



HAL
open science

Purification et caractérisation biologique de polyphénols polyprénylés issus de *Garcinia bancana* capables de moduler l'expression de molécules du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH)

Chloé Coste

► To cite this version:

Chloé Coste. Purification et caractérisation biologique de polyphénols polyprénylés issus de *Garcinia bancana* capables de moduler l'expression de molécules du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH). Sciences du Vivant [q-bio]. 2017. dumas-01627633

HAL Id: dumas-01627633

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01627633>

Submitted on 6 Nov 2017

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.

**AGROCAMPUS
OUEST**

CFR Angers

CFR Rennes



Instituts
thématiques



<p>Année universitaire : 2016-2017</p> <p>Spécialité : Horticulture</p> <p>Spécialisation (et option éventuelle) : M2 extérieur : Polymères et Principes Actifs d'Origine Naturelle (P²AON)</p>	<p>Mémoire de fin d'études</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> d'Ingénieur de l'Institut Supérieur des Sciences agronomiques, agroalimentaires, horticoles et du paysage</p> <p><input type="checkbox"/> de Master de l'Institut Supérieur des Sciences agronomiques, agroalimentaires, horticoles et du paysage</p> <p><input type="checkbox"/> d'un autre établissement (étudiant arrivé en M2)</p>
--	---

**Purification et caractérisation biologique de polyphénols
polyprénylés issus de *Garcinia bancana* capables de moduler
l'expression de molécules du Complexe Majeur
d'Histocompatibilité (CMH)**

Par : Chloé COSTE

Soutenu à Nantes, le 22 juin 2017

Devant le jury composé de :

Président : Pascal Richomme

Maître de stage : Béatrice Charreau, Docteur en
Immunologie

Enseignant référent : Séverine Derbré, Maître de
conférence en pharmacognosie

Les analyses et les conclusions de ce travail d'étudiant n'engagent que la responsabilité de son auteur et non celle d'AGROCAMPUS OUEST

Ce document est soumis aux conditions d'utilisation

«Paternité-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de Modification 4.0 France»

disponible en ligne <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.fr>



Remerciements

Je souhaite remercier en premier lieu le Pr Pascal Richomme, directeur du laboratoire SONAS, et le Pr Régis Josien, directeur du Centre de Recherche en Transplantation et Immunologie, de m'avoir permis de réaliser mon stage au sein de leurs laboratoires.

En second lieu, j'adresse mes remerciements sincères à Béatrice Charreau et à Séverine Derbré pour leur encadrement, leurs précieux conseils, leur confiance et pour l'attention qu'elles ont accordée à mon travail.

Ce rapport de stage est le résultat d'un travail d'équipe entre plusieurs acteurs avec qui j'ai pris beaucoup de plaisir à travailler.

Je remercie Dimitri Bréard pour son savoir-faire et son aide en HPLC et RMN. Sans oublier, Benjamin Siegler et Ingrid Freuze pour les analyses de RMN et de MS nécessaires à l'avancée de mon stage.

Je remercie Nathalie Gérard pour ses conseils et son aide précieuse pour les extractions ARN et qPCR.

Un grand merci à Antoine Bruguière qui a été présent en quasi-permanence au cours de ce stage et qui m'a soutenue à chaque instant avec ses conseils, sa bonne humeur et ses fameuses imitations. Je le remercie également pour sa contribution dans l'élucidation structurale de mes composés.

Pour finir, mes pensées vont aussi à toutes les personnes que j'ai pu côtoyer au sein du laboratoire SONAS et de l'INSERM UMR1064, et plus particulièrement Mathieu, Alexandra, Florian, Maxime et Mélanie pour leur accueil et leur bonne humeur.

Liste des abréviations

CBP = (C-AMP Response Element)-Binding Protein
CDCl₃ : Chloroforme deutéré
CE : Cellule Endothéliale
CLHP : Chromatographie Liquide Haute Performance
CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité
DO : Densité Optique
EGF : Epidermal Growth Factor
ESI : ElectroSpray Ionization
GAF : Gamma-interferon Activated Factor
GAS : Gamma-interferon Activated Sequence
HAEC : Human Endothelial Cell
HAT : Histone Acetyl Transferase
HDAC : Histone Desacetylase
HLA : Human Leucocyte Antigen
IFN- γ : Interféron- γ
JAK : Janus Kinase
MeOD : Méthanol deutéré
NK : cellules Natural Killer
PBS : Phosphate Buffer Saline
PPAP : Acylphloroglucinol polyprénylé polycyclique
pSTAT1 : STAT1 phosphorylée sur la tyrosine 701
RT-PCR : Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction
RMN : Résonance Magnétique Nucléaire
rpm : rotation par minute
SDS-PAGE : Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
SOCS : Suppressor Of Cytokine Signaling
STAT : Signal Transducer and Activator of Transcription
VCAM-1 : Vascular Cell Adhesion Molecule 1
 λ : longueur d'onde

Sommaire

INTRODUCTION	1
I. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	2
1. Contexte de l'étude : l'immunothérapie	2
2. Intérêt des PPAPs dans la modulation de la réponse immunitaire	4
3. Molécules du CMH et immunorégulation	6
II. MATERIELS ET METHODES	9
A. Partie Phytochimie	9
1. Matériel végétal	9
2. Extraction du matériel végétal	9
3. Méthode d'analyse, chromatographie liquide haute performance : HPLC-UV-DAD	10
4. Méthodes de fractionnement des extraits et de purification des métabolites secondaires	10
5. Détermination structurale des composés purifiés	11
B. Partie Biologie	12
1. Cultures des cellules endothéliales et des lignées cellulaires	12
2. Molécules de référence sélectionnées	12
3. Méthodes d'analyse de l'expression des molécules du CMH et de la voie de l'IFN- γ	13
III. RESULTATS ET DISCUSSION	18
A. Etude Phytochimie	18
1. Résultats antérieurs : fractionnement et étude dérégulatrice de l'extrait dichlorométhanique d'écorces de <i>Garcinia bancana</i> (KL4967)	18
2. Purification de l'extrait KL4967_B_D F14	18
3. Identification des PPAPs purifiés	18
B. Etude Biologique : Caractérisation des effets biologiques	22
1. Effet régulateur des PPAPs sur l'expression des molécules du CMH à la surface des cellules	22
2. Régulation de l'expression transcriptionnelle des molécules du CMH par les PPAPs	23
3. Effet des inhibiteurs de HAT et de HDAC sur l'expression des molécules du CMH à la surface des cellules	24
4. Effet des PPAPs sur l'expression et la phosphorylation de STAT1	25
IV. CONCLUSION ET PERSPECTIVES	30

INTRODUCTION

Lors d'une transplantation d'organes, les traitements immunosuppresseurs permettent de contrôler la réponse immunitaire dirigée contre le greffon et de réduire ainsi le risque de rejet. Cependant, les effets secondaires des traitements immunosuppresseurs actuels ne sont pas négligeables¹. La plupart des molécules immunosuppressives utilisées en thérapeutique pour la prévention de rejet de greffe sont d'origine naturelle^{2, 3}, microbiennes et fongiques principalement, telles que la ciclosporine, un inhibiteur de la calcineurine, qui constitue le premier immunosuppresseur utilisé en transplantation. Toutefois la ciclosporine est cytotoxique pour le rein et, en raison de son manque de spécificité, induit de nombreuses complications en diminuant les défenses immunitaires du patient, rendant alors son utilisation délicate⁴. La recherche de nouvelles stratégies thérapeutiques, et plus particulièrement d'alternatives aux inhibiteurs de la ciclosporine s'avère ainsi essentielle. Celle-ci passe notamment par la découverte de nouvelles cibles thérapeutiques.

De ce fait, dans le cadre de la collaboration entre l'EA921 SONAS (Angers, Dr. S. Derbré) et l'équipe 4 de l'unité INSERM, UMR1064 du CRTI (Nantes, Dr. B. Charreau), mon projet de stage propose, à la suite des résultats déjà obtenus (thèse de Caroline Rouger⁵) et en parallèle du projet BioAsie (collaboration avec l'université de Malaya, Kuala Lumpur, Pr. K. Awang), d'isoler et d'identifier de nouveaux acylphloroglucinols polycycliques polyprénylés (PPAPs) extraits d'une plante Malaisienne dont la phytochimie est peu décrite, *Garcinia bancana*, (*Clusiaceae*). En effet, les travaux déjà réalisés au cours de cette collaboration ont montré que ces métabolites secondaires sont capables de moduler l'expression de plusieurs molécules impliquées dans la réponse immunitaire. Plus particulièrement, certains de ces composés ont montré des capacités à moduler des voies de signalisation cellulaires essentielles, conduisant alors à des effets immunorégulateurs « ciblés », exploitables également en cancérologie⁶.

Ainsi il s'agit plus précisément de poursuivre l'étude de l'activité des PPAPs sur des cellules vasculaires humaines impliquées dans le rejet de greffe et cibles de réponses immunitaires, les cellules endothéliales, mais également de l'étendre à d'autres types cellulaires. La mise en place d'essais biologiques évaluant leurs propriétés doit permettre d'observer et de confirmer leur effet sur l'expression de molécules du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH), et ainsi de pouvoir aborder l'étude des mécanismes d'action mis en jeu dans les effets observés.

L'objectif de ce stage est donc à la fois, pour la partie phytochimie, d'isoler et d'identifier de nouveaux composés extraits de *Garcinia bancana*, et aussi, pour la partie biologie, d'analyser l'activité biologique de ces molécules en la comparant aux PPAPs déjà étudiés dans notre équipe ou décrits. L'étude biologique cherchera, dans un premier temps, à définir un effet et, dans un second temps, à en étudier les mécanismes.

I. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1) Contexte de l'étude : l'immunothérapie

Le système immunitaire regroupe un ensemble coordonné et dynamique d'effecteurs moléculaires et cellulaires afin de défendre l'intégrité de l'organisme contre les attaques extérieures (bactéries, virus, champignons). La réaction immunitaire d'un organisme a pour but de reconnaître un Antigène (agent étranger) par une cellule immunitaire afin d'en induire l'élimination. La réponse immunitaire peut être cellulaire et consiste alors en l'activation de cellules immunes qui comprennent des lymphocytes, des cellules Natural Killer (NK), des cellules dendritiques, des monocytes et des macrophages. L'activation des différentes populations de cellules immunitaires met en jeu les molécules du CMH appelées HLA chez l'homme (Human Leucocyte Antigens).

1.1 Importance de la modulation de la réponse immunitaire

L'immunothérapie est une méthode de traitement destinée à moduler la réponse immunitaire du patient. En effet, un défaut du système immunitaire peut conduire à une réponse immunitaire trop faible ou trop tardive pour être efficace, engendrant alors un plus fort développement des pathogènes ou favorisant le développement tumoral. Ainsi, dans le cadre d'infections ou de cancers, une stimulation de la réponse immunitaire sera recherchée afin de mobiliser les défenses immunitaires du patient dirigées contre les agents infectieux ou les cellules tumorales⁷.

A l'inverse dans certains contextes pathologiques, la réponse immune peut s'attaquer aux cellules de l'organisme (cellules dites du soi) et induire une maladie auto-immune (le diabète de type I par exemple). Le système immunitaire peut aussi contribuer, lors d'une transplantation, au rejet de l'organe ou du tissu greffé.

Le greffon peut être un organe (rein, foie, cœur...), un tissu (cornée, peau, os) ou des cellules⁸. Pourtant, qu'il s'agisse d'organes ou de tissus, le rejet de greffe reste un obstacle majeur à la survie à long terme du greffon, et ce ne fut qu'à partir des années 1960 que le

recours à un traitement, dit immunosuppresseur, fut envisagé lors d'une greffe de rein¹. Un traitement qui vise, ici, à réduire la réponse immunitaire anormalement importante de l'organisme afin de prévenir la destruction du greffon.

La recherche en immunologie vise une meilleure compréhension de cette régulation, positive ou négative, des réponses immunes afin d'identifier des cibles cellulaires ou moléculaires pour les contrôler et pour développer de nouvelles approches thérapeutiques. L'ensemble de ces approches est regroupé sous le terme d'immunothérapie.

1.2 Outils actuels mis en place pour contrôler la réponse immunitaire

La stimulation de la réponse immunitaire peut se faire par injection de sérum ou d'immunoglobuline qui apporte les anticorps spécifiques (immunothérapie passive), par injection de gènes (thérapie génique) ou encore par vaccinothérapie qui induit la production de ces anticorps (immunothérapie active).

Au contraire, des traitements immunosuppresseurs sont mis en place pour diminuer la réponse immunitaire, en jouant notamment sur la diminution de l'activation et de la prolifération lymphocytaire. Parmi ces traitements, les inhibiteurs de la calcineurine (ciclosporine, tacrolimus), les inhibiteurs de mTOR (rapamycine)^{2,3} ou encore des anticorps monoclonaux constituent des immunosuppresseurs majeurs administrés aux patients afin d'assurer la survie du greffon. Toutefois, ces outils thérapeutiques actuels présentent certains inconvénients non négligeables et restent ainsi délicats d'utilisation.

1.3 Nécessité de nouvelles stratégies thérapeutiques

Le rôle des traitements immunosuppresseurs tels que la ciclosporine, le tacrolimus ou encore la rapamycine est de diminuer la réponse immunitaire au niveau du lymphocyte T afin d'éviter leur activation et leur prolifération ainsi que la « cascade biologique » qui s'ensuit. Cependant, la réponse immune se trouvant ainsi diminuée, les risques d'infections et de cancers sont augmentés et représentent des effets secondaires majeurs de ce type de traitement, qualifié de traitement lourd⁴.

Parmi ces molécules immunosuppressives, plusieurs sont issues de sources naturelles, majoritairement fongiques ou microbiennes, telles que la ciclosporine qui constitue le 1^{er} traitement immunosuppresseur utilisé en transplantation rénale^{2,3}. Pourtant, celle-ci engendre, d'une part, des complications au niveau des défenses immunitaires du patient et, d'autre part,

une certaine toxicité pour le rein. Cela reste très problématique dans la mesure où les risques de rejet d'organe à long terme sont toujours présents, nécessitant alors une administration de ces traitements à vie, et donc le besoin de trouver de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Ainsi, le défi actuel est de trouver des inhibiteurs plus spécifiques, capables de bloquer l'activation lymphocytaire en ciblant mieux la cellule, et les mécanismes mis en jeu lors des phénomènes d'activation et de prolifération lymphocytaire.

2) Intérêt des PPAPs dans la modulation de la réponse immunitaire

2.1 Résultats antérieurs obtenus : mise en évidence d'une activité biologique de polyphénols polyprénylés (P²) sur les molécules du CMH

Lors de la thèse de Caroline Rouger (2012-2015), des polyphénols polyprénylés (P²) ont été isolés à partir de différentes espèces de *Clusiaceae* et de *Calophyllaceae* d'origine malaisienne. Ces composés présentant des activités anti-inflammatoires et un potentiel effet immunomodulateur en inhibant de manière significative l'expression de VCAM-1 (un des protéines de l'inflammation), de molécules du CMH présentes à la surface des CE, ont été identifiés⁵. En effet, certaines mammea coumarines (**61a**, **66a**, **94** et **120/121**, figures 1 et 2) réduisent significativement les expressions basale et induite (par la cytokine) de HLA de classe I, de HLA de classe II, de MICA et de HLA-E^{5, 17}. Par exemple, une des mammea coumarines, le lépidotol A (**94**) exerce une très forte activité immunorégulatrice avec 95% d'inhibition de l'expression des molécules du HLA de classe II induites (figure 1). De la même manière, la mammea A/AA (**61a**) induit une inhibition de 50% de l'expression de MICA et de 60% sur l'expression du HLA de classe II (figures 1 et 2).

Plus spécifiquement, la guttiférone J (**125** dans figures 1 et 2), montre un effet immunomodulateur important restreint aux molécules du CMH de classe II et HLA-E en régulant négativement leur expression : avec des inhibitions très élevées de l'expression induite de ces protéines, allant de 75% pour les molécules du HLA de classe II à 90% pour HLA-E. Au contraire, ce composé n'affecte pas l'expression du HLA de classe I et ne semble pas avoir d'effet significatif sur l'expression induite de MICA.

Cet effet « ciblé » de la guttiférone J représente un réel intérêt en immunologie. Ainsi mon stage portera sur la purification et l'étude des PPAPs purifiés et de leurs effets biologiques et mécanismes.

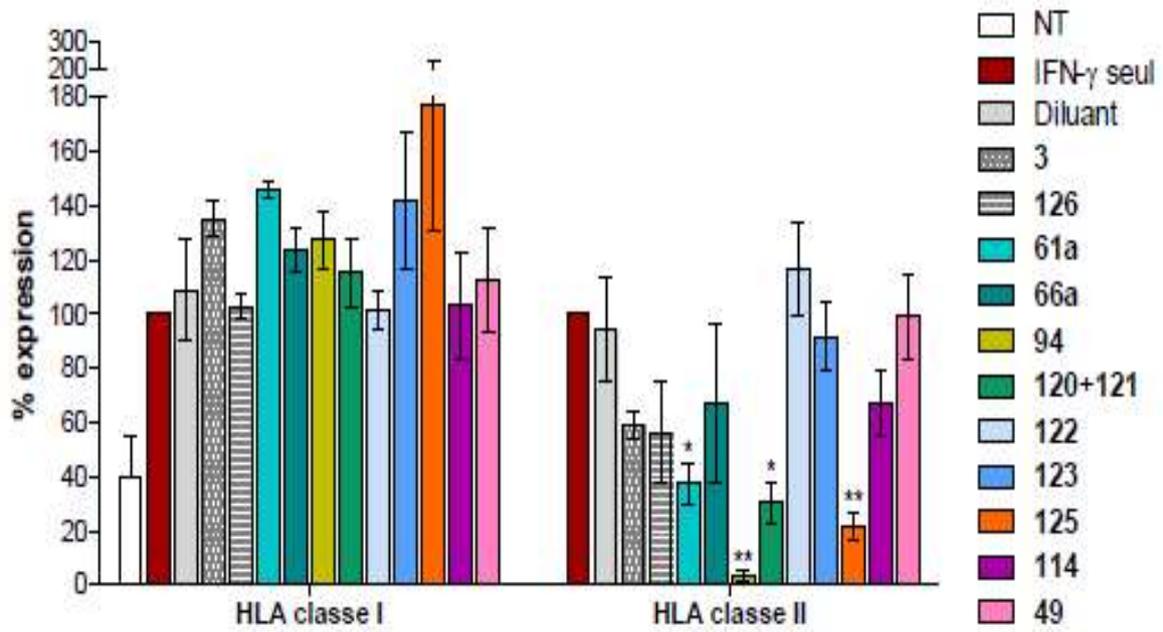


Figure 1 : Effets de composés phénoliques (10 μ M) sur l'expression des molécules du HLA de classe I et de classe II induite par l'IFN- γ^5

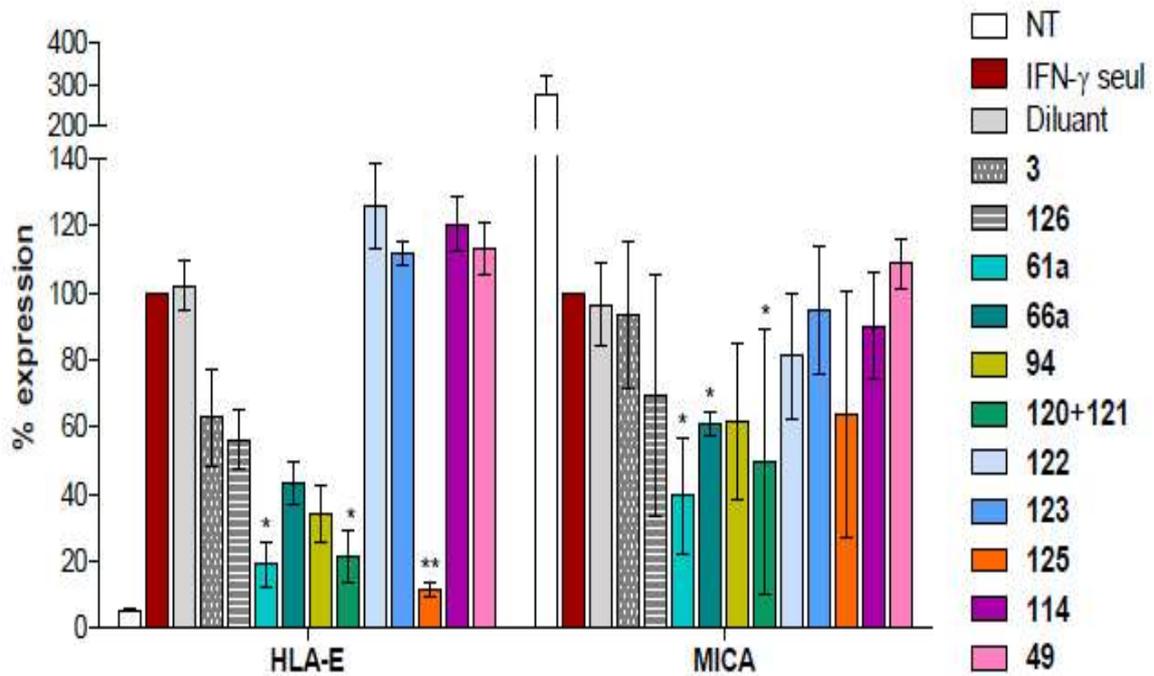


Figure 2 : Effets de composés phénoliques (10 μ M) sur l'expression de HLA-E et de MICA modulée par l'IFN- γ^5

En effet, les mécanismes de régulation du CMH médiés par ces PPAPs restent à élucider, et constitueront ainsi une partie de l'étude biologique de ce stage. Pour cela, une voie de signalisation impliquée dans la réponse immunitaire sera approfondie et développée.

