibitrice de la thréonine 14 ou tyrosine 15 en position N-terminale au niveau du site de liaison à l'ATP ; 3 : Activation par la phosphatase cdc 25 ; 4 : Inhibition par association avec une CKI.)

Les gènes codant pour des éléments essentiels du système de contrôle sont appelés gènes cdc pour « cell division cycle », il faut noter que les oncogènes sont souvent des gènes cdc, on retrouve par exemple le cdc 25 surexprimé dans de nombreux cancers.

1.6. L'apoptose.

L'apoptose ou mort cellulaire programmée est le processus physiologique actif comprenant des signaux spécifiques par lequel les cellules induisent leur propre autodestruction. L'apoptose suit une séquence d'évènements cellulaires bien précis à différencier de la nécrose, processus dégénératif observé chez des cellules ayant subies des dommages chimiques, physiques ou osmotiques.

Ce phénomène se caractérise par une condensation puis une fragmentation du noyau et du cytosquelette entraînant la formation de corps apoptotiques sans processus inflammatoire. Une famille particulière de protéines prend une place centrale dans les mécanismes moléculaires de l'apoptose: les caspases (« cysteinyl aspartate cleaving proteases »). Ces dernières sont à la fois initiatrices (caspase-2, -8, -9 et -10) et déclenchent des cascades d'activations des caspases et effectrices (caspase-3, -6 et -7) en dégradant des substrats cellulaires spécifiques. Le clivage en cascade de procaspases (figure 48) peut se réaliser selon 2 voies : la voie intrinsèque (mitochondries) et la voie extrinsèque (récepteurs de morts).

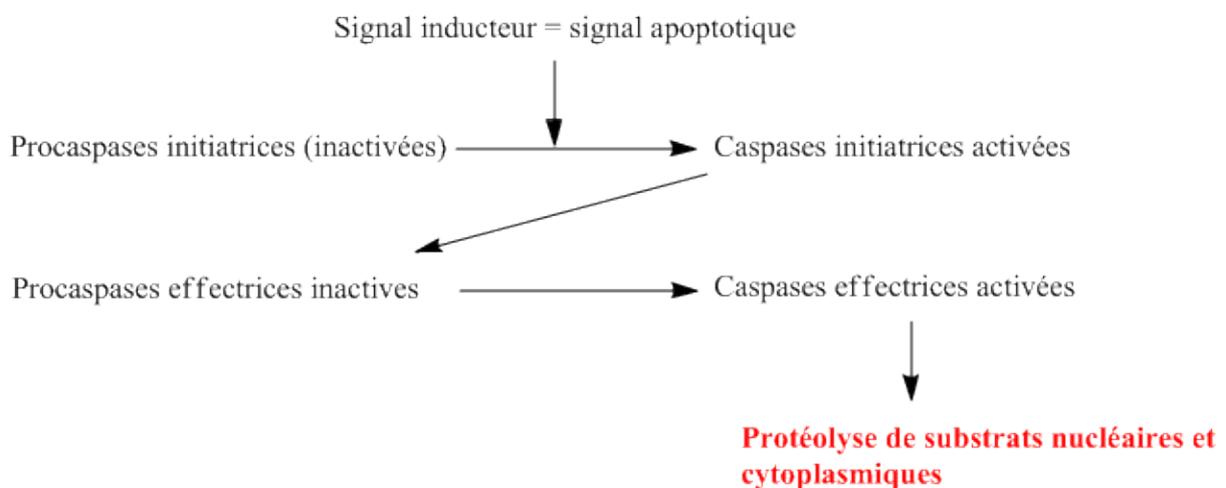


Figure 48: Clivage en cascade de procaspases en caspases suite au signal apoptotique.

Les caspases sont toutes produites sous forme d'un grand précurseur inactif (procaspase) contenant trois domaines : un pro-domaine en N-terminal, une grosse sous-unité et une petite sous-unité. Les caspases initiatrices ont généralement un pro-domaine plus long où on peut retrouver deux motifs apparentés. Le DED (« Death Effector Domain »), présent dans les caspase-8 et -10, interagit avec les DED de protéines impliquées dans la signalisation, comme FADD (Fas-associated death domain) (Boldin *et al.*, 1995). Le CARD (« CASpase Recruitment Domain ») (Hofmann *et al.*, 1997), dans les caspases effectrices, est important dans les interactions avec d'autres caspases ainsi qu'avec toute une gamme de protéines adaptatrices et régulatrices (figure 49).

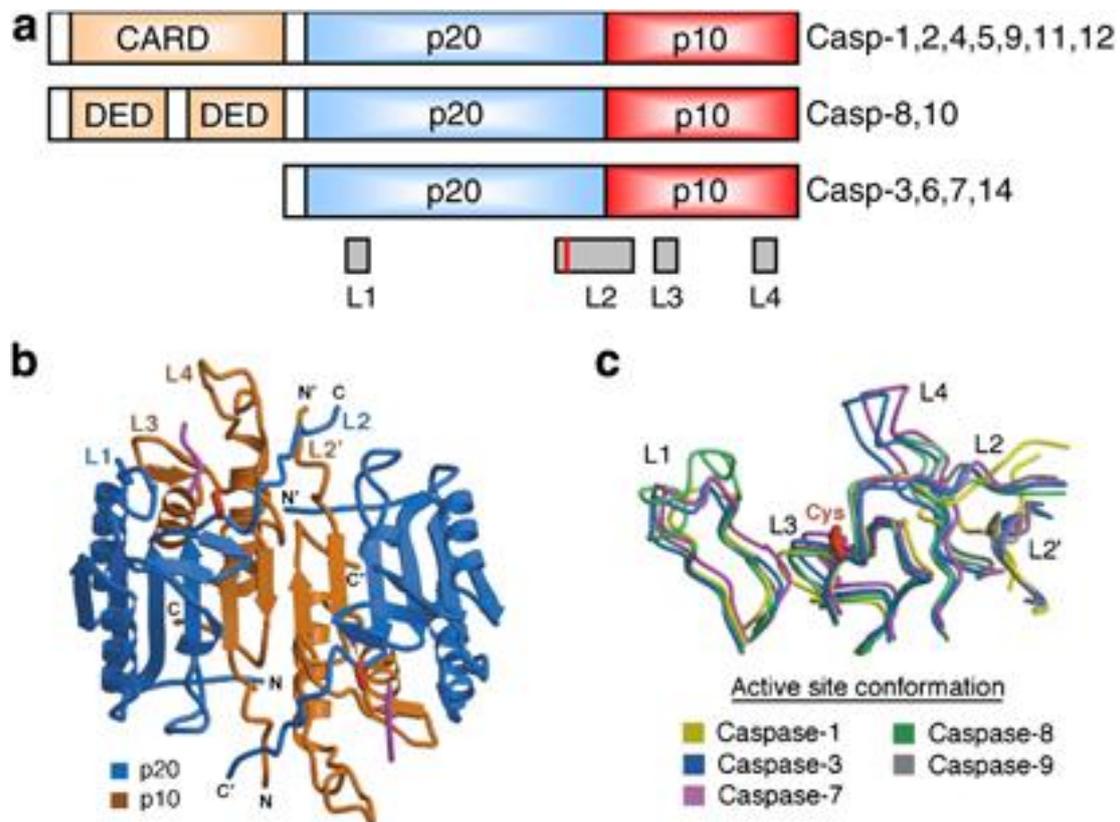


Figure 49: Structures des procaspases et des caspases. (a : DED pour « Death Effector Domain » et CARD pour « Caspase Recruitment Domain » sont les pro-domaines, p20 est la grosse sous-unité et p10 la petite ; b et c : structure tridimensionnelle des caspases).

Le signal apoptotique qui déclenche le processus d'apoptose peut être généré par différents stimuli intra ou extracellulaires :

- Des mécanismes de réparation de l'ADN défectueux.
- Des molécules cytotoxiques, l'irradiation.
- Un défaut de signalisation dans le cycle cellulaire.
- Des signaux de morts cellulaires (TNF- α , FasL...).

La voie extrinsèque consiste au recrutement des procaspases initiatrices (caspase 8) via des signaux dits « inducteurs de mort », encore appelés DISC (« Death Inducing Signaling Complex ») initiés par la liaison de ligands particuliers tels que le FasL (ligand de Fas/CD95), le TNF- α et le TRAIL (« TNF Related Apoptosis Inducing Ligand ») sur les récepteurs de morts correspondants. En présence de leur ligand, ces récepteurs recrutent grâce à leur domaines cytoplasmiques un adaptateur FADD (FAS Associated Death Domain) ou TRADD (TNF Receptor Associated Death

Domain) qui possèdent tous les 2 un DED. Ces adaptateurs vont pouvoir recruter, via des interactions entre domaines DED homologues, la caspase 8 initiatrice qui clive les procaspases effectrices 3, 6 et 7 exécutant le programme de destruction cellulaire (figure 50).

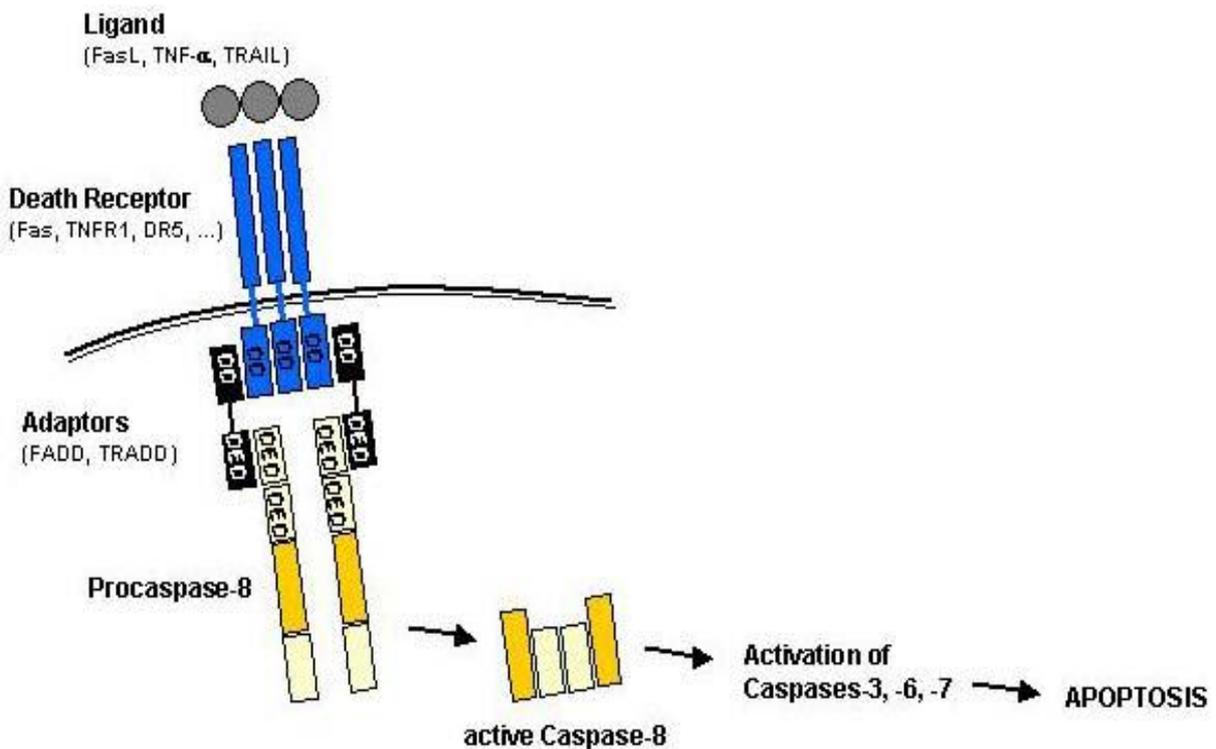


Figure 50: Voie d'activation extrinsèque des caspases.

La voie intrinsèque engendre une perméabilisation membranaire de la mitochondrie activant la caspase 9 par le cytochrome c (figure 50). Cette voie est régulée par les protéines de la famille Bcl-2 (« B-cell leukemia/lymphoma-2 ») qui peuvent être pro-apoptotiques (Bax, Bak, Bok, Bad, Bid et Bim) ou anti-apoptotique (Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w et Nr13).

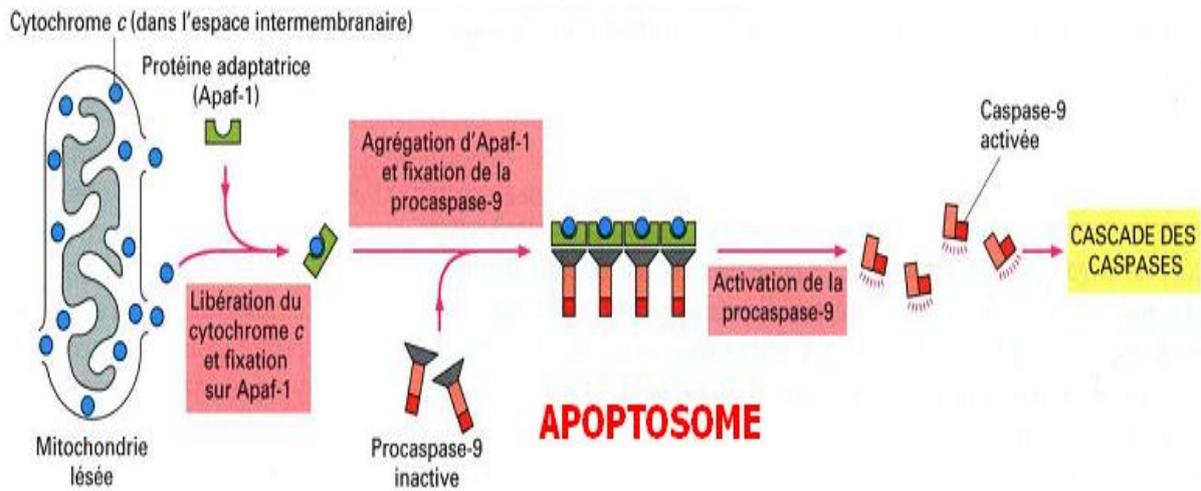


Figure 51: Voie intrinsèque de l'apoptose.

1.7. Signalisations cellulaires et cancer.

1.7.1. Généralités.

La communication cellulaire est indispensable à la vie des organismes pluricellulaires: les cellules doivent impérativement échanger les informations nécessaires à la coordination de leurs actions. Les principes de la communication cellulaire sont universels : des molécules de signalisations sont émises par une cellule, reconnues par une autre qui met alors en œuvre une voie de transduction du signal reçu qui aboutit à un système effecteur prenant en compte le signal. La variété des systèmes de transmission de l'information est immense, tant au niveau de la réception des signaux que de la mise en jeu des effecteurs. Pourtant, il est possible de trouver des structures communes de cheminement de l'information, allant des récepteurs aux effecteurs.

La première étape est la réception du signal, les mécanismes de cette réception dépendent de la nature chimique du messenger :

- Les messagers de nature hydrophile (protéines, peptides ou acides aminés) ne peuvent entrer dans la cellule, il y'aura des récepteurs membranaires aptes à traduire le message au delà de la membrane.

- Les messagers de nature lipidique (stéroïdes, acides gras et dérivés) et composés très simples (oxygène) peuvent diffuser directement dans la membrane et atteindre leur cible intracellulaire.
- Les messagers de nature ionique (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Cl^-) vont induire ouvertures ou fermetures transitoire de canaux ioniques et générer des courants transmembranaires.

La deuxième étape est la transduction des signaux perçus par les récepteurs. Celle-ci fait intervenir de multiples processus, mais les mécanismes généraux mis en jeu sont en petit nombre :

- Le recrutement de protéines capables d'interagir avec d'autres protéines. Ces protéines dites « adaptatrices » sont en très grand nombre.
- Les réactions de phosphorylation et de déphosphorylation par des kinases et des phosphatases qui modifient la conformation tridimensionnelle des protéines et donc leur réactivité.
- La mise en jeu de protéines G.
- La production de seconds messagers intracellulaires relayant l'information.

Les effecteurs sont aussi très nombreux mais peuvent être regroupés grâce à leur mode de fonctionnement :

- Les régulateurs transcriptionnels (facteurs de transcription) commandent la transcription de gènes cibles.
- Les régulateurs traductionnels interviennent sur le niveau de synthèse protéique.
- Les protéines du cytosquelette ou de la matrice extracellulaire qui commandent les phénomènes d'adhésion, de motilité et de dispersion cellulaires.
- Les canaux ioniques mis en jeu notamment dans la transmission synaptique.

Les altérations de la signalisation cellulaire sont à l'origine des caractéristiques si particulières des cellules cancéreuses et sont donc au cœur des mécanismes d'oncogénèses. Toutes les voies de signalisation impliquées dans la prolifération et dans la différenciation, dans l'adhésion et dans la migration, dans la survie et dans la

mort, pourront servir de support à des altérations oncogéniques. On peut dire que le cancer était une maladie de la signalisation cellulaire.

Nous allons décrire maintenant, de manière simplifiée, quelque-une des voies de signalisation particulièrement connues pour être impliquées dans le développement de cancers.

1.7.2. Facteurs de croissance et récepteurs à activité tyrosine kinase.

La signalisation apportée par les facteurs de croissance est certainement la mieux connue en raison, en particulier, de son rôle dans l'oncogenèse. Elle ouvre en fait sur de multiples voies de transductions. Les facteurs de croissance et leurs récepteurs sont classés en fonction du mécanisme de l'activation de ces derniers : la classe principale est celle des récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK) dont il sera uniquement question dans ce chapitre. D'autres classes existent comme celle des récepteurs activant une tyrosine kinase ou celle des récepteurs à activité sérine/thréonine kinase.

Il existe plusieurs centaines de facteurs de croissance capables d'activer un RTK et plusieurs dizaines de récepteurs capables de les reconnaître. Les uns et les autres sont regroupés en familles protéiques homologues correspondantes : les facteurs de croissance de la famille de l'EGF (Epidermal growth factor) interagissent avec les récepteurs de la famille des récepteurs de l'EGF, et ainsi de suite. Le tableau 8 présente quelques unes des différentes familles de facteurs de croissance et leurs récepteurs.

Familles	Récepteurs	Ligands
Récepteurs de l'EGF	EGFR	EGF
	ERBB2	TGF- α
	ERBB3	Epigène (EPGN)
	ERBB4	Bétacelluline (BTC)
		Amphiréguline (AREG)
	Neuréguline 1 à 4 (NRG1-4)...	
Récepteurs du VEGF	VEGFR1	VEGF-A à VEGF-D
	VEGFR2	

	VEGFR3	
Récepteurs du FGF	FGFR1	FGF1 à 10
	FGFR2	FGF15 à FGF23
	FGFR3	
	FGFR4	
Récepteurs du RET	RET	GDNF
Récepteurs ROR	ROR 1	Protéines WNT
	ROR 2	
Récepteurs de l'insuline	IGF1R	Insuline
	INSR	IGF1
	INSRR	IGF2

Tableau 8: *Quelques familles de récepteurs de facteurs de croissance.*

Le mode d'activation de tous les RTK est analogue : il comporte une dimérisation du récepteur qui permet l'autophosphorylation de résidus tyrosine du domaine intracellulaire. La présence de phosphotyrosines constitue le véritable signal permettant la mise en œuvre d'une voie de transduction conduisant à l'activation des effecteurs. Ces phosphotyrosines seront reconnues par des protéines dotées de domaines de liaison que l'on appelle domaines SH2 (SRC homology domain 2) et PTB (Phosphotyrosine binding). Ces protéines sont susceptibles de reconnaître de façon très spécifique les différentes tyrosines phosphates du récepteur activé. Deux types de signalisation peuvent alors être mis en œuvre :

- Des protéines cytoplasmiques à domaine SH2 ou PTB peuvent être phosphorylées et activées par le récepteur au niveau de résidus tyrosine, mettant en œuvre ensuite les actions résultant de leur phosphorylation. Certaines sont des tyrosines kinases cytoplasmiques comme SRC (pour Sarcoma) ou JAK (Janus kinase), des tyrosines phosphatases comme SHP1 (SH2 domain containing phosphatase 1), la phospholipase C gamma (PLC γ), d'autres sont des protéines adaptatrices dont la phosphorylation permet ensuite la transmission du message.
- Des protéines cytoplasmiques adaptatrices, possédant également un domaine de reconnaissance SH2 ou PTB, peuvent être recrutées par l'activation du

récepteur, sans phosphorylation subséquente. Ces dernières sont aussi susceptibles de reconnaître de façon très spécifique les tyrosines phosphates du récepteur activé. Citons comme exemples la protéine GRB2 (Growth factor receptor binding protein 2) qui est une des principales entrées vers la voie des MAP kinases et la protéine p85 ou PIK3R1 qui ouvre la voie de la phosphatidylinositol 3-kinase dont elle constitue une sous-unité régulatrice.

Au niveau des récepteurs des facteurs de croissance, de nombreuses altérations sont rencontrées dans les cancers et c'est à ce niveau qu'ont été identifiés le plus grand nombre de proto-oncogènes.