2.2 Le genre *Garcinia*, source de PPAPs

Le genre *Garcinia* a été décrit pour la première fois par Carl von Linné en 1753⁹ et englobe plus de 300 espèces¹⁰. Le genre *Garcinia* appartient à la famille des *Clusiaceae*. Il s'agit d'un arbre tropical à feuilles persistantes pouvant atteindre 37 m de haut et 57 cm de diamètre, originaire d'Amérique centrale et du Sud, d'Afrique tropicale et d'Asie du Sud-Est¹¹. Des investigations phytochimiques portant sur le genre *Garcinia* ont permis l'isolement et la mise en évidence d'une richesse en composés bioactifs tels que les acylphloroglucinols polyprénylés polycycliques (PPAPs), les xanthonés ou encore les biphényles^{12,13,14}. Plusieurs polyphénols isolés de ce genre montrent des propriétés anti-inflammatoires¹⁵ et/ou immunosuppressives¹⁶. Les différents organes issus du genre *Garcinia* comme les fruits, les écorces, les fleurs ou encore les tiges ont été largement utilisés dans la médecine traditionnelle pour traiter des inflammations, des infections microbiennes, des cancers¹⁰... Les composés bioactifs majoritaires sont des PPAPs comme le garcinol (**1**), le xanthochymol (**2**), l'isogarcinol (**3**), les guttiférones (dont la guttiférone J (**4**)) et les xanthonés¹⁰(figure 3).

De nombreuses espèces de cette famille sont endémiques et restent encore inconnues ou très peu étudiées au niveau phytochimique. Elles renferment potentiellement des molécules originales, dont des PPAPs, potentiellement modulatrices de la réponse immunitaire.

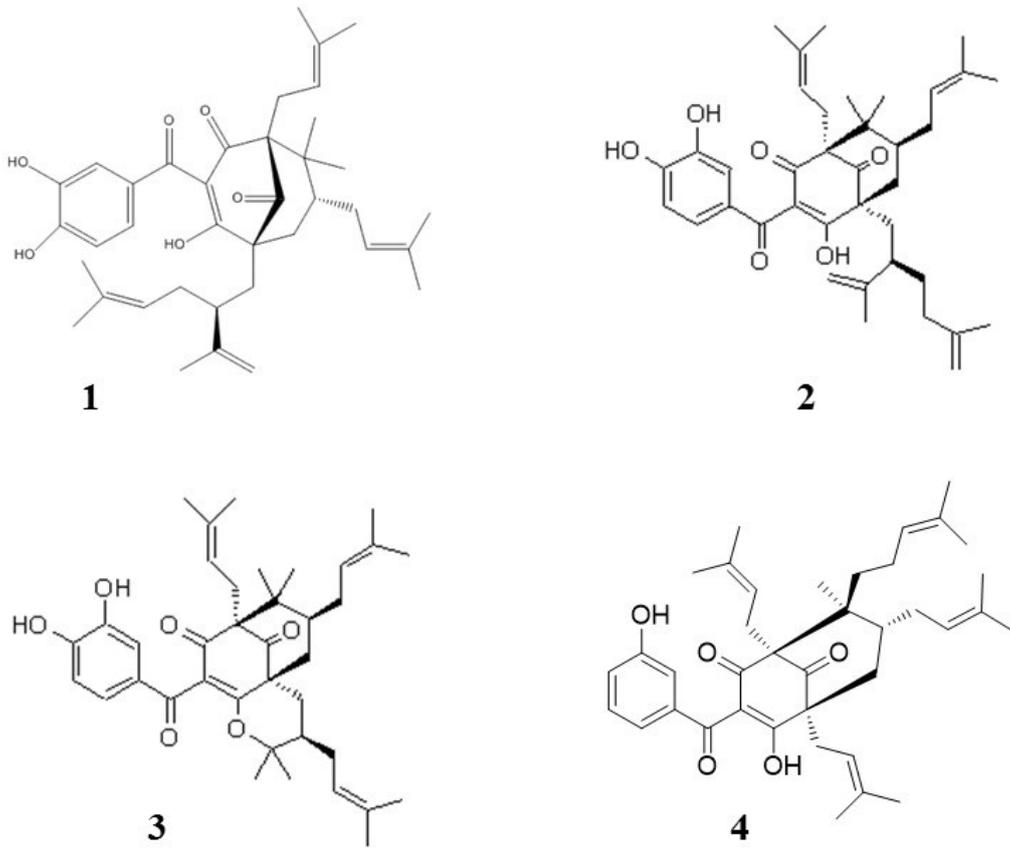


Figure 3 : Structures des PPAPs bioactifs majoritaires présents dans le genre *Garcinia*¹⁰

3) Molécules du CMH et immunorégulation

3.1 Protéines membranaires impliquées dans la réponse immunitaire

Les cellules endothéliales (CE), localisées à l'interface du sang et des tissus, affichent des activités régulatrices et contribuent, notamment, aux réponses immunitaires en exprimant les antigènes du CMH de classe I et II¹⁸. On distingue deux types de molécules du CMH de classe I : celles dites de classe Ia ou encore classiques, HLA-A, -B et -C chez l'homme, et celles dites de classe Ib ou non classiques, HLA-E, -F et -G et MICA^{19,20}.

Toutes sont des glycoprotéines transmembranaires qui, pour pouvoir être exprimées à la surface des cellules, nécessitent généralement de former un complexe hétérodimérique^{19,20}. Les molécules du CMH de classe I classiques sont très polymorphiques et sont exprimées par la majorité des cellules nucléées de l'organisme²⁰. L'expression de HLA-E semble, quant à elle, restreinte aux leucocytes dans le sang, dans les organes lymphoïdes et aux CE de l'ensemble des tissus et organes vasculaires¹⁸.

De la même manière, l'expression de MICA à la surface de cellules est limitée à un panel de cellules et de conditions : à l'état basal, les protéines MICA sont exprimées à la surface des cellules épithéliales, des CE, des monocytes, des fibroblastes¹⁸.

L'expression de ces molécules peut être fortement régulée, la plupart du temps vers une augmentation, dans des contextes inflammatoires ou d'activation des réponses immunes.

L'ensemble de ces molécules est en particulier régulé par une cytokine, l'interféron-gamma (IFN- γ).

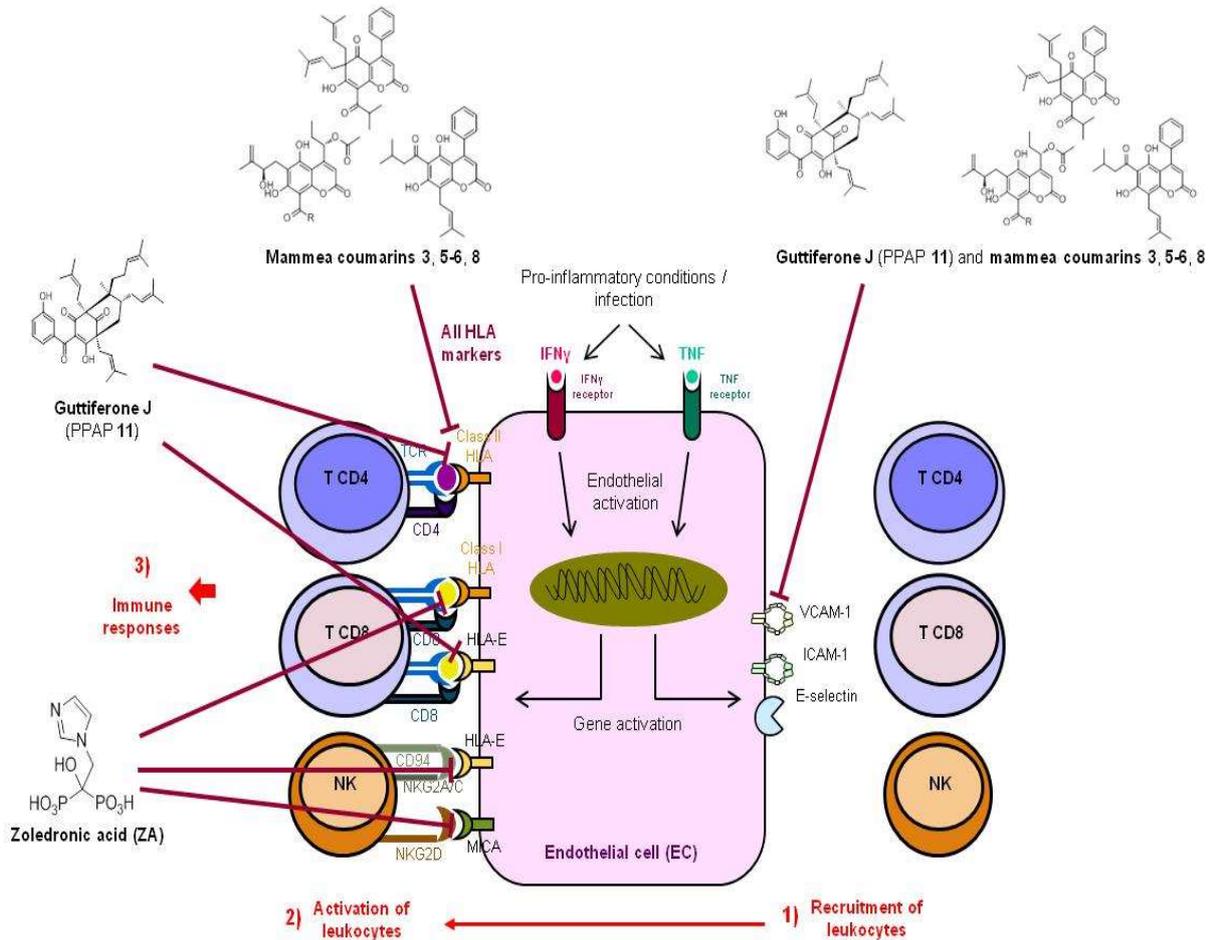


Figure 4 : Régulation de l'inflammation et de l'immunité par des polyphénols polyprénylés isolés de *Clusiaceae* et de *Calophyllaceae* malaisiennes (Rouger, 2015)

3.2 Régulation des molécules du CMH : la voie de signalisation de l'IFN- γ

Les cytokines, telles que les interférons (IFNs), régulent l'expression de gènes, dont les molécules du CMH, HLA de classe I et II, MICA et HLA-E. Cette régulation se fait par activation des protéines STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription) via une phosphorylation²¹. Les STATs, notamment STAT1, sont des transducteurs de signal et des activateurs de transcription très importants dans le cadre de l'immunité^{22, 23} : en effet, une déficience en STAT1 induit des défauts dans la réponse immunitaire²².

Par une liaison spécifique avec leurs récepteurs, les IFNs engendrent la phosphorylation de leurs récepteurs et des protéines STAT1 par les Janus kinases (JAKs)^{22,23}. Les IFNs de classe I (IFN- α et IFN- β)^{22, 23, 24} peuvent activer plusieurs STATs alors que l'IFN- γ (IFN de classe II) induit spécifiquement la phosphorylation des homodimères STAT1 au niveau de la tyrosine 701^{22, 23}. Le complexe homodimérique STAT1 phosphorylé, appelé GAF (*Gamma-interferon Activated Factor*), entre dans le noyau où il induit l'expression de gènes cibles en se fixant à l'ADN^{22, 23}. La fixation à l'ADN se fait au niveau de sites de fixation présents dans la zone promotrice du gène cible : la GAS (*Gamma-interferon Activated Sequence*).

De plus, l'histone désacétylase HDAC3 et l'histone acétyltransférase (HAT) CBP/p300 régulent dynamiquement l'acétylation de STAT1. Cette acétylation contrecarre la phosphorylation de STAT1 induite par l'INF- γ , la fixation à l'ADN et donc l'expression de gènes cibles^{21, 22}. Des facteurs biochimiques et génétiques, en altérant le ratio d'activité HDAC/HAT, ont révélé l'importance du *switch* phospho-acétyle dans la régulation du signal de STAT1^{21, 22, 23}. Ce *switch* fait intervenir CBP/p300, HDAC3 et la tyrosine phosphatase TCP45 et régule l'expression de gènes cibles via la voie de signalisation STAT1 induite par l'IFN- γ (figure 5)^{22, 24}.

Or, certains composés phénoliques sont connus pour être capables de moduler des molécules de cette voie de signalisation, en régulant notamment l'activité des HDACs et des HATs²⁵.

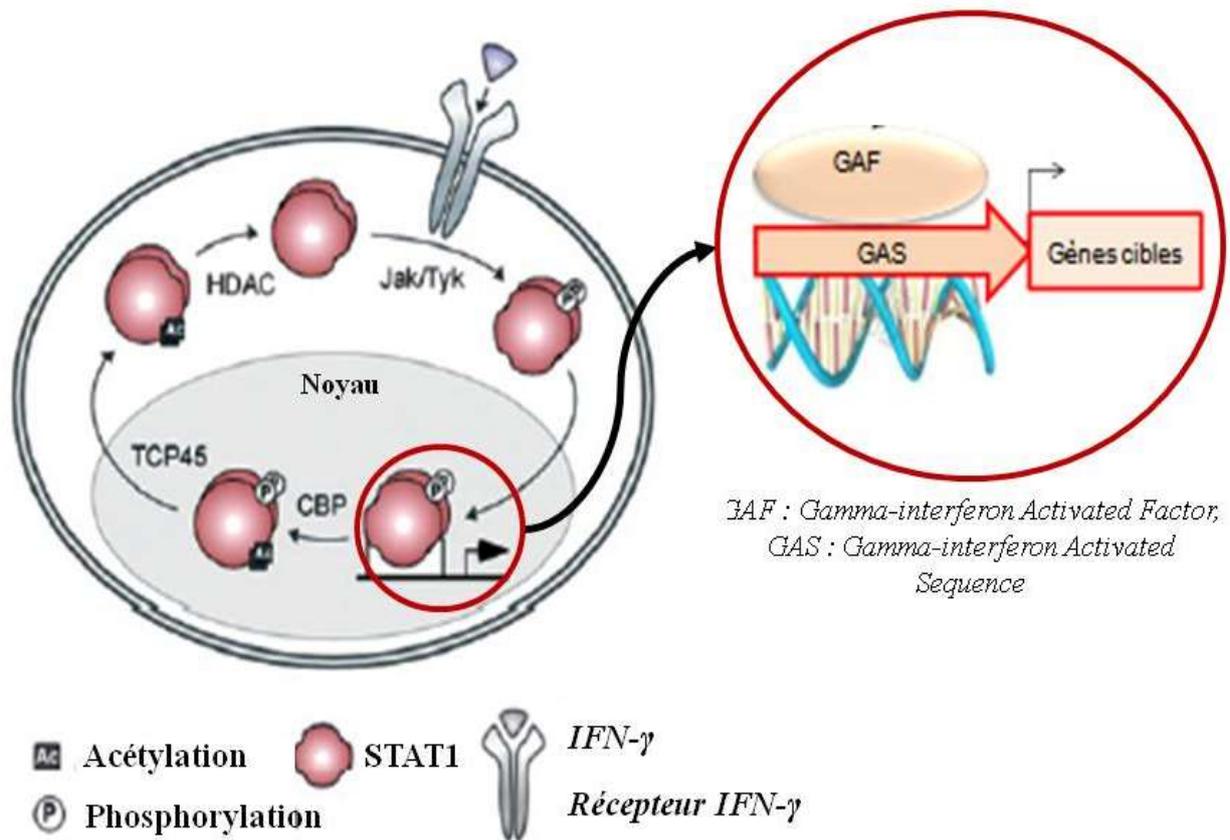


Figure 5 : Modèle illustrant le *switch* dynamique de STAT1 et son action transcriptionnelle directe après son activation par la voie de signalisation de l'IFN- γ ^{22, 23, 24}

Par exemple, le garcinol (**1**) montre un effet régulateur négatif sur les HATs en diminuant leur activité, et donc en diminuant l'acétylation de STAT1^{25,26}. De plus, le garcinol (**1**) et les guttiférones, K et M, ont été reconnus comme des composés polyprénylés ayant un effet inhibiteur sur la voie d'activation JAK/STAT1²⁷. En effet, ces composés polyprénylés démontrent une forte affinité pour la protéine STAT1 et empêchent alors la translocation nucléaire de celle-ci, induisant ainsi une modulation du signal de l'IFN- γ par une non-expression des gènes cibles²⁷.

Cela sous-entendrait alors la mise en place de mécanismes moléculaires spécifiques liés à la structure de ces PPAPs²⁷.

Cette revue bibliographique relève l'implication de la réponse immunitaire dans des pathologies tels que le rejet de greffe ou encore les cancers, et souligne l'intérêt de la modulation de la réponse immunitaire comme stratégie thérapeutique. Plus précisément, la compréhension des voies de signalisation impliquées doit permettre d'identifier de nouvelles cibles. Un PPAP, la guttiférone J (**4**), module l'expression des molécules HLA-II et HLA-E. Cependant, l'effet d'autres PPAPs n'a pas été évalué. Les plantes des familles des *Clusiaceae* et des *Calophyllaceae* se révèlent être sources d'une très grande diversité en métabolites secondaires, et plus particulièrement en PPAPs. Dans le cadre du projet BioAsie (2016-2017), l'espèce *Garcinia bancana* a été retenue pour une étude phytochimique et biologique car elle s'est révélée, au cours d'une étude déréplicative, être une source de nombreux PPAPs de type garcinol (**1**). Cette espèce constituera donc l'objet d'étude de mon stage.