1.7.3. La voie des MAP kinases.

1.7.3.1. De l'activation du récepteur à l'activation de RAS.

La voie des MAP kinases est une des principales voies de prolifération cellulaire dont les altérations oncogéniques ont suscité de nombreux travaux. Elle est située en aval de nombreux récepteurs, en particulier les récepteurs de la famille de l'EGFR, et aboutit à l'activation de facteurs de transcription, les MAP (Mitogen-activated proteins), qui gouvernent la transcription de nombreux gènes nécessaires à la réplication de l'ADN et à la mitose (Boutros, *et al.*, 2008). À côté de la voie classique, la mieux connue, que nous présenterons ici, existent des voies parallèles qui sont activées par d'autres stimuli et qui aboutissent à l'activation d'autres facteurs de transcription plus impliqués dans la réponse au stress, dans l'inflammation et dans le développement que dans la prolifération cellulaire. Dans le chapitre précédent, nous avons dit que les tyrosines phosphates du récepteur activé pouvaient être reconnues par de nombreuses protéines adaptatrices dotées d'un domaine de reconnaissance SH2 ou PTB. La protéine GRB2 (Growth factor receptor-bound protein 2) est une protéine adaptatrice dotée de ces deux domaines. Son domaine SH2 reconnaît des tyrosines phosphates du RTK activé. Cela permet le recrutement à la membrane d'un facteur d'échange GTP-GDP, nommé SOS1 (Son of sevenless homolog 1), dont le rôle est de fixer sur la protéine RAS un GTP à la place du GDP, c'est le rôle d'une famille de protéines que l'on appelle des GEF (Guanine nucleotide exchange factor) (McKay & Morrison, 2007). Si la voie EGFR-GRB2-SOS1-RAS est la mieux connue, il en existe de multiples variantes : d'autres

protéines adaptatrices sont capables de coupler le RTK activé à la protéine RAS, en particulier, dans le cas des FGF (Fibroblastic growth factor), une protéine FRS (FGF receptor substrate) qui est phosphorylée par le récepteur, et dont les phosphotyrosines sont ensuite reconnues par la protéine GRB2. Par ailleurs, d'autres protéines d'échange GTP-GDP existent, susceptibles elles aussi d'activer la protéine RAS ; elles sont recrutées par divers types de RTK ainsi que par d'autres types de récepteurs.

Il existe trois protéines RAS homologues, K-RAS (Kirsten RAS), H-RAS (Harvey RAS) et N-RAS (Neuroblastoma RAS), qui se distinguent par leur spécificité tissulaire. Ces dernières appartiennent à la famille des petites protéines G qui fonctionnent selon le même mécanisme : un facteur d'échange GEF remplace le GDP, pour lequel elles ont une affinité importante, par du GTP. Ce remplacement induit un changement de conformation de la protéine G qui lui permet d'exercer une action en aval, par exemple, pour la protéine RAS, de se lier à une sérine/thréonine kinase RAF et de l'activer. Les petites protéines G possèdent une activité GTPasique qui leur permet ensuite d'éliminer le phosphate en gamma du nucléotide et de revenir à leur forme première, liée au GDP. Cette activité GTPasique est stimulée par un facteur activateur GAP (GTPase-activating protein). Il existe une grande variété de petites protéines G et des modulateurs de leur activité, GEF et GAP. Dans le cas des protéines RAS et en réponse à l'activation d'un RTK, le GEF est donc la protéine SOS1 et le GAP une protéine nommée RASGAP. Un autre GEF de RAS, nommé RASGRP (RAS guanyl nucleotide releasing protein), peut être activé par les seconds messagers, l'IP3 (Inositol-3-phosphate), via le Ca^{2+} qu'il mobilise et le DAG (Diacylglycérol), libéré du phosphatidylinositol par la phospholipase C gamma (PLC γ), cette dernière possédant un domaine SH2 permettant son activation par un RTK. Signalons enfin que ce GEF peut être activé par une autre voie de signalisation, celle impliquant des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés à des protéines G (GPCR, pour G protein-coupled receptor).

1.7.3.2. En aval de RAS.

Lorsqu'il est lié au GTP, RAS subit une modification conformationnelle qui lui permet de reconnaître et de recruter à la membrane une sérine/thréonine kinase qui

est une protéine RAF dans la voie des MAP kinases. Plusieurs autres sérine/thréonine kinases peuvent ainsi être activées par RAS, comme la PI3 kinase que nous retrouverons plus loin, ainsi que d'autres enzymes comme la phospholipase C epsilon (PLC ϵ) ou d'autres petites protéines G comme RAL. Les protéines RAS sont ainsi un carrefour important au cœur de plusieurs voies de signalisation. L'activation des protéines en aval de RAS est un phénomène limité dans le temps, puisque l'activité GTPasique de RAS, aidée en cela par la protéine RASGAP, désactive rapidement RAS en le ramenant à la forme RAS-GDP inactive, incapable de reconnaître et d'attirer RAF à la membrane plasmique. La protéine RASGAP possède un domaine SH2 qui lui permet, comme GRB2, d'être recrutée à la membrane par un récepteur RTK afin d'y exercer son action. La figure 52 présente les étapes successives de la voie des MAP kinases.

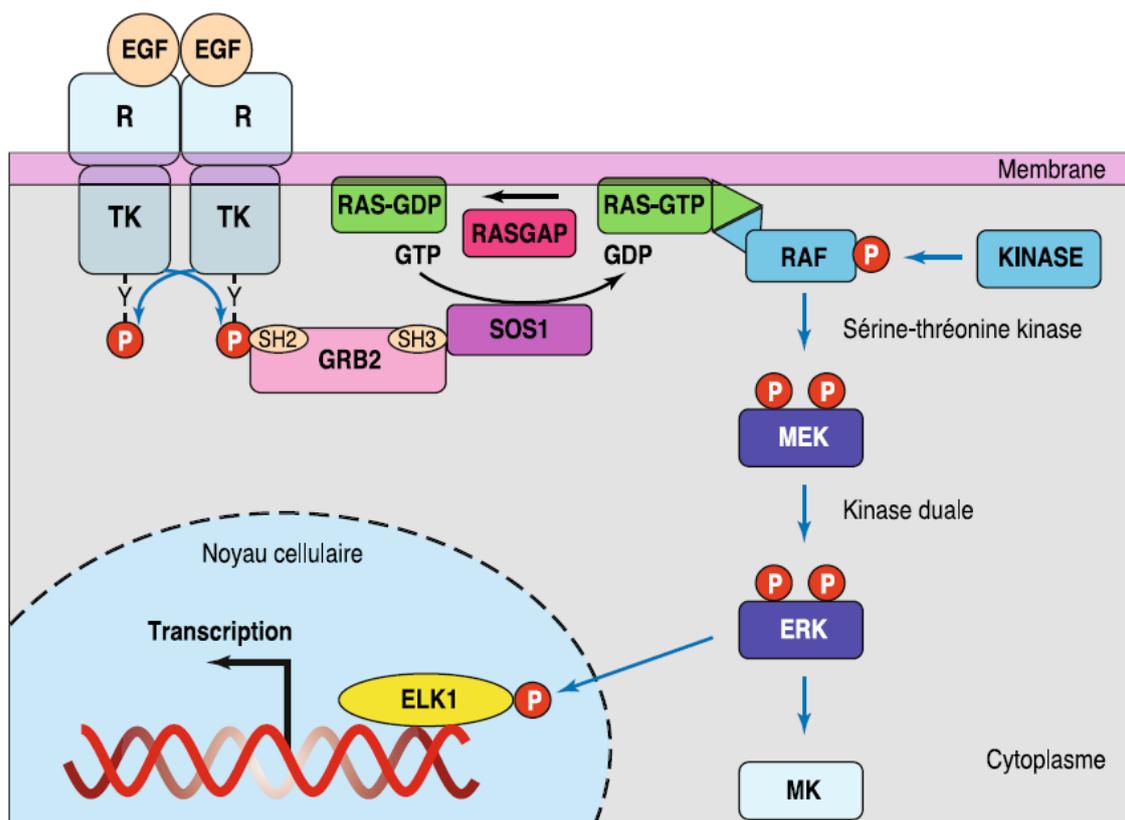


Figure 52: La voie des MAP kinases (Robert, 2010).

Il existe en fait trois protéines RAF, nommées A-RAF, B-RAF et C-RAF. Leur liaison avec RAS-GTP entraîne un changement de conformation qui dévoile une boucle

d'activation les rendant aptes à être phosphorylées et activées selon un processus complexe et mal élucidé.

En aval des kinases RAF se situent les kinases MEK1 et MEK2, et en aval de MEK1/2 se situent les kinases ERK1 et ERK2 (Extracellular signal-regulated kinase). On a ainsi un système à trois niveaux de phosphorylation, les kinases RAF sont aussi appelées des MAP3K ou MAPKKK, les kinases MEK des MAP2K ou MAPKK, et les kinases ERK les MAP kinases proprement dites (MAPK). Ce « module » RAF-MEK-ERK n'est qu'un module parmi d'autres et il existe des voies parallèles à trois niveaux successifs de phosphorylation, plutôt impliquées dans la réponse au stress et dans l'inflammation que dans la prolifération cellulaire. On a identifié au total vingt et une MAP3K, sept MAP2K et dix MAPK. Enfin, des régulateurs négatifs de la voie des MAP kinases sont les phosphatases duales, au nombre de dix, que l'on appelle MKP (MAP kinase phosphatases) ou DUSP (Dual specificity phosphatases). Elles exercent leur activité au niveau de thréonines comme de tyrosines phosphates, avec une spécificité de substrat variable.

Comme nous l'avons mentionné plus haut, il existe plusieurs modules de signalisation en aval de protéines du type de RAS et mettant en jeu successivement trois étages de phosphorylation avec des MAP3K, MAP2K et MAPK. Sans pouvoir les décrire toutes et sans entrer dans le détail des combinaisons possibles entre les trois étages de phosphorylation, nous mentionnerons la voie de la p38, la voie de la JUN N-terminal kinase (JNK) et la voie ERK5.

La figure 53 résume ces voies de signalisation parallèles à la voie RAF-MEK-ERK. Il est important de noter que leurs effets vont plus souvent dans le sens de la différenciation ou de l'apoptose que dans le sens de la prolifération cellulaire, ce qui montre combien il est difficile d'attribuer une fonction unique à une voie de signalisation.

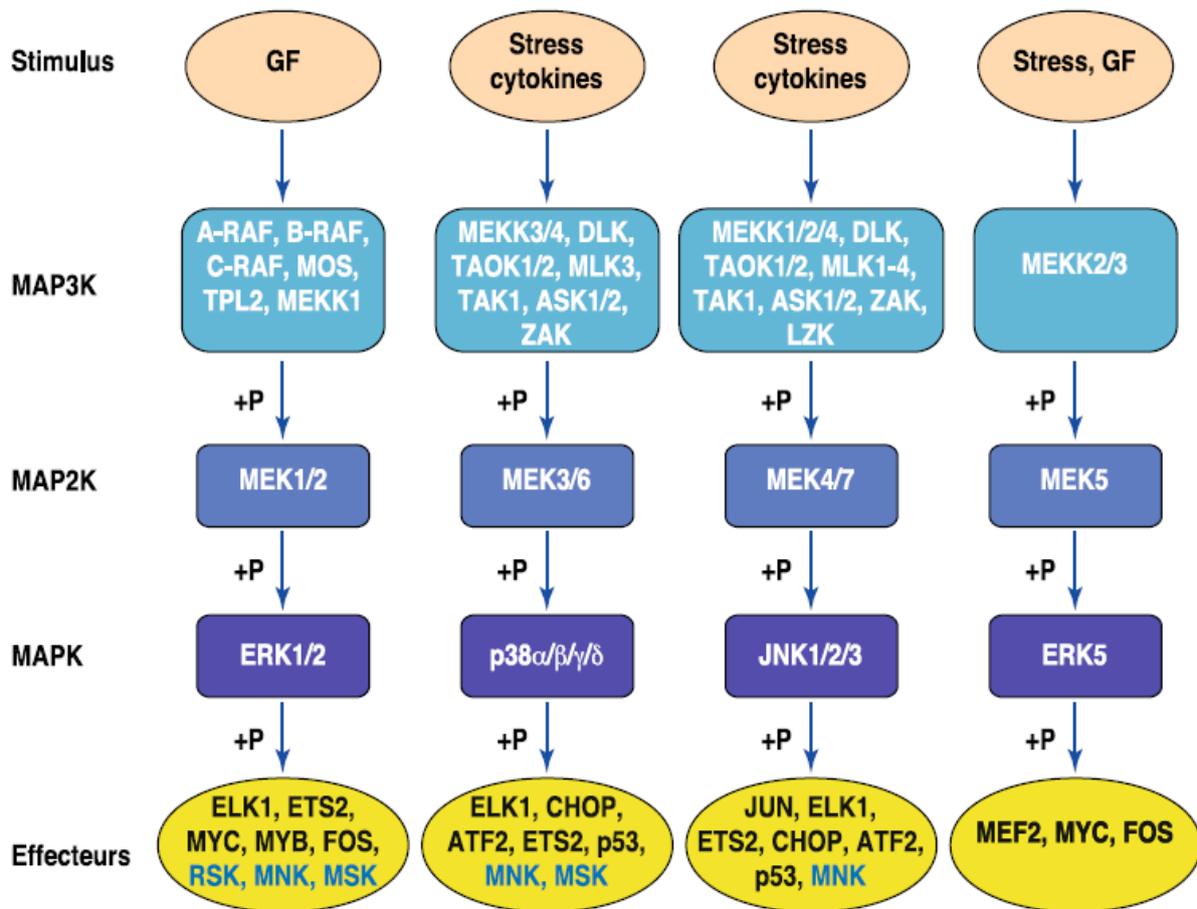


Figure 53: Les différents modules des cascades kinases (Robert, 2010).

Cinq systèmes de kinases à plusieurs étages ont été identifiés ; tous partent d'un stimulus (facteur de croissance, cytokine, stress) qui active une MAP3K, qui phosphoryle et active une MAP2K, qui phosphoryle et active une MAPK, qui phosphoryle et active un effecteur (facteur de transcription, autre kinase, etc.). Notons que le stimulus initial peut provenir d'une petite protéine G comme RAS accompagné d'une phosphorylation par une kinase de quatrième niveau (MAP4K). De gauche à droite, la voie classique des MAP kinases, la voie de la p38, la voie de la JUN N-terminal kinase, la voie d'ERK5.

Les JUN N-terminal kinases, JNK ou SAPK (Stress-activated protein kinase), au nombre de trois, sont activées en réponse à des cytokines pro-inflammatoires, à des stress comme la chaleur, aux radiations ionisantes, à l'endommagement de l'ADN ou au stress oxydatif et accessoirement aux facteurs de croissance. Le TNF (Tumor necrosis factor) et les ligands WNT activent également cette voie de signalisation. Les JUN kinases phosphorylent des facteurs de transcription comme JUN, MYC et ELK1, qui à leur tour contrôlent l'expression de gènes spécifiques impliqués dans la prolifération et la différenciation cellulaire. Elles sont phosphorylées par MEK4 et MEK7, elles-mêmes phosphorylées par diverses MAP3K.

Les kinases p38, au nombre de quatre (p38 α , β , γ et δ ou MAPK11 à MAPK14) sont elles aussi activées en réponse au stress (radiations UV, choc osmotique, hypoxie, cytokines pro-inflammatoires) plus qu'en réponse aux facteurs de croissance. Elles phosphorylent également un panel de facteurs de transcription et de kinases MK dont beaucoup sont communs aux voies ERK1/2 et JNK1/2/3. Elles sont préférentiellement activées par phosphorylation par MEK3 et MEK6, elles-mêmes phosphorylées par diverses MAP3K. Elles exercent un effet négatif sur la prolifération cellulaire et un effet positif sur l'apoptose, leur rôle semble être, en définitive, d'empêcher les cellules ayant subi un stress de s'engager dans le cycle cellulaire. Toutefois, elles ont également un rôle positif sur la motilité cellulaire.

1.7.3.3. Les substrats des MAP Kinases.

Les MAP kinases ont la propriété de phosphoryler et d'activer de nombreux facteurs de transcription, comme ELK1, ETS, FOS, JUN, MYC et SP1, qui induisent l'expression de nombreux gènes impliqués dans le cycle cellulaire et la prolifération, la plupart étant connus comme proto-oncogènes. Les MAP kinases sont également capables de phosphoryler une famille d'une dizaine de kinases aux propriétés biologiques diverses, appelées MK (MAPK-activated protein kinases), comprenant des RSK (Ribosome S6 kinases), des MSK (Mitogen and stress-activated kinases) et des MNK (MAP kinase interacting proteins). Ces kinases exercent des effets divers dans la cellule, surtout au niveau de la prolifération et de l'adhésion cellulaire.

La famille MYC

Les gènes dont la transcription est activée par MYC sont nombreux ; on y trouve des gènes impliqués dans la croissance, la prolifération et l'avancement du cycle cellulaire : cyclines, CDK, CDC25, télomérase, facteurs d'initiation de la traduction. Parmi les gènes dont la transcription est réprimée, on trouve au contraire des régulateurs négatifs du cycle cellulaire : p21, p27, p15, ainsi que le gène de la protéine p53. Les oncogènes de MYC sont c-myc, N-myc et L-myc.

La famille FOS-JUN

Les facteurs de transcription JUN et FOS (nommés d'après les noms des oncogènes correspondants) appartiennent à une famille appelée AP1 (Activator protein 1) associée à la prolifération et à la différenciation cellulaire. Ils fonctionnent après

dimérisation. On dénombre trois protéines JUN (JUN ou c-JUN, JUNB et JUND) et quatre protéines FOS (FOS ou c-FOS, FOSB, FRA1 et FRA2). Les protéines JUN peuvent former des homodimères ou des hétérodimères avec les protéines FOS, mais les protéines FOS ne peuvent que s'hétérodimériser avec des protéines JUN. Les MAP kinases ERK, ainsi que les kinases des modules JNK et p38, sont capables de phosphoryler et d'activer les éléments des complexes AP1. D'autres phosphorylations sont possibles : JUNB peut être phosphorylé par le complexe CDK1-cycline B d'entrée en mitose, ce qui le conduit à la protéolyse. Les différents dimères pouvant exister ont des rôles physiologiques opposés, c'est ainsi que le dimère JUN-FOS induit la transcription de gènes de prolifération, comme celui de la cycline D et du CDK4/6, alors que les dimères JUN-JUNB ou JUN-JUND en sont incapables : JUNB et JUND apparaissent ainsi comme des inhibiteurs de JUN. Ils induisent en revanche la transcription des régulateurs négatifs du cycle cellulaire. On comprend ainsi pourquoi les différents modules de MAP kinases, qui phosphorylent de façon différentielle les divers éléments des complexes AP1, peuvent avoir des effets opposés sur la prolifération et la différenciation cellulaire. Parmi les gènes cibles des complexes AP1 figurent également les gènes de cytokines et de facteurs de croissance, de FASL et du TNF.

1.7.3.4. Altérations oncogéniques.

La voie des MAP kinases est une des grandes voies de l'oncogénèse et plusieurs oncogènes et gènes suppresseurs de tumeurs y ont été identifiés depuis longtemps. Si la protéine adaptatrice GRB2 et le facteur d'échange GDP-GTP ne semblent pas subir de mutations oncogéniques, il n'en est pas de même pour la protéine RAS dont les trois isoformes K-RAS, H-RAS et N-RAS sont mutées dans de nombreux cancers. Par exemple, K-RAS est muté dans environ 40 % des cancers colorectaux, 20 % des cancers du poumon non à petites cellules, 90 % des cancers du pancréas et 5 % des cancers du sein. C'est une des protéines les plus fréquemment mutées dans les cancers humains. Les mutations activatrices aboutissent au remplacement de deux glycines par d'autres acides aminés, la protéine mutée conserve ses propriétés de liaison au GDP, d'échange GDP-GTP, de reconnaissance et de recrutement à la membrane d'une protéine RAF mais elle devient incapable de remplir sa fonction enzymatique intrinsèque qui est de cliver le GTP en GDP et reste donc active en permanence pour transmettre un ordre de

prolifération. Des mutations, plus rares, entravent la stimulation de l'activité GTPasique par le facteur GAP, les conséquences sont alors les mêmes, l'activité enzymatique intrinsèque de RAS paraissant insuffisante pour une désactivation rapide. Pour les mêmes raisons, des mutations désactivatrices du système de stimulation de l'activité GTPasique de RAS auront un effet oncogénique.

La protéine RAF constitue également un point d'appel pour l'oncogenèse. Une mutation activatrice qui introduit un acide glutamique à proximité des sites de phosphorylation du domaine catalytique de la protéine B-RAF est principalement rencontrée. Ces mutations sont retrouvées dans les mélanomes et les cancers thyroïdiens principalement, mais aussi dans les cancers de l'ovaire et du côlon.

Les protéines MEK et ERK, en revanche, ne subissent pas de mutations activatrices récurrentes, celles-ci sont souvent surexprimées dans les cancers et apportent par là, vraisemblablement, une contribution significative à l'oncogenèse.

Les voies des p38 et des JNK se comportent le plus souvent, à l'inverse de la voie ERK, comme des suppresseurs de tumeurs, des altérations invalidantes des kinases de ces voies, comme MEK4 et MEK6, pourraient être impliquées dans l'oncogenèse. Le niveau d'activité des kinases p38 et MEK6 est très faible dans les carcinomes hépatocellulaires et des mutations « perte de fonction » de MEK4 ont été décrites dans des tumeurs humaines. Toutefois, une augmentation du niveau de phosphorylation de p38 α a été corrélée à une malignité accrue de divers cancers, peut-être en raison du rôle de la voie p38 dans la régulation de l'expression des cytokines proinflammatoires comme l'IL6 ou l'IL1. En outre, la voie JNK et la voie p38 stimulent l'angiogenèse et l'invasivité tumorale en raison de leur activité stimulatrice de la motilité cellulaire et de la production des métalloprotéinases. L'un des effecteurs principaux de la voie JNK, le facteur de transcription JUN, qui participe au complexe AP1, est clairement oncogénique.

Enfin, les facteurs de transcription (les MAP) sont également des proto-oncogènes importants à l'extrémité de cette voie de signalisation. Parmi les facteurs de transcription phosphorylés et activés par les MAP figurent la protéine MYC, la protéine MYB, les protéines JUN et FOS et bien d'autres connues pour leur rôle oncogénique.

1.7.4. La voie de la phosphatidylinositol-3-kinase.

La voie de la phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) est une des voies de signalisation qui s'ouvre en aval de l'interaction d'un facteur de croissance avec un récepteur à activité tyrosine kinase (RTK). Elle suit donc un chemin parallèle à la voie des MAP kinases. Comme cette dernière, elle est mise en œuvre à la suite de la reconnaissance d'une phosphotyrosine du récepteur activé par une protéine adaptatrice et comporte des activations séquentielles de kinases aboutissant à des effets multiples sur la transcription de gènes impliqués dans la prolifération, la différenciation et la survie cellulaire. La PI3 kinase assure la phosphorylation en 3 d'un lipide membranaire particulier, le phosphatidylinositol-4,5-diphosphate, afin de le transformer en phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate. La présence d'un groupement phosphate en 3 sur l'inositide permet le recrutement à la membrane de protéines kinases, en particulier la PDK1 (Phosphoinositide-dependent kinase 1) et la protéine AKT, anciennement nommée protéine kinase B (PKB). La PDK1 est susceptible de phosphoryler et d'activer une protéine AKT (sérine-thréonine kinase), cette dernière est à l'origine de l'activation de multiples effecteurs, présentés sur la figure 54. Parmi les substrats des protéines AKT, sans prétendre à l'exhaustivité, on peut citer :

- La protéine BAD (BCL2-associated agonist of cell death), qui est une protéine impliquée dans la régulation positive de l'apoptose mitochondriale. Cette protéine est inactivée par phosphorylation.
- La protéine IKK (I κ B kinase), activée par cette phosphorylation, et qui phosphoryle et inhibe la protéine I κ B, elle-même inhibiteur du facteur de transcription NF κ B. AKT contrôle donc positivement NF κ B, qui lui-même est impliqué dans la survie cellulaire, la prolifération, la chimiorésistance, l'angiogénèse et l'invasion.
- La protéine WEE1, inhibée par cette phosphorylation, qui est une tyrosine kinase inhibitrice du CDK1, nécessaire à l'entrée des cellules en mitose.
- Les protéines FOXO (Forkhead box class O), qui sont des facteurs de transcription inducteurs d'apoptose en agissant à la fois sur la voie extrinsèque (TRAIL, FASL) et sur la voie mitochondriale (protéines BH3). Leur phosphorylation par AKT entraîne leur relocalisation dans le cytoplasme et la perte de leurs fonctions sur la transcription.

- La protéine TSC2 (Tuberous sclerosis complex 2), inhibée par phosphorylation, qui, associée à TSC1, constitue un facteur activateur de GTPase (GAP, GTPase activating protein) pour une protéine de la superfamille RAS nommée RHEB (RAS homolog enriched in brain) ; c'est par cette voie que se fait l'activation de mTOR.

Toutes les actions d'AKT orientent donc la cellule vers la prolifération et la survie.

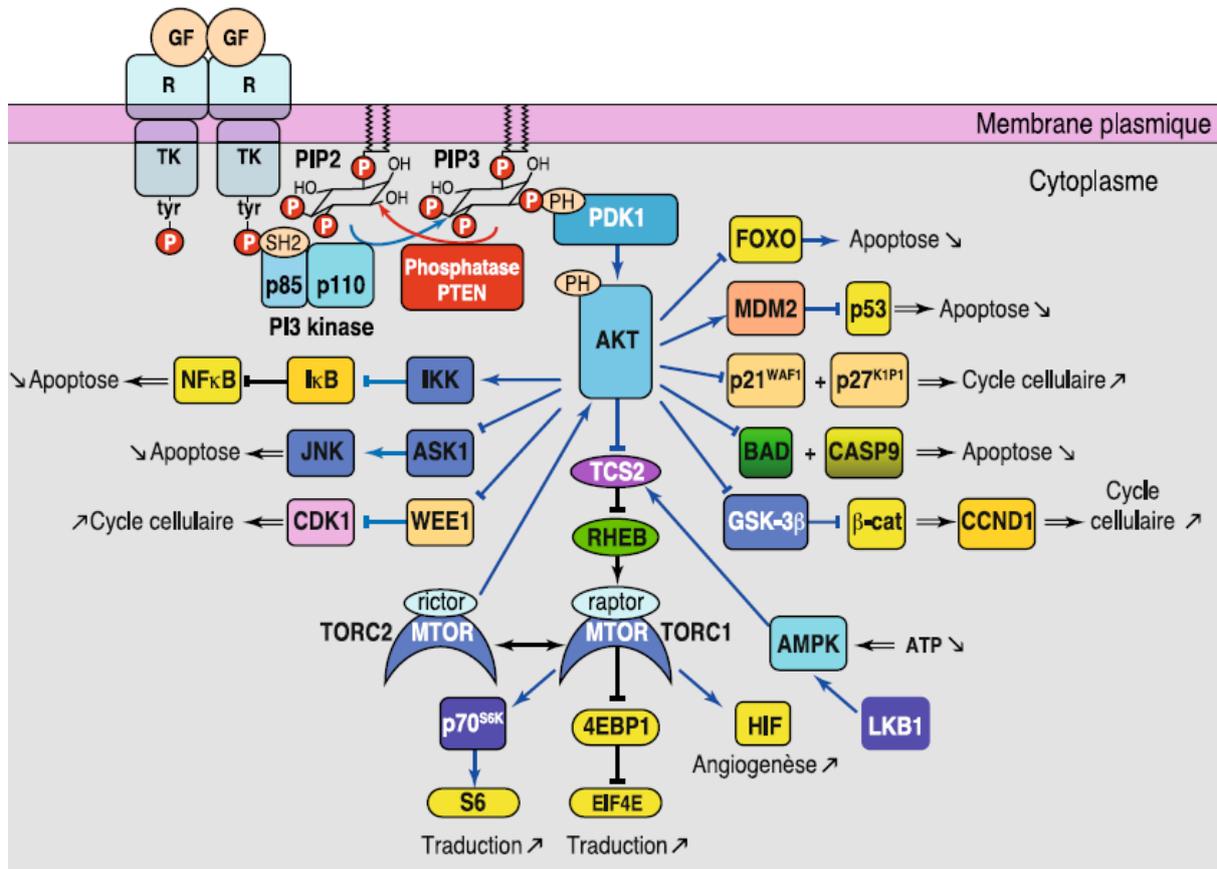


Figure 54 : Schéma récapitulatif de la voie des PI3 kinases.

La voie de la PI3 kinase est riche en altérations, mutationnelles et non mutationnelles, capables de concourir à l'oncogenèse. La PIK3CA (sous-unité catalytique de la PI3K) est elle-même une oncoprotéine majeure : les mutations de son gène sont fréquemment rencontrées, entre autres choses, dans les cancers du sein et du côlon. Les mutations activatrices siègent le plus souvent au niveau de trois acides aminés distincts. Une amplification du gène ou une surexpression de la protéine peuvent également être rencontrées dans les cancers. La sous-unité régulatrice peut être, elle aussi, le siège de mutations activatrices, que l'on rencontre dans des syndromes lymphoprolifératifs et les cancers colorectaux. La phosphatase

PTEN, qui réverse l'action de la PI3 kinase, est le produit d'un gène suppresseur de tumeurs de type « gatekeeper » dont les altérations sont notamment retrouvées dans les cancers de l'endomètre, du sein, du côlon, de l'ovaire, les glioblastomes ou les mélanomes. L'inactivation de PTEN peut se produire par de nombreuses mutations invalidantes incluant des délétions, par méthylation du promoteur du gène diminuant son expression et par toute régulation transcriptionnelle négative.

2. Polyphénols du vin rouge et effets anticancers.

2.1. Le cas du resvératrol.

Des études *in-vitro* révèlent de multiples cibles intracellulaires du resvératrol affectant la croissance cellulaire, l'inflammation, l'apoptose, l'angiogenèse et l'invasion métastatique. Ces multiples cibles moléculaires font du resvératrol un potentiel agent chimiopréventif majeur dont les propriétés ont certainement fait l'objet du plus grand nombre d'études parmi tous les polyphénols. Nous allons ici décrire les effets pléiotropes du resvératrol afin d'illustrer les multiples cibles potentielles des polyphénols.

2.1.1. La régulation de la progression du cycle cellulaire.

Nous avons vu précédemment que la progression du cycle cellulaire est intimement régulée par des complexes cyclines/Cdk et des protéines inhibitrices telles que p21 ou p27. On sait que l'activité des cycles cellulaires est augmentée dans les cancers notamment à cause d'une surexpression de cyclines et de Cdks mais aussi une inactivation des inhibiteurs de Cdks. Le resvératrol a montré la capacité de moduler les médiateurs majeurs du cycle cellulaire à des concentrations de l'ordre de la micromole et d'arrêter les cellules cancéreuses à la phase G1/S du cycle cellulaire. Cette action antiproliférative implique l'induction de p21 et p27 ainsi que la régulation négative des cyclines D1/D2/E, des Cdks 2/4/6 et des pRb hyperphosphorylées (Ahmad, *et al.*, 2001). Le resvératrol inhibe également directement la synthèse d'ADN en diminuant l'activité de la ribonucléotide réductase et l'ADN polymérase (Fontecave, *et al.*, 1998). D'autre part, ce polyphénol régule à la

baisse l'oncogène c-MYC dans les medulloblastomes et arrête le cycle cellulaire en phase S.

2.1.2. La régulation de l'apoptose et des voies de la survie.

L'apoptose est régulée par un réseau complexe de protéines pro ou anti apoptotiques. On sait que le facteur p53 induit l'activation de gènes pro-apoptotiques tel que Bax et réprime les anti-apoptotiques comme Bcl-2. Le resvératrol est capable d'activer le p53 et donc de déclencher l'apoptose médiée par la mitochondrie dans différentes cellules cancéreuses humaines (Alkhalaf, 2007). Il y'a alors expression entre autres de Bax, Bak, Bim et inhibition d'autre part de l'expression d'anti-apoptotiques tels que Bcl-2 ou Bcl-XL. L'apoptose induite par le resvératrol peut également intervenir via la voie des récepteurs de morts, le resvératrol peut en effet redistribuer les récepteurs de morts tel que FAS/CD95 dans des rafts lipidiques et sensibiliser la cellule aux ligands des récepteurs de morts (Delmas, *et al.*, 2003). Une synergie similaire a été observée entre le resvératrol et le TRAIL, l'apoptose induite par ce dernier provoquant l'arrêt du cycle en phase G1 est améliorée par le resvératrol (Fulda & Debatin, 2005). Par ailleurs, le resvératrol a démontré une capacité à surmonter la chimiorésistance de cellules humaines de myélomes multiples et de potentialiser les effets apoptotiques du bortezomib et du thalidomide par la suppression de NF- κ B et de STAT3, ce qui aboutit à la régulation négative de gènes anti-apoptotiques (Cycline D1, Bcl-2, Bcl-xL, Akt...) et augmente l'apoptose associée à Bax/caspase 3 (Bhardwaj, *et al.*, 2007). Dans des cellules humaines de cancer du sein (cellules MCF7), la phosphorylation d'Akt a été significativement réduite, ce qui est suivi par une diminution de l'activation de la pro-caspase 9 (Li, *et al.*, 2006). Sur des cellules de cancer de prostate de type PC-3 et LNCaP, le resvératrol peut à la fois inhiber les récepteurs aux androgènes et aux estrogènes mais aussi l'activité de la PI3K (Benitez, *et al.*, 2007).

Une autre voie conduisant à la mort des cellules peut être amplifiée par le resvératrol : la voie des sphingomyéline. Cette voie est une réponse à divers stress environnementaux tels que les UV, les radiations, le stress oxydatif, certaines cytokines (TNF- α et IL-1 β) ou encore des chimiothérapies et dont le céramide est le messenger secondaire, synthétisé soit par l'hydrolyse de sphingomyéline, soit par

une biosynthèse *de novo*. Le céramide provoque l'apoptose via c-Jun N-terminal kinase (JNK) et les stress-activated protein kinase (SAPK), la déphosphorylation de Bcl-2, de Bax et de Bad ainsi que l'activation des caspases-3 (Kolesnick, 2002). Le resvératrol est associé, avec un effet dose dépendant, à une augmentation de la synthèse *de novo* de céramide.

2.1.3. L'inhibition de l'invasion tumorale et de l'angiogénèse.

L'expression des endopeptidases et des MMPs (Matrix Metalloproteinases) est corrélée avec la dégradation protéolytique de la matrice extracellulaire suivie par l'angiogénèse permettant une croissance rapide. Les MMP-2 et MMP-9 jouent un rôle important dans la dégradation du collagène, constituant majeur de la membrane basale et leur expression est associée aux phénomènes de métastases observés dans de nombreux cancers humains (Waas, *et al.*, 2002). L'expression de MMP-9 est contrôlée par AP-1 et potentiellement par NF- κ B, le resvératrol supprime la fixation de NF- κ B sur l'ADN ainsi que l'activation d'AP-1 (Li, *et al.*, 2003), d'autre part, le resvératrol a démontré la capacité d'inhiber directement la croissance de cellules humaines endothéliales ombilicales en diminuant l'activité gélatinolytique de MMP-2 (Cao, *et al.*, 2005). D'autres études ont également confirmé que l'expression constitutive des protéines MMP-2 et MMP-9 de même que leur activité gélatinolytique étaient inhibées par le resvératrol, notamment au sein de cellules de myélomes multiples (Sun C, *et al.*, 2006).

Le VEGF (Vascular endothelial growth factor), interagissant avec son RTK spécifique (VEGFR) est un élément crucial de l'angiogénèse et de la croissance tumorale puisque impliqué dans le développement de nouveaux vaisseaux sanguins. La voie de signalisation activée par VEGF/VEGFR est connue pour cibler la PI3K qui active Akt et mène à la survie des cellules endothéliales. La PLC- γ et le Src sont également activés en aval de VEGF/VEGFR, de plus, il y'a induction de RAF, suivie par la cascade d'activation déjà évoquée précédemment avec mise en jeu de MEK et d'ERK. Dans des cellules de cancer du sein, une diminution significative des taux extracellulaire de VEGF associée à l'apoptose a suivi le traitement par resvératrol (Garvin, *et al.*, 2006).

2.1.4. Régulation de l'inflammation.

L'inflammation des tissus apparaît comme étant un facteur significatif impliqué dans les mutations épigénétiques intervenant au stade de l'initiation et de la progression du développement du cancer en induisant des dommages oxydatifs et en favorisant la croissance cellulaire. La cyclooxygénase-2 (Cox-2) est l'enzyme catalysant la conversion d'acide arachidonique en prostaglandines. Ce phénomène apparaît dans de nombreuses cellules suite à l'action de médiateurs de l'inflammation et de divers stimuli tels que les oncogènes, les facteurs promoteurs de tumeurs ou les facteurs de croissance. Les prostaglandines peuvent stimuler la croissance tumorale, l'angiogenèse et supprimer l'apoptose. Des expressions aberrantes de Cox-2 sont retrouvées dans les cancers humains tels que le cancer du colon, de la prostate, du foie, du pancréas, du sein, du poumon et de la peau, ce qui témoigne de l'importance de cette enzyme dans le processus de cancérogenèse (de la Lastra & Villegas, 2005). Lors de la conversion de l'acide arachidonique en prostaglandines par la Cox-2, il y'a en effet production d'EOA qui causent des dommages oxydatifs directs à l'ADN, on observe alors des taux significativement plus élevé de 8-oxo-2'déoxyguanosine, véritable marqueur de ces dommages (Nikolic & van Breemen, 2001). Le resvératrol, d'une part, inhibe directement l'activité de la Cox-2 et, d'autre part, inhibe son expression *in vivo* dans les cellules de peau de souris (Kundu, *et al.*, 2006). En amont de l'inhibition de la Cox-2, le resvératrol régule MKP5, un membre de la famille des phosphatases MKP qui déphosphoryle les MAPKs. La MKP5 déphosphoryle spécifiquement les protéine kinase p38 et JNK et donc les inhibent (Tanoue, *et al.*, 1999). Le p38 est connu comme facteur de réponse proinflammatoire dans le cancer de la prostate, son inhibition mène à une moindre activation de NF- κ B ayant pour conséquence une diminution de l'expression de la Cox-2. Le MKP5 est donc un potentiel médiateur anti inflammatoire diminuant la production de composés pro-inflammatoires dépendants de l'activation de NF- κ B telles que l'IL-6, l'IL-8 et la Cox-2 dans des cellules épithéliales prostatiques normales et qui peut être amplifié par le resvératrol dans des cellules de prostatites cancéreuses (Nonn, *et al.*, 2007).

2.1.5. Modulation des facteurs de transcriptions.

Le NF- κ B (nuclear factor-kappa B) est un facteur de transcription impliqué dans des processus cellulaires très variés tels que la réponse immunitaire, l'inflammation, l'apoptose et la régulation de la croissance cellulaire. Des activités aberrantes et soutenues de NF- κ B sont impliquées à divers stades de la progression tumorale et retrouvées dans de nombreux cancers. Dans son état inactif, NF- κ B est séquestré dans le cytoplasme par liaison avec une protéine inhibitrice de la famille I κ B. A la suite de l'exposition à des stimuli externes (mitogènes, cytokines, UV, radiations ionisantes...) les kinases I κ B (IKK) phosphorylent I κ B et dissocient le complexe NF- κ B-I κ B. Cette dissociation permet à NF- κ B d'effectuer sa translocation nucléaire sous forme de dimères libres de NF- κ B pouvant se fixer sur une séquence spécifique d'un promoteur de gènes cibles tels que le gène de la Cox-2 ou de MMP. Le NF- κ B est activé également par des oncogènes tels que RAS, des facteurs de croissance et d'autres kinases diverses comme Akt ou p38 MAPK. Le resvératrol supprime la phosphorylation d'IKK et bloque donc la dégradation d'I κ B, entraînant une inhibition de l'activation de NF- κ B. Ce blocage de l'activation du NF- κ B par le resvératrol a pu être observé dans différentes cellules cancéreuses et à la suite de nombreux stimuli tels que l'exposition à H₂O₂, au céramide et au TNF (Manna, *et al.*, 2000). D'autre part, sans empêcher l'activation de NF- κ B, le resvératrol peut aussi diminuer l'expression des gènes régulés par ce facteur de transcription comme l'IL-6, Bcl-2, Bcl-xL, VEGF et MMP-9 (Sun C, *et al.*, 2006).

Le facteur de transcription AP-1 peut être produit, entre autre, par différentes combinaisons dimériques de Jun (c-Jun, JunB, JunD) et de Fos (C-Fos, FosB, Fra-1, Fra-2). AP-1 joue un rôle important dans la prolifération cellulaire et dans les processus de métastases, ce facteur induit notamment, la Cox-2, Fos, MMP-9, la cycline D1 et le VEGF (Lee & Lee, 2006). Le resvératrol diminue l'affinité de liaison à l'ADN de l'AP-1 (Kundu, *et al.*, 2006). La régulation négative de c-Jun et la diminution de l'activité de l'AP-1 par le resvératrol implique aussi l'inhibition de la signalisation MEK1>ERK1/2 (Kim, *et al.*, 2006).

Le resvératrol peut également réguler le facteur de transcription p53. ERK et la MAPK p38 sont les médiateurs de l'activation de p53 par le resvératrol, cette activation est suivie par l'apoptose cellulaire (She, *et al.*, 2001).

2.1.6. La cathepsine D lysosomale comme cible.

La cathepsine D est une endoprotéase lysosomale surexprimée et hypersécrétée dans les cellules épithéliales de cancer du sein. Dans les cellules de seins cancéreuses positives aux récepteurs aux oestrogènes (ER+), la cathepsine D est régulée par les oestrogènes et certains facteurs de croissances tels que IGF1 et EGF qui provoquent son accumulation (Liaudet-Coopman, *et al.*, 2006). Cette dernière est un médiateur clé de l'apoptose induite par certains stimuli, notamment l'IFN- γ , le TNF- α et le stress oxydatif. Le resvératrol peut induire la mort cellulaire en impliquant la voie protéolytique lysosomale, voie dans laquelle la cathepsine D agit en amont pour l'activation des caspases. Le resvératrol apparaît comme ayant un effet biphasique selon une modalité dose dépendante. A basse concentration (10^{-6} M), il y'a augmentation de la sécrétion de cathepsine D dans les cellules de cancers du sein ER+ mais pas dans les ER- alors qu'à de fortes concentrations (10^{-4} M), le resvératrol inhibe la cathepsine D dans ces cellules (Vyas, *et al.*, 2006).

2.2. Propriétés anti-cancers des flavonoïdes et exemple de la quercétine.

Nous allons décrire ici quelques cibles privilégiées et les principaux mécanismes d'actions des flavonoïdes. Ces derniers peuvent mettre en jeu l'inhibition de la prolifération, de l'inflammation, de l'invasion métastatique et l'activation de l'apoptose (figure 55). L'exemple de la quercétine, un des flavonoïdes ayant fait l'objet du plus de publications, sera étudié plus particulièrement.