Ce dernier se divise ainsi en deux axes principaux :

- Un axe phytochimie (SONAS EA 921, Angers) visant à réaliser la purification des PPAPs de *G. bancana* et d'identifier les structures originales ou potentiellement modulatrice de l'expression des molécules du CMH ;
- Un axe biologie (CRTI, UMR1064, équipe 4, Nantes), consiste en la caractérisation biologique et fonctionnelle des effets immunomodulateurs des PPAPs purifiés. L'analyse de l'effet régulateur sur les molécules du CMH sur différents modèles cellulaires est réalisée par mesure de l'expression des protéines (cytométrie en flux) et par quantification des ARNm codant pour ces protéines (qPCR). Une étude biochimique est réalisée pour définir les mécanismes d'action mis en jeu par les PPAPs dans la régulation du CMH.

II. MATERIELS ET METHODES

A. PARTIE PHYTOCHIMIE

1) Matériel végétal

Garcinia bancana (*Clusiaceae*), un arbre à feuilles persistantes, originaire du Sud de la Thaïlande, de Malaisie et d'Indonésie, a constitué notre matériel d'étude. Les échantillons utilisés lors de notre étude proviennent de Malaisie, en collaboration avec l'université de Malaya (Kuala Lumpur, Pr.K Awang) dans le cadre du projet PANASIA (BioAsie 2016-2017, MEAE)*. Les dates et lieux de récoltes des échantillons sont présentés dans le Tableau 1. L'abréviation KL du numéro d'herbier est utilisée pour Kuala Lumpur (Malaisie). Les parties de plante sont abrégées ainsi : Ec = écorce, Fe = feuille, Fr = fruit.

2) Extraction du matériel végétal

10 g de poudre d'écorce de *G. bancana* (lot KL4967) ont été successivement extraits par le DCM et le MeOH au moyen d'un appareil de Soxhlet. Pour chaque solvant, l'opération a duré 72 heures. Les extraits obtenus ont ensuite été concentrés sous pression réduite à 40 °C à l'aide d'un évaporateur rotatif, pour obtenir des extraits DCM et MeOH secs de 740 mg (rendement 7,4%) et 1,35 g (rendement 13,5%) respectivement.

* Ce travail s'inscrit dans le cadre du projet PANASIA (BioAsie 2016-2017, Ministère de l'Europe et des Affaires Etrangères) visant à valoriser l'activité anti-inflammatoire des polyphénols prénylés de plantes d'origine Malaisienne et Vietnamiennne, appartenant aux familles des *Clusiaceae* et *Calophyllaceae*. Plus précisément, un des axes de recherche, issu de la collaboration entre le laboratoire SONAS, l'université de Malaya (Kuala Lumpur, Pr. K. Awang) et le CRTI, UMR1064, se focalise sur les acylphloroglucinolins modulant l'expression des protéines de l'inflammation et de l'immunité.



Figure 6 : Photos des feuilles, écorces et fruits de *Garcinia bancana*
 Source : http://www.asianplant.net/Clusiaceae/Garcinia_bancana

Tableau 1: Numéro de lots, dates, lieux de récoltes et références des échantillons *Garcinia bancana* étudiés

Espèce	N° d'herbier KL (parties)	Site de collecte	Date de collecte
<i>G. bancana</i> Miq.	4967 (Ec, Fe, Fr)	39 Km Mersing vers Keluang, Johor	21/10/2000
	5033 (Ec, Fe)	51 Km de Dungun à K. Berang, Terengganu	14/05/2003

3) Méthode d'analyse, chromatographie liquide haute performance : HPLC-UV-DAD

Les analyses CLHP ont été effectuées sur un équipement Agilent HP 1100 Series (Agilent Technologies, les Ulis, France) munie d'un injecteur manuel G1328A, relié à un détecteur à barrettes de diodes G13115A, et assisté du logiciel ChemStation for LC 3D. Cette chaîne CLHP peut être couplée à un collecteur de fraction Agilent Technologies 1260 Infinity G1364C.

Avant injection, les échantillons ont été solubilisés dans le MeOH (qualité gradient) et centrifugés à 13000 RPM pendant 10 min afin d'éliminer les particules en suspension. Pour chaque analyse, 10 µL de l'échantillon, concentré à 1 mg/mL, ont été injectés sur une colonne en phase inverse, Pursuit XRs C18 de 250 x 4.6 mm (5µm) (Agilent Technologies) - ou une colonne Luna C18 100A de 250 x 4.6 mm (5µm) (Phenomenex). Les conditions opératoires optimisées et utilisées sont présentées dans le tableau 2.

4) Méthodes de fractionnement des extraits et purification des métabolites secondaires

4.1 Chromatographie flash

Afin de réaliser une étude déréplicative par RMN du carbone 13 (Hubert et al., 2014), l'extrait KL 4967_B_D (650 mg) a été fractionné par chromatographie flash sur gel de silice sur un système CombiFlash Rf-200 (Teledyne Isco.) possédant un détecteur UV et un collecteur de fractions, les conditions opératoires utilisées sont présentées dans le tableau 3. 19 fractions ont été obtenues dont la fraction KL 4967 B_D F14 (30 mg) étudiée au cours de ce travail.

4.2 Purification par CLHP semi-préparative

La fraction KL 4967 B_D F14 à purifier (30 mg), solubilisée dans le méthanol (600 µL) est injectée (volume injecté = 10µL) sur une colonne Luna C18 100A de 250 x 10 mm (5µm) (Phenomenex), à une concentration de 1mg/mL.

Tableau 2 : Conditions d'analyse chromatographiques de l'échantillon KL 4967_B_D F14

Méthode 1	
Colonne	Pursuit XRs C18 250 x 4.6 mm (5µm)
Système de solvants	H ₂ O + 0.1% AF / MeOH + 0.1% AF
Débit	0,6 mL/min
DAD	210 → 410 nm
Méthode 2	
Colonne	Luna C18 100A 250 x 10 mm (5µm)
Système de solvants	H ₂ O + 0,1% AF / MeOH + 0,1% AF
Débit	0,6 mL/min
DAD	210 → 410 nm
Programme d'élution (isocratique)	
Temps (min)	% MeOH+0.1 AF
0	97
25	97

Tableau 3 : Conditions de fractionnement de l'échantillon KL 4967_B_D

Masse de l'extrait	650 mg (+ 1-1.2 g de silice)	
Colonne	Chromabond flash RS 40 SiOH	
Volume colonne	71 mL	
Pression max.	15 bar	
Programme d'élution		
Temps (min)	Cyclohexane (%)	EA (Acétate d'éthyle) (%)
0	100	0
120	70	30

Les paramètres utilisés sont les suivants :

Purification sur colonne semi-préparative : Débit : 2,8 mL/min ; Concentration : 50 mg/mL ;
Volume injecté : 100 µL.

Système de solvants utilisé : MeOH + 0.1% AF / H₂O + 0.1% AF.

Trois injections (deux de 100 µL et une de 50 µL) du produit solubilisé dans le MeOH ont conduit à l'isolement de 3 produits : 8,9 mg de KL4967 B_D F14 1 ($t_R = 8,8\text{min}$), 8,7 mg de KL4967 B_D F14 2 ($t_R = 14,5\text{min}$) et 1.6 mg de KL 4967 B_D F14 3 ($t_R = 18,3\text{min}$). La détection à 254 nm a permis une collecte manuelle (nécessaire pour la dernière injection) couplée à une collecte automatisée.

5) Détermination structurale des composés purifiés

5.1 Préparation des microtubes

Les composés solubilisés dans du méthanol deutéré et de l'acide trifluoroacétique (TFA) (0.1%) ont été transférés soit dans des tubes à extrémité capillaire 507-HP-7 (Norell®, 750 µL), soit dans des tubes capillaires BMT-S-5-400-8-W (Norell®) de 1.7 mm de diamètre (100 µL). L'ajout de TFA limite le dédoublement de signal lors de l'analyse des spectres RMN.

5.2 Analyses RMN

Les spectres mono- et bidimensionnels (¹H, ¹³C, COSY, HMQC, HMBC, DEPT) ont été réalisés sur le spectromètre Jeol 400 MHz YH (Jeol Europe) en utilisant une microsonde Norell ® S400. Le méthanol deutéré a été utilisé comme solvant, le signal du méthanol non deutéré (CH₃OH) résiduel servant de référence pour calibrer le spectre (3.31 ppm sur les spectres RMN ¹H et 49,0 ppm sur les spectres RMN ¹³C). Les valeurs des déplacements chimiques (δ) sont exprimées en partie par million (ppm) et les constantes de couplage (J) en Hertz (Hz). Les spectres sont enregistrés sous forme de fichier MNOVA à l'aide du logiciel MestReNova 6.0 (MestreLab Research S.L).

B. PARTIE BIOLOGIE

1) Culture des cellules endothéliales et des lignées cellulaires

Les cellules endothéliales primaires isolées d'artères de donneurs d'organes (HAEC 43552, 119785, 40340 et 11636) (UMR1064, Nantes) dans un milieu spécifique *Endothelial Cell Basal Medium* (ECBM, Lonza). Ce milieu est supplémenté de 5% de sérum de veau fœtal (SVF, Hyclone™, Thermo Fisher Scientific), de suppléments de croissance des cellules endothéliales (ECGS)/Héparine, de facteur humain de croissance épithéliale (hEGF), de glutamine, de pénicilline et de streptomycine (Life Technologies, Cergy Pontoise, France), de pyruvate de sodium et d'acides aminés non essentiels. Les cellules primaires ont été cultivées à jusqu'à confluence, entre les passages 3 et 6, afin de réaliser les différents traitements. Des lignées cellulaires épithéliales (HEK et HeLa), une lignée de cellules lymphoblastoïde (K562) ont, quant à elles, été cultivées dans du milieu *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM, life technologies®) et RPMI 1640 (life Technologies®) respectivement. Enfin, deux lignées d'hépatocarcinomes (Huh7 et HepG2) ont également été dans un milieu de culture RPMI. L'ensemble des cultures ont été cultivées sous atmosphère humide, à 37°C avec 5% de CO₂.

2) Molécules de référence sélectionnées

La simvastatine (**5**), la fluvastatine (**6**) et l'acide zolédronique (ZA) (**7**) ont été fournis par Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France) et le garcinol (**1**) par StressMarq, Biosciences Inc (Canada). La guttiférone J (**4**) utilisée est un composé de la chimiothèque interne du laboratoire SONAS (pureté de 84.1%)⁵.

Décrits dans la littérature comme des inhibiteurs de HDAC la trichostatine A (**8**) (Sigma-Aldrich) et la vorinostat (**9**) (Cell Signaling Technology, Inc.) ont été retenues dans notre étude³¹, et C646 (**10**) (Sigma-Aldrich) comme inhibiteur de HAT, et plus spécifiquement de CBP/p300³² (figure 7).

L'ensemble de ces molécules a été préparé en solution avec un volume de DMSO défini suivant la concentration finale voulue.

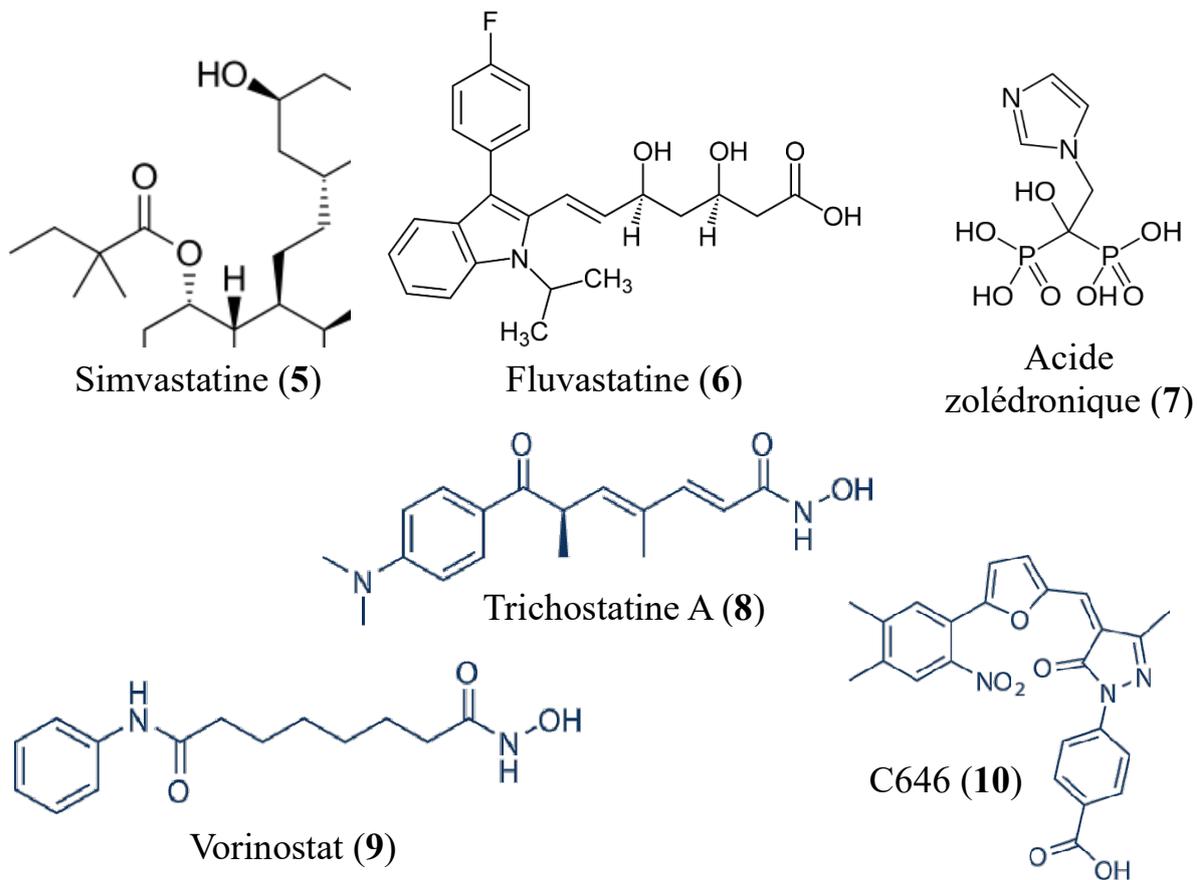


Figure 7 : Structures des molécules de référence sélectionnées (immunosuppressives en noir, et inhibiteurs de HDAC et HAT en bleu)^{28,29,30,31,32}

3) Méthodes d'analyse de l'expression des protéines du CMH et de la voie de l'IFN- γ

3.1 Analyse de la transcription

Cultures et traitement

Les cellules ont été cultivées sous les mêmes conditions que précédemment (voir 1)). Les cellules ont été ensuite incubées pendant 1 heure avec les PPAPs testés à différentes concentrations selon les manipulations (de 5 à 10 μ M), et les molécules de référence (10 μ M), puis ont été traitées entre 15 et 24 heures à l'IFN- γ (100 U/mL). Pour cet essai, un contrôle positif d'activation a été constitué par une boîte de culture uniquement traitée par la cytokine IFN- γ , et un contrôle négatif par une boîte de culture remplie de milieu seul.

Extraction des ARN

Après trois lavages au PBS, 1 mL de TRIzol (Ambion®, life Technologies) a été ajouté aux cellules afin de les lyser pour récupérer l'ARN total des cellules. Les lysats de cellules ont été placés dans des tubes avant d'ajouter 200 μ L de chloroforme (CHCl₃) (200 μ L/mL de TRIzol), puis laissés reposer 2-3 minutes. Afin de séparer les différentes phases constitutives des solutions (ARN et ADN-protéines), les tubes ont été mis à centrifuger pendant 15 minutes à 12000 g à 4°C. La phase aqueuse supérieure contenant les ARN à recueillir (environ 60% du volume initial du TRIzol) a été récupérée à la pipette 200 μ L. Les ARN ont été ensuite précipités dans 500 μ L d'isopropanol à -20°C. Après une centrifugation (20 minutes, 12000 g, 4°C), deux lavages à l'éthanol (70-75%) froid (1 mL) ont été effectués avec une centrifugation de 5 minutes à 7500 g avant de laisser sécher le culot obtenu. Le culot a été repris dans un volume de H₂O entre 25 et 50 μ L.

La lecture de la densité optique (DO) (Condon et al.) à 260nm et 280nm permet d'évaluer la quantité d'ARN (1DO à 260nm équivaut à une concentration de 40 μ g/mL d'ARN) et révèle la présence éventuelle de résidus protéiques dans l'échantillon.

Élimination de l'ADN

Une étape préliminaire à la rétrotranscription est nécessaire afin d'éliminer toute contamination d'ADN génomique présente dans les échantillons. Le traitement à la DNase de 5 μ g d'ARN se fait dans un volume total de 25 μ L contenant du tampon TURBO DNase (2.5 μ L, 10X) et du TURBO DNase (1 μ L, Ambion, Applied Biosystems, Foster city, CA).

Après une incubation de 30 minutes à 37°C, un réactif DNase Inactivation bloque la réaction et une centrifugation (10000 g, 2min) permet de récupérer le surnageant.

RT-PCR

La rétrotranscription se déroule en deux étapes, dans un volume final de 20µL. Les ARN (2µg) sont dilués dans 10µL d'eau et incubés 10 minutes à 70°C en présence des amorces oligodT (2µL), de DTT (1µL à 1M) et des dNTP (5µL à 2.5M). Après cette étape de dénaturation et d'hybridation de l'amorce, une phase d'élongation de 1h à 37°C est réalisée en présence de RNase OUT (1µL à 400U/µL, Invitrogen) et de reverse transcriptase (1µL M-MLV à 200U/µL, Invitrogen).

La PCR quantitative en temps réel est réalisée en utilisant les sondes et amorces commerciales TaqMa® pour MICA (Hs00792195_m1), HLA-E (Hs03045171_m1), STAT1 (Hs01013996_m1) et SOCS1 (Hs00705164_s1). La quantification relative de transcrits des gènes analysés est obtenue par normalisation avec un gène de ménage, i.e. un gène non impacté par les conditions testées (effet des PPAPs ici) et qui présente alors peu ou pas de variations du nombre de transcrits entre ces différentes conditions. Un criblage a été alors nécessaire afin de déterminer le gène de ménage approprié pour nos conditions d'étude : parmi différents gènes de ménage testés, RPLPO (Ribosomal protein, large, PO) (Hs99999902_m1) a été retenu comme gène de ménage pour notre étude.

Cette quantification est réalisée selon la méthode comparative C_T ($\Delta\Delta C_T$ Method, Applied biosystems™, life technologies™, 2017), où le nombre de transcrits est évalué par la formule arithmétique :

$$2^{-\Delta\Delta C_T}$$

Les résultats sont ensuite exprimés en expression relative par rapport à RPLPO. Pour nous permettre de faire une analyse comparative entre les PPAPs et molécules de référence, le nombre de transcrits a été normalisé à un facteur 1 en condition milieu de culture seul.

3.2 Analyse protéique

3.2.1 Cytométrie de flux

Principe de la cytométrie en flux

La cytométrie en flux est une technique qui permet d'analyser l'expression de différentes molécules pour une population cellulaire donnée. Le cytomètre (BD

FACSCANTO II, Becton Dickinson, San Jose, CA, Etats-Unis) détecte la lumière transmise par la cellule quand elle reçoit un faisceau laser. Pour cela, les cellules sont mises en suspension et passent une à une devant le laser et peuvent alors transmettre directement la lumière à un capteur situé en face du laser, renseignant sur la taille relative de la cellule (FSC pour Forward SCatter), ou diffracter la lumière vers un capteur situé à 90° par rapport à l'incidence du rayon laser initial, renseignant alors sur la granulosité de cette même cellule (SSC pour Side SCatter). Grâce à des lasers d'excitation, lorsque les cellules sont marquées par un fluorochrome, porté par un anticorps primaire ou secondaire, elles émettent un signal lumineux dont la longueur d'onde lui est propre. Ces rayons sont alors détectés par des photomultiplicateurs (PMT) qui transforment le signal lumineux en un signal électrique proportionnel à la lumière reçue (figure 8). Les signaux sont alors visualisés, après traitement informatique (logiciel FlowJo 7.6.2, Tree Star Inc., Ashland, OR, Etats-Unis) sous forme de graphiques bidimensionnels (nuage de points) ou d'histogrammes. Cette analyse est complétée par le logiciel GraphPad Prism® (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). L'intensité de la fluorescence est proportionnelle à la quantité d'anticorps fixée, qui reflète le niveau d'expression de l'antigène étudié.