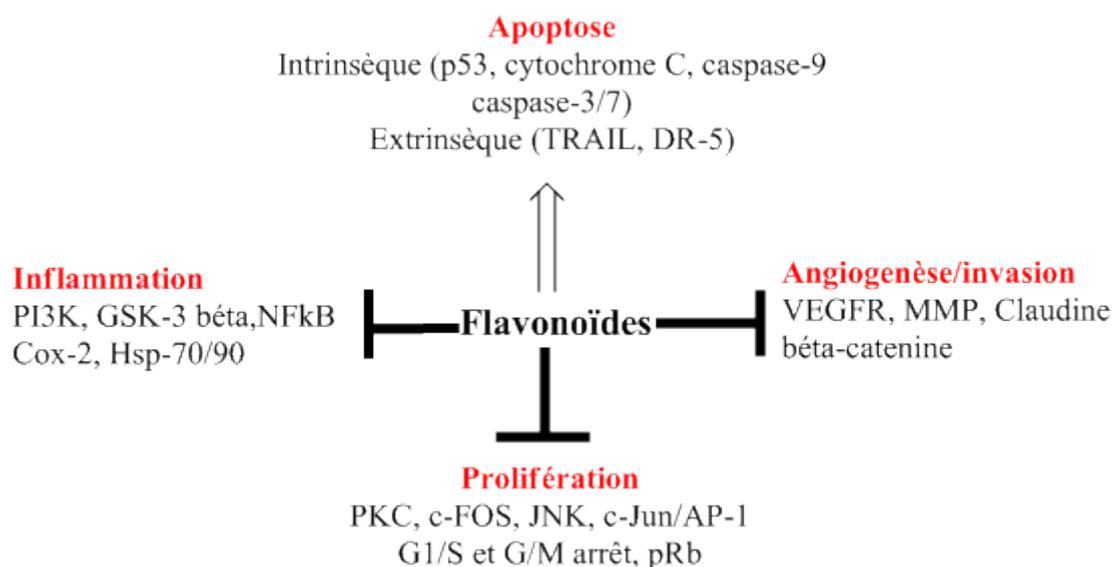


Figure 55: Cibles moléculaires des flavonoïdes dans la prévention du cancer. AP-1, activator protein-1; glycogen synthase kinase-3b (GSK-3b); JNK, c-Jun NH(2)-terminal kinase; MMP, matrix metalloproteinase; NFkB, nuclear factor kB; PI3K, phosphatidylinositol 3-kinase; PKC, protein kinase C; pRB, phosphorylated retinoblastoma; TRAIL, tumor-necrosis factor-related apoptosis inducing ligand; VEGFR, vascular endothelial growth factor receptor.

2.2.1. Inhibition de l'activité des protéines kinases.

Les flavonoïdes, que ce soit *in vivo* ou *in vitro*, influencent l'activité des protéines kinases, enzymes impliquées dans la régulation du cycle cellulaire. Cette propriété est à la base des effets inhibiteurs des flavonoïdes sur la croissance des cellules malignes. Dans l'idéal, un bon inhibiteur de kinase devrait cibler une kinase nécessaire à la prolifération et la survie de la cellule cancéreuse, nous allons donc évoquer ici l'influence des flavonoïdes sur l'activité de trois kinases majeures jouant un rôle important dans la maladie cancéreuse : la PKC, l'EGFR et la FAK.

La PKC est une sérine/thréonine kinase ubiquitaire, Ca^{2+} et phospholipide dépendante, jouant un rôle dans une gamme variée de fonctions cellulaires incluant la promotion tumorale, l'inflammation, la sécrétion et la fonction des lymphocytes T (Nishizuka, 1995). De nombreux polyphénols alimentaires ont montré un potentiel d'inhibition de cette kinase mais c'est la quercétine qui s'est révélée être le composé le plus efficace dans l'inhibition de la PKC (Gamet-Payraastre, *et al.*, 1999). L'EGFR est une glycoprotéine de surface se liant à l'EGF, l'EGFR alors activé peut phosphoryler différents substrats (*cf* chapitre voies de signalisations et cancers). La quercétine supprime non seulement efficacement l'activité tyrosine kinase de l'EGFR

mais cause également sa transinactivation ainsi qu'une réduction marquée des niveaux de plusieurs protéines phosphorylées cellulaires dont la FAK (focal adhesion kinase) (Lee, *et al.*, 2002). La surexpression de FAK est observée dans un grand nombre de tumeurs humaines et semble être un déterminant important dans l'invasion tumorale et le processus de métastases (Schlaepfer, *et al.*, 1999).

2.2.2. Activité anti-proliférative et induction de l'apoptose par les flavonoïdes.

Depuis plusieurs dizaines d'années, les flavonoïdes ont fait preuve de leurs capacités antiprolifératives vis-à-vis de nombreuses lignées cellulaires malignes. La quercétine, l'un des flavonoïdes les plus étudié, a montré que ce soit *in-vitro*, par exemple sur des cellules de cancer du sein et de colon (Hosokawa, *et al.*, 1990) et de cancer gastrique (Yoshida, *et al.*, 1990) ou *in-vivo* sur des modèles animaux (Castillo, *et al.*, 1989) de considérables propriétés d'inhibition de croissance cellulaire. Les cibles moléculaires responsables de cet effet antiprolifératif sont multiples et nous n'allons évoquer ici que quelques cibles majeures. En premier lieu, la quercétine régule à la baisse l'expression de la protéine p53 mutée jusqu'à des niveaux indétectables dans les lignées cellulaires de cancer du sein, menant à l'arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M (Avila, *et al.*, 1994). Cette inhibition est par ailleurs bien moindre en présence du gène p53 intact. Il faut rappeler que la mutation de p53 est une des altérations génétiques les plus communes dans les cancers humains. D'autre part, la faculté de la quercétine à inhiber diverses tyrosines kinases est un des principaux mécanismes sous-jacents à l'activité de cette dernière sur la prolifération tumorale, en effet, l'expression de tyrosine kinase particulière est impliquée dans l'oncogenèse car permettant de dépasser la régulation normale de la croissance cellulaire. Il a été rapporté qu'en plus de l'effet sur les tyrosines kinases précédemment évoqué, la quercétine inhibe l'activité d'une tyrosine kinase spécifique considérée comme responsable de la transformation de fibroblastes non malins vers des cellules de sarcomes (Glossmann, *et al.*, 1981). Chez des patients atteints de cancers avancés, l'administration intraveineuse de quercétine (doses 60-1700mg/m²) mène à l'inhibition de la lymphocyte tyrosine kinase à une heure dans neuf cas sur onze (Ferry, *et al.*, 1996). La quercétine a donc été le premier composé inhibiteur de tyrosine kinase testé sur l'homme. Le blocage de la voie de signalisation induite via l'EGFR par la quercétine a aussi été mis en évidence, il en résulte une inhibition

significative de la croissance des lignées cellulaires A431 et MiapaCa-2 par l'induction de l'apoptose (Lee, *et al.*, 2002; Lee, *et al.*, 2004). Kioka *et al* rapportent que la quercétine perturbe également l'expression du gène MDR1 (multidrug resistance 1) dans des cellules humaines d'hépatocarcinomes Hep G2 (Kioka, *et al.*, 1992). La quercétine a montré, par ailleurs, la capacité d'induire l'expression de récepteurs aux oestrogènes de type II (ERII), à la fois chez les cellules de cancer du sein positives aux récepteurs aux oestrogènes (ER+) et chez les cellules négatives aux même récepteurs (ER-). L'induction des ERII permet une plus grande inhibition de la croissance des cellules ER- avec un traitement à la quercétine (Scambia, *et al.*, 1993), cette dernière ayant montré la capacité de lier ces récepteurs avec une affinité similaire au tamoxifène et au diéthylstilbestrol dans des cellules humaines de mélanomes (Piantelli, *et al.*, 1995). La concentration requise pour observer une inhibition de croissance d'une lignée cellulaire à hauteur de 50% est d'ailleurs plus faible avec la quercétine (7 nM) qu'avec le tamoxifène (9 nM). Il faut noter que les ER II sont présents dans des tissus normaux et dans de nombreuses tumeurs humaines telles que les cancers du seins, de l'ovaire, les cancers colo-rectaux ou encore les mélanomes, leur expression est indépendante vis-à-vis du statut des ER I. La quercétine empêche également la production de HSP (Heat shock proteins) dans plusieurs lignées cellulaires malignes, notamment dans les cancers du sein (Hansen, *et al.*, 1997), les leucémies et les cancers du colon (Koishi, *et al.*, 1992). Les HSP forment des complexes avec les p53 mutés et améliorent les capacités des cellules tumorales à outrepasser les mécanismes normaux d'arrêt du cycle cellulaire. Wei *et al* nous apprennent qu'il y'a une association entre cet effet et l'apoptose induite par la quercétine (Wei, *et al.*, 1994). D'autre part, la quercétine, à une concentration de 10 microM, inhibe l'expression de l'oncogène p21-ras dans des cultures de cellules de cancer de colon (Ranelletti, *et al.*, 1999). Cette mutation du proto-oncogène ras est retrouvée dans plus de 50% des cancers du colon ainsi que dans d'autres cancers et entraîne une activation continue du signal de réplication de l'ADN. Pour finir, d'autres polyphénols du vin tels que la catéchine et l'épicatéchine sont capables (de même que la quercétine et le resvératol) de faire décliner la prolifération de cellules humaines de cancer du sein à des concentrations picomolaires (Le Marchand, 2002), de même que la prolifération les cellules humaines de cancer de la prostate (Messina, *et al.*, 1994).

2.2.3. Inhibition de la migration, de l'angiogenèse et des métastases par les flavonoïdes.

De nombreuses études tendent à démontrer que les flavonoïdes sont des composés régulant à la baisse la biosynthèse des MMPs. La quercétine, par exemple, diminue l'invasion des cellules de mélanomes murins en diminuant la pro-MMP-9 *via* la voie du PKC (Zhang, *et al.*, 2004). Une étude déjà citée plus haut a montré que cette même quercétine diminue la sécrétion de la MMP-2 et de la MMP-9 dans de nombreuses cellules malignes telles que les lignées A431, MiaPaCa-2 (Lee, *et al.*, 2004) et A549. La quercétine est capable par ailleurs de diminuer de façon dose-dépendante l'activité gélatinolytique de la pro-MMP-9. Bracke *et al* observent également la liaison de la (+)-catéchine à la laminine, constituant majeur des lames basales. Le traitement préalable de surface recouvertes de laminine avec une haute dose de (+)-catéchine (0.5 mM) perturbe l'effet de la laminine sur la morphologie et l'adhésion de deux types de cellules différentes, la M04 et la M5076 (Bracke, *et al.*, 1987). D'autre part, la sécrétion d'agents nécessaires à la néovascularisation et l'angiogenèse par les mastocytes ainsi que la stimulation de la migration de ces derniers par des peptides dérivés de tumeur semble indiquer une implication particulière de ces cellules dans la croissance tumorale et le processus de métastases (Theoharides, 1988). De nombreux flavonoïdes ont fait preuve d'un potentiel d'inhibition de l'activation et de la prolifération de ces mastocytes, effet qui contribuerait à leurs propriétés antitumorales, nous pouvons encore citer ici la quercétine qui perturbe l'expression des molécules d'adhésions endothéliales induites par le TNF relargué par les mastocytes (Anné, *et al.*, 1994).

3. Cancers et polyphénols du vin rouge.

3.1. Cancer du sein et polyphénols du vin rouge.

3.1.1. Cancer du sein : généralités.

Le cancer du sein est le plus fréquent des cancers féminins et représente la première cause de décès par cancer chez la femme en Europe avec notamment 11 000 décès par an en France. Dans la majeure partie des cas, il s'agit de carcinomes dont la prolifération est soit intracanalairaire soit intralobulaire. Les

carcinomes peuvent être *in-situ*, c'est-à-dire respectant l'intégrité de la membrane basale ou infiltrant, c'est-à-dire envahissant le tissu mammaire et évoluant dans un premier temps localement avant de se métastaser, les ganglions axillaire servant de 1^{er} relais.

Il existe de nombreux facteurs de risque de développement de cancer du sein. Les BCRA 1 et 2 (BReast CAncer) sont 2 gènes suppresseurs de tumeurs dont les mutations sont retrouvées dans une proportion significative de cancers du sein. Les protéines BCRA1 et BCRA2 ont un rôle dans la voie de signalisation impliquée dans la réparation de l'ADN et la régulation du cycle cellulaire. D'autres gènes largement retrouvés mutés dans d'autres cancers courants sont également observés dans certains cancers du sein. Près de 30% des cancers du sein possèdent des mutations de p53 et près de 20% de PIK3. D'autres gènes sont fréquemment amplifiés dans le cancer du sein comme c-myc et ERBB2 (aussi connu sous le nom de HER2). D'autre part, l'analyse de l'expression génique globale dans les cancers du sein a montré la surexpression fréquente de certains gènes tels que Bcl-2 ou C-SRC.

3.1.2. Potentiel anti-prolifératif des polyphénols de vin rouge sur les cellules de cancer de sein.

Une équipe de recherche a testé l'effet de basses concentrations, de l'ordre de la nanomole ou de la picomole, des polyphénols de vin rouge sur la prolifération de 3 lignées différentes de cellules de cancer du sein que sont MCF-7, T47-D et MDA-MB-231, les 2 premières lignées étant hormono-sensibles tandis que la dernière ne l'est pas. Les résultats indiquent que les polyphénols même à de basses concentrations diminuent la prolifération cellulaire selon une modalité dose et temps dépendante. D'autre part, l'équipe a découvert une compétition des polyphénols pour les sites de fixation des stéroïdes, toujours pour de faibles concentrations de l'ordre de la nanomole et de la picomole, chez les lignées MCF-7 et T47-D. Comme prévu, cet effet n'a pas été retrouvé chez la lignée non hormono-sensible MDA-MB-231, ce qui tend à démontrer que l'effet anti-prolifératif des polyphénols de vin rouge ne peut être expliqué uniquement par l'interaction de ces derniers avec les récepteurs aux stéroïdes. Par ailleurs, les propriétés antioxydantes des polyphénols ont aussi été détectées pour chacune des trois lignées cellulaires avec les mêmes concentrations que celles utilisées précédemment, cet effet est du à la fois à la modification de l'effet

toxique d'H₂O₂ et à la diminution de la production d'EOA. Cette étude suggère donc que de faibles concentrations de polyphénols et donc par conséquent la consommation de vin rouge, pourrait avoir des effets anti-prolifératifs bénéfiques sur la croissance des cellules de cancer du sein (Damianaki, *et al.*, 2000).

3.1.3. Les polyphénols du vin rouge comme inhibiteurs de l'aromatase.

Les œstrogènes jouent un rôle majeur dans le développement du cancer du sein. Environ 60% des cancers pré-ménopause et 75% des post-ménopause sont des carcinomes œstrogène-dépendants. L'aromatase est l'enzyme synthétisant les œstrogènes en convertissant des androgènes à 19 atomes de carbone en stéroïdes œstrogéniques aromatiques à 18 atomes de carbone. Dans les tumeurs du sein, on observe une surexpression de l'aromatase an comparaison de tissus non cancéreux, par ailleurs, les œstrogènes produits *in-situ* ont une influence plus forte dans la croissance tumorale que les œstrogènes de la circulation. La suppression de la formation d'œstrogènes *in-situ* dans les cancers du sein post-ménopausiques par inhibition de l'aromatase constitue donc une approche de choix dans la prévention et le traitement de ce type de cancer. Des études ont enquêté sur l'activité inhibitrice du vin sur l'aromatase, ainsi, le vin rouge a montré une bien meilleure inhibition de l'aromatase que le vin blanc (Eng, *et al.*, 2002). D'autre part, l'équipe a testé une fraction de vin rouge sur l'aromatase de placenta humain ainsi que porcine et a constaté une inhibition de l'aromatase selon un mode non compétitif et dose-dépendant. L'activité inhibitrice du vin rouge a également été examinée *in-vivo*, sur des modèles de souris transgéniques chez lesquelles l'aromatase est surexprimée dans les tissus mammaires. La consommation de l'extrait de vin rouge par gavage a alors complètement supprimé l'hyperplasie induite par l'aromatase dans les glandes mammaires mais aussi dans l'ovaire et l'utérus (figure 56) et montre des effets semblables au létrozole, un inhibiteur de l'aromatase bien connu.

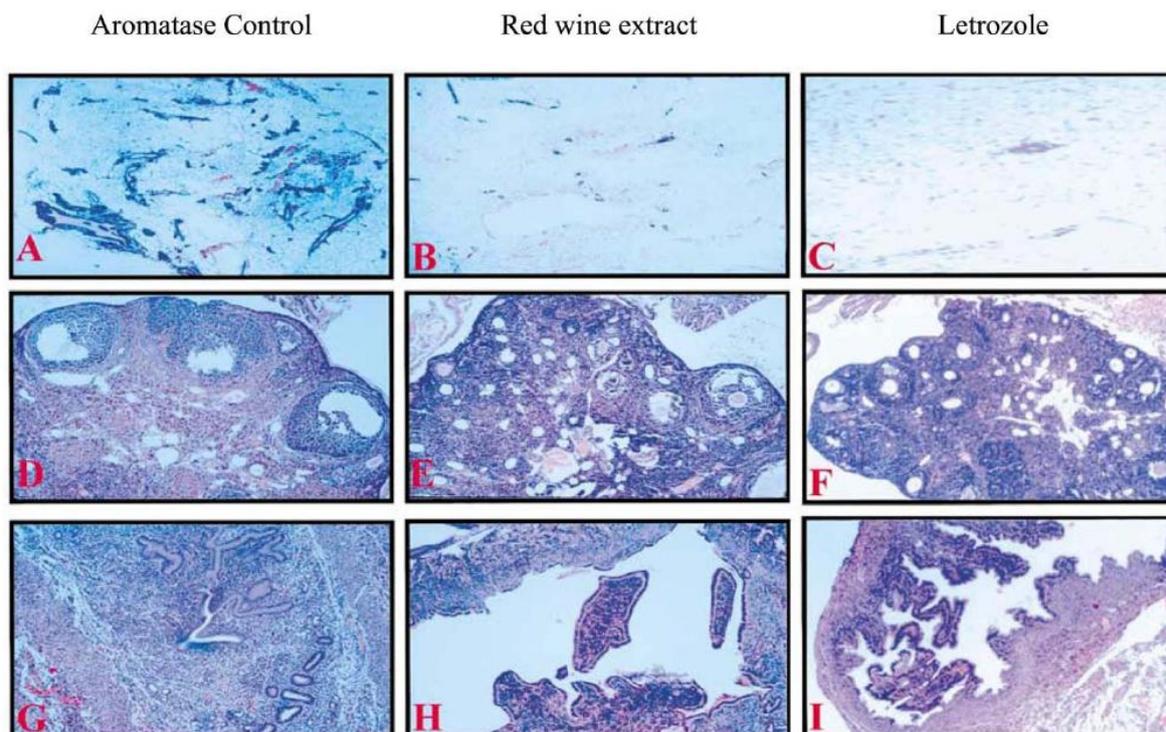


Figure 56: Inhibition de l'activité de l'aromatase par un extrait de vin rouge dans les glandes mammaires (B), l'ovaire (E) et l'utérus (H), en comparaison au groupe de contrôle (A,D,G) et des effets du Letrozole (C,F et I), un inhibiteur de l'aromatase. (Eng, et al., 2002)

Une autre étude de la même équipe s'est attachée à déterminer quels composés du vin rouge étaient responsables de l'activité inhibitrice vis-à-vis de l'aromatase. Les dimères de procyanidines B ont été identifiés comme les polyphénols impliqués dans l'inhibition de l'aromatase par le vin rouge (Eng, et al., 2003). L'analyse de l'inhibition révèle une compétition entre les dimères de procyanidine B et les substrats (androgènes) de l'aromatase pour la fixation sur cette dernière. L'efficacité *in-vivo*, des dimères de procyanidines B a été évaluée sur des modèles animaux xéno greffés avec des cellules de cancer du sein MCF-7 transfectées avec l'aromatase : les dimères ont été capables de réduire la croissance tumorale androgéno-dépendante, ce qui indique qu'il y'a eu suppression de la synthèse *in-situ* d'oestrogènes. Ces études *in-vitro* et *in-vivo* démontrent que les dimères de procyanidines de vin rouge pourraient être utilisés en prévention contre le cancer du sein (Eng, et al., 2003).

3.1.4. Cytotoxicité sélective des polyphénols de vin rouge.

Une étude menée par Hakimuddin *et al.* a testé l'hypothèse d'une cytotoxicité sélective vis-à-vis des cellules de sein cancéreuses par une modulation des niveaux de calcium cytosolique. Ces niveaux sont très faibles en conditions de repos mais vont être augmentés en réponse à des hormones ou des régulateurs de croissance, on observe alors une libération contrôlée de calcium depuis ses compartiments de stockage, par exemple le réticulum endoplasmique, provoquant alors une augmentation transitoire vers des niveaux plus élevés de calcium cytosolique. Le calcium est ensuite rapidement réabsorbé dans les compartiments de stockage par une pompe ATP-dépendante. Un accroissement des niveaux cytosoliques de calcium au-delà des niveaux d'excitation normaux mènent à la mort cellulaire. Après 10 minutes de traitement par une fraction de polyphénols de vin rouge, les cellules MCF-7 montrent une augmentation prolongée des niveaux de calcium cytosoliques aboutissant à un gonflement du réticulum endoplasmique, une dissolution du noyau, une perte de l'intégrité de la membrane plasmique et une réduction du potentiel membranaire mitochondrial. Ces cellules sont alors arrêtées en interphase G2/M. Par opposition, les cellules MCF-10A (cellules épithéliales de sein non cancéreuses) ne montrent pas de tels changements après leur traitement par la même fraction de polyphénols de vin rouge. Cette sélectivité cytotoxique vis-à-vis des cellules cancéreuses de sein (MCF-7) suggère que le relargage de calcium induit par les polyphénols pourrait perturber le fonctionnement mitochondrial et causer des dommages membranaires (Hakimuddin, *et al.*, 2006).

3.1.5. Etudes épidémiologiques, vin et cancer du sein.

Une étude de cohorte regroupant environ 70 000 femmes réalisée en 2009 fait le lien entre consommation d'alcool et risque relatif de développement de cancer du sein. Ce risque relatif est en effet augmenté chez les patientes buvant de l'alcool (dès un verre par jour), selon un mode dose dépendant, en comparaison de celles ne buvant jamais. En outre cette étude ne révèle pas de disparités majeures dans les résultats selon le choix des alcools consommés (vin, liqueurs ou bière) (Li, *et al.*, 2009). Les auteurs de cette études reconnaissent toutefois que l'effet de chaque type d'alcool était difficile à enquêter du fait d'un petit nombre de personnes reportant seulement un seul type de boisson. Une étude française de 2008 réalisée dans le

sud de la France s'est fixée comme objectif d'évaluer plus précisément les différences d'effet, selon le choix de la boisson alcoolisée, sur le risque relatif de cancer du sein, et ce en portant une attention particulière aux consommatrices de vin. Les résultats soutiennent l'hypothèse d'un seuil de consommation au-delà duquel le risque de cancer du sein augmente. D'autre part, le choix de la boisson alcoolisée semble être important, ainsi, chez les femmes ayant une consommation modérée et régulière de vin (1 verre par jour), on observe que le risque de cancer du sein décroît en comparaison des femmes ne buvant pas ou buvant occasionnellement (Bessaoud & Daurès, 2008).

3.2. Cancer du poumon et polyphénols du vin rouge.

3.2.1. Cancer du poumon : généralités.

Le cancer du poumon regroupe 2 grandes entités : le cancer bronchique non à petites cellules (CBNPC) et le cancer bronchique à petites cellules (CBPC). Les cancers bronchiques non à petites cellules (CBNPC) représentent environ 80% des cancers du poumon, les plus fréquents étant des adénocarcinomes et des carcinomes épidermoïdes. Les facteurs de risques sont principalement le tabagisme (plus de 90% des CBNPC sont liés au tabagisme actif ou passif) et l'exposition professionnelle à des produits toxiques (amiante, nickel, arsenic, cobalt, chrome, radon...). En dépit de l'utilisation de stratégies thérapeutiques agressives telles que la chimiothérapie et/ou la radiothérapie, moins de 20% des patients atteints survivent à 5 ans.

Cet état des lieux préoccupant est notamment dû à une résistance significative des CBNPC aux thérapies cytotoxiques conventionnelles, il y'a donc un besoin urgent d'identifier de nouvelles stratégies préventives et thérapeutiques efficaces.

Nous allons étudier ici l'effet des polyphénols du vin rouge sur quelques éléments clés des voies de signalisations cellulaires mutées retrouvés dans le CBNPC, ces éléments ont en partie été décrits dans le chapitre « voies de signalisation et cancers », nous allons faire ici quelques précisions sur ces derniers que sont Erk, Akt et p53 quant à leur rôle dans le CBNPC.

La voie de signalisation induite par les récepteurs de facteurs de croissance tels que l'Epidermal Growth Factor (EGF) et son récepteur (EGFR) stimule la croissance de la cellule cancéreuse ainsi que sa survie et sa résistance aux thérapies cytotoxiques. La liaison de EGF sur EGFR induit un signal de transduction incluant la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)-Akt et Ras-Erk et résultant en une prolifération cellulaire. Dans 80% des cas de CBNPC, on retrouve une expression anormale de EGFR avec un signal augmenté (Mitsudomi & Yatabe, 2010).

L'activation de PI3K par EGFR produit des 3-phosphoinositides qui vont se lier et activer la phosphoinositide-dependent kinase-1 (PDK-1) qui phosphoryle et active à son tour son substrat : la serine-thréonine kinase Akt (anciennement appelé protéine kinase B ou PKB) (Manning & Cantley, 2007). Une fois activée, Akt phosphoryle le tuberous sclerosis complex 2 (TSC2) qui active le mammalian target of rapamycin (mTOR) et la P70 S6 kinase. Cette cascade de signalisation résulte en une stimulation de la synthèse protéique, de la croissance et de la prolifération cellulaire. La version activée d'Akt phosphoryle également le facteur proapoptotique Bad (famille Bcl-2), causant sa dégradation et ayant pour conséquence une inhibition de l'apoptose. Akt est donc un proto-oncogène qui, une fois activé, permet la prolifération de la cellule cancéreuse et sa survie (Liu, *et al.*, 2009).

Erk (Extracellular signal-regulated kinase) est un membre de la famille MAPK (Mitogen-activated protein kinase) et est souvent aussi impliqué dans la prolifération et la survie cellulaire dans de nombreux cancers.

La voie de suppression des tumeurs initiée par le facteur p53 est très souvent inactivée dans les cellules cancéreuses, la résistance à la radiothérapie et à la chimiothérapie de ces dernières a été démontrée comme fortement associée à une diminution du fonctionnement de cette voie. Les thérapies cytotoxiques induisent des lésions de l'ADN et un stress cellulaire qui, en temps normal, activent plusieurs cascades de signalisations dont la voie de p53. Cette dernière est en effet phosphorylée et activée puis se lie à différentes cibles régissant l'arrêt du cycle cellulaire ou l'apoptose au détriment de la croissance incontrôlée des cellules cancéreuses (Cheng, *et al.*, 2010).

3.2.2. Effets anti-prolifératifs du vin rouge sur les cellules de CBNPC.

Une étude (Barron *et al.*, 2014) a examiné les effets du vin sur la prolifération et la survie de modèles de cellules de CBNPC ainsi que sur les éléments de signalisations cellulaires clé de ces cellules que sont AKT, p53 et Erk. La prolifération cellulaire a été évaluée en mesurant l'incorporation de la thymidine tandis que des techniques immunologiques mesuraient les taux des facteurs AKT, Erk et p53.

En premier lieu, il a été démontré que le vin rouge inhibe la prolifération et la survie de cellules de poumons cancéreuses. Des cellules cancéreuses de CBNPC mis en incubation dans des milieux avec différentes concentrations de différents vins rouges montrent en effet toutes une moindre incorporation de thymidine selon un mode dose-dépendant. Cette moindre incorporation prouve un effet antiprolifératif du vin rouge (figure 57A).

En figure 57B, on peut constater les effets des différents vins rouges sur l'incorporation des thymidines, tous inhibent la prolifération cellulaire. Une incubation contrôle a été réalisée avec de l'éthanol dans les mêmes proportions que dans le vin à 5% seul, celui-ci, ne montre aucuns effets particuliers. L'incubation avec 1.1 μ M de resvératrol seul (dose approximativement retrouvée dans le vin à 5%) ne provoque aucuns effets antiprolifératifs. D'autre part, le pouvoir anti-prolifératif du vin rouge a été comparé à 4 polyphénols déjà connus pour leurs effets sur la prolifération cellulaire cancéreuse que sont la quercétine, la catéchine, l'épicatéchine et le resvératrol (figure 57C). L'incubation avec ces composés a été réalisée avec une concentration de 50 μ M pour chacun, concentration pour laquelle ils ont déjà prouvé leurs effets (Yang, *et al.*, 2001). Il n'y a pas de différence significative d'effets anti-prolifératifs entre l'incubation au vin rouge et celles réalisées avec 50 μ M de chaque polyphénol (figure 57C). Enfin, les effets du vin rouge ont été comparés à la rapamycine (inhibiteur de mTOR) et à la metformine, 2 composés inhibant des évènements signalétiques en aval de PI3K. L'exposition à 25 nM de rapamycine et à 1 mM de metformine conduisent à des effets anti-prolifératifs à des niveaux égaux à l'incubation avec une concentration en vin rouge à 5% (figure 57D).

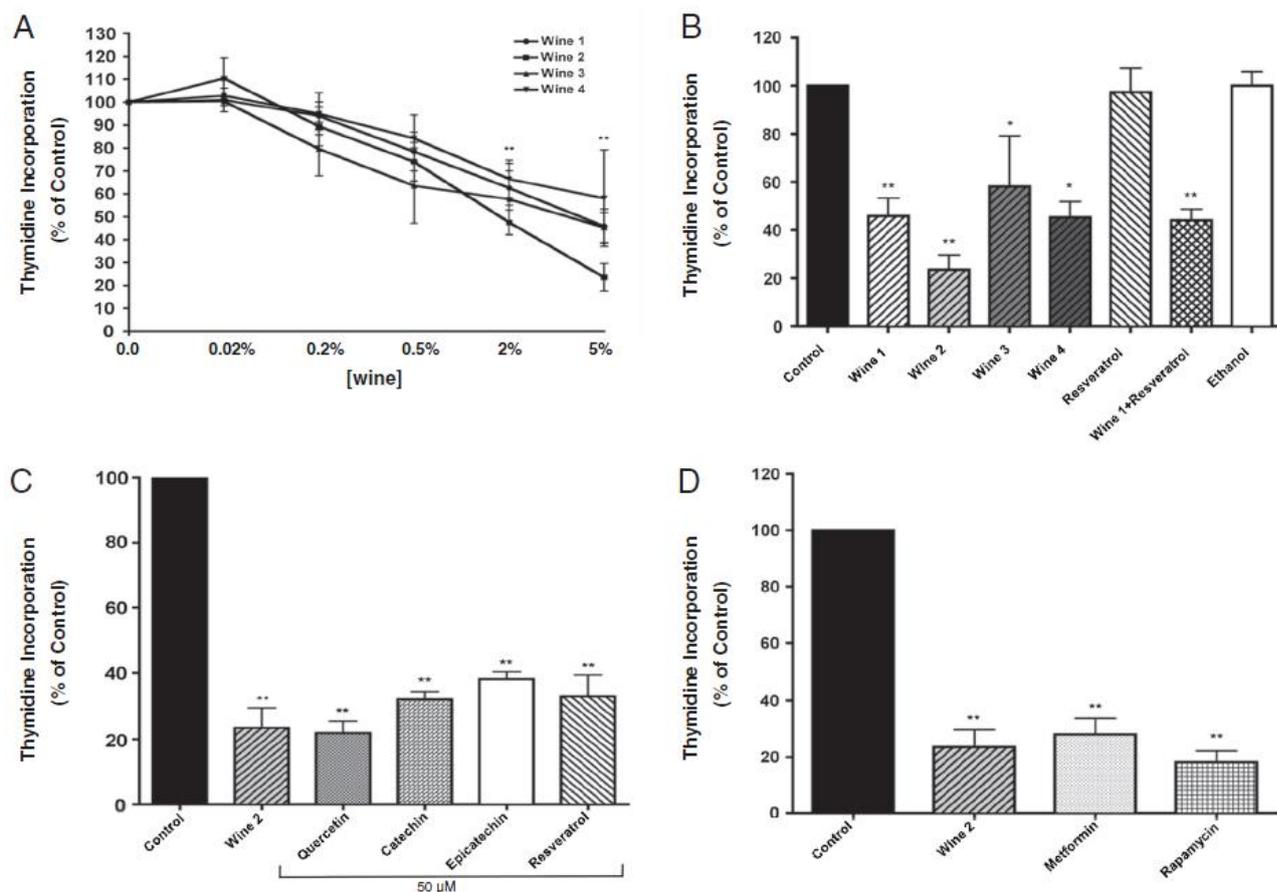


Figure 57: Effet du vin rouge sur l'incorporation de thymidine dans des cellules de CBNPC. En A, cellules incubées avec les concentrations indiquées de 4 différents vins rouges. En B, sans (contrôle) ou avec une concentration de 5% de vin rouge ou 1.1 μM de resvératrol ou éthanol seul (correspondant à la concentration d'éthanol auxquelles les cellules sont exposées dans une concentration de vin à 5%). En C, sans (contrôle) ou avec 5% de vin ou 50 μM de quercétine, de catéchine, d'épicatéchine ou de resvératrol. En D, sans (contrôle) ou avec 5% de vin, 1 mM de metformine ou 25 nM de rapamycine. Adapté de (Barron et al., 2014)

3.2.3. Akt, ERK, p53 et vin rouge.

Dans un second temps, les chercheurs ont montré que les hauts niveaux d'Akt phosphorylés (activés) retrouvés dans les cellules cancéreuses de CBNPC étaient fortement impactés par un traitement au vin rouge. La phosphorylation basale des Akt est en effet inhibée de plus de 60% sans que soit modifiés les niveaux totaux d'Akt (figure 58A). De la même manière, les cellules cancéreuses montrent de hauts niveaux de phosphorylation basale d'ERK1/2 et le vin rouge cause une diminution marquée de cette activité en la réduisant de plus de 75% (figure 58B) sans faire varier les niveaux totaux de cette enzyme. Les chercheurs ont voulu aussi tester l'effet du vin rouge sur les phosphorylations d'Akt et d'ERK1/2 stimulées par EGF. Le vin rouge abolit les phosphorylations induites par l'EGF, que ce soit sur Akt ou ERK.

Le vin rouge inhibe donc le niveau basal élevé de phosphorylation d'Akt et d'ERK retrouvé dans les cellules de CBNPC mais également les phosphorylations de ces 2 protéines stimulées par l'EGF (figure 58 C et D).

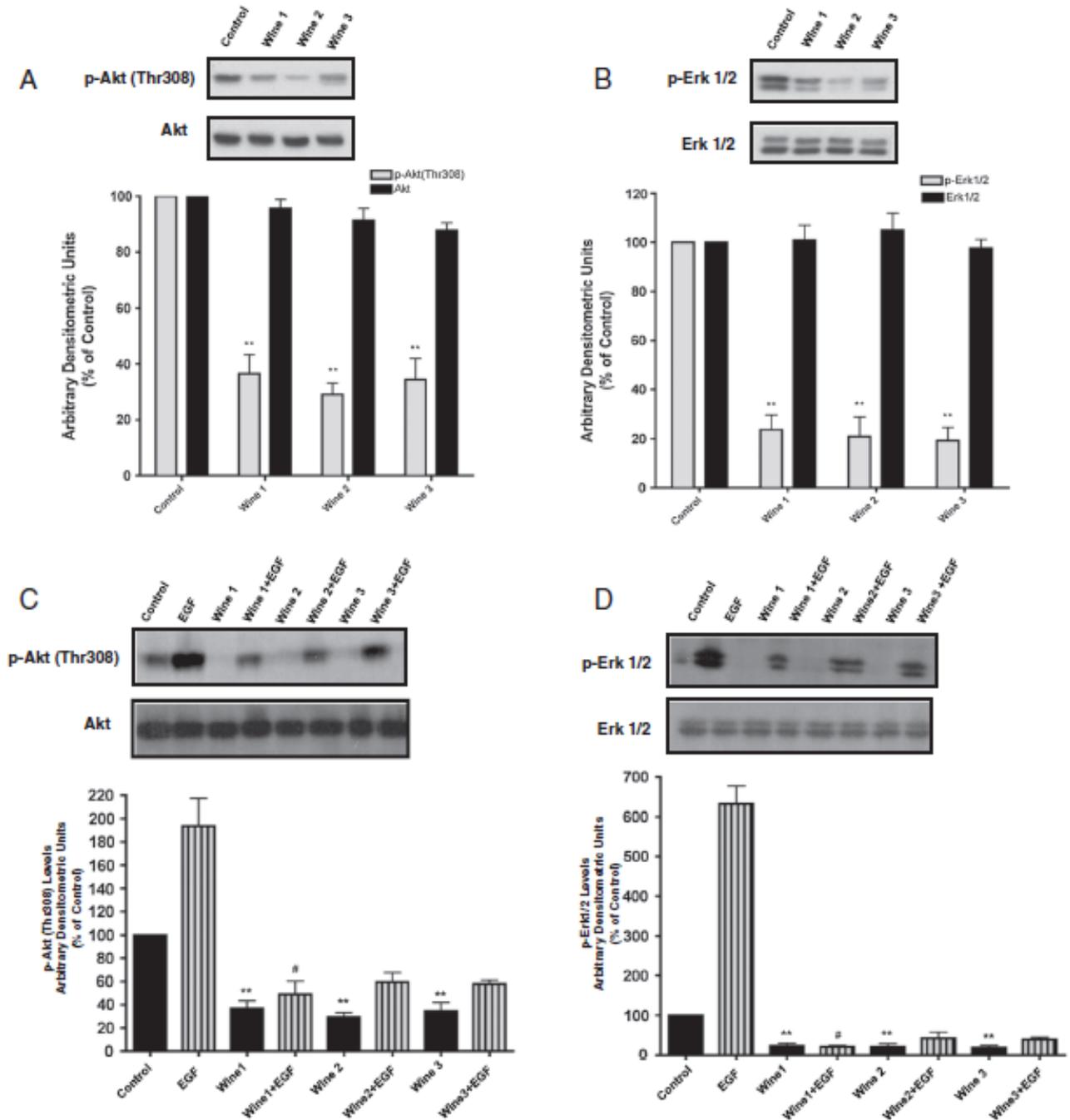


Figure 58: Effets du vin rouge sur Akt et ERK. Les cellules cancéreuses sont traitées ou non avec du vin à 5%. En C et D il y'a stimulation par 100 ng/ml d'EGF pendant 10 min avant lyse cellulaire. Le lysat cellulaire est traité par immunoblot avec anti-phospho ou anti-corps anti-Akt totaux en A et C ou anti-phospho et anticorps anti ERK totaux en B et D. Les immunoblots sont scannés pour mesurer la densité des bandes et les résultats sont retranscrits en barres. Adapté de (Barron et al., 2014).

Pour finir, l'étude a prouvé que le vin rouge augmentait à la fois les taux de p53 totaux, mais aussi les taux de p53 phosphorylés dans les cellules traitées (figure 59).

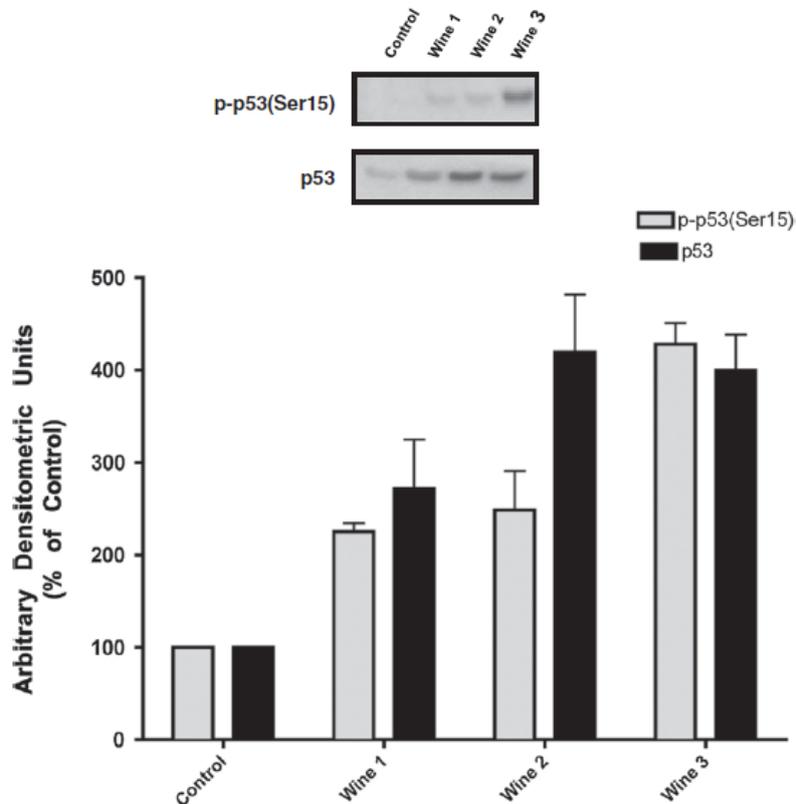


Figure 59: Effet du vin rouge sur le p53. Les modèles cellulaires ont incubé ou non avec du vin rouge à 5% pendant 24h. Les lysats cellulaires sont traités par immunoblot avec des anti-phospho ou anti-corps anti p53 totaux. Les immunoblots sont scannés pour mesurer la densité des bandes et les résultats sont retranscrits sous forme de graphe. Adapté de (Barron et al., 2014).

3.2.4. Etudes épidémiologiques, consommation de vin et cancer du poumon.

Plusieurs études épidémiologiques se sont intéressées aux effets de la consommation de différentes boissons alcoolisées sur le risque de cancers du poumon. Nous pouvons commencer par citer ici une étude danoise portant sur plus de 28 000 personnes qui, après compensation de l'âge, du tabagisme et de l'éducation, suggère un effet protecteur du vin vis-à-vis du risque de cancer du poumon, effet non retrouvé chez les buveurs de bières ou de liqueurs (Prescott, et al., 1999). Par ailleurs l'étude montre qu'il n'y aurait pas d'augmentation du risque de cancer du poumon pour des consommations d'alcools ne dépassant pas 21

verres par semaine, et ce quelque soit le type d'alcool consommé. Le risque est en revanche augmenté pour de grandes consommations de bières ou de liqueurs (Prescott, *et al.*, 1999).

En 2004, une étude espagnole a elle aussi examiné les effets de différentes boissons alcoolisées sur le cancer du poumon. L'étude regroupa 140 patients malades de cancer du poumon et 187 patients non malades et recolta leur habitudes concernant le tabac, leurs occupations ainsi que leur fréquence de consommation d'alcools et le type d'alcool consommé. Selon les chercheurs : « la consommation de vin rouge est associée à une réduction légère mais statistiquement significative du développement de cancer du poumon » (Ruano-Ravina, *et al.*, 2004).