Immuno-marquage des cellules

Après culture en plaque 6 puits (Nunc Brand Product), dans un milieu de culture déprivé (sans facteur de croissance et 2% de SVF), les PPAPs et molécules de référence ont été incubés pendant 1h avant le traitement par l'IFN- γ (100X pour une concentration finale de 100U/mL) (R&D Systems). Plusieurs durées de traitement ont été testées : 24 et 48h. Un contrôle positif d'activation a été constitué par un puits uniquement traité par l'IFN- γ , et un contrôle négatif par du milieu seul. A la fin du traitement, les cellules (environ 2.105 cellules par puits) sont transférées dans un plaque 96 puits à fond conique non stérile (Nunc Brand Product) puis lavées 2 fois avec un tampon PBS-BSA 1%-Azoture de sodium 0.05%. (Sigma-Aldrich). Les cellules ont été ensuite incubées avec l'anticorps spécifique, couplé à un fluorochrome, de la protéine d'intérêt (dilution 1 :24) à 4°C pendant 20 minutes à l'abri de la lumière.

Les anticorps utilisés sont répertoriés dans le tableau 4. A la suite de ce marquage, les cellules sont à nouveau lavées avec un tampon PBS-BSA 1%-Azoture de sodium 0.05%, puis fixées au paraformaldéhyde 4% (PFA, Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, Etats-Unis) à 4°C pendant 10 minutes et conservées dans la solution de lavage jusqu'à la lecture.

Tableau 4 : Anticorps primaires utilisés en cytométrie en flux lors de l'immuno-marquage

Protéine ciblée dans notre étude	Anticorps primaires utilisés (eBioscience Inc. San Diego, CA, USA)
HLA-E	Anti-Human HLA-E conjugué à l'allophycocyanine (APC) (clone 3D12HLA-E)
HLA de classe I	Anti-Human HLA-ABC conjugué à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) (clone W6/32)
HLA de classe II	Anti-Human HLA-DR conjugué à la phycoérythrine (PE) (clone L243)
MICA	Anti-Human MICA/B conjugué à la phycoérythrine (PE) (clone 6D4)

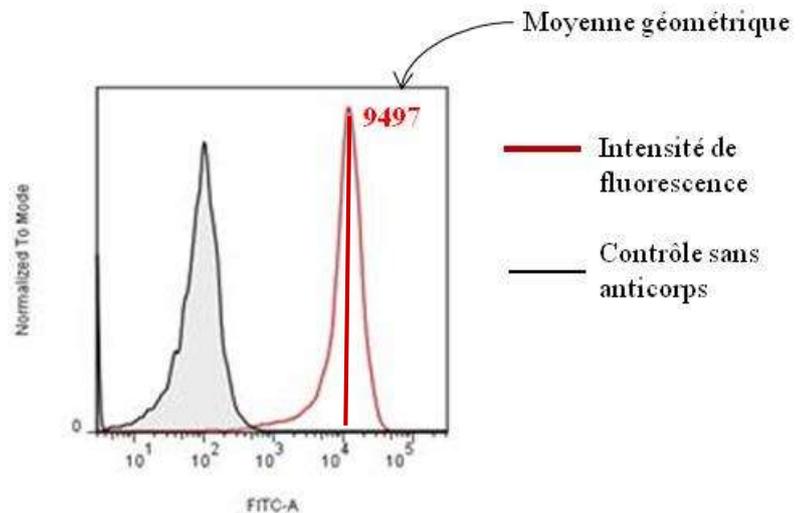
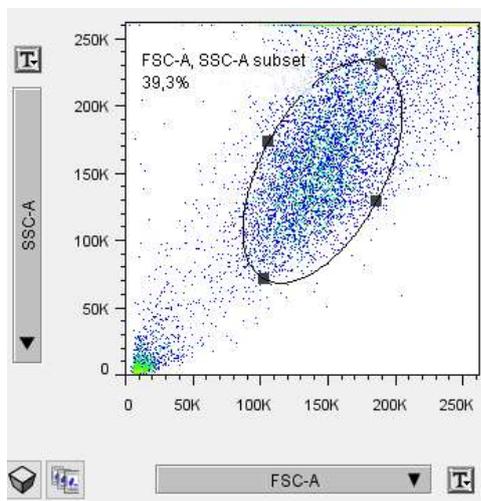


Figure 8 : Fenêtre d'acquisition avec ciblage de la population (gauche) et représentation des résultats de FACS (droite)

Cette plaque inclue un puits contrôle (négatif) non marqué afin de soustraire l'auto-fluorescence des cellules.

Analyse des résultats

Les fenêtres d'analyse ont été définies d'après les caractéristiques de taille et de granulosité, en excluant les cellules mortes et débris cellulaires. Les résultats sont exprimés sous la forme d'histogrammes montrant le log de l'intensité de fluorescence en fonction du nombre de cellules (figure 8). La moyenne de l'intensité de fluorescence, « geometric mean ou moyenne géométrique », est calculée sur l'ensemble des évènements recensés par le cytomètre dans la fenêtre d'analyse sélectionnée.

Pour permettre une analyse comparative des effets des différentes molécules testées, le niveau d'expression basale des molécules du CMH a été normalisé à 100% en condition milieu de culture seul, et celui de l'expression régulée en condition milieu+IFN- γ .

3.2.2 Western Blot

Principe

Il s'agit d'une technique semi-quantitative permettant de détecter une protéine spécifique dans un échantillon donné d'extrait tissulaire ou de lysat cellulaire. Cette technique utilise l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide pour la séparation des protéines, préalablement dénaturées, selon leur masse.

Les protéines sont ensuite transférées depuis le gel sur une membrane (généralement en nitrocellulose) où elles sont exposées à un anticorps spécifique de la protéine d'intérêt. Grâce à cette technique, il est alors possible de détecter la présence d'une protéine dans un tissu ou dans une cellule, de l'identifier selon sa taille, sa concentration et les variations de cette concentration selon les conditions testées.

Technique

Les cellules sont lysées dans du tampon RIPA (10X RIPA buffer, Cell signaling Technology, CA, USA) contenant des inhibiteurs de protéases et de phosphatases (Protein inhibitor cocktail, Sigma, USA). Afin de dénaturer les protéines, les échantillons ont été mis à 95-100°C pendant 10min.

Les protéines de chaque échantillon sont ensuite séparées en fonction de leur taille sous l'influence d'un courant électrique (200V entre 1h30 et 2h) par électrophorèse dans un gel SDS-PAGE (Polyacrylamide Gel Electrophoresis) à 12%. La partie supérieure du gel (stacking gel) présente une concentration de 4% d'acrylamide et permet la concentration des protéines pour obtenir une migration uniforme de celles-ci. Un marqueur de taille migre parallèlement aux échantillons, il permettra de déterminer le poids moléculaire de la protéine d'intérêt révélée. Cette électrophorèse est réalisée dans un tampon de migration dont la composition, comme celle du gel, est détaillée en annexe. Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane de nitrocellulose (ECL Hybond™, Amersham Biosciences, UK) dans un tampon de transfert à l'aide d'un appareil de transfert en milieu semi-liquide (Trans-Blot™ SD semi-dry electrophoretic Transfert Cell, Bio-Rad, CA). En effet, les protéines sont chargées négativement par le SDS et vont donc pouvoir être transférées sur la membrane sous l'influence d'un courant électrique (20V, 20min). Suite à cette étape de transfert, la membrane est saturée pendant au minimum 2h dans du tampon contenant de la BSA afin d'éviter la fixation non spécifique des anticorps.

La membrane est ensuite mise à incuber durant la nuit à 4°C avec un anticorps primaire spécifique de la protéine d'intérêt (dilution 1 :1000) : dans notre étude, les anticorps primaires utilisés ont été les anticorps monoclonaux de lapin Stat1 (D1K9Y) et Phospho-Stat1 (Tyr701) (58D6) (Cell signaling Technology®, Inc.). Puis, la membrane est lavée et incubée pendant 2h à température ambiante avec un anticorps secondaire couplé à la peroxydase et spécifique de l'anticorps primaire (IgG anti-Rabbit). Une nouvelle série de lavages est faite et le substrat de l'enzyme peroxydase (SuperSignal® West Pico, Chemiluminescence substrate, Thermo Scientific, USA) est ajouté sur la membrane. La présence de la protéine d'intérêt est révélée par l'émission de lumière issue de la transformation du substrat par l'enzyme grâce à un analyseur de luminescence LAS-4000 (Fujifilm, Tokyo, Japon). Les bandes ainsi mises en évidence correspondent aux protéines sur lesquelles l'anticorps primaire s'est fixé. Les variations d'intensité des bandes sont calculées avec le logiciel MultiGauge (Fujifilm).

Afin de contrôler la quantité de matériel présente dans chaque échantillon, les protéines de la GAPDH et ACTB, exprimées de façon constante dans les cellules, sont révélées par un anticorps spécifique. Ce contrôle permet de normaliser la quantité de protéines de chaque échantillon. Les différentes solutions utilisées lors de cette technique sont détaillées dans l'annexe III.

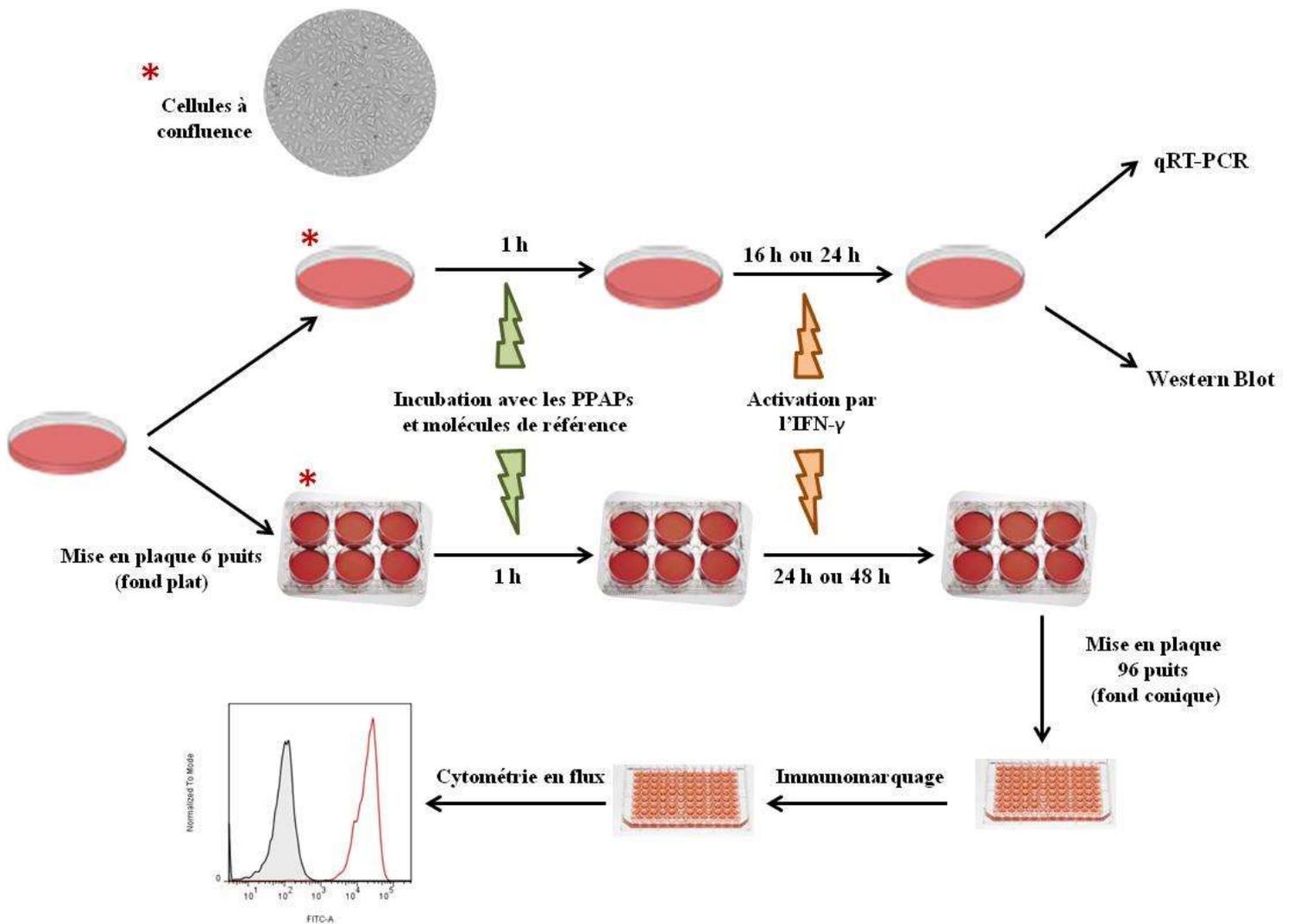


Figure 9 : Schéma de l'ensemble des protocoles mis en place pour les différentes méthodes d'analyse

III. RESULTATS ET DISCUSSIONS

Lors de précédents travaux, l'EA 921 SONAS et l'équipe 4 de l'UMR1064 ont montré que des polyphénols polyprénylés (P²) isolés de plantes, appartenant à la famille de *Clusiaceae* notamment, modulaient l'expression de certaines molécules du CMH impliquées dans les réponses immunes⁵. Parmi ces P², la guttiférone J (4), un acylphloroglucinol polyprénylé polycyclique (PPAP) a retenu notre attention en raison de son effet inhibiteur majeur sur l'expression de HLA de classe II et HLA-E, et non sur HLA de classe I et MICA. Ce composé constituera ainsi un PPAP de référence dans nos évaluations biologiques. Afin de déterminer si l'effet de la guttiférone J (4) est induit par tous les PPAP ou propre à cette molécule, les effets du garcinol (1), largement décrit dans la littérature comme un PPAP ayant des effets sur des facteurs de la voie de signalisation de l'IFN- γ ^{25, 26, 27}, seront également étudiés. Par compléter cette étude, lors de mon stage, d'autres PPAPs ont été purifiées à partir d'une plante du genre *Garcinia*, potentiellement riche en PPAPs.

A. ETUDE PHYTOCHIMIQUE

1) Résultats antérieurs : fractionnement et étude déréplicative de l'extrait dichlorométhanique d'écorces de *Garcinia bancana* (KL4967)

Dans le cadre de la recherche de sources de PPAP nouveaux et/ou potentiellement actifs biologiquement, une étude déréplicative sur des extraits de plantes issues des *Clusiaceae* et *Calophyllaceae* de Malaisie a été menée à l'EA 921 SONAS préalablement à mon arrivée, notamment dans le cadre du projet PANASIA*. Ainsi, l'analyse LC-DAD-MS² indiquait que, sur 206 extraits DCM ou MeOH (35 espèces, 57 lots, 103 parties de plantes), 17 extraits DCM contenaient probablement des PPAPs dont les extraits DCM d'écorce de *Garcinia bancana* (KL4967 et KL5033).

Plus précisément, le profil CL-UV-SMⁿ de cet extrait (figure 10), montre que le poids moléculaire des composés se situe entre 586 et 602 g/mol. Toutefois, l'identification précise de ces composés de formule brute très proche (poids moléculaires aux alentours de 600 g/mol) n'est pas aisée et ne peut être appuyée en intégralité par la littérature encore trop pauvre concernant la fragmentation en spectrométrie de masse de ces composés.

Aussi une analyse dérèplicative par RMN du carbone 13 (Hubert et al., 2014) a été entreprise après fractionnement de l'extrait DCM d'écorce KL4967B (KL 4967_B_D). Elle indique qu'il contiendrait les PPAPs suivants ou leurs dérivés (figure 11):

- Le Cycloxanthochymol (MW 602 g/mol)
- Le Xanthochymol (MW 602 g/mol)
- Le Garcinol (ou un isomère, la Guttiférone E) (MW 602 g/mol)
- Le 13, 14-didéoxyisogarcinol (MW 570 g/mol)

Ces hypothèses sur la nature des composés présents dans l'extrait KL4967_B_D sont cohérentes avec :

- les travaux précédents où du garcinol et de l'isogarcinol ont été isolés à partir des feuilles et des brindilles de *G. bancana* (BioAsie, 2016) ;
- le profil CL-UV-SMⁿ de cet extrait (figure 10),

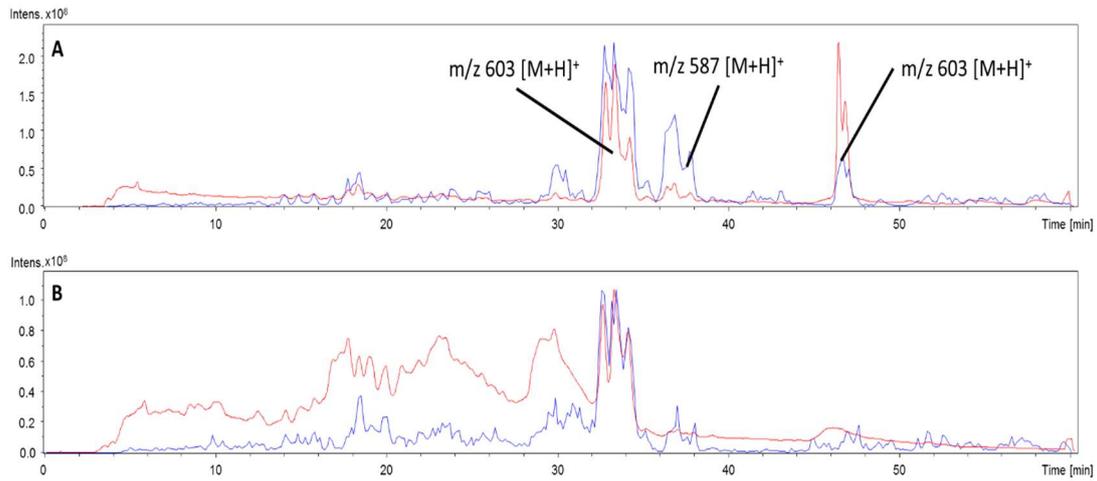


Figure 10 : CLHP-UV (270 nm) (Rouge) et flux d'ions total (TIC) à partir des chromatogrammes CLHP-ESI+-SM (bleu) pour les extraits DCM KL4967_B (A) et KL5033_B (B) (BioAsie, 2016)