Nous pouvons évoquer également une étude de cohorte américaine regroupant près de 85 000 hommes âgés de 45 à 69 ans qui examine les effets de la bière, du vin rouge, blanc ou rosé, ainsi que des liqueurs (Chao, *et al.*, 2008). L'étude démontre qu'il y'a un risque significativement diminué de cancer de poumon chez les fumeurs consommateurs de vin rouge. La consommation d'un verre de vin rouge par jour réduit en effet le risque de cancer du poumon d'environ 60% chez les fumeurs, cette relation est d'ailleurs légèrement plus forte chez les grands fumeurs (>20 paquets-années, soit un paquet par jour pendant 20 ans), alors qu'aucune association claire n'a été démontrée entre consommation de bière, de vin blanc, de rosé ou de liqueurs et ce même risque de cancer du poumon (Chao, *et al.*, 2008). Ces résultats viennent confirmer une étude épidémiologique de 2007 démontrant une association inverse entre la consommation modérée de vin rouge (environ 1 verre par jour) et le risque de cancer du poumon (Chao, 2007). A l'inverse, cette même étude suggère une association positive entre consommation de bière ou de liqueur et risque de cancer du poumon à hauteur d'une augmentation du risque de 20% à 30% pour un verre journalier en moyenne.

3.3. Cancer colorectal et polyphénols du vin rouge.

3.3.1. Le cancer du colon : généralités.

Le cancer colorectal ou CCR est dans 95% des cas un adénocarcinome et représente, par sa fréquence, le 3^{ème} cancer chez l'homme et le 2^{ème} chez la femme. On dénombre 40 000 nouveaux cas par an en France causant près de 17 000 décès

annuels. Bien qu'une minorité de CCR se déclarent dans un contexte héréditaire, 70% à 90% de ces derniers sont imputables à des facteurs diététiques. On sait en effet qu'une alimentation riche en calories, en lipides d'origines animales, en viandes rouges et en éthanol ainsi que certaines maladies telles que le diabète et l'obésité augmente le risque de CCR. En revanche, un régime alimentaire riche en fruits et légumes diminue ce même risque. Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin sont également des facteurs de risques du CCR en raison du stress oxydatifs qu'elles entraînent. L'épithélium intestinal est un tissu dynamique avec une capacité de régénération élevée, l'équilibre entre prolifération, différenciation et apoptose permet le maintien de l'homéostasie du tissu, tout dérèglement de cet équilibre a un rôle déterminant dans le développement du CCR. Le CCR humain est tout particulièrement associé avec une inhibition progressive de l'apoptose, mécanisme par lequel des cellules de colon possédant un ADN endommagé peuvent croître et devenir une tumeur invasive (Watson, 2004).

3.3.2. Polyphénols de vin rouge et inhibition de la croissance de cellules de carcinome de colon.

En 2002, une étude a montré que les polyphénols de vin rouge inhibent la prolifération d'une lignée cellulaire de carcinome de colon HT 19 clone 19A stimulées par l'EGF, cette inhibition étant associée à la modulation de l'activation des MAPK (mitogen activated protein kinases). La JNK 1 / 2 et la p38 MAPK sont significativement activées par les polyphénols de vin rouge, de plus, l'activation d'ERK 1 / 2 (extracellular signal regulated kinase) par l'EGF est inhibée par ces mêmes composés. L'activation de JNK 1 / 2 et de p38 MAPK ainsi que l'inhibition d'ERK 1 / 2 est typique de composés antiprolifératifs et indiquent que les polyphénols de vin rouge inhibent la prolifération de cellules de carcinome du colon par modulation de la voie de signalisation intracellulaire des MAPK (Briviba, *et al.*, 2002).

3.3.3. Polyphénols du vin rouge et régulation de l'expression génique.

En 2005, une équipe étudie l'effet des polyphénols du vin rouge sur la cancérogenèse du colon induite par des carcinogènes chimiques que sont l'AOM (azoxyméthane) et le DMH (1,2-diméthylhydrazine) chez des rats. Les polyphénols du vin rouge administrés à ces rats pendant 16 semaines inhibent d'une part la cancérogenèse du colon induite par AOM ou DMH, d'autre part, en investiguant le

profil d'expression génique induit par les polyphénols du vin rouge, l'équipe découvre la régulation négative de 5707 gènes impliqués dans de nombreuses fonctions physiologiques (métabolisme, transport, signal de transduction, signalisation intracellulaire...) (Dolara, *et al.*, 2005) (figure 60).

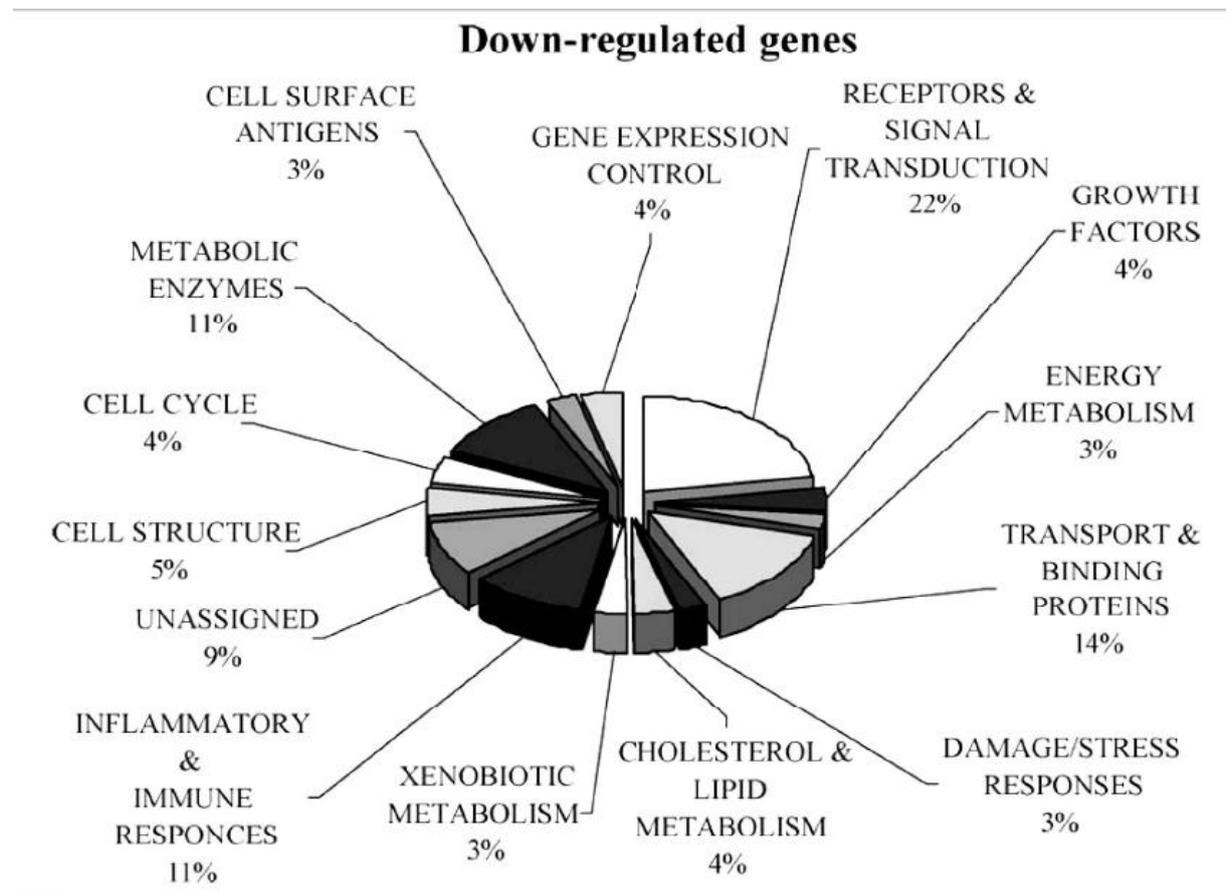


Figure 60: Diagramme des gènes régulés à la baisse après un traitement par des polyphénols de vin rouge et leur fonction. Les pourcentages indiquent la fréquence de gènes dans une classe fonctionnelle en comparaison de la quantité totale des gènes touchés par le traitement (Dolara, *et al.*, 2005).

3.3.4. Etudes des effets particuliers de certains polyphénols du vin rouge sur le CCR.

Parmi les centaines de polyphénols existant, certains ont fait l'objet d'études particulières que nous pouvons évoquer ici. Le tableau 9 reporte, de manière non exhaustive, certaines études se focalisant sur des polyphénols particuliers et recensent leur principales propriétés vis-à-vis de modèles de cellules de CCR.

Polyphénol	Type de cellule	Mécanisme cellulaire
Quercétine	HT-29, Caco-2, COLO 201, LS-174T, HCT-116, SW480.	Inhibition croissance cellulaire, activité cytotoxique, induction de l'arrêt du cycle cellulaire, de l'apoptose, ou de la différenciation, diminution de la migration cellulaire.
Resvératrol	HT-29, SW480, Caco-2, HCT-116, SW-620	Inhibition de la croissance cellulaire, induction de l'apoptose, arrêt de la prolifération, du cycle cellulaire et de la transformation néoplasique.
Myricétine	HT-29, Caco-2, SW480, T84, VACO-235, COLO 205	Inhibition de la croissance cellulaire, réduction de la prolifération, induction de l'apoptose et propriétés antimétastatiques.

Tableau 9: Mécanismes impliqués dans l'effet chimiopréventif de trois polyphénols sur des cellules de cancer colorectal (Araujo, et al., 2011).

3.3.5. Etudes épidémiologiques, consommations de vin rouge et cancer du colon et du rectum.

Les relations entre quantités et types de boissons alcoolisées et le risque de cancer du colon ou du rectum furent notamment analysées dans la population danoise lors d'une étude réalisée en 2003. Les résultats dévoilent une association significative de la consommation d'alcool avec une augmentation du risque de cancer rectal, cette relation est dose dépendante. Ce risque relatif est d'autant plus grand chez les sujets ne buvant pas de vin dans leur consommation totale d'alcool alors que le risque semble réduit chez ceux qui incluent du vin dans cette même consommation totale (Pedersen, et al., 2003). Cependant, concernant le cancer du colon, cette étude ne révèle pas d'association entre la consommation de vin et le risque de développement de ce cancer.

4. Perspectives.

4.1. Vers la « chimioprévention ».

Introduit en premier par Sporn *et al.* en 1976, le terme de chimioprévention des cancers est défini comme « l'utilisation de drogues, vitamines ou tout autres agents afin de réduire le risque de cancers ou d'en retarder le développement ou la récurrence ». Ces agents chimiopréventifs sont classés selon deux modes d'actions (Surh, 2003) (figure 61):

- Les agents bloquants qui préviennent la cancérogenèse en atteignant des cibles, en interagissant avec des macromolécules cellulaires cruciales telles que les acides nucléiques ou les protéines de signalisations cellulaires. Ils peuvent agir en inactivant ou métabolisant les agents cancérogènes mais également se comporter comme des « éboueurs » de radicaux libres, moduler l'activité enzymatique antioxydative ou encore déclencher les mécanismes de réparations de l'ADN (Surh, 2004).
- Les agents supprimeurs sont capables d'inhiber la transformation maligne de cellules initiées et d'interférer sur des étapes plus tardives de la cancérogenèse. Ils peuvent agir sur la prolifération cellulaire cancéreuse en régulant à la baisse de nombreux signaux de voies de transductions. Par ailleurs, les agents supprimeurs présentent probablement la capacité de réduire ou retarder l'acquisition des propriétés métastatiques des cellules cancéreuses en activant l'apoptose et en inhibant certains mécanismes d'angiogenèse, d'invasion et de dissémination (Landis-Piwowar & Iyer, 2014).

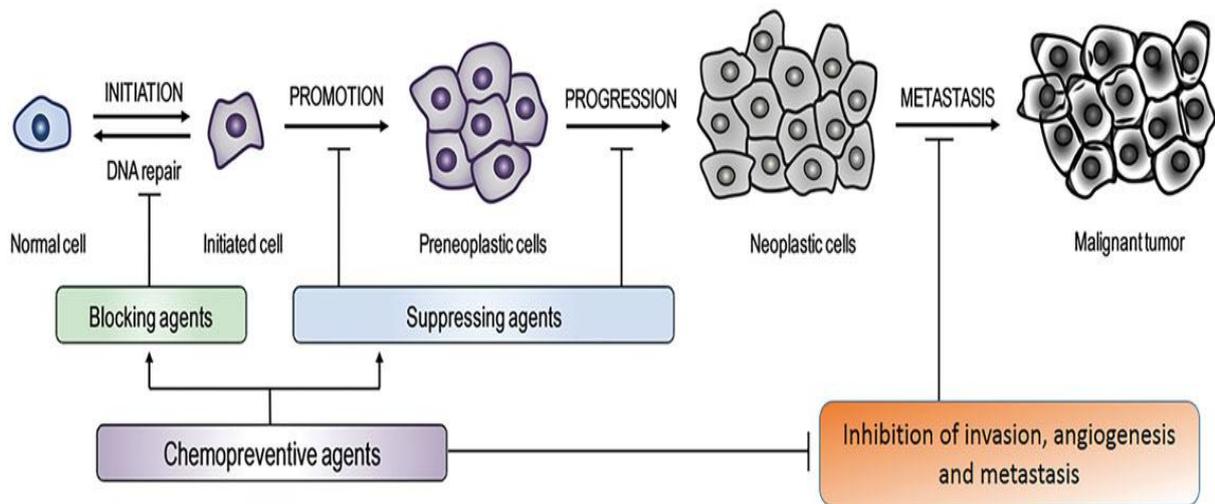


Figure 61: Les différents agents chimiopréventifs et leur sites d'actions sur les différentes étapes de la cancérogenèse.

Les polyphénols sont un groupe de composés bioactifs ayant fait l'objet de recherches considérables, notamment sur des modèles expérimentaux de cancers. De nombreux polyphénols du vin exercent une cytotoxicité différentielle avec un effet antiprolifératif préférentiel vis-à-vis des cellules cancéreuses. D'autre part, des études suggèrent que de basses incidences de cancers dans certaines populations sont liées à la consommation de certains nutriments et spécialement à des régimes riches en polyphénols. Certains polyphénols du vin tel que le resvératrol sont considérés comme de potentiels agents chimiopréventifs majeurs grâce à leurs effets pléiotropes sur plusieurs étapes de la cancérogenèse.

4.2. Un polyphénol en complément des traitements oncologiques strandarts ?

Une étude *in vitro* a montré une légère mais significative amélioration de l'effet cytotoxique de la radiothérapie sur des cellules d'hépatome de rats lorsque la quercétine est additionnée au milieu (van Rijn & van den Berg, 1997). D'autre part, une étude humaine avec administration topique et orale de quercétine a démontré une réduction des dommages de la peau pendant la radiothérapie chez des patients atteints de cancers de la tête et du cou (Rozenfel'd, *et al.*, 1990). Par ailleurs, la quercétine a également montré la capacité, que ce soit *in vitro* ou *in vivo*, d'améliorer l'efficacité thérapeutique du cisplatine. Chez des souris xénogreffées avec une tumeur humaine, un traitement intrapéritonéal constitué d'une combinaison de 20 mg/kg de quercétine et de 3 mg/kg de cisplatine mène à une réduction significative

de la croissance tumorale en comparaison de chaque composé testé séparément (Hofmann, *et al.*, 1990). Une étude *in vitro* utilisant des lignées cellulaires issues de cancer de l'endomètre et de l'ovaire confirme ces résultats, une addition de 0.01 à 10 mM de quercétine au cisplatine potentialise de 1.5 à 30 fois l'effet cytotoxique du cisplatine (Scambia, *et al.*, 1992). La quercétine, à des concentrations allant de 10 à 100 microM, a en outre fait preuve *in vitro* de sa capacité à protéger les cellules tubulaires rénales normales de la toxicité du cisplatine (Kuhlman, *et al.*, 1998). D'autres chimiothérapies classiques ont fait l'objet d'études quant à la modulation de leurs effets par la quercétine, ainsi, l'association quercétine/busulphan s'est montrée synergique contre des lignées cellulaires humaines de leucémies (Hoffman, *et al.*, 1989), tout comme l'association quercétine/adriamycine qui augmente de manière dose-dépendante la cytotoxicité par rapport à la chimiothérapie seule sur des lignées cellulaires humaines de cancer du sein multirésistantes (Scambia, *et al.*, 1994). L'augmentation de l'activité du cyclophosphamide grâce à la quercétine a également été mise en évidence *in vitro*, de même que la diminution de la résistance à la gemcitabine et au topotecan grâce à ce même composé (Sliutz, *et al.*, 1996).

4.3. La prévention ou le traitement du cancer grâce à des formulations galéniques innovantes : la nanoformulation du resvératrol.

Le resvératrol, bien connu pour ses propriétés antioxydantes, a également fait preuve de ses effets antiprolifératifs et de sa capacité à inhiber l'initiation et la promotion de cancers induits dans un large éventail de modèle tumoraux. En revanche, le resvératrol est, comme de nombreux autres polyphénols, un composé à la stabilité chimique faible et à la biodisponibilité limitée restreignant la mise en application thérapeutique de ses effets bénéfiques. Des stratégies de formulations innovantes capables de compenser les limites physico-chimiques et pharmacocinétiques de ce composé via l'utilisation de supports appropriés capables d'associer libération contrôlée et protection du dit composé sont à l'étude et, dans ce contexte, les nanotechnologies prennent toute leur place. La nanotechnologie utilise des particules de moins de 1000 nm et est couramment employée en oncologie, que ce soit pour les diagnostics, l'imagerie ou les thérapies. Les nanodispositifs utilisés sont des polymères biocompatibles et biodégradables permettant la lente délivrance de composés encapsulés (figure 62). En comparaison de la délivrance

orale de resvératrol, les nanodispositifs permettent une amélioration de la solubilité aqueuse, une meilleure biodisponibilité, une stabilité physico-chimique augmentée, un ciblage facilité du tractus gastro-intestinal, une libération contrôlée et prolongée de la drogue et une minimisation des effets secondaires.

Parmi les expériences de nanoformulation du resvératrol, nous pouvons citer l'étude *in vitro* de Mohan *et al.* Cette étude explore le potentiel thérapeutique synergique de l'association du 5-fluoro-uracile avec le resvératrol en utilisant comme véhicules des nanoliposomes Pegylés. Cette co-encapsulation, testée sur des lignées cellulaires de cancer de la tête et du cou, améliore l'effet cytotoxique par rapport à l'association des deux drogues libres *in vitro* (Mohan, *et al.*, 2014). Jung *et al* ont quant à eux chargé le resvératrol dans des nanoparticules de PEG-PLA (polyethylene glycol-poly(lactic acid)) et testent ce conjugué sur des cellules de colon cancéreuses CT26. Le nombre de ces dernières diminue, de même que leur capacité de formation de colonies. Une amélioration de la survie avec retard de la croissance tumorale est également observée *in vivo* chez des souris porteuses de tumeurs (Jung, *et al.*, 2014). Une autre étude a incorporé le resvératrol dans des nanoparticules de lipides et en investigate les effets contre les dommages induits par le condensat de fumée de cigarette dans les cellules épithéliales bronchiques. L'action chimiopréventive de cette formulation a été évaluée par sa capacité à contrecarrer la fragmentation de l'ADN induite par le condensat dans les cellules épithéliales bronchiques et à activer l'apoptose protectrice dans ces mêmes cellules. Les nanoparticules testées diminuent bel et bien la cytotoxicité induite par le condensat de fumée de cigarette (Pulliero, *et al.*, 2015).

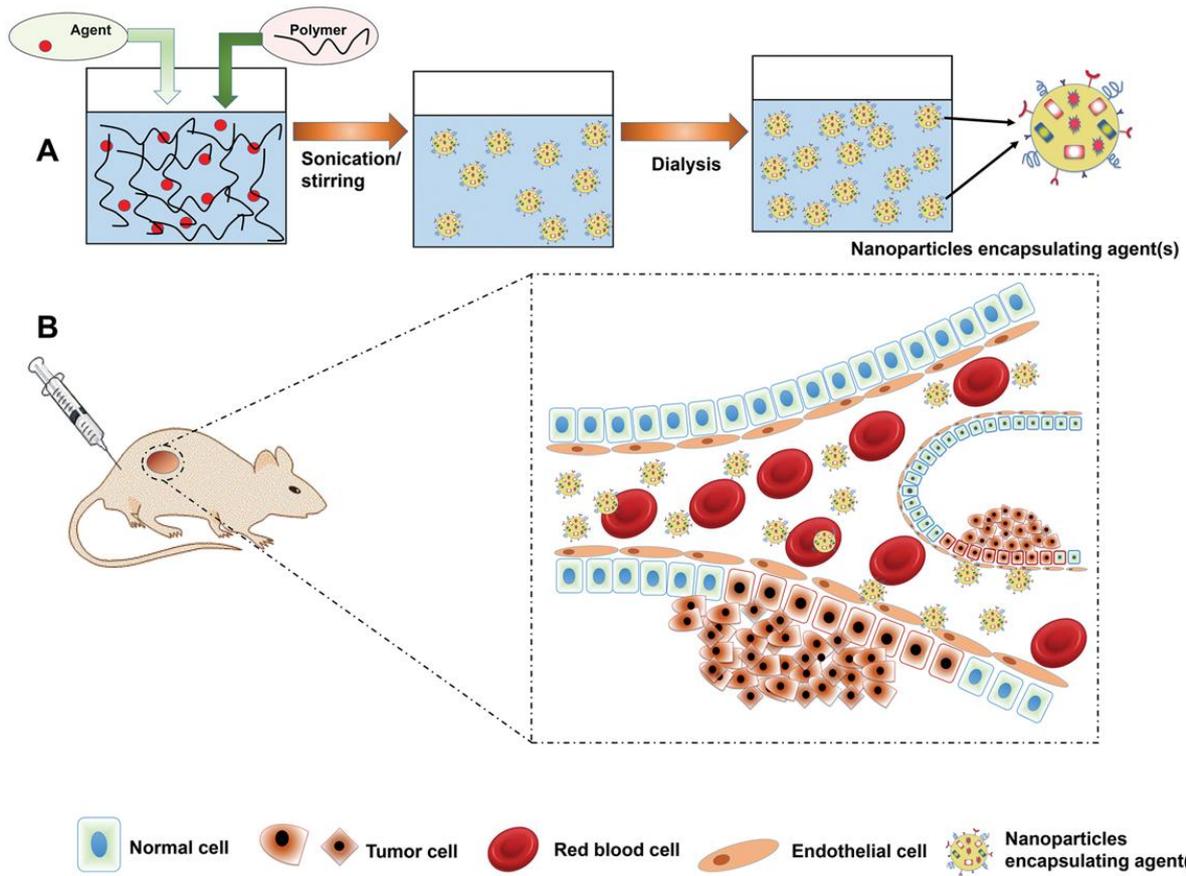


Figure 62: *Principes de la nanoformulation dans le traitement des cancers. A : Représentation schématiques des étapes de synthèses des nanoparticules. B : Le tissu tumoral et très perméable et l'infiltration des nanoparticules est facilitée, celles-ci circulent librement une fois entrées dans la circulation sanguine et atteignent alors ces tissus tumoraux ou elles peuvent relarguer la drogue encapsulée (Siddiqui, et al., 2015).*

CONCLUSION

Lors de ces dernières années, de nombreuses études se sont employées à décrire la potentielle activité de chimioprévention cancéreuse des polyphénols du vin rouge. Ces derniers ont alors montré la capacité de bloquer la cancérogenèse, d'inhiber la croissance tumorale que ce soit *in vitro* ou *in vivo*, ces effets étant attribués à de multiples mécanismes biochimiques incluant par exemple une apoptose améliorée, l'arrêt du cycle cellulaire et la modulation des signaux de voies de transductions ou de l'expression génique. Ces formidables propriétés, auxquelles il faut bien sûr ajouter le pouvoir anti-oxydant, font des polyphénols du vin rouge de parfaits candidats à la prévention des cancers ou chimioprévention, option qui semble être viable dans le contrôle de cette maladie.

Les recherches futures devront préciser les modalités de cette chimioprévention en désignant les polyphénols les plus bénéfiques, en identifiant leurs métabolites actifs ainsi que les doses efficaces et éventuellement en proposant des formulations galéniques innovantes permettant une administration contrôlée pouvant prétendre à une place dans une stratégie thérapeutique au côté des thérapies conventionnelles.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abd El Mohsen, M., Kuhnle, G., Rechner, A., Schroeter, H., Rose, S., Jenner, P., et al. (2002). Uptake and metabolism of epicatechin and its access to the brain after oral ingestion. *Free Radic Biol Med*, 33 , 1693-1702.
- Ahmad, N., Adhami, V., Afaq, F., Feyes, D., & Mukhtar, H. (2001). *Clinical Cancer Research* 7 . 1466-1473.
- Alkhalaf, M. (2007). *Pharmacology*, 80. 134-143.
- Alluis, B., & Dangles, O. (2001). Quercetin glycosides and sulfates: chemical synthesis, complexation and antioxydant properties. *Helv chim Acta*, 84 , pp. 1133-1156.
- Alvarez, Real, Pérez, Mendoza, Prieto, & Merino. (2010). Modulation of the activity of ABC transporters (p-glycoprotein, MRP2, BCRP) by flavonoïds and drug response. *J.Pharm.Sci*,99,598-617 .
- Anné, S., Agarwal, R., Nair, M., Schwartz, S., Ballow, M., Kandaswami, C., et al. (1994). Inhibition of endotoxin-induced expression of intercellular adhesion molecule-1 and of leukocyte adhesion to endothelial cells by the plant flavonoid quercetin. *J Allergy Clin Immunol* 93: 276 .
- Ansell, B., Watson, K., Fogelman, A., & al. (2005). High-density lipoprotein function. Recent advances. *J. Am. Coll. Cardiol*; 46 , 1792-1798.
- Araujo, J., Gonçalves, P., & Martel, F. (2011). Chemopreventive effect of dietary polyphenols in colorectal cancer cell lines. *Nutrition Research* 31 , 77-87.
- Aura, Martin-Lopez, O'Leary, williamson, Oksman-Caldentey, Poutanen, et al. (2005). In vitro metabolism of anthocyanins by human gut microflora. *Eur. J Nutr.*44:133-42 .
- Avila, M., Velasco, J., cansado, J., & Notario, V. (1994). Quercetin mediates the down-regulation of mutant p53 in the human breast cancer cell line MDA-MB468. *Cancer Res.*54 , 2424-2428.
- Barron, C., Moore, J., Tsakiridis, T., Pickering, G., & Tsiani, E. (2014). Inhibition of human lung cancer cell proliferation and survival by wine. *Cancer Cell international*,14:6 .
- Benitez, D., Pozo-Guisado, E., Clementi, M., Castellon, E., & Fernandez-Salguero, P. (2007). *British Journal of Cancer* 96 , 1595-1604.
- Berke, B., Chèze, C., Vercauteren, J., & Deffieux, G. (1998). Bisulfite addition to anthocyanins: revisited structures of colourless adducts. *Tetrahedron Lett*,39 , pp. 5771-5774.
- Berké, b., Vauzour, D., Castagnino, C., Arnaudinaud, V., Nay, B., Chèze, C., et al. (2003). Vin et santé: découvertes récentes. *j.Pharm.Belg* 58(3) , pp. 57-74.

- Bessaoud, F., & Daurès, J. (2008). Patterns of alcohol (especially wine) consumption and breast cancer risk: a case-control study among a population in southern France. *Ann. Epidemiol*; 18 , 467-475.
- Bhardwaj, A., Sethi, G., Vadhan-Raj, S., Bueso-Ramos, C., Takada, Y., Gaur, U., et al. (2007). *Blood* 109 , 2293-2302.
- Bitsch, R., Netzel, M., Frank, T., Strass, G., & Bitsch, I. (2004). *J.Biomed.Biotechnol*,5 , p. 293.
- Boldin, M., Varfolomeev, E., Pancer, Z., Mett, I., Camonis, J., & Wallach, D. (1995). A novel protein that interacts with the death domain of Fas/APO1 contains a sequence motif related to the death domain. . *J Biol Chem* 270: 7795-8 .
- Bordwell, F., & Cheng, J. (1991). Substituent effects on the stabilities of phenoxy radicals and the acidities of the phenoxy radical cations. *J Am Chem Soc*, 113 , pp. 1736-1743.
- Bors, W., & Michel, C. (1999). Antioxydant capacity of flavanols and gallate esters: pulse radiolysis studies. *Free Radic Biol Med*,27 , pp. 1413-1426.
- Bors, W., Michel, C., & Schikora, S. (1995). Interaction of flavonoids with ascorbate and determination of their univalent redox potentials: u pulse radiolysis study. *Free radic Biol Med*, 19 , pp. 45-52.
- Boulton, D., Walle, U., & Walle, T. (1998). Extensive binding of the bioflavonoid quercetin to human plasma proteins. *J Pharm Pharmacol*, 50 , 243-249.
- Boutros, T., Chevet, E., & Metrakos, P. (2008). Mitogen-activated protein (MAP) kinase/MAP kinase phosphatase regulation: roles in cell growth, death, and cancer. *Pharmacol Rev*; 60: 261-310 .
- Bracke, M., Castronovo, V., Van Cauwenberge, R., Coopman, P., Vakaet, L. J., Strojny, P., et al. (1987). The antiinvasive flavonoid (+)-catechin binds to laminin and abrogates the effect of laminin on cell morphology and adhesion. *Exp Cell Res* 173(1) , 193-205.
- Briviba, K., Pan, L., & Rechkemmer, G. (2002). Red wine polyphenols inhibit the growth of colon carcinoma cells and modulate the activation pattern of mitogen-activated protein kinases. *J.Nutr* 132 , 2814-2818.
- Brouillard, R., & Dubois, J. (1977). Mechanism of the structural transformations of anthocyanins in acidic media. *J Am Chem Soc*, 99 , pp. 1359-1364.
- Brouillard, R., & Lang, J. (1990). The hemiacetal-cis-chalcone equilibrium of malvin, a natural anthocyanin. *Canadian Journal of Chemistry*, 68 , pp. 755-761.
- Brouillard, R., Mazza, G., Saad, Z., Albrecht-Gary, A., & Cheminat, A. (1989). The copigmentation reaction of anthocyanins: a microprobe for the structural study of aqueous solution. *J Am Chem Soc*, 111 , pp. 2604-2610.
- Brunet, M., Bladé, C., Salvado, M., & Arola, L. (2002). Human Apo A-I and rat transferrin are the principal plasma proteins that bind wine catechins. *J Agric Food Chem*, 50 , pp. 2708-2712.

- Cao, D., Fu, Z., Wang, F., Liu, H., & Han, R. (2005). *Journal Of Asian Natural Products Research* 7 , 205-213.
- Cao, Muccitelli, Sanchez-Moreno, & Prior. (2001). Anthocyanins are absorbed in glycosylated forms in elderly women: a pharmacokinetic study. *Am. J Clin Nutr.*73:920-6 .
- Castillo, M., Perkins, E., Campbell, J., Doerr, R., Hassett, J., Kandaswami, C., et al. (1989). The effect of the bioflavonoids quercetin on squamous cell carcinoma of head and neck origin. *Am J Surgery* 158 , 351-355.
- Chao, C. (2007). Association between beer, wine and liquor consumption and lung cancer risk: a meta-analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*;16(11) , 2439-2447.
- Chao, C., Slezak, J., Caan, B., & Quinn, V. (2008). Alcoholic beverage intake and risk of lung cancer: the California Men's health study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 17(10) , 2692-2699.
- Cheng, F., Wang, W., & El-Deiry, W. (2010). Current strategies to target p53 in cancer. *Biochem Pharmacol*, 80(5) , 724-730.
- Cooke, M., Evans, M., Dizdaroglu, M., & Lunec, J. (2003). Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation and disease. *FASEB J*;17 , 1195-1214.
- Cornard, J., Boudet, A., & Merlin, J. (2001). Complexation of Al(III) with 3',4'-dihydroxyflavone: characterization, theoretical and spectroscopic study. *Spectrochim Acta A*, 57 , pp. 591-602.
- Criqui, M., & Ringel, B. (1994). Does diet or alcohol consumption explain the french Paradox? *The Lancet* .
- Damianaki, A., Bakogeorgou, E., Kampa, M., Notas, G., Hatzoglou, A., Panagiotou, S., et al. (2000). Potent inhibitory action of red wine polyphenols on human breast cancer cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 78 , 429-441.
- Dangles, O., & Brouillard, R. (1992). Anthocyanin copigmentation: thermodynamic data from temperature variation and relaxation kinetics. Medium effect. *Can J Chem*, 70 , pp. 2174-2189.
- Dangles, O., & Dufour, C. (2008). *Recent advances in polyphenol research*.
- Dangles, O., Dufour, C., & Bret, S. (1999). Flavonol-serum albumin complexation. Two electron oxidation of flavonols and their complexes with serum albumin. *J Chem Soc, Perkin Trans II*, 4 , pp. 737-744.
- Dangles, O., Dufour, C., Manach, C., Morand, C., & Remesy, C. (2001). Binding of flavonoids to plasma proteins. *Methods Enzymol*, 335 , 319-333.
- Dangles, O., Fargeix, G., & Dufour, C. (2000). Antioxydant properties of anthocyanins and tannins: a mechanistic investigation with catechin and the 3', 4', 7-trihydroxyflavylium ion. *J Chem soc, Perkin Trans 2* , pp. 1653-1663.

- Das, S., Lin, H., Ho, P., & Ng, K. (2008). The impact of aqueous solubility and dose on the pharmacokinetic profiles of resveratrol. *Pharm Res*(25)11:2593-600 .
- Day, A., DuPont, M., Ridley, S., Rhodes, M., Rhodes, M., Morgan, M., et al. (1998). Deglycosylation of flavonoid and isoflavonoids glycosides by human small intestine and liver-glucosidase activity. *FEBS Letter*, 436 , pp. 71-75.
- Day, A., Mellon, F., Barron, D., Sarrazin, G., Morgan, M., & Williamson, G. (2001). *Free Radical Res*, 35, 941 .
- de la Lastra, C., & Villegas, I. (2005). *Molecular Nutrition & Food Research* 49 , 405-430.
- De Santi, C., Pietrabissa, A., Spisni, R., Mosca, F., & Pacifici, G. (2000). Sulphation of resveratrol, a natural product present in grapes and wine, in the human liver and duodenum. *Xenobiotical* 30(6):609-17 .
- Delattre, J., Beaudoux, J., & Bonnefont-Rousselot, D. (2005). *Radicaux libres et stress oxydant, aspects biologiques et pathologiques*. Paris: tec et doc, Lavoisier, 547 pages.
- Delmas, D., Rebe, C., Lacour, S., Filomenko, R., Athias, A., Gambert, P., et al. (2003). Resveratrol-induced apoptosis is associated with Fas redistribution in the rafts and the formation of a death-inducing signaling complex in colon cancer cells. *J Biol Chem* 278(42): 41482-90 .
- Dolara, P., Luceri, C., De Filippo, C., Femia, A., Giovanelli, L., Caderni, G., et al. (2005). Red wine polyphenols influence carcinogenesis, intestinal microflora, oxidative damage and gene expression profiles of colonic mucosa F344 rats. *Mutat.Res.* 591 , 237-246.
- Donovan, Crespy, Manach, Morand, Besson, Scalbert, et al. (2001). Catechin is metabolized by both the small intestine and liver of rats. *J. Nutr*;131:1753-7 .
- Donovan, J., Bell, J., Kasim-Karakas, S., German, J., Walzem, R., Hansen, R., et al. (1999). *J. Nutr.* 129 , p. 1662.
- Donovan, J., Kasim-Karakas, S., German, J., & Waterhouse, A. (2002). *Br.J.Nutr.* 87 , p. 31.
- Dragoni, S., Gee, J., Bennett, R., Valoti, M., & Sgaragli, G. (2006). Red wine alcohol promotes quercetin absorption and directs its metabolism towards isorhamnetin and tamarixetin in rat intestine in vitro. *Br J Pharmacol.* 147:765-71 .
- Eng, E., Williams, D., Mandava, U., Kirma, N., Tekmal, R., & Chen, S. (2002). Anti-aromatase chemicals in red wine. *Ann N.Y. Acad. Sci*, 963 , 239-246.
- Eng, E., Ye, J., Williams, D., Phung, S., Moore, R., Young, M., et al. (2003). Suppression of estrogen biosynthesis by procyanidine dimers in red wine end grape seeds. *Cancer Research* 63 , 8516-8522.
- Es-Safi, N., Fulcrand, H., Cheynier, V., & Moutounet, M. (1999). Competition between (+)-catechin and (-)-epicatechin in acetaldehyde induced polymerization of flavanols. *J agric Food Chem*, 47 , pp. 2088-2095.

- Ferry, D., Smith, A., Malkhandi, J., Fyfe, D., deTakats, P., Anderson, D., et al. (1996). Phase I clinical trial of the flavonoid quercetin: pharmacokinetics and evidence for in-vivo tyrosine kinase inhibition. *Clin Cancer Res* 2 , 659-668.
- Fontecave, M., Lepoivre, M., Elleingand, E., Gerez, C., & Guittet, O. (1998). *FEBS letters* 421 , 277-279.
- Forester, & Waterhouse. (2008). Identification of cabernet sauvignon anthocyanin gut microflora metabolites. *J Agric Food Chem*.56:9299-304 .
- Fougère-Rifot, M., Park, H., & Bouard, J. (1997). Ontogénèse du péricarpe de la baie de *Vitis vinifera* L. var Merlot de la fécondation à la maturité. *J. Int. Sci. Vigne Vin*, 31, , 109-118.
- Fulda, S., & Debatin, K. (2005). *European Journal of Cancer*, 41 , 786-798.
- Gamet-Payrastre, L., Manenti, S., Gratacap, M., Thulliez, J., Chap, H., & Payrastre, B. (1999). Flavonoïds and the inhibition of PKC and PI3-kinase. *Gen Pharmacol* 32 , 279-286.
- Gamet-Payrastre, L., Manenti, S., Gratacap, M., Tulliez, J., Chap, H., & Payrastre, B. (1999). Flavonoids and the inhibition of PKC and PI3-kinase. *General Pharmacol*, 32 , pp. 279-286.
- Garvin, S., Ollinger, K., & Dabrosin, C. (2006). *Cancer Letters* 231 , 113-122.
- Gester, S., Wuest, F., Pawelke, B., Bergmann, R., & Pietzsch, J. (2005). Synthesis and biodistribution of an F-18-labelled resveratrol derivative for small animal positron emission tomography. *Amino acids* 29:415-28 .
- Glories, Y. (1984). La couleur des vins rouges. I - Les équilibres des anthocyanes et des tanins. *Connaissance de la Vigne et du Vin* 18 , pp. (3):195-217.
- Glossmann, H., Presek, P., & Eigenbrodt, E. (1981). Quercetin inhibits tyrosin phosphorylation by the cyclic nucleotide-independent, transforming protein kinase, pp60src. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 217 , 100-102.
- Goldberg, D., Yan, J., & Soleas, G. (2003). Absorption of three wine related polyphenols in three different matrices by healthy subjects. *ClinBiochem*.36 , pp. 79-87.
- Gonthier, Cheyner, & Donovan. (2003). Microbial aromatic acid metabolites formed in the gut account for a major fraction of polyphenols excreted in urine of rats fed red wine polyphenols. *J Nutr*;133:461-7 .
- Gonthier, Remesy, Scalbert, Cheyner, Souquet, Poutanen, et al. (2006). Microbial metabolism of caffeic acid and its esters chlorogenic and caftaric acids by human faecal microbiota in vitro. *Biomed Pharmacother*;60:536,40 .
- Gronbaek, M., Becker, U., Johansen, D., Gottschau, A., Schnohr, P., Hein, H., et al. (2000). Type of alcohol consumed and mortality of all causes, coronary heart disease, and cancer. *Ann.Intern.Med*;133 , 411-419.
- Groupy, T., Dufour, C., Loonis, M., & Dangles, O. (2003). A quantitative kinetic analysis of hydrogen tranfert reactions from dietary polyphenols to the DPPH radical. *J Agric Food Chem*,51 , pp. 615-622.

- Guyot, S., Vercauteren, J., & Cheynier, V. (1996). Structural determination of colourless and yellow dimers resulting from (+)-catechin coupling catalysed by grape polyphenoloxidase. *Phytochemistry*, *42*, pp. 1279-1288.
- Hakimuddin, F., Paliyath, G., & Meckling, K. (2006). Treatment of MCF-7 breast cancer cells with red grape wine polyphenol fraction results in disruption of calcium homeostasis and cell cycle arrest causing selective cytotoxicity. *J. Agric. Food Chem*, *54*, 7912-7923.
- Haleng, J., Pincemail, J., Defraigne, J., Charlier, C., & Chapelle, J. (2007). Le stress oxydant. *Rev Med Liege*; *62*:10, pp. 628-638.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, Vol. *100*, 57-70.
- Hansen, R., Oesterreich, S., Lemieux, P., & al, e. (1997). Quercetin inhibits heat shock protein induction but not heat shock factor DNA-binding in human breast carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun*: *239*, 851-856.
- Hapiot, P., Neudeck, A., Pinson, J., Fulcrand, H., Neta, P., & Rolando, C. (1996). Oxidation of caffeic acid and related hydroxycinnamic acid. *J Electroanal Chem*, *405*, pp. 169-176.
- Harada, Kan, Naoki, Fukui, Kageyama, Nakai, et al. (1999). Identification of the major antioxidative metabolites in biological fluids of the rats with ingested (+)-catechin and (-)-epicatechin. *Biosci. Biotechnol. Biochem*; *63*:973-7.
- Havsteen, B. (2002). The biochemistry and medical significance of flavonoids. *Pharmacol therap*, *96*, pp. 67-202.
- He, J., Magnuson, B., & Giusti, M. (2005). Analysis of anthocyanins in rat intestinal contents: impact of anthocyanin chemical structure on fecal excretion. *J Agric Food Chem*; *53*:2859-66.
- Heim, K., Tagliaferro, A., & Bobilya, D. (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationship. *Journal of Nutritional Biochemistry*. *13*, 572-584.
- Henry-Vitrac, C., Desmoulière, A., Girard, D., Merillon, J., & Krisa, S. (2006). Transport, deglycosylation, and metabolism of trans-piceid by small intestinal epithelial cells. *Eur. J. Nutr.* *45*(7): 376-82.
- Hoffman, R., Graham, L., & Newlands, E. (1989). Enhanced anti-proliferative action of busulphan by quercetin on the human leukaemia cell line K562. *Br J Cancer*: *59*, 347-348.
- Hofmann, J., Fiebig, H., Winterhalter, B., & al., e. (1990). Enhancement of the antiproliferative activity of cis-diamminedichloroplatinum(II) by quercetin. *Int J Cancer*: *45*, 536-539.
- Hofmann, K., Bucher, P., & Tschopp, J. (1997). The CARD domain: a new apoptotic signalling motif. *Trends Biochem Sci* *22*: 155-6. *Trends Biochem Sci* *22*: 155-6.
- Hollman, P., DeVries, J., Vanleeuwen, S., Mengelers, M., & Katan, M. (1995). Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers. *AM J Clin Nutr*, *62*, pp. 1276-1282.