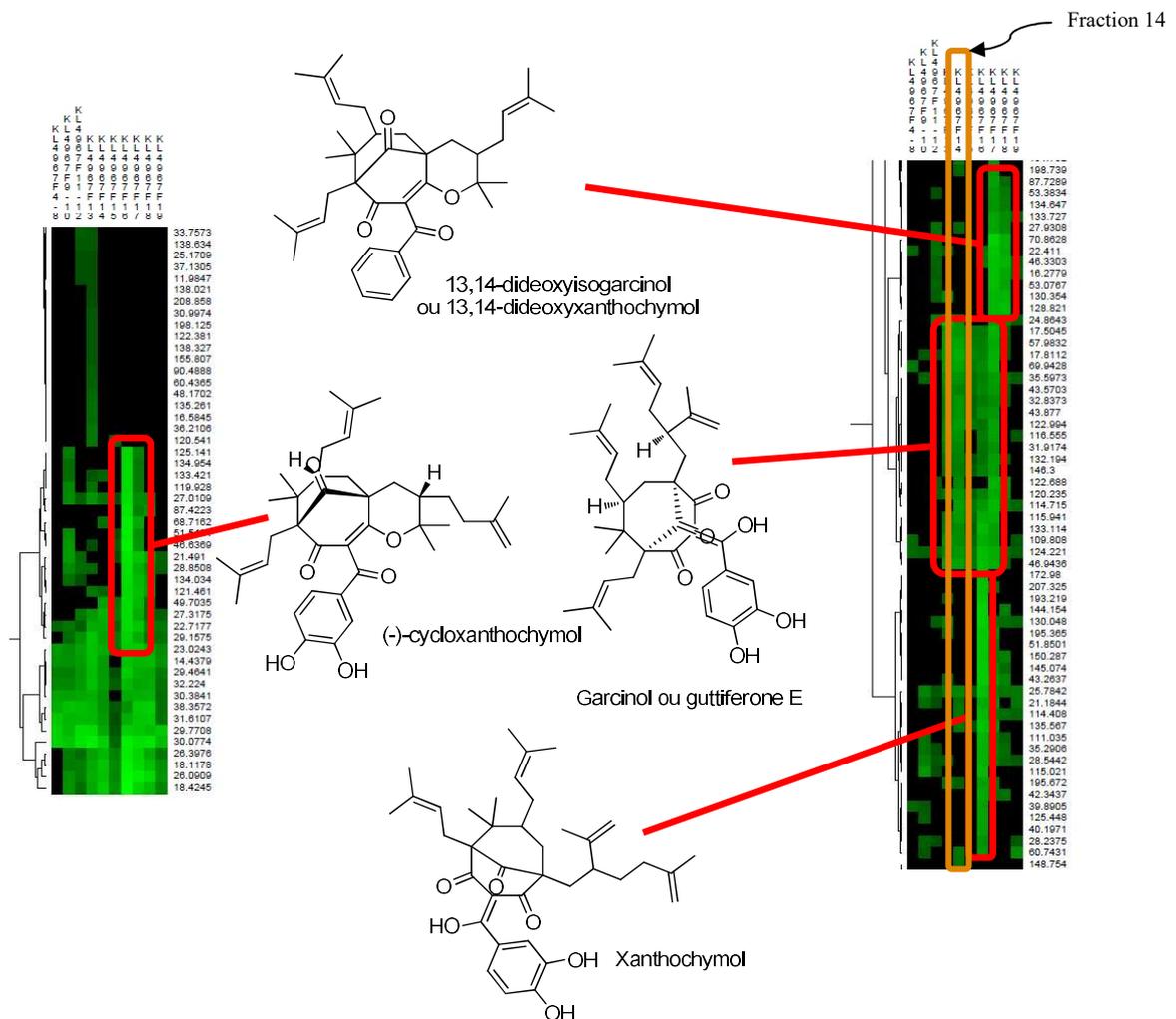


Figure 11 : Clusters de déplacements chimiques obtenus pour l'extrait KL 4967_B_D DCM et composés hypothétiques présents (BioAsie, 2016)

2) Purification de l'extrait KL4967 B D F14

Les composés d'intérêt possédant des spectres UV caractéristiques de PPAPs présents dans l'extrait KL4967_B_D F14 ont été purifiés. L'analyse par CLHP-DAD de l'extrait 4967 DCM d'écorces de *G. bancana* montre nettement la présence d'un composé majoritaire (**P₂**) élué après 14,5min dans les conditions chromatographiques optimisées (tableau 5) et présentant un maximum d'absorbance à 254 nm. Des composés plus minoritaires (**P₁** et **P₃**), affichant un profil UV semblable sont également présents (figure 12).

Le tableau 5 regroupe les résultats obtenus de la purification de la fraction KL4967 B_D F14. Le composé majoritaire a été purifié sous la forme d'une huile jaune, l'aspect caractéristique de certains PPAPs, comme le garcinol (**1**). De plus, le spectre UV de **P₂** reste très similaire à celui du garcinol : deux pics d'absorbance à 252 nm et 360 nm (255nm et 365 nm pour le garcinol, annexe I).

3) Identification des PPAPs purifiés

Les structures des PPAPs isolés à partir de l'extrait KL 4967_B_D F14 sont élucidées à l'aide des données des spectres RMN monodimensionnels comparées à celles de la littérature.

L'analyse des spectres monodimensionnels (¹H et ¹³C RMN), qui présentaient de nombreux signaux (au-delà de 60 signaux pour la RMN du ¹³C, annexe II), a mis en avant la présence de plusieurs composés dans le « produit majoritaire » (**P₂**) isolé.

Avec le travail préliminaire qu'a constitué l'étude déréplicative par RMN du carbone 13, nous savions que les produits isolés étaient des dérivés du garcinol (**1**) (figure 11). Cela a également été confirmé par le profil des spectres monodimensionnels obtenus où les signaux caractéristiques de PPAPs ont pu être retrouvés (annexe II).

De ce fait, par comparaison avec les données de la littérature sur les PPAPs^{33, 34}, l'identification des composés présents dans **P₂** a pu être faite.

Tableau 5 : Composés obtenus après purification de l'extrait KL 4967_B_D F14

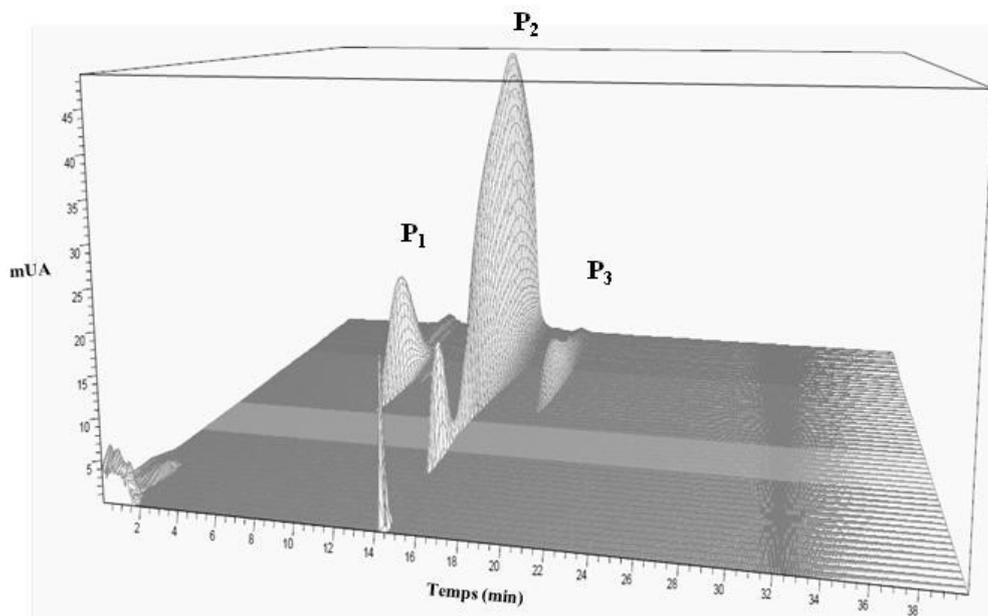
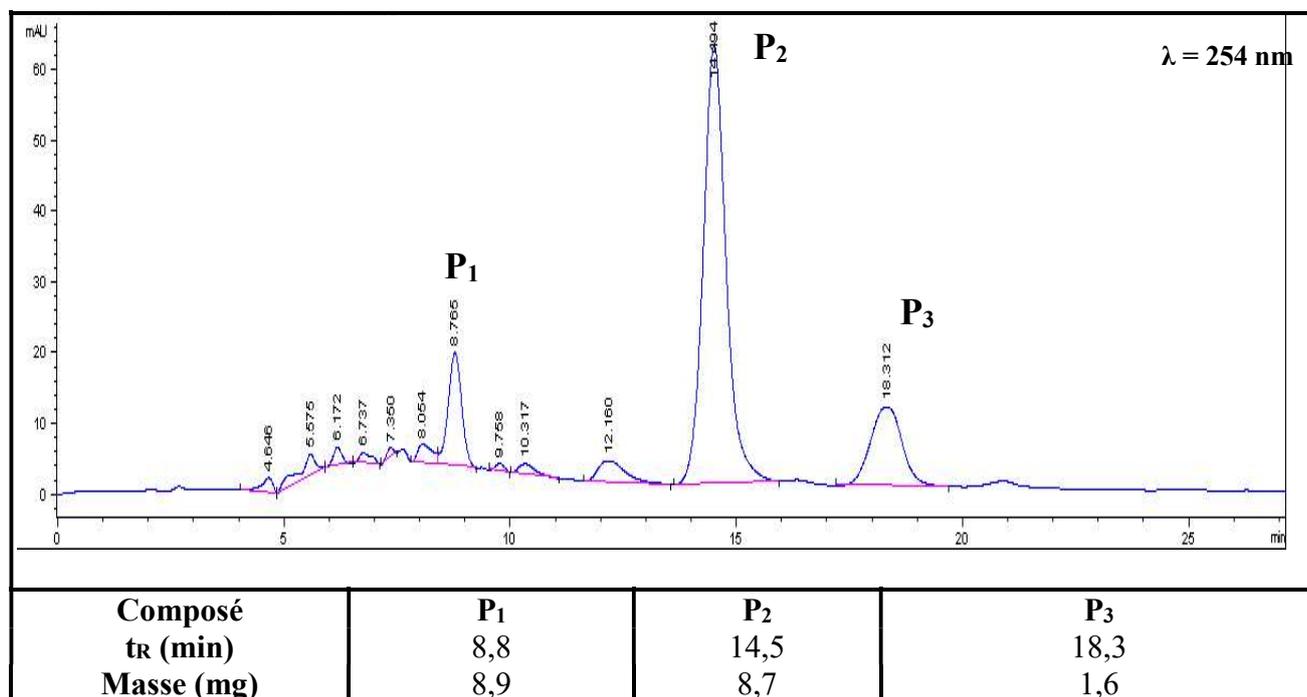


Figure 12 : Profil CLHP (3D PLOT) de KL4967_B_D F14, selon les méthodes du tableau 2

Certains déplacements chimiques sont communs aux deux PPAPs alors identifiés, le xanthochymol **2** et la guttiférone F **11**, alors que d'autres sont spécifiques à l'un ou à l'autre (tableau 6). Par exemple, le déplacement chimique du C-33, porteur d'un groupement méthyle pour les deux composés, reste différent : 17,7 ppm pour **2** et 18,2 ppm pour **11**^{33,34}. De la même manière, plusieurs déplacements chimiques se distinguent entre les deux produits naturels, notamment des signaux de carbones des chaînes prényles : particulièrement les signaux de C-35, C-37 et C-38 qui reflètent le « déplacement » d'une double liaison en fin de chaîne prényle (tableau 6, figure 13). Cette différence au niveau de la chaîne prényle, couplée aux données de la littérature, nous a permis de faire la distinction entre ces deux composés et de les identifier : il s'agit de la guttiférone F (**11**) et du xanthochymol (**2**).

Cependant, la séparation de ces composés restant très difficile et délicate, le *ratio* de ces deux composés n'a pu être établi par CLHP. Ayant distingué les signaux caractéristiques de chacun, une RMN quantitative pourrait être envisagée afin de déterminer ce *ratio*.

Ainsi, l'étude phytochimique a permis l'obtention de PPAPs dérivés du garcinol (**1**) à partir d'écorces de *G. bancana*, isolés sous forme d'un mélange. Ce mélange, de guttiférone F (**11**) et de xanthochymol (**2**), sera nommé « GX » lors de l'étude biologique visant à caractériser les effets des PPAPs sur la régulation de molécules du CMH notamment.

Tableau 6 : Déplacements chimiques caractéristiques permettant la distinction des deux types de molécules présentes dans la fraction P₂ (signaux du xanthochymol (2) en bleu, signaux de la guttiférone F (11) en blanc)^{33,3}

N° Carbone	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	Type de C	$\delta^1\text{H}$ (ppm)
10	195,4	Cq	/
10	196,1	Cq	/
31	149,4	Cq	/
31	148,9	Cq	/
32	113,5	CH ₂	4,5
32	113,0	CH ₂	4,46
33	18,2	CH ₃	1,58
33	17,7	CH ₃	1,61
35	124,1	CH	5,04
35	36,8	CH ₂	1,84
37	110,4	CH ₂	4,64
37	26,0	CH ₃	1,66
38	22,8	CH ₃	1,69
38	18,2	CH ₃	1,59

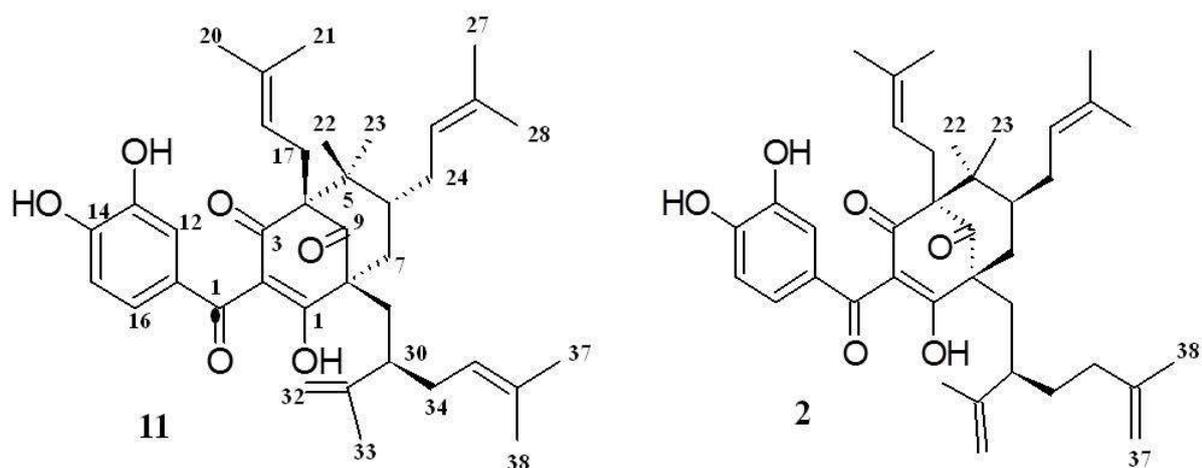


Figure 13 : Identification de la guttiférone F (11) et du xanthochymol (2) obtenus lors de la purification du produit P₂ (tableau 5)^{33,34}

B. Etude Biologique : Caractérisation des effets biologiques

1) Effet régulateur des PPAPs sur l'expression des molécules du CMH à la surface des cellules

Le garcinol (1) et la guttiférone J (4), ayant montré des effets inhibiteurs sur certaines molécules du CMH⁵, ont été considérés comme des PPAPs de référence lors de la caractérisation des effets biologiques de GX (2, 11). Nous avons également utilisé deux statines (5 et 6) qui, indépendamment de leur effet d'inhibition de la HMG CoA, ont un effet sur les molécules du CMH de classe II voire de classe I²⁸ et l'acide zolédronique (7) déjà utilisé dans l'étude précédente de notre équipe⁵.

1.1 Expression et régulation des molécules du CMH

La technique de cytométrie en flux nous a permis d'analyser l'expression des molécules du CMH à la surface des cellules en absence et présence d'IFN- γ . L'intensité de la fluorescence reflète le niveau d'expression des protéines étudiées (figure 14). En absence de traitement, les CE expriment les molécules du HLA de classe I, HLA-E et MICA (figure 14). Un traitement avec de l'IFN- γ permet l'induction des molécules du HLA de classe II, où la moyenne géométrique passe d'environ 200 à 2410. L'IFN- γ augmente l'expression de HLA de classe I et de HLA-E et diminue l'expression de MICA avec une moyenne géométrique proche de 200 (figure 14). Nous avons ensuite analysé l'effet des PPAPs (1, 2, 11 et 4) sur l'expression basale (figure 15A) et régulée par un traitement avec de l'IFN- γ de 48h (figure 15B).

1.2 Effet des PPAPs sur les expressions basale et régulée par l'IFN- γ des molécules du CMH

Tout d'abord, la figure 15B permet de montrer l'activation des cellules par l'IFN- γ qui induit une forte surexpression des molécules du HLA de classe I et HLA-E (jusqu'à un facteur 10) et une induction de HLA de classe II après 48h de traitement. En absence de traitement, nous observons que les 3 PPAPs ont des effets variables sur HLA de classe I, HLA-E et MICA (figure 15A). Le garcinol (1) et GX (2, 11) diminuent l'expression de HLA de classe I et de HLA-E, avec une inhibition allant jusqu'à 30% pour le garcinol (1), mais seul le garcinol (1) régule MICA avec une inhibition de 20%. La guttiférone J (4) diminue uniquement HLA-E. Les statines (5, 6) et ZA (7) n'ont d'effet que sur HLA de classe I : ces effets sont relativement modérés avec une inhibition de l'ordre de 25% (figure 15A).

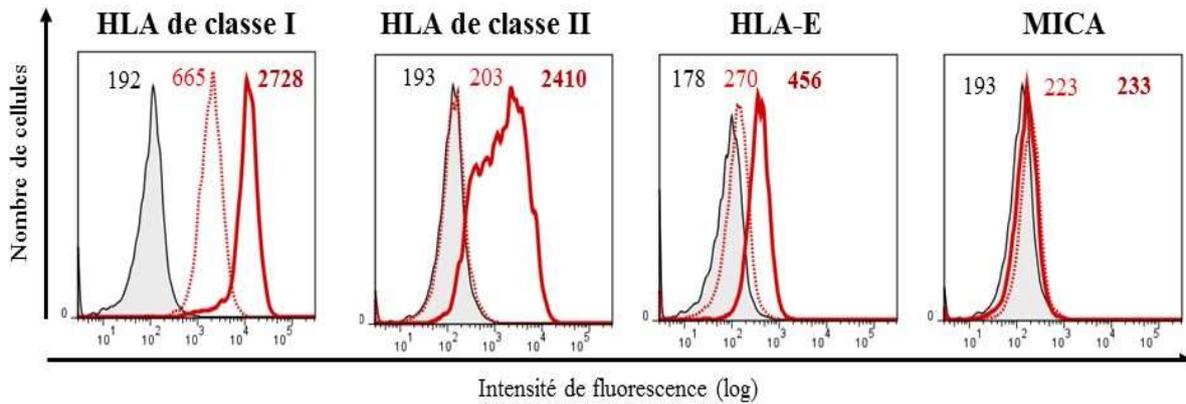


Figure 14 : Analyse par FACS de l'expression membranaire des molécules du CMH. Les résultats du FACS sont exprimés sous forme d'histogrammes présentant le log de l'intensité spécifique de fluorescence en fonction du nombre de cellules analysées. Le contrôle, présenté ici en trait fin noir, représente les mêmes cellules non marquées par un anticorps (évaluation d'une éventuelle autofluorescence). Les résultats des cellules marquées non traitées sont en trait fin rouge, et les cellules traitées avec l'IFN- γ pendant 48h sont en trait épais rouge. Les valeurs au-dessus de chaque histogramme indiquent les moyennes géométriques de chacune des conditions.