- Hosokawa, N., Hirayoshi, K., Nakai, A., Hosokawa, Y., Marui, N., Yoshida, M., et al. (1990). Flavonoids inhibit the expression of heat shock proteins. *Cell Struct Funct* 15 , 393-401.
- Hung, L., Lin, Y., Huang, Z., & Fang, J. (2008). Delivery of resveratrol, a red wine polyphenol, from solutions and hydrogels via the skin. *Bio. Parm. Bull* 31(5):955-62 .
- Jeandet, P., Bessis, R., & Gauteron, B. (1991). Production of resveratrol by grape berries in different development stages. *Am. J. Enol. Vitic.*, 42 , 41-49.
- Juan, M., Buenafuente, J., Casals, I., & Planas, J. (2002). Plasmatic levels of trans-resveratrol in rats. *Food res intern.*35:195 , p. 9.
- Jung, K., & al. (2014). Resveratrol-loaded polymeric nanoparticles suppress glucose metabolism and tumor growth in vitro and in vivo. . *Int. J. Pharm.* 478 , 251-257.
- Kaldas, & Walle. (2003). Resveratrol transport and metabolism by human intestinal Caco-2 cells. *J.Pharm.Pharmacol*,55,307-312.
- Karnoub, A., & Weinberg, R. (2008). Ras oncogenes: split personalities. *Nat Rev Mol Cell Biol*; 9:517-31 .
- Kern, Bennett, Needs, Mellon, Kroon, & Garcia-Conesa. (2003). Characterization of metabolites of hydroxycinnamates in the in vitro model of human small intestine epithelium Caco-2 cells. *J Agric Food Chem*;51:7884-91 .
- Kim, A., Zhu, Y., Zhu, H., Han, L., Kopelovich, L., Bickers, D., et al. (2006). *Experimental Dermatology* 15 , 538-546.
- Kim, D.-H., Jung, E.-A., Sohng, I.-S., Han, J.-A., Kim, T.-H., & Han, M. (1998). Intestinal bacterial metabolism of flavonoids and its relation to some biological activities. *Arch Pharm Res*,21 , 17-23.
- Kim, S., Lee, M., Hong, J., Li, C., Smith, T., Yang, G., et al. (2000). Plasma and tissue levels of tea catechins in rats and mice during chronic consumption of green tea polyphenols. *Nutr Cancer*, 37 , 41-48.
- Kioka, M., Hosokawa, N., Komano, T., Hirayoshi, K., Nagata, K., & Ueda, K. (1992). Quercetin, a bioflavonoid, inhibits the increase of human multidrug resistance gene (MDR1) expression caused by arsenite. *FEBS Lett* 301 , 307-309.
- Klatsky, A. L., Friedman, G. D., Armstrong, M. A., & Kipp, H. (2003, march 25). Wine, liquor, Beer and mortality. *American journal of epidemiology* 158 , pp. 585-595.
- Koishi, M., Hosokawa, N., Sato, M., & al, e. (1992). Quercetin, an inhibitor of heat shock protein synthesis inhibits the acquisition of thermotolerance in a human colon carcinoma cell line. *Jpn J Cancer Research*:83 , 1216-1222.
- Kolesnick, R. (2002). *The Journal Of Clinical Investigation* 110 , 3-8.
- Konishi, Y., & Kobayashi, S. (2003). Microbial metabolites of ingested caffeic acid are absorbed by the monocarboxylic acid transporter (mct) in intestinal Caco-2 cells monolayers. *Biosci Biotechnol Biochem*; 67:2317-24 .

- Konishi, Y., Hitomi, Y., & Yoshioka, E. (2004). Intestinal absorption of p-coumaric and gallic acids in rats after oral administration. *J Agric Food Chem*;52:2527-32.
- Kuhlman, M., Horsch, E., Burkhardt, G., & al., e. (1998). Reduction of cisplatin toxicity in cultured renal tubular cells by the bioflavonoid quercetin. *Arch Toxicol*:72 , 536-540.
- Kuhnle, G., Spencer, J., Chowrimootoo, G., Schroeter, H., Debnam, E., Srai, S., et al. (2000). Resveratrol is absorbed in the small intestine as resveratrol glucuronide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*272(1)212-7 .
- Kundu, J., Shin, Y., & Surh, Y. (2006). *Biochemical Pharmacology* 72 , 1506-1515.
- Kundu, J., Shin, Y., Kim, S., & Surh, Y. (2006). *Carcinogenesis* 27 , 1465-1474.
- Lancon, A., Delmas, D., Osman, H., Thenot, J., Jannin, B., & Latruffe, N. (2004). Human hepatic cell uptake of resveratrol: involvement of both passive diffusion and carrier-mediated process. *Biochem. Biophys Res. Commun* 316(4):1132-7 .
- Lancon, A., Hanet, N., Jannin, B., Delmas, D., Heydel, J., Lizard, G., et al. (2007). Resveratrol in human hepatoma HepG2 cells: metabolism and inducibility of detoxifying enzymes. *Drug Metab Dispos* 35(5): 699-703.
- Landis-Piowar, K., & Iyer, N. (2014). Cancer chemoprevention: current state of the art. *Cancer growth metastasis* 7 , 19-25.
- Le Marchand, L. (2002). Cancer preventive effects of flavonoids-a review. *Biomed Pharmacother* 56(6) , 296-301.
- Lee, K., & Lee, H. (2006). *BioFactors (Oxford, England)* 26 , 105-121.
- Lee, L., Huang, Y., Hwang, J., Lee, A., Ke, F., Huang, C., et al. (2004). Transinactivation of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase and focal adhesion kinase phosphorylation by dietary flavonoids: effects of invasive potential of human carcinoma cells. *Biochem pharmacol* 67 , 2103-2114.
- Lee, L., Huang, Y., Hwang, J., Lee, H., Ke, F., Nair, M., et al. (2002). Blockade of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase activity by quercetin and luteolin leads to growth inhibition and apoptosis of pancreatic tumor cells. *Anticancer research* 22 , 1615-1628.
- Lewandowska, U., Szewczyk, K., Hrabec, E., Janecka, A., & Grolach, S. (2013). Overview of metabolism and bioavailability enhancement of polyphenols. *Journal of agricultural and food chemistry*,61 , pp. 12183,12199.
- Li, Y., Baer, D., Friedman, G., Udaltsova, N., Shim, V., & Klatsky, A. (2009). Wine, liquor, beer and risk of breast cancer in a large population. *European Journal of Cancer*, 45 , 843-850.
- Li, Y., Liu, J., Liu, X., Xing, K., Wang, Y., Li, F., et al. (2006). *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 135 , 181-192.
- Li, Y., Shen, F., Liu, B., & Cheng, G. (2003). *Acta Pharmacologica Sinica* 24 , 1167-1171.

- Liaudet-Coopman, E., Beaujouin, M., Derocq, D., Garcia, M., Glondu-Lassis, M., Laurent-Matha, V., et al. (2006). Cathepsin D: newly discovered functions of a long-standing aspartic protease in cancer and apoptosis. *Cancer letters* 237 , 167-179.
- Liu, P., Cheng, H., Roberts, T., & Zhao, J. (2009). Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer. *Nat Rev Drug Discov*, 8(8) , 627-644.
- Manach, C., Morand, C., Crespy, V., Demigné, C., Texier, O., F, R., et al. (1998). Quercetin is recovered in human plasma as conjugated derivatives which retain antioxidant properties. *FEBS Lett*, 426 , pp. 331-336.
- Manna, S., Mukhopadhyay, A., & Aggarwal, B. (2000). *Journal of immunology* 164 , 6509-6519.
- Manning, B., & Cantley, L. (2007). AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell*, 129(7) , 1261-1274.
- McKay, M., & Morrisson, D. (2007). Integrating signals from RTKs to ERK/MAPK. *Oncogene*;26: 3113-21 .
- Messina, M., Persky, V., Setchell, K., & Barnes, S. (1994). Soy intake and cancer risk; a review of the in vitro and in vivo data. *Nutr Cancer* 21 , 114-131.
- Mistry, T., Cai, Y., Lilley, T., & Haslam, E. (1991). Polyphenol interactions. part 5. Anthocyanin copigmentation. *J Chem Soc, Perkin Trans 2* , pp. 1287-1296.
- Mitsudomi, T., & Yatabe, Y. (2010). Epidermal growth factor receptor in relation to tumor development: EGFR gene and cancer. *FEBS J*, 277(2) , 301-308.
- Mohan, A., & al, e. (2014). Novel resveratrol and 5-fluorouracil coencapsulated in PEGylated nanoliposomes improve chemotherapeutic efficacy of combination against head and neck squamous cell carcinoma. *BioMed Res. Int.* 424239 .
- Morgan, D. (1995). Principles of Cdk regulation. *Nature*. 374 (6518): 131-4 .
- Mullen, W., Graf, B., Caldwell, S., Hartley, R., Duthie, G., Edwards, C., et al. (2002). Determination of flavonol metabolites in plasma and tissues of rats by HPLC-radiocounting and tandem mass spectrometry following oral ingestion of [2-(14)C]quercetin-4'-glucoside. *J Agric Food Chem*, 50 , 6902-6909.
- Nagata, K., Suzuki, H., & Sakaguchi, S. (2007). Common pathogenic mechanisms in the development progression of liver injury caused by non-alcoholic or alcoholic steatohepatitis. *J. Toxicol Sci*; 32 , 453-468.
- Nakajima, k., Nakano, t., & Tanaka, A. (2006). The oxydative modification hypothesis of atherosclerosis: the comparaision of atherogenic effects on oxidized LDL and remnant lipoproteins in plasma. *Clin Chim Acta*, 367,36-47 .
- Nikolic, D., & van Breemen, R. (2001). *Chemical Research in Toxicology* 14 , 351-354.
- Nishizuka, Y. (1995). Protein kinase and lipid signaling for sustained cellular responses. *FASEB J* 9 , 484-496.

Nonn, L., Duong, D., & Peehl, D. (2007). *Carcinogenesis* 28 , 1188-1196.

Organization for Economic Co-operation and development (OECD). (1991). *Food consumption statistisc.*

Passamonti, S., Vrhovsek, U., Vanzo, A., & Mattivi, F. (2003). The stomach as a site for anthocyanins absorption from food. *FEBS Lett*, 544 , pp. 210,213.

Pedersen, A., Johansen, C., & Gronbaek, M. (2003). Relations between amount and type of alcohol and colon and rectal cancer in a danish population based cohort study. *Gut*; 52 , 861-867.

Piantelli, M., Maggiano, N., Ricci, R., & al, e. (1995). Tamoxifen and quercetin interact with type II estrogen binding sites and inhibits the growth of human melanoma cells. *J Invest Dermatol*:105 , 248-253.

Prescott, E., Gronbaek, M., Becker, U., & Sorensen, T. (1999). Alcohol intake and the risk of lung cancer: influence of type of alcoholic beverage. *American Journal of Epidemiology*. 149, n°5. , 463-470.

Pulliero, A., & al. (2015). Nanoparticles increase the efficacy of cancer chemopreventive agents in cells exposes to cigarette smoke condensate. *Carcinogenesis* 36 , 368-377.

Ranelletti, F., Maggiano, N., Serra, F., & al., e. (1999). Quercetin inhibits p21-ras expression in human colon cancer cell lines and in primary colorectal tumors. *Int J Cancer*:85 , 438-445.

Renaud, S., & de Lorgeril, M. (1992). Wine, Alcohol, Platelets and the french paradox for coronary heart disease. *the Lancet* .

Renaud, S., Guéguen, R., Siest, G., & Salamon, R. (1999, septembre 13). Wine, beer, and mortality in middle-aged men from eastern France. *American medical association* , pp. 1865-1870.

Ribéreau-Gayon, P. (1965). Identification d'esters des acides cinnamiques et de l'acide tartrique dans les limbes et les baies de *Vitis vinifera*. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences.*, (pp. 360:341-343).

Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., & Lonvaud, L. (2012). *Traité d'oenologie. Tome 1: Microbiologie du vin, vinification.* Dunod.

Ribéreau-Gayon, P., Pontallier, P., & Glories, Y. (1983). Some interpretations of colour changes in young red wines during their conservation. *Journal of the Science of Food and Agriculture* , pp. 505-516.

Rice-Evans, C., Miller, N., & Paganga, G. (1996). Structure-antioxydant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med*, 20 , pp. 933-956.

Rimm, E., Klatsky, A., Grobbee, D., & Stampfer, M. (1996). Review of moderate alcohol consumption and reduced risk of coronary heart disease: is the effect due to beer, wine or spirits? *BMJ* .

Robert, J. (2010). *Signalisation cellulaire et cancer.* Springer.

Rozenfel'd, L., Abyzov, R., Bozhko, G., & al., e. (1990). The possibilities of protection against local radiation injuries in ORL-oncologic patients. *Vestn Otorinolaringol: 2* , 56-58.

Ruano-Ravina, A., Figueiras, A., & Barros-Dios, J. (2004). Type of wine and risk of lung cancer: a case-control study in Spain. *Thorax;59* , 981-985.

S.Renaudl, & de Lorgeril, M. (1992). *The French Paradox: Dietary Factors and Cigarette Smoking-Related Health Risks*. 22, avenue du Doyen Lepine, 69500 Bron, France: Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) unité 63.

Sarni, P., Fulcrand, H., Souillol, V., Souquet, J., & Cheynier, V. (1995). Mechanisms of anthocyanin degradation in grape must like model solutions. *J Sci Food Agric*, 69 , pp. 385-391.

Sarni-Manchado, P., & Cheynier, V. (2006). *Les polyphénols en agroalimentaire*. Lavoisier, ed Tec & Doc.

Sarni-Manchado, P., Cheynier, V., & Moutounet, M. (1997). Reactions of polyphenoloxidase generated caffeoyl acid o-quinone with malvidin 3-O-glucoside. *Phytochemistry;45* , pp. 1365-1369.

Scambia, G., Ranelletti, F., & Panici, P. (1994). Quercetin potentiates the effect of adriamycin in a multidrug-resistant MCF-7 human breast-cancer cell line: P-glycoprotein as a possible target. *Cancer Chemother Pharmacol;34* , 459-467.

Scambia, G., Ranelletti, F., Benedetti Panici, P., & al, e. (1993). Quercetin induces type-II estrogenbinding in estrogen-receptor-negative (MDA-MB231) and estrogen-receptor-positive (MCF-7) human breast cancer cell lines. *Int J cancer;54* , 462-466.

Scambia, G., Ranelletti, F., Panici, P., & al., e. (1992). Inhibitory effect of quercetin on primary ovarian and endometrial cancers and synergistic activity with cis-diamminedichloroplatinum (II). *Gyn Oncol;45* , 13-19.

Scheline, R. (1991). *CRC Handbook of mammalian metabolism of plants compounds*. CRC Press, Boca Raton.

Schlaepfer, D., Hauck, C., & Siegel, D. (1999). Signaling through focal adhesion kinase. *Prog Biophys Mol Bio 71* , 435-478.

Sestili, P., Guirdarelli, A., Dacha, M., & Cantoni, O. (1998). Quercetin prevents DNA single strand breakage and cytotoxicity caused by tert-butylhydroperoxide: free radical scavenging versus iron chelating mechanism. *Free Radic Biol Med, 25* , pp. 196-200.

She, Q., Bode, A., Na, W., Chen, N., & Dong, Z. (2001). *Cancer Research 61* , 1604-1610.

Siddiqui, I., Sanna, V., Ahmad, N., Sechi, M., & Mukhtar, H. (2015). Resveratrol nanoformulation for cancer prevention and therapy. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* , 1-12.

Sliutz, G., Karlseder, J., Tempfer, C., & al., e. (1996). Drug resistance against gemcitabine and topotecan mediated by constitutive hsp70 overexpression in vitro: implication of quercetin as sensitizer in chemotherapy. *Br J Cancer;74* , 172-177.

Sporn, M., & Suh, N. (2002). Chemoprevention: an essential approach to controlling cancer. *Nat. Rev. Cancer*;2 , 537-543.

St Leger, A., Cochrane, A., & Moore, F. (1979). Factors associated with cardiac mortality in developed countries with particular reference to the consumption of wine. *The lancet* .

Suganuma, M., Okabe, S., Oniyama, M., Tada, Y., Ito, H., & Fujiki, H. (1998). Wide distribution of [3H](-)-epigallocatechin gallate, a cancer preventive tea polyphenol, in mouse tissue. *Carcinogenesis*, 19 , 1171-1176.

Sun, C., Hu, Y., Guo, T., Wang, H., Zhang, X., He, W., et al. (2006). *Acta Pharmacologica Sinica* 27 , 1447-1452.

Sun, C., Hu, Y., Liu, X., Wu, T., Wang, Y., He, W., et al. (2006). *Cancer Genetics and Cytogenetics* 165 , 9-19.

Surh, Y. (2003). Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nat.Rev.Cancer*;3 , 768-780.

Surh, Y. (2004). Transcription factors in the cellular signaling network as prime targets of chemopreventive phytochemicals. *Cancer. Res. Treat.*36 , 275-286.

Tanoue, T., Moriguchi, T., & Nishida, E. (1999). *The journal of biological Chemistry* 274 , 19949-19956.

Theoharides, T. (1988). Neuroimmunology of tumor growth: the role of mast cells. *Int J Immunopathol Pharmacol* 1 , 89-98.

Tronchet, J. (1978). Effets réversibles des frottements sur le contenu flavoniques des organes aériens. Hypothèse d'une série commune de flavonoïdes spécialisée dans la défense. *Bulletin Liaison Groupe Polyphénols n° 8. JIEP Nancy* , 410-419.

Van Acker, S., Van Balen, G., Van Den Berg, D., Bast, A., & Van der Vijgh, W. (1998). Influence of iron chelation on the antioxydant activity of flavonoïds. *Biochem Pharmacol*, 56 , pp. 935-943.

van Rijn, J., & van den Berg, J. (1997). Flavonoids as enhancers of X-ray-induced cell damage in hepatoma cells. *Clin Cancer Res*;3 , 1775-1779.

Vermerris, W., & Nicholson, R. (2009). *Phenolic compound biochemistry*. Springer.

Videla, L., & Valenzuela, A. (1987). Alcohol ingestion, liver glutathione and lipoperoxidation: metabolic interrelations and pathological implications. *Life Sci*;31 , 2395-2407.

Vitrac, X., Desmoulière, A., Brouillaud, B., Krisa, S., Deffieux, G., Barthe, N., et al. (2003). Distribution of [14C]-trans-resveratrol, a cancer chemopreventive polyphenol, in mouse tissues after oral administration. *Life Sci*, 72 , 2219-2233.

Vyas, S., Asmerom, Y., & De Leon, D. (2006). *Growth Factors (Chur, Switzerland)* 24 , 79-87.

- Waas, E., Lomme, R., DeGroot, J., Wobbes, T., & Hendriks, T. (2002). *British Journal of Cancer* 86 , 1876-1883.
- Walle, T., Hsieh, F., DeLegge, M., Oates, J., & Walle, U. (2004). High absorption but low bioavailability of oral resveratrol in humans. *Drug Metab Dispos* 32(12): 1377-82 .
- Waterhouse, A. L. (2002). Wine phenolics. *New York Academy of Science* .
- Watson, A. (2004). Apoptosis and colorectal cancer. *Gut*; 53 , 1701-1709.
- Wei, Y., Zhao, X., Kariya, Y., Fukato, H., Teshigawara, K., & Ushida, A. (1994). Induction of apoptosis by quercetin: involvement of heat shock protein. *Cancer Research* 54 , 4952-4957.
- Witztum, J. (1994). The oxidation hypothesis of atherosclerosis. *Lancet*;344 , 793-795.
- World Health Organization. (1989). *World Health Statistic Annual*. Geneva: World Health Organization.
- Yang, C., Landau, J., Huang, M., & Newmark, H. (2001). Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds, 21. *Annu Rev Nutr* , 381-406.
- Yoshida, M., Sakai, T., Hosokawa, N., Marui, N., Matsumoto, K., Fujioka, A., et al. (1990). The effect of quercetin on cell cycle progression and growth of human gastric cancer cells. *FEBS Lett* 260: , 10-13.
- Youdim, K., Martin, A., & Joseph, J. (2000). Incorporation of the elderberry anthocyanins by endothelial cells increases protection against oxidative stress. *Free Radic Biol Med*, 29 , 51-60.
- Yu, C., Shin, Y., Chow, A., Li, Y., Kosmeder, J., Lee, Y., et al. (2002). Human, rat and mouse metabolism of resveratrol. *Parm. Res.* 19(12):1907-14 .
- Zhang, X., Huang, S., & Xu, Q. (2004). Quercetin inhibits the invasion of murine melanoma B16-BL6 cells by decreasing pro-MMP-9 via the PKC pathway. *Cancer Chemother Pharmacol* 53(1) , 82-88.

SERMENT DE GALIEN

Je jure, en présence des maîtres de la Faculté, des conseillers de l'ordre des Pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit(e) dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses que je sois couvert(e) d'opprobre et méprisé(e) de mes confrères si j'y manque.

Résumé

Les polyphénols du vin rouge ont fait preuve de nombreuses propriétés bénéfiques pour la santé à l'origine d'une diminution de la mortalité globale observée pour une consommation modérée régulière de un à deux verres de vin par jours. Parmi ces propriétés bénéfiques, les effets sur la prévention des cancers sont à la fois en relation avec leur activité anti-oxydante mais également du fait d'interactions régulatrices avec des molécules de signalisations intracellulaires impliquées dans le processus de cancérogenèse telles que les MAPK, le NFκB ou la PI3K/Akt. Ces interactions permettent aux polyphénols du vin rouge de revendiquer, que ce soit suite à l'expérimentation *in vitro* ou *in vivo*, l'aptitude de contester l'évolution normale du cancer en s'opposant à la prolifération, l'inflammation, l'angiogenèse, l'invasion et la formation de métastases. Les polyphénols du vin rouge sont donc de parfaits candidats à la chimioprévention des cancers, dont les modalités pratiques restent encore à être précisées par des recherches futures.

Mots clés : Polyphénols, vin rouge, cancers, anti-oxydants, chimioprévention, resvératrol, quercétine