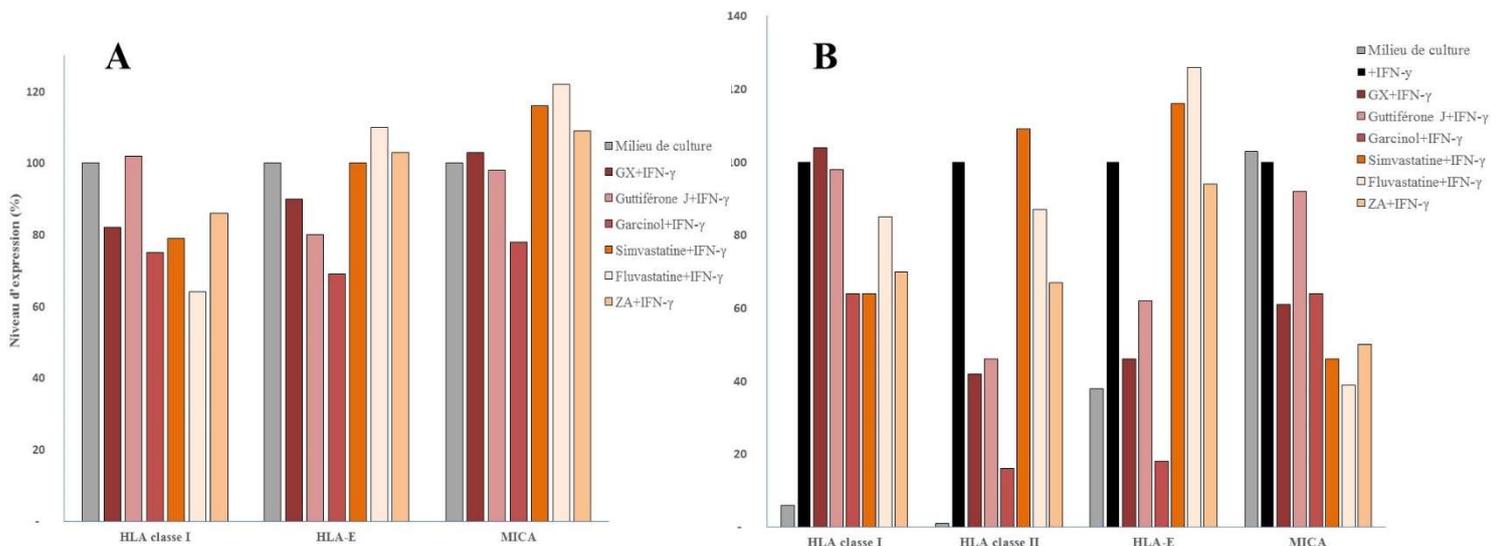


Figure 15 : Effet des PPAPs et molécules de référence sur l'expressions basale (A) et régulée par l'IFN- γ (B) de molécules du CMH. Les CE ont été traitées par l'IFN- γ (100U/mL) pendant 48h. Les PPAPs et molécules de référence sont testés à 10 μ M. Les graphiques représentent les niveaux d'expression des molécules du CMH obtenus par cytométrie de flux. La condition « +IFN- γ » constitue le contrôle. Pour l'analyse de régulation de l'expression basale, le niveau d'expression a été normalisé à 100% avec la condition « Milieu de culture ». Pour l'analyse de régulation de l'expression régulée par l'IFN- γ , le niveau d'expression a été normalisé à 100% avec la condition « +IFN- γ ».

Les 3 PPAPs ont donc des effets inhibiteurs qui varient selon la molécule du CMH étudiée, mais ont tous les trois un effet sur HLA-E. Toutefois, cet effet n'est observé ni pour les statines (5, 6) ni pour ZA (7).

Ensuite, nos résultats montrent un effet majeur des PPAPs sur les molécules du HLA de classe II et HLA-E dont l'expression est diminuée fortement par rapport à la condition IFN- γ . Les PPAPs testés présentent un fort effet inhibiteur sur la protéine HLA-E avec une diminution de l'expression allant de 50 % avec la guttiférone J (4) à 80% avec le garcinol (1). De la même manière, ces composés induisent une inhibition supérieure à 50% de l'expression du HLA de classe II.

La régulation de la protéine HLA-E par l'IFN- γ n'est ici refreinée par aucune des molécules de référence testées. Toutefois, un effet sur les molécules du HLA de classe II induites est observé pour la fluvastatine (6) et ZA (7) avec une inhibition modérée et quatre fois moins importante que celle obtenue avec le garcinol (1). Les statines testées et ZA présentent un effet inhibiteur pour les molécules du HLA de classe I et, de manière beaucoup plus importante, sur la protéine MICA avec une diminution de l'expression supérieure à 50%. Au contraire, les expressions du HLA de classe I et de MICA sont moins affectées par les PPAPs avec une inhibition maximale de 30%.

Ainsi, ces résultats suggèrent un effet inhibiteur prépondérant des PPAPs sur HLA-E et HLA de classe II. L'effet inhibiteur observé pour les PPAPs semble plus fort lors d'un traitement par l'IFN- γ que sur l'expression basale.

2) Régulation de l'expression transcriptionnelle des molécules du CMH par les PPAPs

Une quantification des ARNm codants pour les protéines HLA de classe I (HLA-A2), HLA-E et MICA a été réalisée afin d'analyser la régulation du nombre de transcrits en présence des PPAPs. Les résultats sont exprimés par rapport à la condition de traitement des échantillons par l'IFN- γ seul.

Tout d'abord, la figure 16A montre la quantification des ARNm codant pour HLA-A2 (HLA de classe I) dans les différentes conditions de traitement. L'IFN- γ augmente d'un facteur 3,5 ce nombre d'ARNm après 16h de traitement. Les PPAPs, et plus particulièrement GX (2, 11) diminuent le taux d'ARNm de HLA-A2, avec une diminution d'environ 25%. La simvastatine

(5) et ZA (7) n'impactent pas l'expression transcriptionnelle de HLA-A2 où aucune différence significative n'est observable.

Ensuite, la figure 16B montre la quantification des ARNm codant pour HLA-E dans les différentes conditions de traitement. Nos résultats indiquent que l'IFN- γ augmente d'un facteur 4 le taux d'ARNm d'HLA-E dans les cellules après 16h de traitement. Nous n'observons pas de différence significative pour les cellules traitées avec les PPAPs, la simvastatine et ZA. Toutefois, une tendance vers une diminution est observée pour le garcinol (1).

Pour finir, les résultats de la figure 16C, qui indique le nombre d'ARNm codant pour MICA, montrent que l'IFN- γ diminue ce taux d'ARNm après 16h de traitement. Le garcinol (1) et GX (2, 11) diminue encore plus fortement le nombre d'ARNm de MICA, avec une inhibition d'un facteur 2. Aucune différence significative avec la condition IFN- γ n'est observée pour la guttiférone J (4), la simvastatine (5) et ZA (7).

L'effet inhibiteur du garcinol (1) et de GX (2, 11) observé précédemment sur l'expression de molécules du CMH est retrouvé au niveau transcriptionnel avec une diminution du taux d'ARNm codant pour HLA-A2 et MICA. L'effet est également observé avec la guttiférone J (4) sur HLA de classe I. Cet effet semble également se retrouver au niveau de l'expression transcriptionnelle de HLA-E avec le garcinol (1). Par analogie structurale, GX (2, 11) pourrait avoir un mode d'action identique au garcinol (1).

Ainsi, une analyse de l'effet de l'inhibition de HAT et de HDAC sur l'expression des molécules du CMH a été réalisée.

3) Effet des inhibiteurs de HAT et de HDAC sur l'expression des molécules du CMH à la surface des cellules

Le garcinol (1) étant décrit dans la littérature comme inhibiteur de HAT²⁶, et l'acétylation/désacétylation de STAT1 étant régulée par une HAT (CBP/p300) et une HDAC^{21, 22}, il semblait intéressant de faire une analyse comparative des effets des PPAPs à ceux d'inhibiteurs de HAT et de HDAC. Les inhibiteurs que nous avons choisis sont : la trichostatine A (8), C646 (10) et la vorinostat (9) (figure 17)^{31, 32}.

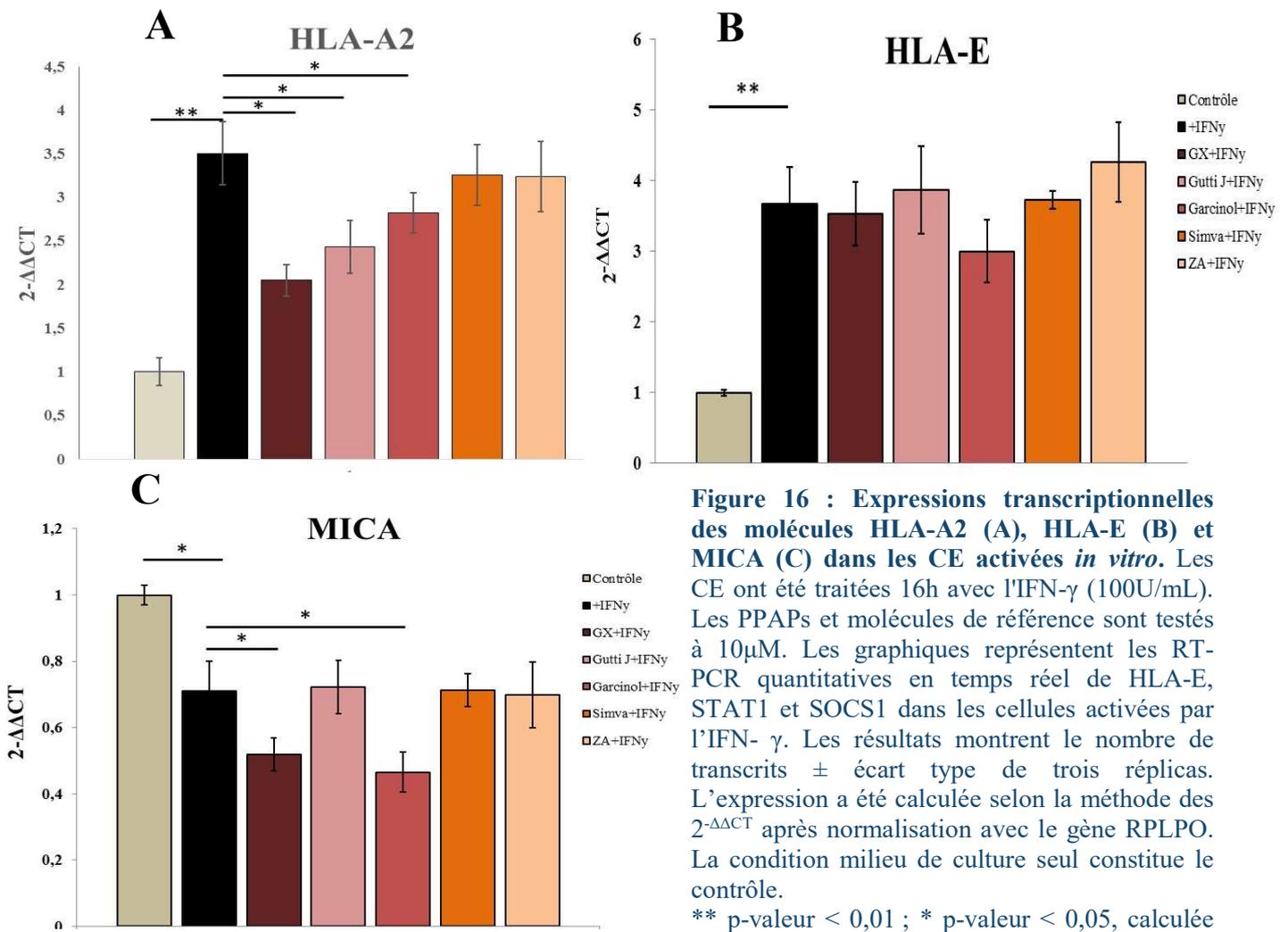


Figure 16 : Expressions transcriptionnelles des molécules HLA-A2 (A), HLA-E (B) et MICA (C) dans les CE activées *in vitro*. Les CE ont été traitées 16h avec l'IFN- γ (100U/mL). Les PPAPs et molécules de référence sont testés à 10 μ M. Les graphiques représentent les RT-PCR quantitatives en temps réel de HLA-E, STAT1 et SOCS1 dans les cellules activées par l'IFN- γ . Les résultats montrent le nombre de transcrits \pm écart type de trois réplicas. L'expression a été calculée selon la méthode des $2^{-\Delta\Delta CT}$ après normalisation avec le gène RPLPO. La condition milieu de culture seul constitue le contrôle. ** p-valeur < 0,01 ; * p-valeur < 0,05, calculée par test de Kruskal-Wallis avec Excel XLSTAT.

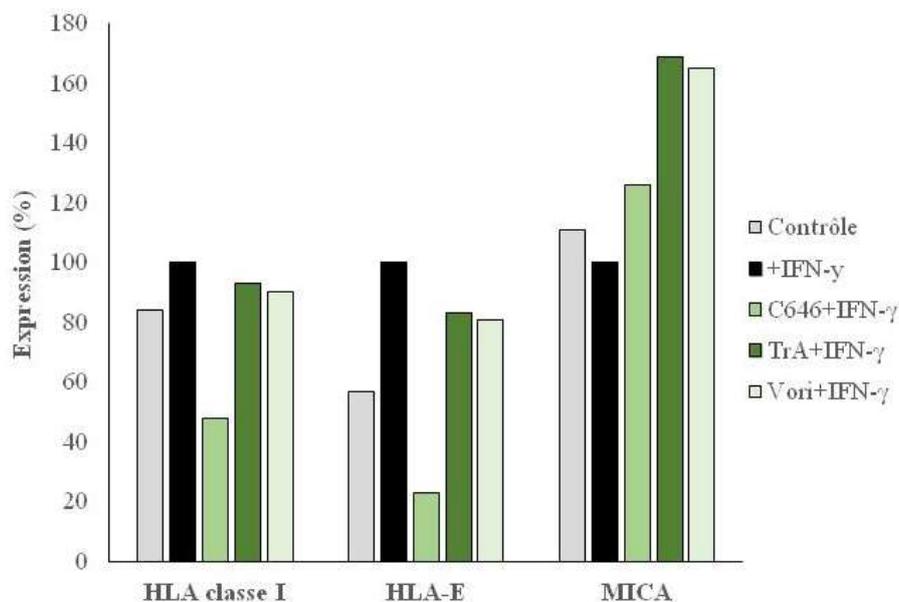


Figure 17 : Effet des inhibiteurs HAT et HDAC sur l'expression régulée de molécules du CMH par l'IFN- γ . Les CE ont été traitées avec de l'IFN- γ pendant 24h. Le niveau d'expression des molécules du CMH a été analysé par cytométrie de flux, et normalisé à 100% avec la condition +IFN- γ .

Nos résultats montrent un effet majeur de C646 (**10**), similaire à celui-ci des PPAPs vu précédemment : la molécule HLA-E semble être régulée de manière plus importante par rapport à la condition IFN- γ seul, avec une diminution de l'expression de 80% (figure 14). Nous noterons aussi un effet moindre des HDAC (**8, 9**) sur l'expression des molécules du CMH avec une diminution inférieure à 20% (figure 17). Ces résultats suggèrent un rôle important de HAT dans la régulation de HLA-E par l'IFN- γ . De façon intéressante nous montrons aussi qu'inhiber HAT ou les HDAC semble non pas inhiber mais à l'inverse augmenter l'expression de MICA.

Ainsi, seul l'effet d'un inhibiteur de HAT, et plus particulièrement de CBP/p300, pourrait être comparé à celui observé sur l'expression de HLA-E en présence des PPAPS. Nos résultats suggèrent alors que HAT contrôle et inhibe l'expression de HLA-E à la surface des cellules. Nous avons donc posé l'hypothèse que les PPAPs, GX (**2, 11**) et la guttiférone J (**4**), pourraient également agir sur HAT comme cela a été décrit pour le garcinol (**1**).

De plus, la régulation de l'expression de HLA-E par l'IFN- γ repose sur l'activation du facteur de transcription STAT1, qui subit un cycle de phosphorylation/acétylation. STAT1 joue ainsi un rôle majeur dans l'expression de HLA-E et constitue alors une cible préférentielle lors des phénomènes de régulation.

Pour étudier l'effet de GX (**2, 11**) sur la voie de l'IFN- γ , nous avons donc choisi d'analyser l'expression et la phosphorylation de STAT1 en présence de nos PPAPs.

4) Effet des PPAPs sur l'expression et la phosphorylation de STAT1

Parmi les gènes cibles que régule STAT1, SOCS1 (Suppressor Of Cytokine Signaling) est une protéine induisant la déphosphorylation des JAK, ce qui engendre alors une absence de phosphorylation de STAT1 et donc son inactivation²². Ainsi, lors de nos PCR, le gène *SOCS1* a été inclus afin de constituer un contrôle positif d'une régulation du nombre de transcrits de *STAT1*.

Dans un premier temps une analyse des expressions transcriptionnelles de STAT1 et de SOCS1 a été faite. L'expression transcriptionnelle de STAT1 est régulée par l'IFN- γ avec un

nombre d'ARNm codant pour STAT1 multiplié par 5 (figure 18A). Ce taux d'ARNm est également fortement régulé par le garcinol (1) avec un nombre de transcrits en dessous d'un facteur 1 indiquant un retour au niveau de base (figure 18A).

Pour une durée de traitement similaire, cet effet inhibiteur est retrouvé avec GX (2, 11) et la guttiférone J (4), mais reste cependant moins important (figure 18A). Au contraire, la statine (5) et ZA (7) ne semblent pas réguler l'expression transcriptionnelle de STAT1.

Le nombre de transcrits de *SOCS1* est fortement augmenté d'un facteur 60 avec l'IFN- γ . Par comparaison avec la condition +IFN- γ , ce taux d'ARNm est diminué en présence des PPAPs : une diminution supérieure à 50% avec le garcinol (1), et d'environ 30% pour GX (2, 11) et la guttiférone J (4) (figure 18B). Toutefois, cette diminution de l'expression transcriptionnelle de *SOCS1* ne serait pas due directement à la présence des PPAPs mais à la diminution du nombre de transcrits de *STAT1* qui, celle-ci, est due aux PPAPs. Les molécules de référence (5, 7) ne semblent pas impacter l'expression transcriptionnelle de *SOCS1*.

Ainsi, ces résultats suggèrent une régulation négative du nombre de transcrits de *STAT1* en présence de PPAPs, une régulation qui se retrouve au niveau de l'expression transcriptionnelle de *SOCS1*.

De plus, pareillement aux résultats pour la protéine HLA-E, les molécules de référence (5, 7) ne semblent pas réguler les expressions transcriptionnelles de *STAT1* et de *SOCS1* (figure 18). De ce fait, nous pourrions penser que, même si ces molécules sont également impliquées dans une régulation de la réponse immunitaire, elles agissent différemment des PPAPs. Plus particulièrement, elles n'interviendraient pas au niveau de la voie de signalisation IFN- γ /STAT1.

Dans un second temps, par la technique du Western Blot, nous avons mesuré la protéine STAT1 phosphorylée sur la tyrosine 701 (pSTAT1) et de la protéine STAT1 totale dans nos différents échantillons (différentes conditions testées), à partir de lysats cellulaires. Pour cela, les protéines ont été au préalable dénaturées afin de les séparer selon leur masse, puis marquées par un anticorps spécifique. Il nous a alors été possible d'évaluer la présence de pSTAT1, de l'identifier selon sa taille (environ 84kDa) et d'analyser les variations de sa concentration selon les conditions testées.

Tout d'abord, l'analyse par Western Blot révèle une bande à environ 84kDa pour l'ensemble des lysats de nos échantillons, excepté pour les cellules non stimulées pour pSTAT1 (figure 19).

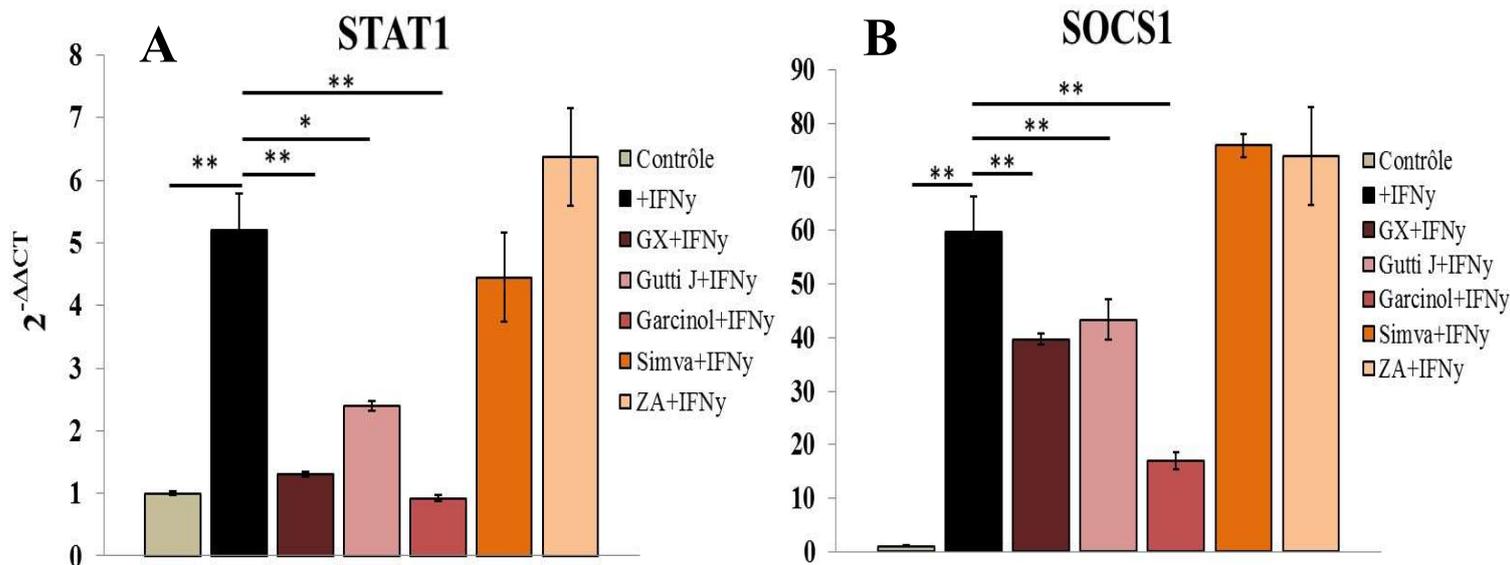


Figure 18 : Expressions transcriptionnelles des molécules STAT1 (A) et SOCS1 (B) dans les CE activées *in vitro*. Les CE ont été traitées 16h avec l'IFN- γ (100U/mL). Les PPAPs et molécules de référence sont testés à 10 μ M. Les graphiques représentent les RT-PCR quantitatives en temps réel de HLA-E, STAT1 et SOCS1 dans les cellules activées par l'IFN- γ . Les résultats montrent le nombre de transcrits \pm écart type de trois répliques. L'expression a été calculée selon la méthode des $2^{-\Delta\Delta CT}$ après normalisation avec le gène RPLPO. La condition milieu de culture seul constitue le contrôle.

** p-valeur < 0,01 ; * p-valeur < 0,05, calculée par test Kruskal-Wallis avec XLSTAT.

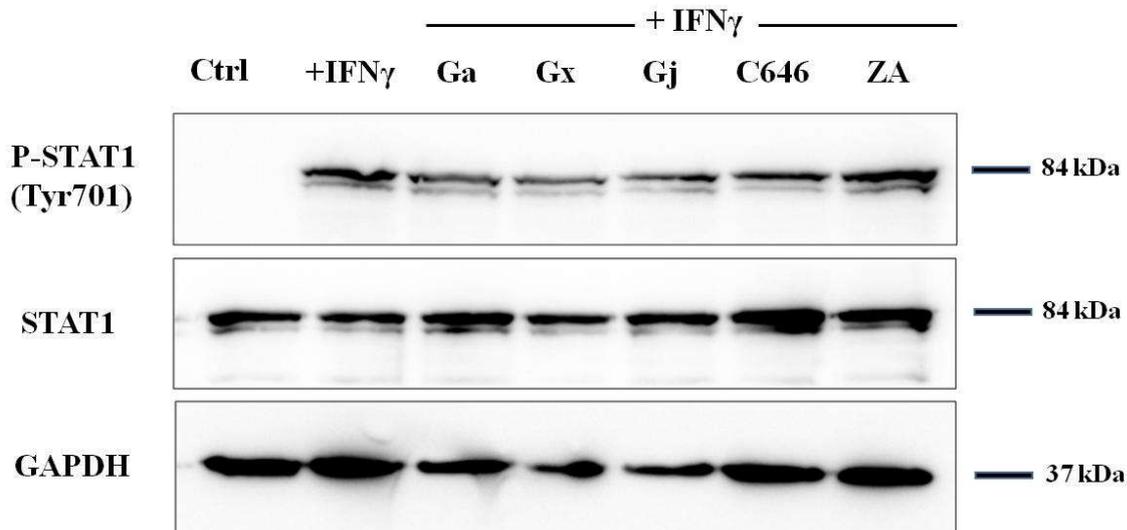


Figure 19 : Profil d'expression protéique de pSTAT1 et STAT1 dans les CE activées *in vitro*. Les cellules ont été traitées pendant 6h avec l'IFN- γ (100U/mL). Les PPAPs (1, 2, 11 et 4) et molécules de référence (7 et 10) sont testés à 10 μ M. Les cellules ont été lysées et les protéines séparées par électrophorèse sur un gel SDS-PAGE (12%). Après transfert sur une membrane de nitrocellulose, les protéines sont incubées avec un anticorps monoclonal spécifique, soit Stat1, soit Phospho-Stat1 (Tyr701). L'anticorps secondaire couplé à la peroxydase est incubé 1h30-2h avec la membrane. La révélation par le kit ECL permet la visualisation des bandes d'intérêt. Les blots ont été réhybridés avec un anticorps anti-GAPDH pour s'assurer d'un chargement protéique équivalent pour nos différents échantillons. Le puits « Ctrl » constitue le contrôle avec des cellules non stimulées.

Nos résultats montrent, comme attendu, une induction de la phosphorylation de STAT1 par l'IFN- γ . En effet, en absence d'IFN- γ aucun signal n'est détecté alors qu'un signal est observé dans le puits 2 (+IFN- γ) (figure 19).

Ensuite, par comparaison avec le signal obtenu avec l'IFN- γ seul, le signal des échantillons traités avec les PPAPs (**1**, **2**, **11** et **4**) est de moins forte intensité pour pSTAT1 (diminution d'un facteur 1,5 à 2, analysée avec le logiciel Multi Gauge) : ceci suggère un effet des PPAPs, et plus particulièrement une diminution de phosphorylation de la protéine STAT1 par les PPAPs. Cet effet peut être également observé avec l'inhibiteur de HAT, C646 (**10**) (diminution de l'intensité du signal d'un facteur 2) (figure 19).

Ces observations sont appuyées par l'intensité des signaux obtenus avec l'anticorps anti-GAPDH où celle-ci est la même, ce qui indique une concentration protéique initiale équivalente dans nos différents échantillons (figure 19). Aucun effet de ZA (**7**) n'est observé sur pSTAT1. Les bandes indiquant la présence de STAT1 total sont d'intensité similaire, ce qui suggère alors une action préférentielle des PPAPs sur la phosphorylation de STAT1.

Des essais complémentaires, avec des temps de traitement différents devront être mis en place afin de confirmer cette régulation de pSTAT1 par les PPAPs.

Discussion :

L'étude réalisée durant ce stage a permis, d'une part, de purifier et d'identifier des PPAPs à partir d'une plante malaisienne dont la phytochimie est peu décrite, *Garcinia bancana* et, d'autre part, de poursuivre l'analyse de l'activité biologique des PPAPs en la comparant à deux PPAPs déjà étudiés dans notre équipe (guttiférone J (**4**))⁵ ou décrit (garcinol (**1**))^{25, 26, 27}, et d'aborder leur mode d'action.

Les différents résultats obtenus suggèrent un effet des PPAPs sur l'expression de certaines molécules du CMH, particulièrement HLA-E. L'effet observé est similaire aux travaux précédents où la guttiférone J (**4**) a montré un effet inhibiteur sur l'expression de HLA-E⁵. En effet, une inhibition de l'expression de HLA-E, par les trois PPAPs étudiés, a été observée au niveau protéique en cytométrie de flux après 48h de traitement à l'IFN- γ .

Toutefois, la régulation de l'expression de certaines molécules du CMH, HLA-E notamment, nécessite au préalable la mise en place de l'ensemble des mécanismes réactionnels de la voie de signalisation IFN- γ /STAT1^{20, 22, 23, 24}. Cela pourrait expliquer nos résultats de RT-PCR sur *HLA-E*, où un traitement de 16h semblait insuffisant afin de voir une régulation du nombre de

transcrits. Nous pouvons alors suggérer la mise en place d'une cascade d'évènements lors de cette régulation par la voie de l'IFN- γ :

- un premier niveau avec l'induction de phosphorylation de STAT1 par l'IFN- γ dès 6h de traitement (observé par Western Blot) et de l'ensemble des mécanismes régité par cette voie de signalisation;
- un second niveau avec une régulation de l'expression transcriptionnelle de STAT1 et des « conséquences transcriptionnelles » sur des acteurs de la voie de l'IFN- γ , dépendants de l'activation de STAT1, comme SOCS1, à partir de 16h de traitement.
- un dernier niveau avec une régulation de l'expression de gènes cibles de STAT1, comme HLA-E²⁰, après 48h de traitement.

Les PPAPs étudiés ici ont montré un effet dès le second niveau de cette cascade en diminuant fortement le nombre de transcrits de *STAT1*. Cette diminution de l'expression transcriptionnelle de STAT1 pourrait s'expliquer par :

- un effet inhibiteur sur l'activité de HAT (ici CBP/p300), décrit pour le garcinol **(1)**, qui bloquerait l'acétylation de STAT1 et donc sa translocation hors du noyau^{22, 23,24}. Nous pourrions ainsi supposer que STAT1 reste fixée à l'ADN, créant alors un encombrement au niveau de la zone promotrice du gène cible, ce qui empêcherait toute nouvelle fixation de facteur de transcription activant l'expression de ce gène (figure 5)^{23, 24}.

- une liaison spécifique des PPAPs à STAT1 qui empêcherait sa dimérisation et donc sa phosphorylation, rendant le facteur de transcription inactif (figure 5)²⁷.

Ces mécanismes d'action sont décrits pour le garcinol **(1)**, et nos différents travaux ont mis en évidence des effets similaires pour les deux autres PPAPs testés, la guttiférone J **(4)** et GX **(2, 11)**. Nous pourrions alors suggérer que ces PPAPs agissent de façon similaire au garcinol sur la voie de l'IFN- γ , induisant probablement ainsi une inhibition de l'expression de HLA-E. Pourtant, nous avons noté des différences entre ces trois PPAPs, notamment au niveau de l'intensité des effets observés. En effet, de façon générale le garcinol **(1)** s'est révélé être le PPAP avec l'activité la plus importante sur l'expression transcriptionnelle de STAT1 et sur l'expression de HLA-E, et GX **(2, 11)** a montré une intensité d'effet légèrement plus importante que la guttiférone J **(4)**. GX étant un mélange de deux molécules, xanthochymol **(2)** et guttiférone F **(11)**, nous ne pouvons pas énoncer un effet dû au xanthochymol seul ou à la guttiférone F seule. Toutefois, nous pouvons poser l'hypothèse que cet effet de GX serait dû à la guttiférone F **(11)** qui est probablement le produit majoritaire du mélange. Cela serait d'autant plus intéressant dans la mesure où cette guttiférone n'est que très peu décrite dans la

littérature. Contrairement aux PPAPs, les statines (**5** et **6**), décrites comme des molécules régulant l'expression de HLA de classe II, voire de classe I^{28, 29} et ZA (**7**) également connu pour leur effet sur la réponse immunitaire^{29, 30}, n'ont montré ici aucun effet sur la voie de signalisation de l'IFN- γ , ce qui laisserait penser que ces molécules de référence ont un mode d'action différent des PPAPs. Cela pourrait alors sous-entendre, ici, la mise en place de mécanismes moléculaires spécifiques liés à la structure des PPAPs étudiés. Le garcinol (**1**) et les guttiférones K et M, par leur structure, sont décrits dans la littérature comme ayant une forte affinité avec un domaine de STAT1²⁷. Ainsi, en présentant de fortes similitudes structurales et des effets biologiques similaires, les deux autres PPAPs étudiés pourraient également avoir les mêmes mécanismes d'action que le garcinol (**1**)^{25, 26, 27}. Une étude plus approfondie de la structure et la caractérisation biologique de ces PPAPs permettrait d'évaluer une relation structure-fonction de ces molécules.

Ensuite, malgré des effets similaires sur l'expression de molécules du CMH, le garcinol (**1**), comme énoncé précédemment, s'est distingué des deux autres PPAPs en ayant une activité plus importante. Toutefois, celui-ci s'est également distingué par un effet négatif sur la viabilité cellulaire (observable au microscope lors de nos expériences). A l'inverse, une faible toxicité a été observée pour GX (**2, 11**), de même que pour la guttiférone J (**4**). En effet, les effets de GX (**2, 11**) ont été similaires à ceux observés avec la guttiférone J (**4**) lors des travaux précédents⁵, i.e. sans impact notable sur la viabilité des cellules lors des traitements. Cet effet observé pourrait s'expliquer par une activité pro-apoptotique du garcinol (**1**) décrite largement dans la littérature^{35, 36}. De ce fait, le garcinol (**1**), par cette capacité à induire un phénomène d'apoptose, se distinguerait des deux autres PPAPs avec lesquels cet effet n'est pas retrouvé. Ceci pourrait alors constituer un autre aspect intéressant des PPAPs dans la modulation de la réponse immunitaire, en cancérologie notamment où l'induction d'apoptose peut être recherchée.

Pour finir, dans le cadre de mon stage, par la présence de deux PPAPs, le xanthochymol (**2**) et la guttiférone F (**11**) peu décrite dans la littérature, l'espèce *Garcinia bancana* constitue une source riche et diverse en PPAPs. Plus particulièrement, des dérivés du garcinol (**1**) qui, par leur structure, semblent présenter des activités biologiques intéressantes, les rendant notamment capables de moduler l'expression de molécules du CMH lors des réponses immunes sans, toutefois, induire un phénomène d'apoptose.

IV. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'objectif de ce stage était, d'une part, de purifier et d'identifier de nouveaux PPAPs à partir de *Garcinia bancana* et, d'autre part, par une étude biologique, de définir un effet de ces PPAPs et d'en étudier les mécanismes.

Sur trois produits isolés au cours de mon stage, un seul a été identifié, comme un mélange de xanthochymol (**2**) et de guttiférone F (**11**). Ce mélange, au cours de l'étude biologique, s'est révélé capable de modifier l'expression de molécules impliquées dans les réponses immunes, en inhibant notamment la voie de signalisation de l'IFN- γ . Ces résultats préliminaires devront être confirmés par des expériences supplémentaires et si possible étendues à d'autres types de cellules tels que des lignées tumorales qui expriment HLA-E. Au cours de mon stage, deux lignées cellulaires ont retenu notre attention en exprimant fortement HLA-E et pourront ainsi être étudiées afin de transposer nos résultats obtenus avec les CE aux lignées tumorales.

Ensuite, il serait intéressant d'évaluer l'effet de la guttiférone F (**11**) et du xanthochymol (**2**) séparément en testant et en optimisant des conditions chromatographiques afin de réaliser leur séparation. Toutefois, cette séparation restant très difficile, il serait judicieux, en parallèle, de poursuivre l'étude en identifiant les deux autres produits isolés lors du stage (qui sont certainement des dérivés du garcinol également) et de définir leurs effets. Par une caractérisation biologique d'un panel important de PPAPs isolés de *Garcinia bancana*, il serait alors possible de dégager les éléments structuraux spécifiques à leur activité et de mettre ainsi en avant une potentielle relation structure-fonction de ces composés, qui pourrait aboutir par la suite à la modélisation d'un pharmacophore.

Enfin, pour approfondir l'étude de l'effet des PPAPs et des mécanismes mis en jeu au niveau de la voie de l'IFN- γ , d'autres essais biochimiques pourront être envisagés tels qu'une étude de l'acétylation de STAT1, débutée en fin de stage, et du rôle de la protéine HAT CBP/p300 à l'origine de l'acétylation de STAT1. Une étude sur la fixation du facteur de transcription STAT1 à l'ADN pour détecter un encombrement de la zone promotrice des gènes régulés, en présence de PPAPs, pourra également être faite.

Pour finir, afin de mieux documenter l'effet toxique des trois PPAPs une quantification de l'effet cytotoxique et une étude des voies et médiateurs de la mort cellulaire par apoptose pourront être envisagées.

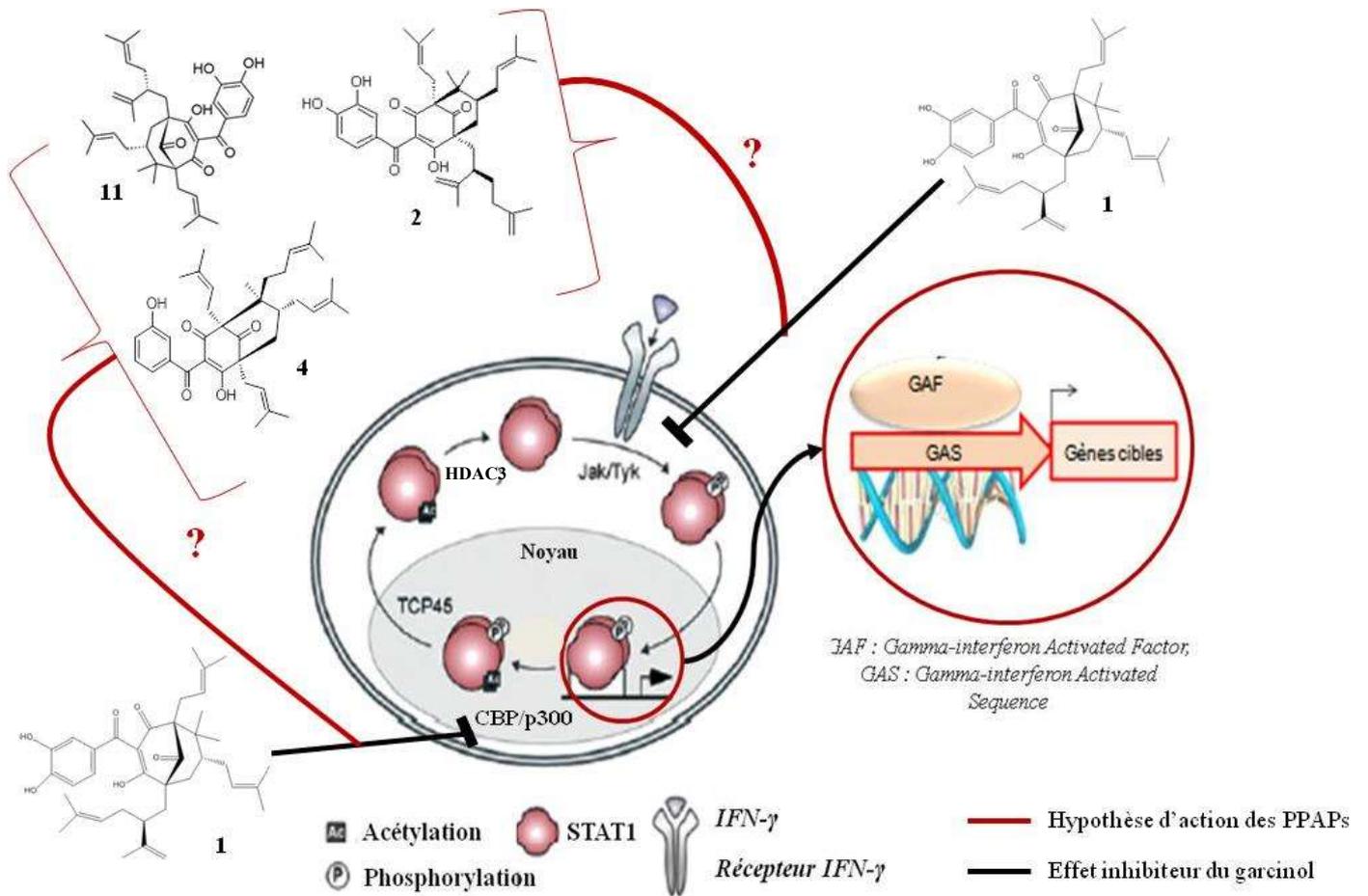


Figure 19 : Hypothèse d'une régulation de l'expression de molécules du CMH par un effet inhibiteur de PPAPs sur la voie de l'*IFN-γ*^{24, 25, 26, 27}

BIBLIOGRAPHIE

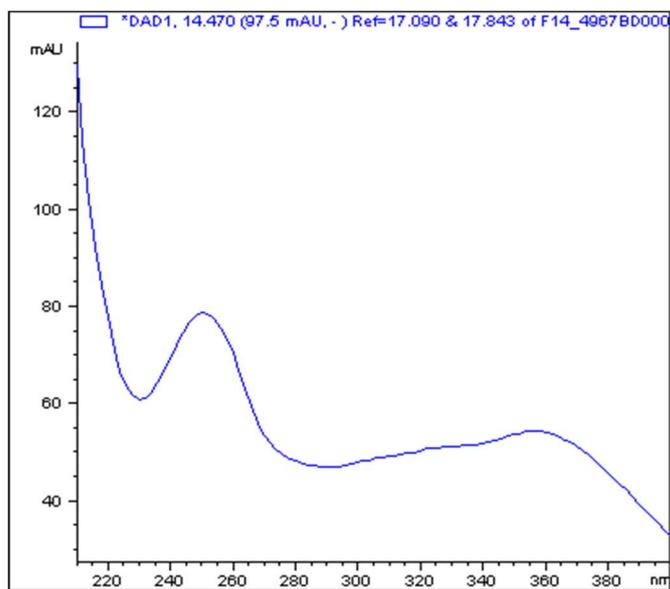
- 1) Haddad, E., Evolution des concepts de l'immunosuppression dans le cadre de la transplantation d'organe. *Archives de Pédiatrie* **2004**, *11*, 532-534.
- 2) Taylor, A. L.; Watson, C. J. E.; Bradley, J. A., Immunosuppressive agents in solid organ transplantation: mechanisms of action and therapeutic efficacy. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* **2005**, *56*, 23-46.
- 3) Thervet, É.; Zuber, J.; Sberro, R., et al., Traitements immunosuppresseurs : mécanismes d'action et utilisation clinique. *Néphrologie & Thérapeutique* **2011**, *7*, 566-581.
- 4) Chandak P.; Callaghan C., The immunology of organ transplantation. *Surgery (Oxf.ord)* **2014**, Vol. 32; n°7, 325–332.
- 5) Rouger, C.; Pagie, S.; Derbré, S., et al., Prenylated Polyphenols from Clusiaceae and Calophyllaceae with Immunomodulatory Activity on Endothelial Cells. *PLoS One* **2016**.
- 6) Ahmad, A.; Sarkar, S. H.; Aboukameel, A., et al., Anticancer action of garcinol in vitro and in vivo is in part mediated through inhibition of STAT-3 signaling. *Carcinogenesis* **2012**, Vol. 33, n°12, 2450-2456.
- 7) Rouas-Freiss, N.; Moreau, P., et al., HLA-G proteins in cancer: do they provide tumor cells with an escape mechanism? *Cancer Research* **2005**, *65*(22): 10139-10144.
- 8) Salvadori, M.; Bertoni, E., What's new in clinical solid organ transplantation by 2013. *World Journal of Transplantation* **2014**, *4*, 243-266.
- 9) Tropicos.org. Missouri botanical garden [en ligne], <http://www.tropicos.org>, consulté le 17 mars 2015.
- 10) Hemshekhar, M.; Sunitha, K.; Sebastin Santhosh, M., et al., An overview on genus garcinia: phytochemical and therapeutical aspects. *Phytochemical Review* **2011**, *10*:325-351.

- 11) Stevens, P. F., Angiosperm phylogeny website. Version 13 [en ligne], <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>, consulté le 16 mars 2015.
- 12) Cechinel, F.V.; Meyre-Silva, C.; Niero, R., Chemical and pharmacological aspects of the genus *Calophyllum*. *Chemistry & Biodiversity* **2009**, *6*, 313.
- 13) Magadula, J.J., Bioactive mammea-type coumarins and benzophenones from two clusiaceae plants. *Journal of Pharmaceutical and Scientific Innovation* **2012**, *1*, 31.
- 14) Dang, B.T.; Guitton, Y.; Freuze, I., et al., Dereplication of *Mammea neurophylla* metabolites to isolate original 4-phenylcoumarins. *Phytochemistry Letters* **2015**, *11*, 61.
- 15) Dzoyem, J.P.; Lannang, A.M.; Fouotsa, H., et al., Anti-inflammatory activity of benzophenone and xanthone derivatives isolated from *Garcinia (Clusiaceae)* species. *Phytochemistry Letters* **2015**, *14*, 153.
- 16) Cen, J.; Shi, M.; Yang, Y., et al., Isogarcinol is a new immunosuppressant. *PLoS One* **2013**.
- 17) Rouger, C.; Derbre, S.; Charreau, B., et al., Lepidotol A from *Mesua lepidota* inhibits inflammatory and immune mediators in human endothelial cells. *Journal of Natural Products* **2015**, *78*, 2187.
- 18) Gavlovsky, P.J.; Tonnerre, P.; Guitton, C., et al., Expression of MHC class I-related molecules MICA, HLA-E and EPCR shape endothelial cells with unique functions in innate and adaptive immunity. *Human Immunology* **2016**, *77*, 1084-1091.
- 19) Collins, R. W. M., Human MHC class I chain related (MIC) genes: their biological function and relevance to disease and transplantation. *European Journal of Immunogenetics* **2004**, *31*, 105-114.

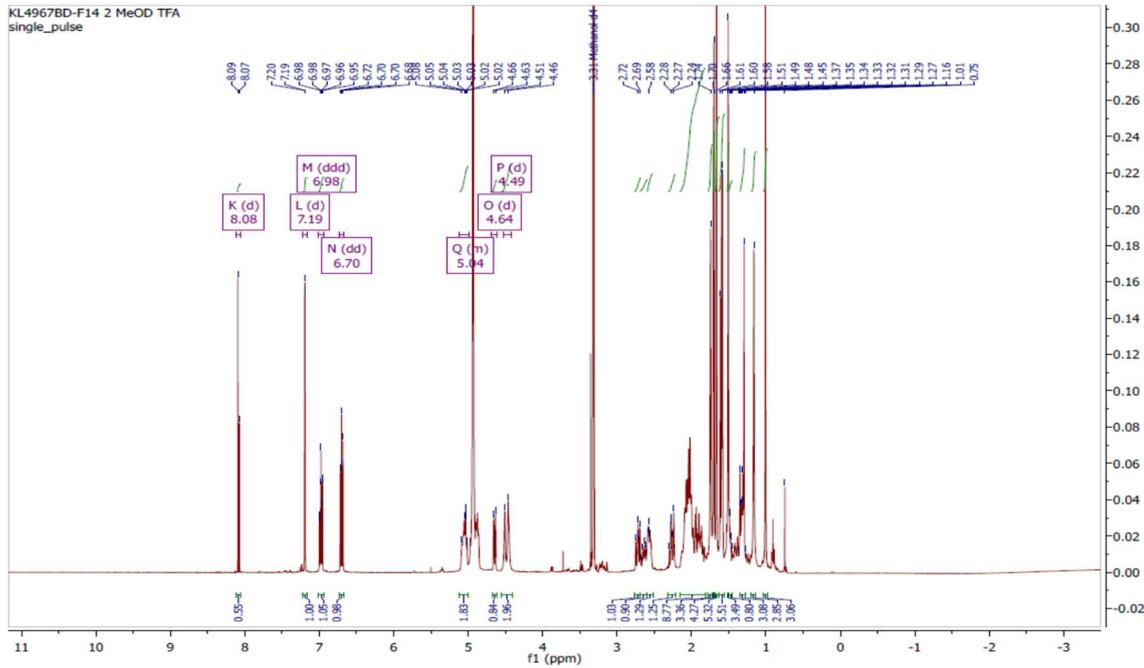
- 20) Allard, M., *Fonctions immunologiques de la molécule HLA-E : Implication en Cancérologie et en Transplantation*. Thèse de doctorat : biologie-santé, spécialité Immunologie. Université de Nantes, **2012**.
- 21) Kramer, O. H.; Knauer, S.K.; Greiner, G., et al., A Phosphorylation-Acetylation Switch Regulates STAT1 Signaling. *Genes & Development* **2009**.
- 22) Lemadre, E., *Nouveaux rôles anti-tumoraux de STAT1 : expression des immunoglobulines et réparation de l'ADN*. Thèse de doctorat : biologie cellulaire. Université Paris Nord : Paris XIII, **2014**. <NNT : 2014PA132020>.
- 23) Torsten, G.; Bier, C.; Knauer, S.K., et al., Histone Deacetylase Inhibitors Block IFN γ -Induced STAT1 Phosphorylation. *Cellular Signalling* **2012**.
- 24) Ivashkiv, L. B., and Donlin, L., Regulation of Type I Interferon Responses. *Nature Reviews Immunology* **2013**.
- 25) Yuqing Yang, A.; Hyuck, K.; Wenji, L., Natural Compound-Derived Epigenetic Regulators Targeting Epigenetic Readers, Writers and Erasers. *Current Topics in Medicinal Chemistry* **2016**, 697-713.
- 26) Balasubramanyam K.; Altaf, M.; Varier, R.A., et al., Polyisoprenylated Benzophenone, Garcinol, a Natural Histone Acetyltransferase Inhibitor, Represses Chromatin Transcription and Alters Global Gene Expression. *The Journal of Biological Chemistry* **2004**, n°32, 33716-33726.
- 27) Milena, M.; Menegazzi, M.; Di Micco, S., et al., Direct Interaction of Garcinol and Related Polyisoprenylated Benzophenones of *Garcinia Cambogia* Fruits with the Transcription Factor STAT-1 as a Likely Mechanism of Their Inhibitory Effect on Cytokine Signaling Pathways. *Journal of Natural Products* **2014**, 77.
- 28) Singh, P.; Kohr, D.; Kaps, M., et al., Influence of statins on MHC class I expression. *Annals of the New York Academy of Sciences* **2009**, 1173, 746-751.

- 29)** Charreau, B.; Coupel, S.; Goret, F., et al., Association of glucocorticoids and cyclosporin A or rapamycin prevents E-selectin and IL-8 expression during LPS- and TNF α -mediated endothelial cell activation. *Transplantation* **2000**, *69*, 945-953.
- 30)** Bukowski, J. F.; Dascher, C. C.; Das, H., Alternative bisphosphonate targets and mechanisms of action. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2005**, *328*, 746-750.
- 31)** Manal, M.; Chandrasekar, M.J.N.; Priya, J.G., et al., Inhibitors of Histone Deacetylase as Antitumor Agents: A Critical Review. *Bioorganic Chemistry* **2016**, *67*, 18–42.
- 32)** Henry, Ryan A.; Kuo, Y.M.; Bhattacharjee, V., et al., Changing the Selectivity of p300 by Acetyl-CoA Modulation of Histone Acetylation. *ACS Chemical Biology* **2015**, *10*, 146–56.
- 33)** Fuller, Richard W.; Blunt, J.W.; Boswell, J.L., et al., Guttiferone F, the First Prenylated Benzophenone from *Allanblackia Stuhlmannii*. *Journal of Natural Products* **1999**, *62*, 130–32.
- 34)** Iinuma, M.; Tosa, H.; Tanaka, T., et al., Antibacterial Activity of Some Garcinia Benzophenone Derivatives against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* **1996**, *19*, 311-314.
- 35)** Ahmad, A.; Sarkar, S.H.; Aboukameel, A., et al., Anticancer action of garcinol in vitro and in vivo is in part mediated through inhibition of STAT-3 signaling. *Carcinogenesis* **2012**, vol.32, n°12, 2450-2456.
- 36)** Sethi, G.; Chatterjee, S.; Rajendran, P., et al., Inhibition of STAT3 dimerization and acetylation by garcinol suppresses the growth of human hepatocellular carcinoma in vitro and in vivo. *Molecular Cancer* **2014**, *13*:66.

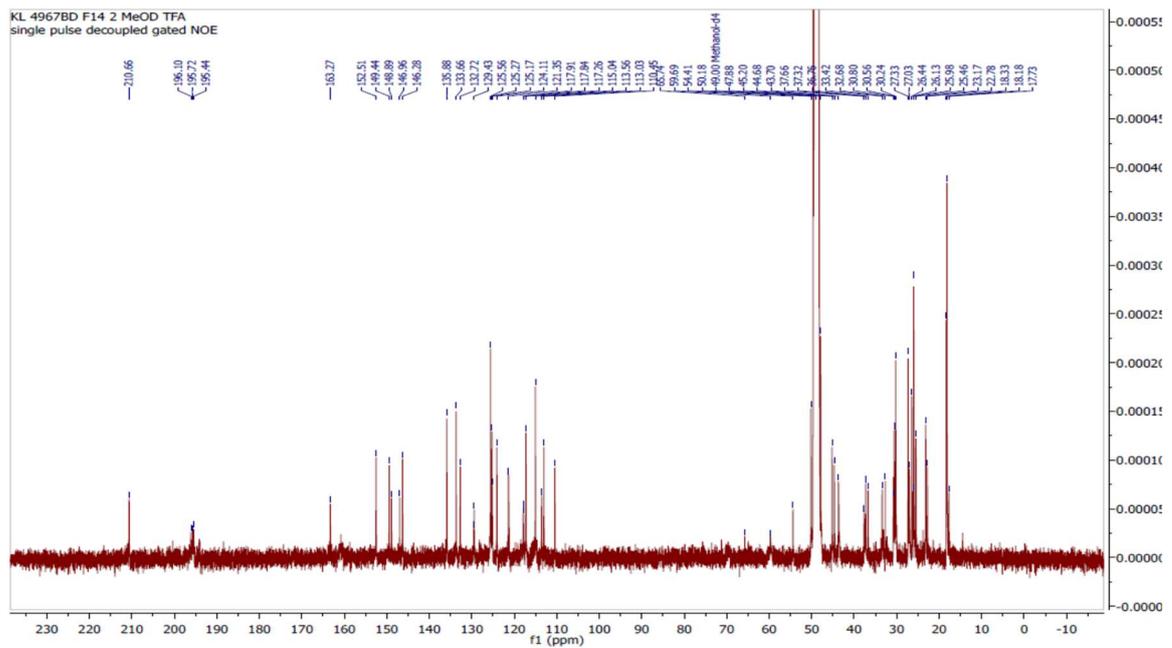
Annexe I : Spectre UV du mélange « guttiférone F-xanthochymol »



Annexe II : Spectres monodimensionnels du mélange « guttiférone F-xanthochymol »



Spectre RMN ^1H



Spectre RMN ^{13}C

Annexe III : Solutions utilisées dans le Western Blot

➤ **Gel d'acrylamide**

Gel 12% acrylamide		Stacking gel	
H2O	3,4mL	H2O	6,1mL
30% acrylamide/bis (29 :1)	4mL	30% acrylamide/bis (29 :1)	1.3mL
Tris 1.5M	2,5mL	Tris 0,5M	2,5mL
SDS 10%	100µL	SDS 10%	100µL
APS 10%	100µL	APS 10%	100µL
TEMED	5µL	TEMED	10µL

➤ **Tampon de migration** (pour 1L, 10X) :

30.3g de Tris Base

144g de Glycine

10g de SDS

➤ **Tampon de transfert** (pour 1L) :

5.82g de Tris Base

3g de Glycine

3,75g de SDS à 10%

Ethanol/méthanol 200mL

➤ **Tampon de lavage des membranes**

100mL de TBS 10X

1mL de Tween20

900mL H2O

➤ **Tampon de saturation :**

TBS 1X

0,1% Tween20

5% de BSA

➤ **Solution de déshybridation :**

100mM de mercaptoéthanol

2% SDS

62.5mM Tris HCl pH 6.7

	Diplôme : Ingénieur de l'Institut Supérieur des Sciences agronomiques, agroalimentaires, horticoles et du paysage Spécialité : Horticulture Spécialisation / option : Polymères et Principes Actifs d'Origine Naturelle (P ² AON) Enseignant référent : Séverine Derbré
Auteur(s) : Chloé Coste	Organisme d'accueil : Centre de Recherche en Transplantation et Immunologie, INSERM UMR1064
Date de naissance* : 06/08/1993	Adresse : 30 Bd Jean Monnet 44093 Nantes
Nb pages : 30 Annexe(s) : 3	
Année de soutenance : 2017	Maître de stage : Béatrice Charreau
Titre français : Purification et caractérisation biologique de polyphénols polyprénylés issus de <i>Garcinia bancana</i> capables de moduler l'expression de molécules du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH).	
Titre anglais : Purification and biological characterization of polyprenylated polyphenols from <i>Garcinia bancana</i> which can modulate the expression of molecules of the Major Histocompatibility Complex (MHC).	
<p>Résumé : Lors d'une transplantation d'organes, les traitements immunosuppresseurs actuels permettent de contrôler la réponse immunitaire dirigée contre le greffon, toutefois ceux-ci présentent des effets secondaires non négligeables. La recherche de nouvelles stratégies thérapeutiques s'avère alors essentielle. Des travaux précédents au sein de notre équipe ont montré qu'un polyphénol polyprénylé, la guttiférone J, était capable de moduler l'expression de molécules impliquées dans la réponse immunitaire (Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH)). Ainsi, ce travail a consisté, tout d'abord, en la purification par CLHP semi-préparative de nouveaux polyphénols polyprénylés extraits de <i>Garcinia bancana</i> et leur identification : le xanthochymol et la guttiférone F qui, par analogie structurale, pouvaient présenter des effets similaires à la guttiférone J. Puis, lors d'une étude biologique par cytométrie en flux, qPCR et Western Blot, une diminution de l'expression de molécules du CMH, notamment HLA-E, a été observée en présence de ces composés. Cela s'est traduit par une diminution des protéines en surface, une diminution de l'expression et de la phosphorylation du facteur de transcription STAT1 impliqué dans la voie de signalisation de l'IFN-γ, activée lors de réponses immunitaires. Ces produits naturels constituent ainsi de nouveaux inhibiteurs de STAT1, dont les mécanismes d'inhibition restent à approfondir.</p>	
<p>Abstract: In organs transplantation, current immunosuppressive treatments are used to control the immune response directed against the graft but they have important secondary effects. The search for new therapeutic strategies is then essential. Previous works within our team have shown that a polyprenylated polyphenol, guttiferone J, was able to modulate the expression of molecules involved in the immune response (molecules of the Major Histocompatibility Complex (MHC)). Thereby, this work, first of all, consisted in the purification by semi-preparative HPLC of some new polyprenylated polyphenols extracted from <i>Garcinia bancana</i> and their identification: xanthochymol and guttiferone F which, by structural analogy, may have effects similar to guttiferone J. Then, in a biological study by flow cytometry, qPCR and Western Blot, a decrease in the expression of MHC molecules, especially HLA-E, was observed with these compounds. This resulted in a decrease in surface protein, a decrease in the expression and phosphorylation of the transcription factor STAT1 involved in the signaling pathway of IFN-γ, activated during immune responses. Thus, these natural products constitute new STAT1 inhibitors whose inhibition mechanisms remain to be further investigated.</p>	
Mots-clés : réponse immunitaire, CMH, PPAPs, HLA-E, IFN- γ , STAT1	
Key Words: immune response, MHC, PPAPs, HLA-E, IFN- γ , STAT1	

